

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**XILANASE, FITASE E PROTEASE ISOLADAS E ASSOCIADAS EM
DIETAS COM AJUSTES NUTRICIONAIS PARA SUÍNOS MACHOS
CASTRADOS DOS 30 AOS 100 KG**

TAYNAH VIEIRA AGUIAR FARIAS

CAMPO GRANDE, MS

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO

XILANASE, FITASE E PROTEASE ISOLADAS E ASSOCIADAS EM
DIETAS COM AJUSTES NUTRICIONAIS PARA SUÍNOS MACHOS
CASTRADOS DOS 30 AOS 100 KG

Xylanase, phytase and protease isolated and associated in diets with
nutritional adjustments for barrows from 30 to 100 kg

Taynah Vieira Aguiar Farias

Orientador: Prof. Dr. Charles Kiefer
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Karina Márcia Ribeiro de Souza Nascimento
Prof^a. Dr^a. Viviane Maria Oliveira dos Santos

Tese apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de
Doutora em Ciência Animal.
Área de concentração: Produção
Animal.

CAMPO GRANDE, MS
2021

Aos meus pais Wilson e Juçânia por sempre acreditar, apoiar e incentivar em todos os momentos em busca do meu grande sonho e ao meu esposo e companheiro de Henrique por todas as caminhadas, estando presente em tudo, sempre acreditando em mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por minha vida e por sempre me amparar diante dos momentos de dificuldade e obstáculos encontrados.

Ao meu pai Wilson Farias “in memoriam” que sempre foi um exemplo de alegria de viver, de luta e de superação, um homem que me ensinou a ser uma mulher de caráter e personalidade e que me inspirou a ser um ser humano melhor e buscar por meus objetivos de vida. Obrigada pelos ensinamentos, pela simplicidade, por me tornar quem eu sou, e por ter sido de longe a melhor pessoa que eu conheci. Jamais o esquecerei, te amarei sempre, saudade.

A minha mãe Juçânia Farias, obrigada pelas palavras, pelos conselhos, pela honestidade, pelo afeto, pela amizade e amor incondicional.

Aos meus irmãos Bruno Farias e Caio Farias, que sempre estiveram ao meu lado, me permitindo conhecer a singularidade do amor entre irmãos e por me apresentarem o amor de tia.

Ao meu esposo Henrique Barbosa, meu amor, melhor amigo, que representa minha segurança em todos os aspectos. Obrigada pela compreensão, paciência e por todos os momentos em que estive ao meu lado, sempre me incentivando e me apoiando em todas as decisões.

Em especial ao Prof. Dr. Charles Kiefer, pela grande orientação, paciência, dedicação no ensino, pelo grande apoio e principalmente pela confiança em mim.

Aos meus amigos e companheiros do setor de Suinocultura que me ajudaram muito em todos os momentos e tornaram tudo mais fácil e possibilitaram o término de todas as atividades.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela oportunidade da realização do curso. Agradecimento a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa durante o período de doutorado. A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pela concessão de apoio financeiro durante o período experimental.

Imagine uma viagem em um carro chamado vida, uma estrada chamada sonho, com amores chamados família e um amigo chamado Deus. Então vire a esquina chamada esperança e quando chegar a um lugar chamado sucesso, agradeça ao motorista chamado Jesus. Quando chegar na casa chamada prosperidade, não se acanhe com os hóspedes cujos os nomes são: Andei, Lutei e Venci!"

Tathios

Resumo

FARIAS, T. V. A. Xilanase, fitase e protease isoladas e associadas em dietas com ajustes nutricionais para suínos machos castrados dos 30 aos 100 kg. 2021. 72f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2021.

As enzimas endógenas dos animais são capazes de quebrar os alimentos em moléculas menores que fornecem nutrientes para o aproveitamento dos animais. Porém, este processo não é totalmente eficiente, pois alguns ingredientes utilizados possuem fatores antinutricionais indigestíveis pelos animais. Além disso, algumas enzimas não são sintetizadas pelos suínos em quantidades suficientes para a quebra destes e outros componentes presentes nas dietas. Neste sentido, realizou-se este estudo com o objetivo de avaliar a inclusão da xilanase, fitase e protease isoladas e associadas na dieta de suínos machos castrados dos 30 aos 100 kg sobre o desempenho e características de carcaça. Foram utilizados 120 suínos machos castrados, distribuídos em delineamento em blocos ao acaso, com seis dietas sendo controle positivo (CP): dieta formulada para atender às exigências nutricionais e sem enzimas; xilanase: dieta com xilanase e ajuste da matriz nutricional; protease: dieta com protease e ajuste da matriz nutricional; fitase: dieta com fitase e ajuste da matriz nutricional; blend: dieta com xilanase, protease e fitase associada com os ajustes da matriz nutricional; e controle negativo (CN): dieta sem enzimas mantendo os ajustes nutricionais da dieta blend, com dez repetições de dois animais por unidade experimental. Dietas contendo xilanase, protease, fitase e o blend proporcionaram ($P>0,05$) desempenho e características de carcaça similares à dieta CN. Concluiu-se que é possível reduzir a matriz nutricional das dietas com a inclusão de xilanase, protease, fitase isoladas ou associadas sem prejudicar o desempenho e as características de carcaça dos suínos.

Palavras-chave: aminoácidos, blend, energia, enzimas, fósforo, matriz nutricional

Abstract

FARIAS, T. V. A. Xylanase, phytase and protease isolated and associated in diets with nutritional adjustments for barrows from 30 to 100 kg. 2021. 72f. Thesis (Doctorate) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2021.

Animal endogenous enzymes are capable of breaking down feed into smaller molecules that provide nutrients for the animals to use. However, this process is not fully efficient, as some ingredients used have antinutritional factors indigestible for animals. Furthermore, some enzymes are not synthesized by pigs in the amounts necessary to break down these and other components present in the diet. The objective of this study was to evaluate the inclusion of isolated and associated xylanase, phytase and protease on the performance and carcass traits in the diet of barrows from 30 to 100 kg. A total of 120 animals were distributed in a randomized block design, with six diets (positive control (PC): diet formulated to meet nutritional requirements and without enzymes; xylanase: diet with xylanase and adjustment of the nutritional matrix; protease: diet with protease and adjustment of the nutritional matrix; phytase: diet with phytase and adjustment of the nutritional matrix; blend: diet with xylanase, protease and phytase associated with the adjustments of the nutritional matrix; and negative control (NC): diet without enzymes maintaining nutritional adjustments of the blend diet), with ten replicates of two animals per experimental unit. Diets containing xylanase, protease, phytase and the blend provided ($P > 0.05$) performance and carcass characteristics similar to the CN diet. It was concluded that it is possible to reduce the nutritional matrix of the diets with the inclusion of xylanase, protease, complete or associated phytase without prejudice to performance and as carcass characteristics of pigs.

Keywords: amino acids, blend, energy, enzymes, nutritional matrix, phosphorus

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1

2

Figura 1 - Estrutura da molécula de ácido fítico 15

3

1

LISTA DE TABELAS

2

Tabela 1 - Classificação de polissacarídeos não amiláceos	13
Tabela 2 - Classificação, distribuição e proteases-alvo de inibidores de proteases serínicas de plantas.....	18
Tabela 3 - Exemplos de 3- e 6-fitases atualmente disponíveis comercialmente e suas características	23
Tabela 4 - Composições centesimal e nutricional das dietas experimentais de suínos machos castrados dos 30 aos 50 kg	52
Tabela 5 - Composições centesimal e nutricional das dietas experimentais de suínos machos castrados dos 50 aos 70 kg	53
Tabela 6 - Composições centesimal e nutricional das dietas experimentais de suínos machos castrados dos 70 aos 100 kg	54
Tabela 7 - Desempenho de suínos, machos castrados, dos 30 aos 100 kg alimentados com dietas contendo xilanase, protease, fitase isoladas ou associadas	58
Tabela 8 - Características de carcaça de suínos, machos castrados, alimentados dos 30 aos 100 kg alimentados com dietas contendo xilanase, protease, fitase isoladas ou associadas	59

INTRODUÇÃO	11
1 Fatores antinutricionais	12
1.1 Polissacarídeos não amiláceos (PNA's)	12
1.2 Molécula de ácido fítico	14
1.3 Antiproteases	16
2 Enzimas na alimentação animal	18
2.1 Xilanase	19
2.1.1 Mecanismos de ação da xilanase	20
2.1.2 Principais resultados na alimentação de suínos	21
2.2 Fitase	22
2.2.1 Mecanismos de ação da fitase	24
2.2.2 Principais resultados na alimentação de suínos	25
2.3 Protease	26
2.3.1 Mecanismos de ação da protease	28
2.3.2 Principais resultados na alimentação de suínos	29
2.4 Complexo enzimático	30
2.4.1 Mecanismos específicos de ação	30
2.4.2 Principais resultados na alimentação de suínos	31
REFERÊNCIAS	32
Xilanase, fitase e protease isoladas e associadas em dietas com ajustes nutricionais para suínos dos 30 aos 100	46
Resumo	46
Abstract	47
Introdução	48
Material e Métodos	49
Resultados	57
Discussão	60
Conclusões	66
Referências	67

INTRODUÇÃO

1
2
3 Na produção de suínos a alimentação representa em torno de 64 a 72 % dos
4 custos de produção (Teagasc, 2016). Além disso, alguns ingredientes utilizados na
5 formulação das dietas contêm fatores antinutricionais, que são compostos que reduzem
6 o valor nutritivo, interferem na digestibilidade, absorção ou utilização dos nutrientes
7 pelos animais (Andrade et al., 2015).

8 Os principais fatores antinutricionais presentes em dietas a base de milho e farelo
9 de soja são os polissacarídeos não amiláceos, o ácido fítico e as antiproteases. Esses
10 compostos aumentam a viscosidade das dietas (Brito et al., 2008), indisponibilizam o
11 fósforo (Rostagno et al., 2011) e prejudicam a atividade endógena de enzimas
12 proteolíticas, (Lingaraju e Gowda, 2008) respectivamente.

13 A suplementação de dietas para suínos com enzimas exógenas tem sido sugerida
14 como ferramenta para melhorar a eficiência alimentar, através da hidrólise de
15 elementos químicos específicos que não são degradados pelas enzimas endógenas dos
16 suínos (Adeola e Cowieson, 2011).

17 As enzimas também podem aumentar a digestibilidade dos nutrientes das dietas,
18 diminuir a excreção de nutrientes e minimizar a poluição ambiental (Varley et al., 2011;
19 Childers et al., 2011), bem como manter o desempenho dos animais alimentados com
20 dietas contendo menor concentração de nutrientes (Wu et al., 2018), além de reduzir os
21 custos com alimentação (Li et al., 2014; Bavaresco et al., 2020).

22 Contudo, na literatura, há diversos estudos com a utilização de enzimas na
23 nutrição de suínos, porém a maioria avalia o efeito das enzimas isoladamente. Portanto,
24 realizou-se este estudo com o objetivo de avaliar a inclusão da xilanase, fitase e protease
25 de forma isolada e associadas, na dieta de suínos machos castrados dos 30 aos 100 kg,
26 sobre o desempenho e características de carcaça.

27

1 **1 Fatores antinutricionais**

2
3 Os fatores antinutricionais são exclusivamente produzidos pelos vegetais como
4 mecanismo de defesa quanto a agentes externos, por meio do bloqueio de alguns
5 compostos que possam vir a causar algum dano a planta. No entanto, do ponto de vista
6 da alimentação animal, geralmente a presença desses fatores levam a prejuízos na
7 digestão e absorção de nutrientes (Souza et al., 2019).

8 De forma geral, quando se fala em alimentos, em especial milho e farelo soja que
9 são amplamente utilizados na nutrição de não ruminantes, são encontrados além de
10 nutrientes essenciais para os animais a presença de fatores antinutricionais. Compostos
11 como os polissacarídeos não amiláceos (PNA's), o ácido fítico, e os inibidores de
12 proteases, sendo estes responsáveis por interferirem negativamente no aproveitamento
13 de nutrientes pelos animais.

15 **1.1 Polissacarídeos não amiláceos (PNA's)**

16
17 Os PNA's são os principais componentes da fibra dietética presentes em cereais, e
18 suas unidades formadoras são unidas por ligações do tipo beta, o que os torna
19 indigestíveis para os animais. Os PNA's (Tabela 1) podem ser subdivididos em solúveis e
20 insolúveis, ou seja, sua classificação está relacionada a solubilidade em água e soluções
21 alcalinas (Albersheim et al., 2011).

22 A celulose, β -glucanos e arabinosilanos são os principais polissacarídeos da
23 parede celular de grãos. A celulose é um polímero de glicose unido por ligações β -1,4-
24 glicosídicas, e por conta de sua estrutura retém diversos nutrientes, além de dificultar o
25 contato de enzimas endógenas com o alimento (Sakomura et al., 2014). Os β - glucanos
26 são formados por cadeias laterais do tipo β -1,3 e β -1,4, que são responsáveis por
27 impedir a formação de fibras. Em relação aos arabinosilanos (pentosas), entende-se que
28 são compostos principalmente por duas pentoses, sendo arabinose e xilose, e são
29 basicamente formadas por uma estrutura linear de xiloses com ligações β -1,4 e uma
30 cadeia lateral de arabinose com ligações β -1,3. Essas frações de β -glucano e
31 arabinosilana se tornarão solúveis depois da digestão, causando aumento na viscosidade
32 da digesta, e conseqüentemente má absorção dos nutrientes, crescimento microbiano
33 nocivo no intestino delgado e baixa produtividade animal (Tavernari et al., 2008).

1

2 Tabela 1 - Classificação de PNA's

Categoria	Resíduo monomérico	Ligação	Alimentos
Celulose	Glicose	β -(1-4)	Cereais (cevada, milho, trigo) e leguminosas (soja, caroço de algodão, canola)
Polímeros não celulolíticos			
Arabinoxilanos	Arabinose e xilose	β -(1-4) - unidades de xilose ligadas	Cereais (cevada, milho, trigo, aveia e sorgo)
β -glucanos de ligação mista	Glicose	β -(1-3) e β -(1-4)	Cevada e aveia
Polissacarídeos pécticos			
Arabinanas	Arabinose	α -(1-5)	Subprodutos de cereais
Galactanos	Galactose	β -(1-4)	Tremoço, soja
Arabinogalactanos (tipo 1)	Arabinose e galactose	β -(1-4)	Grãos de leguminosas
Arabinogalactanos (tipo 2)	Arabinose e galactose	β -(1-3,6)	Canola

3 Fonte: Sinha et al. (2011).

4

5 Os suínos não sintetizam enzimas capazes de quebrar as ligações que formam os
6 PNA's, e por isso são considerados fatores antinutricionais quando ingeridos pelos
7 animais, sendo que no trato gastrintestinal favorecem a formação de complexos
8 aumentando a viscosidade da dieta, o que impede a ação das enzimas digestíveis sobre o
9 alimento, dificultando a absorção dos nutrientes (Brito et al., 2008).

10 Este prejuízo na absorção de nutrientes ocorre pelo aumento da viscosidade da
11 dieta, levando a mudanças no pH intestinal (Lindeberg, 2014). Consequentemente
12 secreções endógenas dos hormônios como secretina e colecistoquinina não são
13 produzidas em quantidade suficientes prejudicando a secreção de enzimas como
14 amilase, tripsina, lipase, além de outras substâncias como sais biliares, maltase, sacarase
15 e aminopeptidase (Chamone et al., 2010), importantes no processo de digestão.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

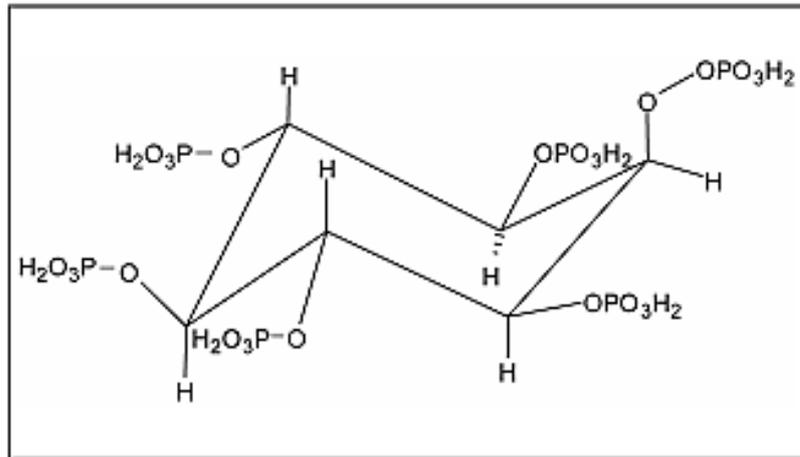
1.2 Molécula de ácido fítico

O fósforo é o segundo mineral encontrado em maior quantidade no corpo e é um macro mineral essencial para suínos (Zhang et al., 2010). No metabolismo é importante para a formação e manutenção dos ossos e dentes, está diretamente relacionado com a absorção de cálcio, armazenamento de energia (AMP, ADP e ATP), compõem a estrutura do DNA e RNA, manutenção do equilíbrio homeostático, e participa de processos enzimáticos (Lenhinger et al., 2002), além de ser o mineral mais oneroso nas formulações das rações (Figuereido et al., 2000).

Sabe-se que grande parte do fósforo está acumulado na célula vegetal na forma de ácido fítico. No entanto, sua disponibilidade, ou seja, o que está de forma acessível para os animais nos alimentos de origem vegetal é baixa, pois, cerca de 70% do fósforo é aprisionado na molécula de ácido fítico (Rostagno et al., 2011).

Em consequência, a absorção de fósforo é prejudicada, uma vez que suínos e aves não possuem fitase endógena para a hidrólise dessa complexa molécula, sendo necessária outra fonte de suplementação de fósforo para atender as exigências nutricionais. Geralmente, a principal fonte de fósforo na alimentação de aves e suínos é o fosfato bicálcico, pois é 100% disponível para os animais e por isso, usado amplamente nas dietas de não ruminantes (Rostagno et al., 2017).

O ácido fítico é formado por seis grupos fosfato ligados negativamente a 12 átomos de hidrogênio e um anel de inositol (IP6) (Figura 1), formando em suas regiões negativas sais insolúveis, denominados fitatos associados a outros nutrientes como Ca⁺, K⁺, Mg⁺⁺, Zn⁺, Fe⁺, e Mn⁺⁺ (Lott et al., 2000), sendo, portanto, considerado um fator antinutricional em ingredientes de origem vegetal.



1
2 Figura 1. Estrutura da molécula de ácido fítico.

3
4 Em geral, para não ruminantes, o milho e farelo de soja são os principais
5 componentes utilizados nas dietas e podem conter aproximadamente de 2,5 g/kg de
6 fósforo fítico ou 8,9 g/kg na forma de ácido fítico (Selle et al., 2000), sendo que no milho
7 90% está principalmente armazenado na camada de aleurona, e na soja parece não
8 haver local específico (Steiner et al., 2007).

9 O fitato é considerado fator antinutricional para aves e suínos, pois retém o
10 fósforo, reage com outros nutrientes dos alimentos no trato digestório dos animais,
11 particularmente em baixo pH, ocasionando a formação de quelatos de fitato com
12 minerais e proteínas, diminuindo assim a disponibilidade de fósforo e outros nutrientes
13 (Shirley e Edwards, 2003). Também pode inibir a ação de algumas enzimas endógenas
14 digestivas como α -amilase, tripsina, fosfatase ácida e tirosinase (Singh e Satyanarayana,
15 2015).

16 Por conta de suas cargas negativas de grupos fosfatos, o fitato forma sais
17 misturados com cátions de minerais que possuem grande importância quanto ao
18 armazenamento de minerais na célula (O'Dell et al., 1972). Dentre os minerais, além do
19 fósforo, o zinco (Zn) parece ser um dos mais afetados pelo ácido fítico que se liga
20 fortemente ao Zn no trato gastrointestinal, reduzindo sua disponibilidade para absorção e
21 reabsorção (Flanagan, 1984).

22 Há também efeito inibitório do fitato na absorção de cálcio (Ca), principalmente
23 por suas propriedades molares e pH intestinal a partir de 5,0, sendo este valor limitante
24 crítico para a formação de complexos insolúveis de fitato-Ca, dificultando a ação da
25 fitase (Kaufman e Kleinberg, 1971). Isto provavelmente ocorre em dietas de aves e

1 suínos que tem como principal fonte de cálcio o calcário, onde possui alta capacidade de
2 ligação ácida, além de aumentar o pH da digesta no intestino (Shafey et al., 1991),
3 favorecendo dessa forma a formação desses complexos (Selle et al., 2009).

4 Além da interação do fitato com minerais essenciais, sua presença reduz a
5 digestibilidade de lipídeos, carboidratos e proteínas, formando complexos que são
6 menos solúveis e mais resistentes à proteólise. As cargas negativas da molécula de ácido
7 fítico reagem com as positivas de alguns aminoácidos, tais como lisina, arginina,
8 histidina, das moléculas de proteínas, incluindo as enzimas envolvidas na digestão de
9 proteínas, diminuindo assim a disponibilidade dos aminoácidos (Ravindran et al., 1999;
10 Cowieson et al., 2006).

11 Considerando a baixa atividade de fitase endógena encontrada no sistema
12 digestivo de aves e suínos, o fósforo ligado ao fitato é praticamente 100% indisponível
13 para animais não ruminantes, sendo excretado em grande quantidade pelos animais
14 (Smith et al., 1999).

15 Portanto, mesmo que a exigência de fósforo dos animais seja atendida através da
16 suplementação de outras fontes inorgânicas de fósforo, deve-se levar em consideração
17 que ocorre aumento do custo da dieta, uma vez que grande parte do mineral presente
18 nos ingredientes vegetais não está sendo utilizado. Para diluir esses efeitos negativos na
19 alimentação dos suínos, a enzima exógena fitase passou a ser suplementada em dietas
20 para disponibilizar o fósforo armazenado na molécula de ácido fítico.

22 **1.3 Antiproteases**

24 Antiproteases ou inibidores de proteases podem ser definidos como proteínas
25 que são capazes de impedir a atividade enzimática das enzimas proteolíticas (Lingaraju
26 e Gowda, 2008), presentes em plantas, animais e microrganismos (Dokka et al., 2015).

27 Em plantas, as antiproteases estão presentes nos órgãos reprodutivos e como
28 fonte de reserva, sendo responsáveis pela regulação das proteases endógenas, além de
29 atuarem como mecanismo de defesa contra proteases exógenas de pragas e insetos
30 (Kato, 2002).

31 A concentração dos inibidores nos vegetais pode variar de acordo com a
32 maturação, época de colheita, localização no tecido e armazenamento da planta (Ribeiro,
33 2010), sendo que a interação entre o tipo de inibidor e o seu sítio catalítico formam o

1 complexo enzima-inibidor, dificultando a atividade das enzimas (Oliveira e Macedo,
2 2011).

3 Os diferentes tipos de antiproteases (Tabela 2) são classificadas conforme sua
4 sequência de aminoácidos, localização no sítio ativo, mecanismo de ação, estrutura e
5 agentes de desnaturação (De Leo et al., 2002).

6 Alimentos como o farelo de soja, contém valores expressivos de fatores
7 antinutricionais, como os inibidores de proteases, além de lectinas, fitoestrogênios, fitina,
8 entre outros (Pettersson e Pontoppidan, 2013). Em relação aos inibidores de proteína,
9 estes tornam-se responsáveis por reduzirem a disponibilidade de proteína, pois se ligam
10 e inativam as enzimas digestivas tripsina e quimotripsina no trato gastrointestinal dos
11 suínos (Jo et al., 2012).

12 Na soja sabe-se que existem dois tipos principais de inibidores de tripsina, os
13 Kunitz TI e Bowman-Birk, que são aproximadamente de 80 e 20%, respectivamente, na
14 soja crua (Shivakumar et al., 2015). No entanto, como são termolábeis, quando passam
15 por tratamento térmico são inativados e passam a reter em média 20% do inibidor
16 Bowman-Birk da quimiotripsina e tripsina e do inibidor Kunitz da tripsina (Friedman e
17 Brandon, 2001), sendo que a presença desses inibidores está negativamente relacionada
18 com a capacidade dos animais de digerirem proteínas (Chen et al., 2020).

19 Na nutrição de suínos acredita-se que dietas com a inclusão de proteases
20 exógenas possam melhorar o aproveitamento da proteína dos ingredientes, uma vez que
21 possam existir variações na digestibilidade dos nutrientes conforme a concentração dos
22 inibidores de protease contidos nos ingredientes da ração (Norgaard et al., 2019).

23 Além disso, entende-se que as proteases beneficiam a saúde intestinal dos
24 animais através de modificações na integridade da mucosa, no transporte de
25 aminoácidos e resistência a tração intestinal (Cowieson e Roos, 2016).

26

1 Tabela 2 - Classificação, distribuição e proteases-alvo de inibidores de proteases
 2 serínicas de plantas

Família	Exemplo	Enzima alvo	Fonte	Referência
Kunitz (I3A)	Inibidor de tripsina/subtilisina	Tripsina, quimiotripesina, Subtilsina, α -amilase, α -quimiotripsina	Glycine max Hordeum vulgare Psococarpus tetraglonobus	Laskowski e Kato (1980) Valee et al. (1998) Habu et al. (1992)
		Proteases serínicas microbianas, tripsina, quimiotripsina	Canavalia lineata, Sagittaria sagittifolia, Acacia confusa, Solanum tuberosum	Terada et al. (1994) Laskowski e Kato (1980) Lin et al. (1991)
Kunitz (I3B)	Inibidor de subtilisina/proteinase A, cathepsina D	α -quimiotripsina	Triticum aestivum	Sherry et al. (1984)
Cereal	Inibidor α -amilase/tripsina	α -amilase/tripsina	Hordeum vulgare	Lazaro et al. (1988)
Bowman Birk	Inibidor de tripsina/quimiotripsina	Tripsina, quimiotripesina, elastase	Helianthus annuus Arachis hypogae	Mulveena et al. (2005) Suzuki et al. (1987)

3 Fonte: Adaptado de Habib & Fazili (2007).

4

5 2 Enzimas na alimentação animal

6

7 As enzimas são catalizadores biológicos proteicos que aceleram as reações
 8 químicas, o que facilita a quebra desse substrato em moléculas disponíveis para serem
 9 utilizadas pelo corpo (Copeland, 2000).

1 As enzimas endógenas dos animais são capazes de quebrar os alimentos em
2 moléculas menores que fornecem nutrientes para o aproveitamento dos animais. Porém,
3 este processo não é totalmente eficiente, pois alguns ingredientes utilizados possuem
4 fatores antinutricionais indigestíveis pelos animais. Também algumas enzimas não são
5 sintetizadas pelos suínos em quantidades necessárias para a quebra destes e outros
6 componentes presentes nas dietas (Bedford e Partridge, 2011).

7 Neste contexto, a utilização de enzimas exógenas, como por exemplo a xilanase,
8 fitase e protease, na alimentação dos suínos tem possibilitado a melhora da digestão e
9 absorção de nutrientes (Torres-Pitarch et al., 2018) e a diminuição da excreção de
10 elementos como fósforo e nitrogênio no ambiente (Humer et al., 2015), mantendo ou até
11 mesmo reduzindo os custos com alimentação (Bedford e Partridge, 2011).

13 **2.1 Xilanase**

15 A composição das dietas pode interferir na absorção, e conseqüentemente, na
16 utilização dos nutrientes pelo organismo. Por isso a inclusão de enzimas exógenas, como
17 por exemplo, a xilanase que age sobre as frações fibrosas dos alimentos como celulose e
18 hemicelulose, pode liberar compostos antes não disponíveis para os animais (Lehnen et
19 al., 2011).

20 A xilanase comercial é produzida a partir de bactérias, fungos e leveduras como
21 *Bacillus*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Penillium* e *Trichoderma*, entre outros, sendo que cada
22 tipo de xilanase possui suas especificidades (Bedford e Partridge, 2010). No entanto, há
23 maior interesse naquelas oriundas de fungos filamentosos, pois conseguem ter maior
24 produção extracelular de xilanase do que bactérias e leveduras (Goswami e Rawat,
25 2015).

26 Existem diferentes tipos de xilanase e sua classificação é baseada na similaridade
27 e sequencias glicosídicas (Cantarel et al., 2009), sendo que são pertencentes a famílias
28 de enzimas do tipo glicosil hidrolases (GH) 5, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, etc, tendo mais
29 importância GH 10 e GH 11, pois estas possuem maior ação na quebra das ligações β -1,4
30 do esqueleto de xilano (Yag et al., 2019).

31 As GH 10 e 11 possuem características relevantes, como por exemplo, GH 10 são
32 maiores e hidrolisam partes da xilana e celulose da parede celular vegetal (Paes et al.,
33 2012), enquanto que GH 11 tem alta capacidade catalítica e seletividade pelo substrato,

1 principalmente por aqueles que contém D-xilose, sendo, portanto, consideradas
2 xilanases verdadeiras, uma vez que sua hidrólise é exclusiva do composto xilana (Sabini
3 et al., 2001).

4 5 **2.1.1 Mecanismos de ação da xilanase**

6
7 Mesmo que o milho possua alta digestibilidade para animais não ruminantes, há
8 diferenças na digestibilidade dos grãos, e acredita-se que isso está relacionado aos
9 fatores antinutricionais, principalmente quanto ao conteúdo de PNA's que pode
10 ocasionar déficit no aproveitamento de nutrientes, diminuindo a disponibilidade de
11 energia oriunda da dieta (Cowieson et al., 2010). Portanto, qualquer melhoria no
12 aproveitamento de nutrientes é válida, sendo que este propósito pode ser alcançado
13 através da enzima xilanase.

14 A principal função da suplementação exógena de carboidrases é hidrolisar os
15 PNA's, complexo presente nos alimentos para animais, uma vez que, não ruminantes são
16 incapazes de hidrolisar esses compostos com suas enzimas digestivas endógenas
17 (Krogdahl et al., 2005).

18 A xilanase pode aumentar a digestibilidade de nutrientes energéticos como o
19 amido e gordura, por meio de sua ação em reduzir os efeitos dos PNA's, permitindo que
20 enzimas endógenas tenham acesso a seus substratos (Adeola e Bedford, 2004).

21 A literatura sugere que a capacidade de quebra da xilanase ocorre por meio das
22 xilanases da família GH 10 e 11, que contém enzimas que catalisam a hidrólise por meio
23 do aprisionamento da mutarrotação de uma molécula de carbono anomérico, resultando
24 em mecanismo catalítico de duplo deslocamento formando o intermediário da enzima α -
25 glicosil, que inverte a configuração de β a α , e na segunda etapa ocorre uma substituição
26 na qual o carbono anomérico passa novamente por um estado de transição e muda sua
27 configuração novamente para β . (Payan et al., 2004).

28 Em síntese, a hidrólise da xilana ocorre por meio da quebra das ligações β -1-4 na
29 extremidade redutora e não redutora no esqueleto principal do xilano, em duas fases:
30 uma sólida e outra líquida, onde enzimas são absorvidas na fase líquida para o substrato
31 sólido, que irão catalisar a quebra do substrato insolúvel na fase sólida,
32 simultaneamente com enzimas dissolvidas que catalisam a hidrólise do substrato na fase
33 líquida. Assim, os compostos xilose e xilo-oligossacarídeos (XOS) são solubilizados na

1 fase líquida enquanto os de cadeia longa ficam dispersos na fase sólida para que ocorra a
2 hidrólise, portanto, a degradação enzimática ocorre ao mesmo tempo na fase líquida e
3 sólida, com ação da xilanase tanto nos açúcares solúveis quanto nas frações insolúveis
4 da hemicelulose (Dutta e Chakraborty, 2015).

5 As xilanas dependendo de suas ramificações na cadeia podem ser subdivididas em
6 arabinoxilanas, glucuronoxilanas, arabinoglucuroxilanas e glucuronoarabinoxilanas
7 (Dekker, 1989). Essas ramificações da cadeia irão determinar a solubilidade,
8 conformação física e a reatividade da molécula de xilana com os outros componentes da
9 hemicelulose e, portanto, irão influenciar diretamente a ação enzimática (Shahi et al.,
10 2016), sendo que em cereais são encontradas na forma de arabinoxilanas e
11 arabinoglucuroxilanas (Collins et al., 2005).

12 A arabinoxilanas e arabinoglucuroxilanas irão se tornar solúveis após a digestão
13 aumentando a viscosidade das dietas no trato gastrintestinal dos animais e dessa forma
14 dificultando a absorção de outros nutrientes. Neste sentido, a enzima xilanase atua na
15 hidrólise das ligações β -1-4 dentro das cadeias de xilana (Polizeli et al., 2005),
16 produzindo xilo-oligossacarídeos (XOS) (Collins et al., 2005), principalmente pela ação
17 de xilanases da família GH10 que possuem alta atividade em XOS curtos, solúveis e
18 ramificados (Biely et al. 2016; Nordberg-Karlsson et al. 2018).

19 Conseqüentemente, os XOS serão fermentados por microrganismos no intestino
20 grosso, melhorando a integridade da barreira da mucosa intestinal contra a
21 patógenos do lúmen, melhorando o status sanitário dos animais e dessa forma seu
22 desempenho (Hu et al., 2013).

23 A melhora na utilização de energia se dá pela mudança na absorção de nutrientes
24 que ocorre em maior quantidade no intestino delgado, diminuindo a competição pelos
25 microrganismos, concentrando os nutrientes no órgão onde há maior possibilidade de
26 absorção (Adeola e Cowieson, 2011).

27 UNIDADE DA XILANASE

28

29 **2.1.2 Principais resultados na alimentação de suínos**

30

31 A inclusão de xilanase na alimentação de suínos tem o propósito de aumentar a
32 digestibilidade de dietas liberando nutrientes aprisionados na célula vegetal,
33 melhorando por exemplo, o aproveitamento de energia pelos animais. Mesmo que esses

1 efeitos possam ser mais evidentes em dietas com ingredientes fibrosos, as dietas de
2 suínos ainda são praticamente a base de milho e farelo de soja, que em sua composição
3 possuem fatores antinutricionais que possam vir a dificultar a utilização de nutrientes
4 essenciais para o crescimento desses animais, sendo estes prejuízos minimizados pela
5 xilanase.

6 Na literatura tem-se constatado que, tanto em leitões quanto em suínos em fase
7 de crescimento em terminação, a inclusão de xilanase às dietas possibilitam redução da
8 viscosidade das dietas (Wellock et al., 2008; Adeola e Cowieson 2011; Passos et al.,
9 2015; Duarte et al., 2019), melhora na digestibilidade da energia (Cadogan e Choct 2015;
10 Passos et al., 2015; Kiarie et al., 2016), dos aminoácidos (Upadhaya et al., 2016), com a
11 manutenção do desempenho dos animais quando comparados com dietas sem xilanase
12 (Hanczakowska et al., 2012; Kiarie et al., 2013; Cadogan e Choct 2015; Kiarie e Petracek,
13 2015; Zier-Rush et al., 2016; Duarte et al., 2019). Além disso, o tipo de ingrediente e
14 xilanases utilizados podem interferir na digestibilidade de nutrientes e na microbiota
15 intestinal dos suínos (Zhang et al 2018).

16 Trabalhos com suínos desde o desmame até a fase de terminação alimentandos
17 com dietas a base de milho e farelo de soja e suplementadas com xilanase ainda são
18 escassos, pois, as pesquisas em sua grande maioria sugerem que os benefícios da
19 inclusão de xilanase em dietas de não ruminantes são mais evidentes quando
20 ingredientes fibrosos são adicionados as rações.

21 No entanto, há indícios de que mesmo que o milho e farelo de soja tenham alta
22 digestibilidade para suínos, alguns nutrientes não são eficientemente aproveitados pelos
23 animais, e neste sentido a adição de xilanase pode vir a ser uma alternativa para
24 reduzir perdas na absorção.

26 **2.2 Fitase**

27
28 A inclusão da fitase em dietas para não ruminantes ocorreu a partir da década de
29 90 por meio de uma legislação nos países baixos para controlar a poluição de fosfatos,
30 tornando-se posteriormente, amplamente utilizada no mundo todo (Kumar et al., 2010).

31 A fitase (mio-inositol hexa fosfato fosfo-hidrolase) é uma enzima exógena, que
32 pode ser definida como uma proteína de estrutura terciária ou quaternária que age
33 como catalizador biológico, aumentando a velocidade das reações químicas nos

1 organismos sem alteração das mesmas. É uma enzima obtida a partir de fungos
 2 bactérias, leveduras e plantas (Ullah e Sethumadhavan, 2003) (Tabela 3), sendo que
 3 possuem sítios de ligação específicos que permitem atuarem na degradação de ligações
 4 químicas em condições favoráveis de pH, umidade e temperatura (Yin et al., 2001).

5

6 Tabela 3 - Exemplos de 3- e 6-fitases atualmente disponíveis comercialmente e suas
 7 características

Tipo	Origem da proteína	Expressão	pH	Temp (°C)	Nome comercial
3	A. niger	A. niger	2,5 -5,5	65	Natuphos
3	A. niger	A. niger	6	-	Allzyme
3	A. niger	Tricoderma reesei	2,5	-	Finase
6	Escherichia coli	ATCC 5233	4,5	55	Phyzyme
6	Escherichia coli	Pichia pastoris	4,5	-	Quantum
6	Escherichia coli	Tricoderma reesei	-	-	Quantum Blue
6	Escherichia coli	Pichia pastoris	3,4-5,0	58	OptiPhos
6	Escherichia coli	Aspergillus oryzae	4-4,5	50-55	Ronazym
6	Escherichia coli	Aspergillus oryzae	-	-	Ronazym
6	Escherichia coli	Tricoderma reesei	3,5-4,5	60	Axtra

8 Fonte: Li et al. (2014).

9

10 No entanto, as diferentes fitases não são idênticas quanto ao modo de ação na
 11 quebra do ácido fítico, sendo que existem vários grupos: fitase ácida de histidina
 12 (HAPhy), fitase de hélice b (BPPhy), fitase de ácido púrpura (PAPhy) e fitase de proteína
 13 tirosina (PTPhy) (Mullaney e Ullah, 2007), onde cada grupo possui variadas formas de
 14 atuação na reação catalítica sob seu substrato de afinidade (Lei et al., 2013).

15 Comercialmente, as fitases de bactérias e fúngicas possuem maior destaque em
 16 relação as outras pois, apresentam algumas características relevantes, como
 17 especificidade pelo substrato, resistência a proteólise e maior eficiência na catálise

1 (Konietzny e Greiner., 2004). Além disso, as fitases são classificadas de acordo com o
2 local em que ocorre a hidrólise da molécula de ácido fítico, sendo as principais a 3-fitase
3 e 6-fitase (Cowieson et al., 2008). A 3-fitase remove um grupo ortofosfato da posição do
4 carbono C3, enquanto a 6-fitase atua na posição do carbono C6 da molécula ácido fítico
5 (Selle e Ravindran, 2007). Sua atividade enzimática é expressa em unidades de atividade
6 (FTU), em que 1 FTU é a quantidade de enzima que libera 1 mmol de ortofosfato
7 inorgânico / min a partir de 0,0051 fitato de sódio mol/l a pH 5,5 e a uma temperatura
8 de 37 °C (Selle et al., 2000).

9 10 **2.2.1 Mecanismos de ação da fitase**

11
12 No processo de hidrólise do ácido fítico, ocorre a catalização e desfosforilação
13 mediada pela enzima fitase em fosfato inorgânico, inositol livre ou compostos de inositol
14 mono, bi, tri, tetra e penta-fosfato (Dasgupta et al., 1996), possibilitando assim a absorção
15 do fósforo que estava indisponível para o animal, e por conseguinte, reduzindo a sua
16 excreção no ambiente (Yin et al., 2001). Nesse processo não ocorre somente a liberação
17 do fósforo inorgânico, mas também torna disponível o cálcio, magnésio, proteínas e
18 lipídeos (Li et al., 2015).

19 Com a reação catalisada pela fitase e degradação do mio-inositol a fósforo
20 inorgânico, há liberação do grupo ortofosfato e, conseqüentemente, o grupamento
21 amino de aminoácidos básicos e demais cátions para serem absorvidos (Ludke, 1999),
22 beneficiando os animais com um maior aproveitamento da proteína e também de
23 minerais contidos nas dietas, uma vez que, segundo Camiruaga et al. (2001), a retenção
24 dos minerais é significativamente melhorada quando se adiciona fitase às dietas basais
25 com cereais.

26 A eficácia de degradação do fitato varia de acordo com alguns fatores como
27 espécie animal, especificidade pelo substrato, termo estabilidade, resistência ao trato
28 gastrintestinal, pH (faixa de 4,5 e 6,0) e relação cálcio e fósforo, pois devido à alta
29 concentração de cálcio em dietas de não ruminantes há a formação de quelatos
30 insolúveis de fitato e outros nutrientes (Mullaney et al., 2000).

31 Além disso, a razão enzima: substrato, também pode vir a influenciar a eficiência
32 de hidrólise da fitase, pois segundo Li et al (2016) testando atividade da fitase em
33 diferentes alimentos observou que houve maior quebra de IP6 do farelo soja em

1 comparação ao farelo de canola, demonstrando relação dependente da concentração de
2 ácido fítico dos ingredientes e ação da enzima.

3 Outro fator a ser considerado é o sítio de ativação de cada fitase. Sabe-se que
4 algumas possuem maior atividade no estômago, outras no intestino delgado e há ainda
5 aquelas que possuem atuação nas duas regiões, sendo estas mais eficazes
6 principalmente por terem maior atuação na hidrólise das ligações do fitato às proteínas
7 da dieta, reduzindo as perdas endógenas de aminoácidos (Cowieson et al., 2008).

8 Além disso, o ácido fítico é capaz de formar complexos com aminoácidos
9 principalmente quando o pH está abaixo do ponto isoelétrico da proteína, a molécula de
10 fitato é carregada negativamente e tem capacidade de formar fortes ligações
11 eletrostáticas com o grupo catiônico dos resíduos básicos de lisina, arginina e histidina,
12 além de outros aminoácidos (Cheryan, 1980).

13 Conseqüentemente, esses complexos são menos prováveis de serem digeridos
14 por enzimas proteolíticas (pepsina, tripsina e quimotripsina) e também outras enzimas
15 digestivas pancreáticas como a lipase e α -amilase, por serem inibidas pela alta
16 concentração de fitato na digesta (Caldwell, 1992).

17

18 **2.2.2 Principais resultados na alimentação de suínos**

19

20 Por muito tempo a fitase vem sendo estudada e utilizada na dieta de não
21 ruminantes, destacando-se nos últimos anos por conta de suas diversas vantagens,
22 principalmente quanto a melhora na digestibilidade de fósforo e outros nutrientes
23 através da hidrólise da molécula de ácido fítico presente em muitos ingredientes de
24 origem vegetal comumente utilizados na alimentação de monogástricos, como milho e
25 farelo de soja.

26 Estudos demonstram que a fitase em dietas de suínos leva ao aumento da
27 retenção e concentração de nitrogênio e energia, melhora da digestibilidade do cálcio,
28 fósforo e aminoácidos (Veja et al., 2015; Cowieson et al., 2017, Wu et al., 2018; Zouaoui
29 et al., 2018; Arredondo et al., 2019), sem comprometer ou ainda otimizando o
30 desempenho dos animais em comparação com aqueles que receberam dietas sem a
31 fitase (Veum et al., 2006; Dersjant-Li et al., 2017; Li et al., 2018).

32 Esses resultados demonstram que uma vez que a dieta Controle Positivo (CP, sem
33 adição de enzimas) na maioria dos estudos foi formulada para atender às necessidades

1 nutricionais dos animais, o desempenho melhorado ou semelhante das dietas contendo
2 fitase em relação a dieta CP, confirma as hipóteses que de a inclusão da enzima fitase
3 pode impactar a utilização de outros nutrientes, como energia ou aminoácidos. A fitase
4 pode não apenas hidrolisar a molécula de ácido fítico aumentando somente a
5 disponibilidade do fósforo, mas também reduzir os impactos negativos do fitato na
6 digestão de outros nutrientes, como aminoácidos e energia (Selle et al., 2012).

8 **2.3 Protease**

9
10 As dietas geralmente formuladas somente com ingredientes cereais, farelos,
11 farinhas, etc, não atendem as exigências dos animais, sendo necessária a inclusão dos
12 aminoácidos industriais para suprir o requerimento proteico e aminoacídico dos
13 animais.

14 As proteases são enzimas que degradam as proteínas de diversos vegetais que
15 são utilizados como ingredientes na dieta de aves e suínos. Estas são responsáveis por
16 quebrar as proteínas de armazenamento, e atuam sobre os fatores antinutricionais
17 proteicos como os inibidores de tripsina que bloqueiam a ação da tripsina produzida
18 pelo pâncreas e as lectinas que se ligam a açúcares, reduzindo a digestibilidade das
19 proteínas. O calor é o método utilizado para eliminar esses fatores, porém ainda irá
20 conter níveis residuais de inibidores de tripsina e lectinas no farelo de soja (Rao, 2003).
21 As proteases podem ser usadas para reduzir os níveis de inibidores de tripsina e
22 lectinas, melhorando, assim, a digestibilidade da proteína (Bedford e Partridge, 2010).

23 As enzimas proteolíticas são divididas em exo e endopeptidases, sendo a sua
24 principal função a catálise da clivagem de ligações peptídicas de proteínas além de
25 conduzirem modificações seletivas e específicas em proteínas. Na maioria dos casos, a
26 proteólise é direcionada e limitada à clivagem de ligações peptídicas específicas da
27 proteína (Bedford e Partridge, 2010).

28 Segundo a União Internacional de Bioquímica (IUB), as enzimas proteolíticas se
29 classificam em seis famílias de acordo com o tamanho molecular, com as suas
30 propriedades elétricas e de acordo com a sua especificidade ao substrato. São elas:
31 serina protease I (ex. tripsina, elastase), serina protease II (ex. subtilisina), cisteína
32 protease (ex. papaína), aspartil protease (ex. pepsina, quimosina), metalo protease I (ex.
33 carboxipeptidase bovina) e metalo protease II (ex. termolisina). Serina proteases, assim

1 como as metalo proteases se subdividem em duas famílias, as proteases de mamíferos e
2 as proteases microbianas (Choplin, 2001).

3 Cada família de proteases possui resíduos de aminoácidos característicos no seu
4 sítio ativo (Beynon e Bond, 1996). As proteases executam uma grande variedade de
5 funções fisiológicas complexas, como por exemplo, o catabolismo de proteínas, a
6 coagulação do sangue, o crescimento e migração celular, ativação de zimogênios e o
7 transporte e secreção de proteínas através da membrana. De maneira geral, proteases
8 extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em moléculas menores para absorção
9 pela célula, enquanto as intracelulares possuem um papel vital na regulação do
10 metabolismo (Rao et al., 1998).

11 As plantas, os animais e microrganismos são as principais fontes de obtenção de
12 enzimas proteolíticas. As proteases originárias de plantas são dependentes de alguns
13 fatores, como a disponibilidade de uma grande área para o cultivo e as condições
14 climáticas para o ótimo crescimento. Além disto, o processo de obtenção de proteases
15 por plantas é bastante demorado, devido ao período de espera para o total
16 desenvolvimento de uma planta. Algumas proteases originárias de plantas são oriundas
17 da papaína, bromelaína, queratinases e ficinas (Rao et al., 1998).

18 As de origem microbiana representam a principal fonte (40% do total das
19 proteases comercializadas), devido à sua ampla diversidade bioquímica. Devido ao seu
20 rápido crescimento, pequeno espaço requerido para seu cultivo, e à grande variedade de
21 atividades catalíticas que dispõem, os microrganismos são preferidos como fonte de
22 proteases (Rao et al., 1998).

23 Outro ponto a se levar em consideração é que as proteases microbianas em geral
24 são mais estáveis do que as oriundas de plantas e animais, pois seu processo de
25 produção é mais fácil e seguro (Wiseman, 1991). Os microrganismos responsáveis pela
26 produção de proteases são os fungos e as bactérias, devido à maior facilidade de cultivo
27 e obtenção da enzima (Bernardi et al., 1991). Em geral, as enzimas fúngicas têm um pH
28 ótimo ácido ou neutro, não sendo termoestáveis. Por outro lado, as proteases
29 bacterianas possuem um pH ótimo alcalino ou neutro, sendo com frequência
30 termoestáveis (Wiseman, 1991).

31 A adição de proteases exógenas pode representar um potencial desejável para
32 inativação de fatores antinutricionais, tais como lectinas, proteínas antigênicas e
33 inibidores de tripsina, presentes em determinados alimentos, particularmente em

1 leguminosas (Cowieson et al., 2006) e, também, suplementar a atividade proteolítica em
2 animais jovens, liberar peptídeos menores e facilitar a ação das enzimas endógenas.

3

4 **2.3.1 Mecanismos de ação da protease**

5

6 Entende-se que as proteases endógenas produzidas pelos animais geralmente são
7 suficientes para que ocorra a utilização de proteína em quantidades adequadas pelos
8 animais. Entretanto, a digestibilidade de proteínas e aminoácidos, variam devido a
9 diversos fatores, e passam pelo trato gastrintestinal sem serem completamente
10 aproveitados (Lemme et al., 2004).

11 As ligações peptídicas das proteínas são quebradas pela ação das proteases,
12 classificadas como exo ou endopeptidases, conforme o local onde ocorre a hidrólise da
13 ligação peptídica, sendo que quando a quebra ocorre no grupo amino terminal da
14 molécula, essas são classificadas exopeptidases, quando ocorre dentro da molécula em
15 locais longe da porção terminal, são classificadas como endopeptidases (Wu, 2013).

16 As exopeptidases, sendo as aminopeptidases e carboxipeptidases, que possuem
17 sua ação nas porções terminais de nitrogênio e carbono dos substratos peptídicos, serão
18 diferenciadas conforme seu mecanismo de ação, como por exemplo, o tamanho da
19 molécula a ser clivada. Em relação as carboxipeptidases, produzidas por *Aspergillus*,
20 *Penicillium* e *Saccharomyces*, são diferenciadas em três principais grupos com base na
21 presença dos substituintes de aminoácidos na molécula, sendo: serina
22 carboxiproteases, metalocarboxiproteases e a cisteína (Ward, 2011).

23 As endoproteases de acordo Ward (2011) em geral são diferenciadas com base
24 em seu mecanismo de ação específico, sendo:

25 - Serina endoprotease: capaz de catalisar reações de ésteres, amidas e peptídeos,
26 sendo as principais a quimotripsina e subtilinas;

27 - Endoprotease aspártica: possuem resíduos de ácido aspártico no sítio ativo,
28 sendo elas as pepsinas;

29 - Cisteína endoprotease: contêm cisteína-histidina em seus locais catalíticos e
30 geralmente necessitam de agentes redutores para retenção da atividade catalítica e são
31 desnaturadas ou inibidas por reagentes sulfidríla;

1 - Ácido glutâmico e treonina endoprotease: enzimas recentemente caracterizadas
2 com mecanismos de reação envolvendo a participação específica de ácido glutâmico e
3 treonina no sítio ativo, respectivamente.

4 No entanto, o mecanismo de ação da protease em suínos não é claro, porém,
5 acredita-se que possa ocorrer maior disponibilidade de proteína quando a protease é
6 adicionada em dietas, pois, será capaz diminuir os efeitos prejudiciais dos inibidores de
7 proteases dos ingredientes, através do aumento da hidrólise e solubilidade da proteína
8 (Romero et al., 2013).

9 Essa melhora na disponibilidade de aminoácidos parece estar relacionada ao fato
10 de que a ação da protease não esteja limitada somente ao intestino delgado, mas
11 também, ao beneficiamento da digestão no intestino grosso (Romero et al., 2013), além
12 de manter a integridade do intestino delgado, como altura das vilosidades e redução da
13 profundidade da cripta. Além disso, a protease parece hidrolisar proteínas com ligações
14 dissulfeto (glicina e β -conglucina) que se ligam a parede intestinal, reduzindo seus
15 efeitos prejudiciais a mucosa intestinal, melhorando a ingestão de ração pelos animais, e
16 conseqüentemente, maior ingestão de proteína (Zuo et al., 2015).

17 18 **2.3.2 Principais resultados na alimentação de suínos**

19
20 Avaliando dietas sem e com protease para suínos em crescimento e terminação,
21 constata-se que os animais alimentados com a protease tiveram desempenho superior
22 comparados aos alimentados com dieta controle (Kim et al., 2017; Kim et al., 2018; Min
23 et al., 2019; Park et al., 2020; Lee et al., 2020).

24 Além disso, a suplementação de protease na dieta levou a maior digestibilidade
25 de nutrientes e digestibilidade aparente total do trato digestório para aminoácido,
26 proteína e energia, do que os alimentados com a dieta controle, atendendo
27 adequadamente as exigências da fase (Pan et al., 2016; Park et al., 2020; Lee et al., 2020).
28 Por outro lado, outras pesquisas não demonstram efeitos positivos sobre o desempenho
29 e carcaça dos suínos com a inclusão da protease na dieta (O'Shea et al., 2014; Zuo et al.,
30 2015, Choe et al., 2017).

31 No entanto, o efeito da protease parece estar diretamente relacionado ao tipo de
32 da enzima, e ainda ao tipo de ingrediente proteico utilizado na dieta, além da espécie
33 animal, pois, para peixes por exemplo, que necessitam de alto nível proteico na dieta e

1 por conseguirem aproveitar de forma eficiente a proteína, a inclusão de diferentes níveis
2 de protease pode não influenciar positivamente seu desempenho (Nunes et al., 2006).

4 **2.4 Complexo enzimático**

6 Geralmente a inclusão das enzimas é feita isoladamente ou na forma de complexo
7 enzimático (blend) nas dietas dos animais. No entanto, acredita-se que a utilização na
8 forma de complexo enzimático possua efeitos mais expressivos, pois dessa forma o
9 efeito associado de todas as enzimas é considerado.

10 Nas dietas de não ruminantes, geralmente, são utilizadas enzimas que tenham
11 capacidade de quebra dos fatores antinutricionais, que interagem entre si e com outros
12 compostos da dieta e, portanto, deve-se priorizar o agrupamento de enzimas com ações
13 específicas para os seus substratos para promover melhores resultados em relação a
14 utilização de forma isolada (Ruiz et al., 2008).

15 No entanto, a comparação de resultados sobre a utilização de complexos
16 enzimáticos de dietas para suínos é incerta pois, mesmo que exista a hipótese do efeito
17 aditivo das enzimas, na literatura não é bem estabelecido qual mecanismo e real efeito
18 dos diferentes tipos de combinações de enzimas exógenas no organismo dos animais.

20 **2.4.1 Mecanismos de ação do complexo enzimático**

22 Os efeitos da utilização das enzimas na forma de complexo enzimático variam na
23 literatura, porém, independente disso, ao se combinar enzimas leva-se em consideração
24 as ações isoladas de cada enzima e se assume que haverá efeito aditivo de cada uma
25 delas nos animais.

26 Nesse contexto, os principais mecanismos propostos de um complexo enzimático
27 são: hidrólise de ligações químicas específicas nos alimentos, eliminação de nutrientes
28 aprisionados nas moléculas e indisponíveis aos animais, solubilização de PNA's e
29 incremento de enzimas endógenas em uma mesma dieta (Kiarie et al., 2013).

30 Os efeitos positivos de um complexo enzimático podem ser explicados pelo fato
31 de que, ao longo do trato gastrintestinal, a diversidade da microbiota, enzimas, e
32 substratos, leva a diferentes digestibilidades dos alimentos, sendo influenciada por
33 diversos fatores que podem atrapalhar a absorção de nutrientes. Consequentemente, a

1 função metabólica é muito dependente das condições bioquímicas da digesta, além da
2 composição das dietas, sendo que, dietas contendo diferentes enzimas podem
3 influenciar benéficamente a utilização dos nutrientes da dieta ao longo de todo o trato
4 gastrintestinal (Kiarie et al., 2013).

6 **2.4.2 Principais resultados na alimentação de suínos**

8 Diversos estudos avaliaram a inclusão de xilanase e protease associadas nas
9 dietas de suínos, e pode-se constatar efeitos benéficos sobre o desempenho e
10 digestibilidade de nutrientes (Zeng et al., 2017; Juanpere et al., 2005; Olukosi et al.,
11 2007; Nortey et al., 2007; Woyengo et al., 2010), sendo que a intensidade da resposta
12 depende dos substratos da dieta (Cowieson e Bedford, 2009).

13 No entanto, acredita-se que a xilanase quando adicionada em associação com
14 fitase em dietas melhora a digestibilidade de compostos, pois, é responsável pela quebra
15 dos PNA's, liberando nutrientes além de facilitar o acesso da fitase e enzimas endógenas
16 (Ndou et al., 2015; Jang et al., 2016; Zeng et al., 2017).

17 A inclusão de fitase e protease associadas na dieta de suínos não é comumente
18 utilizada, com escassez na literatura. Contudo, a ação da fitase parece estar relacionada
19 com a sua resistência à degradação pela protease endógena em estudos in vitro
20 (Dersjant-Li et al., 2014).

21 Quando a xilanase, protease, fitase foram associadas, os estudos sugerem que
22 alguns substratos presentes na parede celular da planta e que normalmente não são
23 acessíveis para os animais passam a ser liberados para a absorção. Isto ocorre pela ação
24 das outras enzimas não necessariamente específicas ao substrato, que
25 conseqüentemente, disponibilizam estes compostos para a degradação pelas enzimas
26 específicas, ou seja, existindo o efeito aditivo de cada enzima (Torres-Pitarch et al.,
27 2018).

28 Com os resultados obtidos no presente estudo, foi elaborado o artigo intitulado:
29 Xilanase, fitase e protease isoladas e associadas em dietas com ajustes nutricionais para
30 suínos machos castrados dos 30 aos 100 kg, redigidos conforme as normas da Revista
31 Brasileira de Zootecnia e adaptações às normas de elaboração de dissertações e teses do
32 Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal/FAMEZ/UFMS.

REFERÊNCIAS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

Adeola, O and Bedford, M. R. 2004. Exogenous dietary xylanase ameliorates viscosity-induced anti-nutritional effects in wheatbased diets for White Pekin ducks (*Anas platynnchos domesticus*). *British Journal of Nutrition* 92:87-94. <https://doi.org/10.1079/BJN20041180>

Adeola, O.; Cowieson, A. J. 2011. Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *Journal of Animal Science* 89:3189–3218. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3715>

Albersheim, P.; Darvill, A.; Roberts, K.; Sederoff, R.; Staehelin, A. 2011. *Plant cell walls*. Garland Science, Taylor e Francis Group, LLC: New York; 2011.

Andrade, T. V.; Santos, R. N. V.; Santos, C. B.; Araújo, D. J.; Braulino, D. S.; Moura, M. V. T. P. 2015. Tanino em resíduos e subprodutos alimentares para a alimentação animal. *Revista Eletrônica Nutritime*, 12:4230-4236.

Arredondo, M. A.; Casas, G. A.; Stein, H. H. 2019. Increasing levels of microbial phytase increases the digestibility of energy and minerals in diets fed to pigs. *Animal Feed Science and Technology* 248:27–36. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.01.001>

Bavaresco, C.; Krabbe, E.; Gopinger, E.; Sandi, A. J.; Martinez, F. N.; Wernik, B. Roll, V. F. B. 2020. Hybrid Phytase and Carbohydases in Corn and Soybean Meal-Based Diets for Broiler Chickens: Performance and Production Costs. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 22:001-008. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2019-1178>

Bedford, M and Partridge, G. 2010. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. 2nd ed. Hardcover.

Bedford, M. R.; Partridge, G. G. 2011. *Enzymes in farm animal nutrition*. 2nd ed. Cabi. 2011.

Bernardi, D. L. S.; Pilosof, A. M. R.; Bartholomai, G. B. 1991. Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases. *Journal of American Oil Chemists's Society* 68:102-105. <https://doi.org/10.1007/BF02662327>

Biely, P.; Singh, S.; Puchart, V. 2016. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. *Biotechnology Advances* 34:1260-1274. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.09.001>

- 1 Brito, M. S.; Oliveira, C. F. S.; Silva, T. R. G.; Lima, R. B.; Morais, S. N.; Silva, J. H. V. 2008.
2 Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de monogástricos: revisão. *Acta Veterinaria*
3 *Brasilica* 2:111-117. <https://doi.org/10.21708/avb.2008.2.4.917>
- 4 Cadogan, D. J e Choct, M. 2015. Pattern of non starch polysaccharide digestion along the
5 gut of the pig: Contribution to available energy. *Animal Nutrition* 1:160–165.
6 <http://dx.doi.org/10.1016/j.aninu.2015.08.011>
- 7 Caldwell, R. A. 1992. Effect of calcium and phytic acid on the activation of trypsinogen
8 and the stability of trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40:43-46.
9 <https://doi.org/10.1021/jf00013a008>
- 10 Camiruaga, M.; Garcia F.; Elera, R.; Simonetti, C. 2001. Productive response of broiler
11 chickens to exogenous enzyme combinations added to diets based on corn or triticale.
12 *Ciencia e Investigación Agraria*, 28:23-26.
- 13 Cantarel, B. L.; Coutinho, P. M.; Rancurel, C.; Bernard, T.; Lombard, V.; Henrissat, B. 2009.
14 The Carbohydrate-Active Enzymes database (CAZy): An expert resource for
15 glycogenomics. *Nucleic Acids Research* 37:233–238.
16 <https://doi.org/10.1093/nar/gkn663>
- 17 Chamone, J. M. A.; Melo, M. T. P.; Arouca, C. L. C.; Barbosa, M. M.; Souza, F. A.; Santos, D.
18 2010. Fisiologia digestiva de leitões. *Revista Eletrônica Nutritime* 7:353-1363.
- 19 Chen, J.; Wedekind, K.; Escobar, J.; Vazquez-Anon, M. 2020. Trypsin inhibitor and urease
20 activity of soybean meal products from different countries and impact of trypsin
21 inhibitor on ileal amino digestibility in pigs. *Journal of the American Oil Chemists'*
22 *Society* 97:1151-1163. <https://doi.org/10.1002/aocs.12394>
- 23 Cheryan, M. 1980. Phytic acid interactions in food systems. *Critical Reviews in Food*
24 *Science and Nutrition* 13: 297-335. <https://doi.org/10.1080/10408398009527293>
- 25 Childers, D. L.; Corman, J.; Edwards, M.; Elser, J. J. 2011. Sustainability challenges of
26 phosphorus and food: solutions from closing the human phosphorus cycle. *Bioscience*
27 61:117-124. <https://doi.org/10.1525/bio.2011.61.2.6>
- 28 Choe, J.; Kim, K. S.; Kim, H. B.; Park, S.; Kim, J.; Kim, S.; Kim, B.; Cho, S. H.; Cho, J. Y.; Park, I.
29 H.; Cho, J. H.; Song, M. 2017. Effects of protease on growth performance and carcass
30 characteristics of growing finishing pigs. *South African Journal of Animal Science*
31 47:697-703. <http://dx.doi.org/10.4314/sajas.v47i5.13>

- 1 Copeland, R. A. 2000. Kinetics of single substrate enzyme reactions. *Enzymes: A practical*
2 *introduction to structure, mechanism and data analysis*. New York: John Wiley e Sons
3 Inc.
- 4 Collins, T.; Gerday, C.; Feller, G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic
5 xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 29:3–23.
6 <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>
- 7 Cowieson A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. 2006. Phytic acid and phytase:
8 implications for protein utilisation by poultry. *Poultry Science* 85: 878–885.
9 <https://doi.org/10.1093/ps/85.5.878>
- 10 Cowieson, A.J.; Ravindran, V.; Selle, P. H. 2008. Influence of dietary phytic acid and
11 source of microbial phytase on ileal endogenous amino acids flows in broilers chickens.
12 *Poultry Science* 87:2287-99. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00096>
- 13 Cowieson, A.J., Bedford, M.R., 2009. The effect of phytase and carbohydrase on ileal
14 amino acid digestibility in monogastric diets: complementary mode of action. *World's*
15 *Poultry Science Journal* 65:609–624. <https://doi.org/10.1017/S0043933909000427>
- 16 Cowieson, A. J.; Bedford, M. R.; Ravindran, V. 2010. Interactions between xylanase and
17 glucanase in corn/soy-based diets for broilers. *British Poultry Science* 51:246-257.
18 <http://dx.doi.org/10.1080/00071661003789347>
- 19 Cowieson, A. J and Roos, F. F. 2016. Toward optimal value creation through the
20 application of exogenous mono-component protease in the diets of non-ruminants.
21 *Animal Feed Science and Technology* 221:331–340.
22 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.04.015>
- 23 Cowieson, A. J.; Ruckebusch, J-P.; Sorbara, J. O. B.; Wilson, J. W.; Guggenbuhl, P.; Roos, F.
24 F. 2017. A systemic view on the effect of phytase on ileal amino acid digestibility in
25 broilers. *Animal Feed Science and Technology* 225:182-194.
26 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.01.008>
- 27 De Leo, F.; Bonade-Bottino, M.; Ceci, L. R.; Gallenari, R.; Jouanin, L. 2002. Effects of a
28 mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests.
29 *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31:593-602.
30 [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00164-8](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00164-8)
- 31 Dersjant-Li. Y.; Awati A.; Schulze, H.; Partridge G. 2014. Phytase in non-ruminant animal
32 nutrition: a critical review on phytase activities in the tract and influencing factors.
33 *Journal of Science and Food Agriculture*, 95:878–96. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6998>

- 1 Dersjant-Li, Y.; Awati, A.; Schulze, H.; Partridge, G. 2015. Phytase in non-ruminant animal
2 nutrition: A critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and
3 influencing factors. *Journal of Science and Food Agriculture* 95:878–896.
4 <https://doi.org/10.1002/jsfa.6998>
- 5 Dersjant-Li, Y.; Schuh, K.; Wealleans, A. L.; Awati, A.; Dusel, G. 2017. Effect of a
6 Buttiauxella phytase on production performance in growing/finishing pigs fed
7 aEuropean-type diet without inclusion of inorganic phosphorus. *Journal of Applied*
8 *Animal Nutrition* 5:1-7. <https://doi.org/10.1017/JAN.2017.3>
- 9 Dokka, M. K.; Seva, L.; Davuluri, S. P. 2015. Isolation and Purification of Trypsin
10 Inhibitors from the Seeds of *Abelmoschus moschatus* L. *Appl. Applied Biochemistry and*
11 *Biotechnology* 175:3750–3762. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1542-1>
- 12 Duarte, M. E.; Zhou, F. X.; Dutra, W. M.; Kim, S. W. 2019. Dietary supplementation of
13 xylanase and protease on growth performance, digesta viscosity, nutriente digestibility,
14 immune and oxidative stress status, and gut health of newly weaned pigs. *Animal*
15 *Nutrition* 5: 351-358. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.04.005>
- 16 Dutta, S. K and Chakraborty, S. 2015. Kinetic analysis of two-phase enzymatic hydrolysis
17 of hemicelulose of xylan type. *Bioresource Technology* 198:642–650.
18 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.066>
- 19 Figueredo, A. V.; Fialho, E. T.; Vitti, D. M. S. S.; Lopes, J. B.; Filho, J. C. S.; Teixeira, A. S.;
20 Lima, A. F. 2000. Ação da enzima fitase sobre a disponibilidade biológica do fósforo, por
21 intermédio da técnica de diluição isotópica, em dietas com farelo de arroz integral para
22 suínos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 29:177-182. [https://doi.org/10.1590/S1516-](https://doi.org/10.1590/S1516-35982000000100024)
23 [35982000000100024](https://doi.org/10.1590/S1516-35982000000100024).
- 24 Flanagan, P. R. 1984. A model to produce pure zinc deficiency in rats and its use to
25 demonstrate that dietary phytate increases the excretion of endogenous zinc. *The*
26 *Journal of Nutrition* 114:493–502. <https://doi.org/10.1093/jn/114.3.493>
- 27 Friedman, M e Brandon, D. L. 2001. Nutritional and health benefits of soy proteins.
28 *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:1069–1086.
29 <https://doi.org/10.1021/jf0009246>
- 30 Goswami, G. K.; Rawat, S. 2015. Microbial Xylanase and their applications – A review.
31 *Internacional Journal of Current Research and Academic Review* 3:436-450.

- 1 Habib, H and Fazili, K. M. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. 2007.
2 Biotechnology and Molecular Biology Review 2:68-85.
3 <https://doi.org/10.3390/ijms20061345>
- 4 Hanczakowska, E.; Świątkiewicz, M.; Kühn, I. 2012. Efficiency and dose response of
5 xylanase in diets for fattening pigs. Annals of Animal Science 12: 539.
6 [doi:10.2478/v10220-012-0045-z](https://doi.org/10.2478/v10220-012-0045-z).
- 7 Hu, C. H.; Xiao, K.; Luan, Z. S.; Song, J. 2013. Early weaning increases intestinal
8 permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates
9 mitogen-activated protein kinases in pigs. Journal of Animal Science 91: 1094-1101.
10 <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5796>
- 11 Humer, E.; Schwarz, C.; Schedle, K. 2015. Phytate in pig and poultry nutrition. J Anim
12 Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 99:605–625.
13 <https://doi.org/10.1111/jpn.12258>
- 14 Jang, J. C.; Nelson, E. G.; Bend, K.; Underwood, E. M.; Jorgensen, F. G.; Tueros, L. 2016.
15 Cartagena, Glycolytic enzymes localize to synapses under energy stress to support
16 synaptic function article glycolytic enzymes localize to synapses under energy stress to
17 support synaptic function. Neuron 90:278–291.
18 <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.011>
- 19 Jo, J. K.; Ingale, S. L.; Kim, J. S.; Kim, Y. W.; Kim, K. H.; Lohakare, J. D.; Lee, J. H.; Chae, B. J.
20 2012. Effects of exogenous enzyme supplementation to corn- and soybean meal-based
21 or complex diets on growth performance, nutrient digestibility, and blood metabolites in
22 growing pigs. Journal of Animal Science 90:3041–3048.
23 <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3430>
- 24 Juanpere, J.; Pérez-Vendrell, A. M.; Angulo, E.; Brufau, J. 2005. Assessment of potential
25 interactions between phytase and glycosidase enzyme supplementation on nutrient
26 digestibility in broilers. Poultry Science 84:571-580.
27 <https://doi.org/10.1093/ps/84.4.571>
- 28 Kiarie, E.; Romero, L. F.; Nyachoti, C. M. 2013. The role of added feed enzymes in
29 promoting gut health in swine and poultry. Nutrition Research Reviews 26:71–88.
30 <https://doi.org/10.1017/S0954422413000048>
- 31 Kiarie, E. and Petracek, R. 2015. Growth performance of nursery pigs fed pelleted wheat-
32 based diets containing graded levels of supplemental xylanase. Animal Production
33 Science 55:1548-1548. <https://doi.org/10.1071/ANv55n12Ab002>

- 1 Kato, H. 2002. Regulation of functions of vascular wall cells by tissue factor pathway
2 inhibitor-basic and clinical aspects. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*
3 22:539 - 548. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000013904.40673.CC>
- 4 KONIETZNY, U. and GREINER, R. 2004. Bacterial phytase: potential application, in vivo
5 function and regulation of its synthesis. *Brazilian Journal Microbiologic* 35:11-18.
6 <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000100002>
- 7 Kaufman, H. W.; Kleinberg, I. 1971. Effect of pH on calcium binding by phytic acid and its
8 inositol phosphoric acid derivatives and on the solubility of their calcium salts. *Archives of*
9 *Oral Biology* 16, 445-460. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(71\)90168-3](https://doi.org/10.1016/0003-9969(71)90168-3)
- 10 Kiarie, E., M. C. Walsh.; C. M. Nyachoti. 2016. Performance, digestive function and
11 mucosal responses to selected feed additives for pigs. *Journal of Animal Science* 94:169-
12 180. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9835>.
- 13 Kim, Y.; Baek, J.; Jang, K.; Kim, J.; Kim, S.; Mun, D.; Kim, B.; Kim, Y.; Park, J.; Choe, J. 2017.
14 Effects of dietary enzyme cocktail on growth performance, intestinal morphology, and
15 nutrient digestibility of weaned pigs. *Korean Journal of Agricultural Science* 44:513-518.
16 <https://doi.org/10.7744/kjoas.20170057>
- 17 Kim, S. K.; Cho, M. W.; Kim, J. S.; Jang, K. B.; Kim, S. A.; Mun, D. Y.; Kim, B.; Kim, Y.; Park, J.;
18 Choe, J.; Song, M. H. 2018 Effects of eco-friendly multi-enzyme on growth performance,
19 intestinal morphology, and nutrient digestibility of weaned pig. *Korean Journal of*
20 *Agricultural Science* 26:141-149. <http://dx.doi.org/10.11625/KJOA.2018.26.1.141>
- 21 Konietzny, U and Greiner, R. Bacterial phytase: potential application, in vivo function
22 and regulation of its synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology* 35:11-18.
23 <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000100002>
- 24 Krogdahl, A.; Hemre, G. I.; Mommsen, T. P. 2005. Carbohydrates in fish nutrition:
25 digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition* 11:103-122.
26 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00327.x>
- 27 Kumar, V.; Sinha, A. K.; Makkar, H. P. S.; Becker, K. 2010. Dietary roles of phytate and
28 phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry* 120:945-959.
29 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.052>
- 30 Lee, J. J.; Choe, J.; Kang, J.; Cho, J. H.; Park, S.; Perez-Maldonado R.; Cho, J. Y.; Park, H.; Kim,
31 H. B.; Song, M. 2020. Dietary protease improves growth rate and protein digestibility of
32 growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science and Technology* 62:313-320.
33 <https://doi.org/10.5187/jast.2020.62.3.313>

- 1 Lei, X. G.; Weaver, J. D.; Mullaney, E.; Ullah, A. H.; Azain, M. J. 2013. Phytase, a new life for
2 an 'old' enzyme. *Annual Review of Animal Biosciences* 1:283–309.
3 <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103717>
- 4 Lehnen, C. R.; Lovatto, P. A.; Andretta, I.; Kipper, M.; Hauschild, L.; Rossi, C. A. 2011. Meta-
5 analysis of ileal digestibility of amino acids and minerals in pigs fed diets containing
6 enzymes. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 46:438–445.
7 <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011000400014>
- 8 Lemme, A.; Bryden, W. L.; Ravindran, V. 2004. Heal digestibility of amino acids in feed
9 ingredients for broilers. *World's Poultry Science Journal* 60:423-438.
10 <https://doi.org/10.1079/WPS200426>.
- 11 Li, W.; Angel, R.; Kim, S.-W.; Brady, K.; Yu, S.; Plumstead P. W. 2016. Impacts of dietary
12 calcium, phytate, and nonphytate phosphorus concentrations in the presence or
13 absence of phytase on inositol hexakisphosphate (IP6) degradation in different
14 segments of broilers digestive tract. *Poultry Science*. 95:581–589.
15 <https://doi.org/10.3382/ps/pex170>
- 16 Lindberg, J. E. 2014. Fiber effects in nutrition and gut health in pigs. *Journal of Animal*
17 *Science Biotechnology*, 5:1-7. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-15>
- 18 Lingaraju, M. H. e Gowda, L. R. 2008. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens*
19 *Biochimica et Biophysica Acta* 5:850-855.
20 <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.02.013>.
- 21 Lott J. N. A.; Ockenden, I.; Raboy, V.; Batten, G.D. 2000. Phytic acid and phosphorus in
22 crop seeds and fruits: a global estimate. *Seed Science Research* 10:11-33.
23 <https://doi.org/10.1017/S0960258500000039>
- 24 Ludke, M. C. M. M.; López J.; Ludke, J. V. 2002. Phytase in diets for growing pigs: (i)
25 environmental impact. *Ciência Rural* 32:97–102. [https://doi.org/10.1590/S0103-](https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000100017)
26 [84782002000100017](https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000100017)
- 27 Manangi, M. K.; Coon, C. K. 2006. Evaluation of phytase enzyme with chicks fed basal
28 diets containing different soyabean meal samples. *Journal of Applied Poultry Research*
29 15: 292-306. <https://doi.org/10.1093/japr/15.2.292>
- 30 Min, Y.; Choi, Y.; Kim, Y.; Jeong, Y.; Kim, D.; Kim, J.; Jung, H.; Song, M. 2019. Effects of
31 protease supplementation on growth performance, blood constituents, and carcass
32 characteristics of growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science and Technology*
33 61:234-238. <https://doi.org/10.5187/jast.2019.61.4.234>
- 34 Mullaney, E.; Daly, C. B.; Ullah, A. H. J. 2000. Advance in microbial phytase research.

- 1 Advances in Applied Microbiology 47:157-199. <https://doi.org/10.1016/S0065->
2 [2164\(00\)47004-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(00)47004-8)
- 3 Mullaney, E. J.; Ullah, A. H. J. 2007. Phytases: Attributes, catalytic mechanisms and
4 applications. In Inositol Phosphates Linking Agriculture and the Environment, ed. BL
5 Turner, AE Richardson, EJ Mullaney 97–110. Cambridge, MA: CABI.
- 6 Ndou, S. P. N.; Kiarie, A.; Agyekuma, A. K.; Heo, J. M.; Romero, L. F.; Arent, S.; Lorentsend,
7 R.; Nyachotia, C. M. 2015. Comparative efficacy of xylanases on growth performance and
8 digestibility in growing pigs fed wheat and wheat bran- or corn and corn DDGS-based
9 diets supplemented with phytase. Animal Feed Science and Technology 209:230-239.
10 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.08.011>
- 11 Nordberg- Karlsson, E.; Schmitz, E.; Linares-Pastén, J. A.; Adlercreutz, P. 2018. Endo-
12 xylanases as tools for production of substituted xylooligosaccharides with prebiotic
13 properties. Applied Microbiology and Biotechnology 102:9081–9088.
14 <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9343-4>
- 15 Norgaard, J. V.; Malla, N.; Dionisio, G.; Madsen, C. K.; Pettersson, D.; Laerke, H. N.;
16 Hjortshojd, R. L.; Brinch-Pedersenb, H. 2019. Exogenous xylanase or protease for pigs
17 fed barley cultivars with high or low enzyme inhibitors Animal Feed Science and
18 Technology 248:59–66. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.12.005>
- 19 Nortey, T. N.; Patience, J. F.; Simmins, P. H.; Trottier, N. L.; Zijlstra, R. T. 2007. Effects of
20 individual or combined xylanase and phytase supplementation on energy, amino acid,
21 and phosphorus digestibility and growth performance of grower pigs fed wheat-based
22 diets containing wheat millrun. Journal of Animal Science 85:1432–43.
23 <https://doi.org/10.2527/jas.2006-613>
- 24 Nunes, E. S. S.; Cavero, B. A. S.; Filho, M. P.; Roubach, R. 2006. Enzimas digestivas
25 exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. Pesquisa Agropecuária
26 Brasileira 41:139-143. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2006000100019>
- 27 O'Dell, B. L.; Boland, A. R.; Koirtyofohn, S. R. 1972. Distribution of phytate and
28 nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains.
29 Journal of Agricultural and Food Chemistry 20:718–721.
30 <https://doi.org/10.1021/jf60181a021>
- 31 Oliveira, C. F. R e Macedo, M. L. R. 2011. Emprego de inibidores de protease vegetais
32 como ferramenta biotecnológica alternativa no controle de pragas. Perspectiva Online
33 Ciências Biológica e Saúde 1:1-11. <https://doi.org/10.25242/8868112011508>

- 1 Olukosi, O. A.; Cowieson, A. J.; Adeola, O. 2007. Age-related influence of a cocktail of
2 xylanase, amylase, and protease or phytase individually or in combination in broilers.
3 Poultry Science 86:77-86. <https://doi.org/10.1093/ps/86.1.77>
- 4 O'Shea, C. J.; McAlpine, P. O.; Solan, P.; Curran, T.; Varley, P. F.; Walsh, A. M.; Doherty, J. V.
5 O. 2014. The effect of protease and xylanase enzymes on growth performance, nutrient
6 digestibility, and manure odour in grower-finisher pigs. Animal Feed Science and
7 Technology Volume 189:88-97. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.11.012>
- 8 Park, S.; Lee, J. J.; Yang, B. M.; Cho, J. H.; Kim, S.; Kang, J.; Oh, S.; Park, D. J.; Perez-
9 Maldonado, R., Cho, J. Y.; Park, H.; Kim, H. B.; Song, M. 2020. Dietary protease improves
10 growth performance, nutrient digestibility, and intestinal morphology of weaned pigs.
11 Journal of Animal Science and Technology 62:21-30.
12 <https://doi.org/10.5187/jast.2020.62.1.21>
- 13 Passos, A. A.; Park, I.; Ferket, P.; Heimendahl, E. V.; Kim, S. W. 2015. Effect of dietary
14 supplementation of xylanase on apparent ileal digestibility of nutrients, viscosity of
15 digesta, and intestinal morphology of growing pigs fed corn and soybean meal based
16 diet. Animal Nutrition 1:19-23. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.02.006>
- 17 Payan, F.; Leone, P.; Porciero, S.; Furniss, C.; Tahir, T. A.; Williamson, G.; Manzanares, P.;
18 Gilbert, H. J.; Juge, N.; Roussel, A. 2004. The dual nature of the wheat xylanase protein
19 inhibitor XIP-1 — structural basis for the inhibition of family 10 and family 11 xylanases.
20 Journal of Biological Chemistry 279:36029–36037.
21 <https://doi.org/10.1074/jbc.M404225200>
- 22 Pan, L.; Zhao, P. F.; Yang, Z. Y.; Long, S. F.; Wang, H. L.; Tian, Q. Y.; Xu, Y. T.; Xu, X.; Zhang,
23 Z. H.; Piao, X. S. 2016. Effects of coated compound proteases on apparent total tract
24 digestibility of nutrients and apparent ileal digestibility of amino acids for pigs. Asian-
25 Australasian Journal of Animal Sciences 29:1761-1767.
26 <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.16.0041>
- 27 Paes, G.; Berrin, J.; Beaugrand, J. 2012. GH11 xylanases: Structure/function/properties
28 relationships and applications. Biotechnology Advances, 30: 564-592.
- 29 Pettersson, D and Pontoppidan, K. 2013. Soybean meal and the potential for upgrading
30 its feeding value by enzyme supplementation. INTECH Open Access
31 Publisher. <http://dx.doi.org/10.5772/52607>
- 32 Pitarch, T. A., Hermans, D., Manzanilla, E.G., Bindelle, J., Everaert, N., Beckers, Y.,
33 Torrallardona, D., Bruggeman, G., Gardiner, G.E., Lawlor, P.G., Effect of feed enzymes on

- 1 digestibility and growth in weaned pigs: A systematic review and meta-analysis. *Animal*
2 *Feed Science and Technology* 233: 145-159.
3 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.04.024>
- 4 Polizeli, M. L. T. M.; Rizzatti, A. C. S.; Monti, R.; Terenzi, H. F.; Jorge, J. A.; Amorim, D. S.
5 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied*
6 *Microbiology and Biotechnology* 67:577–591. [https://doi.org/10.1007/s00253-005-](https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7)
7 [1904-7](https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7)
- 8 Rao, M. B.; Tanksale, A. M.; Ghatge, M. S.; Deshpande, V. V. 1998. Molecular and
9 biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology*
10 *Reviews* 62:597–635. DOI: [10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998](https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998).
- 11 Rao, J. S. 2003. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases.
12 *Nature Reviews Cancer* 3:489–501. <https://doi.org/10.1038/nrc1121>
- 13 Ravindran, V.; Cabahug, S.; Ravindran, G.; Bryden, W. L. 1999. Influence of microbial
14 phytase on apparent ileal amino acid digestibility in feedstuffs for broilers. *Poultry*
15 *Science* 78:699–706. <https://doi.org/10.1093/ps/78.5.699>
- 16 Ribeiro, P. A. P.; Costa, L. S.; Rosa, P. V. 2010. Manejo alimentar em piscicultura
17 convencional. *Revista Eletrônica Nutritime*, Artigo 2:1189-1196.
- 18 Romero, L.; Parsons, C. M.; Utterback, P. L.; Plumstead, P. W.; Ravindran, R. 2013.
19 Comparative effects of dietary carbohydrases without or with protease on the ileal
20 digestibility of energy and amino acids and AMEn in Young broilers. *Animal Feed*
21 *Science and Technology* 181:35-44. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.02.001>
- 22 Rostagno, H. S.; Albino, L. F. T.; Donzele, J. L.; Gomes, P. C.; Oliveira, R. F.; Lopes, D. C.;
23 Ferreira, A. S.; Barreto, S. L. T.; Euclides, R. F. 2011 *Tabelas brasileiras para aves e*
24 *suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais*. 3 ed. Viçosa, MG:
25 Universidade Federal de Viçosa.
- 26 Rostagno, H. S.; Albino, L. F. T.; Donzele, J. L.; Gomes, P. C.; Oliveira, R. F.; Lopes, D. C.;
27 Ferreira, A. S.; Barreto, S. L. T.; Euclides, R. F. 2017. *Tabelas brasileiras para aves e*
28 *suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais*. 3.ed. Viçosa, MG:
29 Universidade Federal de Viçosa.
- 30 Sabini, E.; Wilson, K. S.; Danielsen, S.; Schulein, M.; Davies, G. J. 2001. Oligosaccharide
31 binding to family 11 xylanases: both covalent intermediate and mutant product
32 complexes display (2,5) B conformations at the active centre. *Archive of Acta*

- 1 Crystallographica Section 57:1344-1347.
2 <https://doi.org/10.1107/S0907444901010873>
- 3 Sakomura, N. K.; Vilar, S J. H.; Perazzocosta, F. G.; Fernandes, J. B. K.; Hauschild, D, L.
4 2014. Nutrição de não-ruminantes. FUNEP. Jaboticabal, Brasil.
- 5 Selle, P. H.; Ravindran, V.; Caldwell, R. A.; Bryden, W. L. 2000. Phytate and Phytase:
6 Consequences for Protein Utilization. Nutrition Research and Reviews 13:255-278.
7 <https://doi.org/10.1079/095442200108729098>
- 8 Selle, P. H.; Ravindran, V. 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. Animal Feed
9 Science and Technology 135:1-41. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.010>
- 10 Selle, P. H.; Cowieson, A. J.; Ravindran, V. 2009. Consequences of calcium interactions
11 with phytate and phytase for poultry and swine. Livestock Science 124:126-141.
12 <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.01.006>
- 13 Selle, P. H.; Cowieson, A. J.; Cowieson, N. P.; Ravindran V. 2012. Protein-phytate
14 interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. Nutrition Research Reviews
15 25:1-17. <https://doi.org/10.1017/S0954422411000151>
- 16 Shivakumar, M.; Verma, K.; Talukdar, A.; Srivastava, N.; Lal, S. K.; Sapra, R. L.; Singh, K. P.
17 2015. Genetic variability and effect of heat treatment on trypsin inhibitor content in
18 soybean [Glycine max (L.) Merrill.]. Legume Research 38:60-5.
19 <https://doi.org/10.5958/0976-0571.2015.00010.7>
- 20 Singh, B and Satyanarayana, T. 2015. Fungal phytases: characteristics and amelioration
21 of nutritional quality and growth of non-ruminants Journal of Animal Physiology and
22 Animal Nutrition 99:646-660. <https://doi.org/10.1111/jpn.12236>
- 23 Sinha, A. K.; Vikas, K.; Harinder, P. S. M.; Gudrun, D. B.; Becke, K. 2011. Non-starch
24 polysaccharides and their role in fish nutrition – A review. Food Chemistry, 127:1409–
25 1426.
- 26 Shafey, T. M.; McDonald, M. W.; Dingle, J. G. 1991. Effects of dietary calcium and available
27 phosphorus concentration on digesta pH and on the availability of calcium, iron,
28 magnesium, and zinc from the intestinal contents of meat chickens. British Poultry
29 Science 32:185–194. <https://doi.org/10.1080/00071669108417339>
- 30 Shahi, N.; Hasan, A.; Akhtar, S.; Siddiqui, M. H.; Sayeed, U.; Kalim, M.; Khan, A. 2016.
31 Xylanase: A promising enzyme. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.
32 8:334-339.

- 1 Shirley, R. B.; Edwards, H. M. 2003. Graded levels of phytase past industry standards
2 improves broiler performance. *Poultry Science* 82:671-680.
3 <https://doi.org/10.1093/ps/82.4.671>
- 4 Smith, V. H.; Tilman, G. D.; Nekola, J. C., 1999: Eutrophication: impacts of excesso nutrient
5 inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution* 100,
6 179–196. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00091-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00091-3)
- 7 Souza, C. G.; Moura, A. K. B.; Silva, J. N. P.; Soares, K. O.; Silva, J. V. C; Vasconcelos, P. C.
8 2019. Fatores antinutricionais de importância na nutrição animal: Composição e função
9 dos compostos secundários. *PUBVET* 13:1-19.
10 <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n5a327.1-19>.
- 11 Steiner, T.; Mosenthin, R.; Zimmermann, B.; Greiner, R.; Roth, S. 2007. Distribution of
12 phytase activity, total phosphorus and phytate phosphorus in legume seeds, cereals and
13 cereal by-products as influenced by harvest year and cultivar. *Animal Feed Science and*
14 *Technology* 133:320–334. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.04.007>
- 15 Tavernari, F. C.; Carvalho, T. A.; Assis, A. P.; Lima, H. J. D. 2008. Polissacarídeo não
16 amiláceo solúvel na dieta de suínos e aves. *Revista Eletrônica Nutritime* 5:673–689.
- 17 Torres-Pitarch, A.; McCormack, U. M.; Beattie, V. E.; Magowan, E.; Gardiner, G. E.; Pérez-
18 Vendrell, A. M.; Torrallardona, D.; O'Doherty, J. V.; Lawlor, P. G. 2018. Effect of phytase,
19 carbohydrase, and protease addition to a wheat distillers dried grains with solubles and
20 rapeseed based diet on in vitro ileal digestibility, growth, and bone mineral density of
21 grower-finisher pigs. *Livestock Science* 216:94–99.
22 <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.07.003>
- 23 Ullah, A. H. J.; Sethumadhavan, K. 2003. PhyA gene products of *Aspergillus niger* and
24 *Peniophora lycii* produces dissimilar phytases. *Biochemical Biophysical Research*
25 *Communications* 303:463-468. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00374-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00374-7)
- 26 Wellock, I. J.; Fortomaris, P. D.; Houdijk, J. G. M.; Wiseman, J.; Kyriazakis, I. 2008. The
27 consequences of non-starch polysaccharide solubility and inclusion level on the health
28 and performance of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*.
29 *British Journal of Nutrition* 99:520-530. <https://doi.org/10.1017/S0007114507819167>
- 30 Ward, O. P. 2011. *Comprehensive Biotechnology*. 2nd ed.
31 <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00222-1>
- 32 Wiseman, A. 1991. *Manual de biotecnología de las enzimas*. Zaragoza, Acribia.

- 1 Wu, F. Z.; M. D.; Tokach, S. S.; Dritz, J. C.; Woodworth, J. M.; DeRouchey, R. D. Goodband,
2 M. A. D.; Goncalves, J. R. 2018. Effects of dietary calcium to phosphorus ratio and
3 addition of phytase on growth performance of nursery pigs. *Journal of Animal Science*
4 96:1825-1837. <https://doi.org/10.1093/jas/sky101>
- 5 Wu G. Amino acids: biochemistry and nutrition. Boca Raton: CRC Press; 2013.
- 6 Varley, P. F.; Callan, J. J.; O'Doherty, J. V. 2011. Effect of dietary phosphorus and calcium
7 level and phytase addition on performance, bone parameters, apparent nutrient
8 digestibility, mineral and nitrogen utilization of weaner pigs and the subsequent effect
9 on finisher pig bone parameters. *Animal Feed Science and Technology* 165:201-209.
10 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.02.017>
- 11 Zeng, Z. K.; Li, Q. Y.; Tian, Q. Y.; Xu, Y. T.; Piao, X. S. 2017. The combination of
12 carbohydrases and phytase to improve nutritional value and non-starch polysaccharides
13 degradation for growing pigs fed diets with or without wheat bran. *Animal Feed Science*
14 *and Technology* 235:138-146. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.11.009>
- 15 Zier-Rush, C. E.; Groom, C.; Tillman, M.; Remus, J.; Boyd, R. D. 2016. The feed enzyme
16 xylanase improves finish pig viability and carcass feed efficiency. *Journal of Animal*
17 *Science* 94:115. <https://doi.org/10.2527/msasas2016-244>
- 18 Zhang, H.; Huang, Y.; YE, X.; XU, F. 2010. Analysis of the contribution of acid phosphatase
19 to P efficiency in *Brassica napus* under low phosphorus conditions. *Science China Life*
20 *Sciences* 53:709-17. <http://10.1007/s11427-010-4008-2>
- 21 Zhang, Z.; Tun, H. M.; Li, R.; Gonzalez, B. J. M.; Keenes, H. C.; Nyachoti, M.; Kiarie, E.;
22 Khafipour, E. 2018. The impact of xylanases on gut microbiota of growing pigs fed with
23 corn- or wheat-based diets. *Animal Nutrition* 4:339-350.
24 <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.06.007>
- 25 Zuo, J.; Ling, B.; Long, L.; Li, T.; Lahaye, L.; Yang, C.; Feng, D. 2015. Effect of dietary
26 supplementation with protease on the growth performance, nutrient utilization,
27 intestinal morphology, digestive enzymes and gene expression of weaned piglets.
28 *Animal Nutrition* 1:276-282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aninu.2015.10.003>
- 29 Zouaoui, M.; Létourneau-Montminy, M. P.; Guay, F. 2018. Effect of phytase on amino acid
30 digestibility in pig: A meta-analysis. *Animal Feed Science and Technology* 238:18-28.
31 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.01.019>
- 32 Yagi, H.; Takehara, R.; Tamaki, A.; Teramoto, K.; Tsutsui, S.; Kaneko, S. 2019. Functional
33 characterization of the GH10 and GH11 xylanases from *Streptomyces olivaceoviridis* E-

1 86 provide insights into the advantage of GH11 xylanase in catalyzing biomass
2 degradation. Journal of Applied Glycoscience 66:29–35.
3 https://doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2018_0008.
4 Yin, Y. L.; Baidoo, S. K.; Jin, L. Z.; Liu, Y. G.; Schulze, H.; Simmins, P. H. 2001. The effect of
5 different carbohydrase and protease supplementation on apparent (ileal and overall)
6 digestibility of nutrients of five hulless barley varieties in young pigs. Livestock
7 Production Science 71:109–120. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(01\)00215-9](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00215-9)
8

1 **Xilanase, fitase e protease isoladas e associadas em dietas com ajustes**
2 **nutricionais para suínos dos 30 aos 100 kg**

3
4 **RESUMO:** Realizou-se este estudo com o objetivo de avaliar a inclusão da xilanase,
5 fitase e protease isoladas e associadas na dieta de suínos machos castrados dos 30 aos
6 100 kg sobre o desempenho e as características quantitativas de carcaça. Foram
7 utilizados 120 suínos machos castrados, híbridos comerciais, distribuídos delineamento
8 em blocos ao acaso, com seis dietas (controle positivo (CP): dieta formulada para
9 atender às exigências nutricionais e sem enzimas; xilanase: dieta com xilanase e ajuste
10 da matriz nutricional; protease: dieta com protease e ajuste da matriz nutricional; fitase:
11 dieta com fitase e ajuste da matriz nutricional; blend: dieta com xilanase, protease e
12 fitase associadas com os ajustes da matriz nutricional; e controle negativo (CN): dieta
13 sem enzimas mantendo os ajustes nutricionais da dieta blend), com dez repetições de
14 dois animais por unidade experimental. Dietas contendo xilanase, protease, fitase e o
15 blend proporcionaram desempenho e características de carcaça similares à dieta CP.
16 Concluiu-se que é possível reduzir os níveis nutricionais das dietas com a inclusão de
17 xilanase, protease, fitase isoladas ou associadas sem prejudicar o desempenho e as
18 características de carcaça dos suínos.

19
20 **Palavras-chave:** aminoácidos, energia, enzimas, fósforo, matriz nutricional

21

1
2 **Xylanase, phytase and protease isolated and associated in diets with**
3 **nutritional adjustments for barrows from 30 to 100 kg**
4

5 **ABSTRACT:** The objective of this study was to evaluate the inclusion of isolated
6 and associated xylanase, phytase and protease on the performance and carcass traits in
7 the diet of barrows from 30 to 100 kg. A total of 120 animals were distributed in a
8 randomized block design, with six diets (positive control (PC): diet formulated to meet
9 nutritional requirements and without enzymes; xylanase: diet with xylanase and
10 adjustment of the nutritional matrix; protease: diet with protease and adjustment of the
11 nutritional matrix; phytase: diet with phytase and adjustment of the nutritional matrix;
12 blend: diet with xylanase, protease and phytase associated with the adjustments of the
13 nutritional matrix; and negative control (NC): diet without enzymes maintaining
14 nutritional adjustments of the blend diet), with ten replicates of two animals per
15 experimental unit. Diets containing xylanase, protease, phytase and the blend provided
16 performance and carcass characteristics similar to the PC diet. It was concluded that it is
17 possible to reduce the nutritional levels of the diets with the inclusion of xylanase,
18 protease, complete or associated phytase without prejudice to performance and as
19 carcass characteristics of pigs.

20
21 **Keywords:** amino acids, energy, enzymes, nutritional matrix, phosphorus
22

Introdução

Ingredientes utilizados na nutrição de suínos possuem fatores antinutricionais, que reduzem ou impedem a utilização dos nutrientes (Jayasena e Jo, 2013). Tem-se evidenciado que enzimas exógenas adicionadas às dietas de suínos podem minimizar os efeitos de fatores antinutricionais como os polissacarídeos não amiláceos (PNA's) (Ndou et al., 2015) e fitato (Varley et al., 2011).

As enzimas também podem aumentar a digestibilidade, diminuir a excreção de nutrientes e minimizar a poluição ambiental (Varley et al., 2011; Childers et al., 2011), bem como manter o desempenho dos animais alimentados com dietas contendo menor concentração de nutrientes (Wu et al., 2018), além de reduzir os custos com alimentação (Li et al., 2014; Bavaresco et al 2020).

Mesmo que dietas formuladas a base de milho e farelo de soja contenham menores quantidades de PNA's (Rostagno et al., 2017) quando comparadas com alguns alimentos fibrosos, existem estudos que demonstram que a inclusão de xilanase em dietas com milho e farelo de soja melhora a digestibilidade da proteína e do amido (Petry et al., 2019).

Além disso, minerais e outros nutrientes contidos em ingredientes de origem vegetal se apresentam aprisionados à molécula de ácido fítico, no qual aproximadamente 70% do fósforo encontra-se indisponível (Silva et al., 2006; Rostagno et al., 2011). O ácido fítico ainda possui capacidade de se ligar a importantes nutrientes, como o fósforo (P) e cálcio (Ca), comprometendo seu aproveitamento e absorção (Selle et al., 2009), sendo que esses efeitos podem ser reduzidos com a inclusão de fitase nas dietas (Bradbury et al., 2016).

1 As proteases hidrolisam as proteínas de armazenamento dos vegetais, e atuam
2 sobre os fatores antinutricionais como as antiproteases que são responsáveis por
3 reduzirem a utilização das proteínas (Rao et al., 2004), melhorando dessa forma a
4 digestibilidade dos nutrientes em dietas a base de milho e farelo de soja para suínos
5 (Pan et al., 2016).

6 Contudo, há diversos estudos avaliando a utilização de enzimas na nutrição dos
7 suínos, porém a maior parte avalia o efeito das enzimas isoladamente.

8 Dessa forma, considerando que a xilanase, fitase, a protease são as principais
9 enzimas aplicadas na nutrição de suínos e que realizar um estudo visando comparações
10 individuais e a avaliação da associação dessas enzimas nas fases de crescimento e
11 terminação poderá gerar novas informações que possibilitem estabelecer estratégias
12 quanto a sua utilização. Portanto, realizou-se este estudo com o objetivo de avaliar a
13 inclusão da xilanase, fitase e protease de forma isolada e associadas, na dieta de suínos
14 machos castrados dos 30 aos 100 kg sobre desempenho e características de carcaça.

15

16

Material e Métodos

17

18 O experimento foi conduzido no Setor de Suinocultura da Fazenda Escola, da
19 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Mato Grosso
20 do Sul, localizada no município de Terenos – MS (20º 26' 32"S, 54º 51' 37"O). O projeto
21 foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais, sob protocolo nº875/2017 -
22 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

23

24

25

Os animais foram alojados em galpão de alvenaria coberto com telhas cerâmicas e laterais teladas. Cada baia era equipada com um comedouro e um bebedouro, com área disponível de 1,0 m² por animal, providas de lâmina d'água.

1 Foram utilizados 120 suínos machos castrados, híbridos comerciais, com peso
2 inicial de $28,07 \pm 0,682$ kg, distribuídos em delineamento em blocos ao acaso, com seis
3 dietas sendo controle positivo (CP): dieta formulada para atender às exigências
4 nutricionais e sem enzimas; xilanase: dieta com xilanase e redução de 100 Kcal de EM
5 kg^{-1} ; protease: dieta com protease e redução de 25,0 Kcal de EM kg^{-1} + 0,5% de proteína
6 bruta + redução de lisina, metionina + cistina, treonina, triptofano e valina digestíveis
7 em 0,0321%, 0,024%, 0,0208, 0,005% e 0,026%, respectivamente; fitase: dieta com
8 fitase e redução de 70,5 Kcal de EM kg^{-1} + redução da lisina, metionina + cistina, treonina,
9 triptofano e valina digestíveis em 0,015%, 0,0105%, 0,0095%, 0,006% e 0,007%,
10 respectivamente + redução do cálcio, fósforo e sódio em 0,190%, 0,152% e 0,0019%,
11 respectivamente; blend: dieta com xilanase, protease e fitase associadas com redução de
12 150 kcal de EM kg^{-1} + redução de lisina, metionina + cistina, treonina, triptofano e valina,
13 da proteína bruta e dos minerais cálcio, fosforo e sódio resultante da soma das reduções
14 das dietas xilanase, protease e fitase; e controle negativo (CN): dieta sem enzimas
15 mantendo a soma das reduções nutricionais da dieta blend; contendo dez repetições de
16 dois animais por unidade experimental. As matrizes nutricionais das enzimas foram
17 consideradas conforme recomendação dos fabricantes. Adotou-se o peso inicial como
18 critério de formação dos blocos.

19 As dietas experimentais (Tabela 4, 5 e 6) foram elaboradas à base de milho e
20 farelo de soja para suínos machos castrados, de alto potencial genético com desempenho
21 médio, seguindo-se as recomendações das exigências nutricionais das fases (30 aos 50
22 kg, dos 50 aos 70 kg e 70 aos 100 kg) propostas por Rostagno et al. (2011). As enzimas
23 comerciais Natugrain (xilanase) oriunda do microrganismo *Aspergillus niger*,
24 Poultrygrow 250 (protease) oriunda do microrganismo *Streptomyces* e Natuphos® E
25 (fitase) oriunda do microrganismo *Aspergillus niger* o e seus respectivos níveis de

- 1 inclusão foram fixados em 100 g t⁻¹ de xilanase (BXU kg⁻¹), 100 g t⁻¹ de fitase (1.000 FTU
- 2 kg⁻¹) e 125 g t⁻¹ de protease (U kg⁻¹).

3

1 Tabela 4 - Composições centesimal e nutricional das dietas experimentais para suínos machos
 2 castrados dos 30 aos 50 kg

Ingredientes	Dietas ¹					
	CP	Xilanase	Protease	Fitase	Blend	CN
Milho grão, 7,86%	74,33	74,33	74,33	74,33	74,33	74,33
F. soja, 46,5%	18,63	18,63	18,63	18,63	18,63	18,63
Óleo de soja	1,205	0,000	1,268	0,388	0,000	0,000
Fosfato bicálcico	1,172	1,172	1,172	0,079	0,079	0,079
Carbonato de cálcio	0,649	0,649	0,649	0,839	0,839	0,839
L-Lisina HCl	0,375	0,375	0,334	0,356	0,314	0,314
Sal comum	0,425	0,425	0,425	0,421	0,421	0,421
Premix vit+min ²	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
Inerte (caulim)	2,389	3,584	2,421	4,165	4,622	4,654
L-Treonina	0,123	0,123	0,102	0,113	0,092	0,092
DL-Metionina	0,100	0,100	0,076	0,090	0,066	0,066
L-Triptofano	0,016	0,016	0,011	0,010	0,005	0,005
L- Valina	0,016	0,016	0,000	0,008	0,000	0,000
Xilanase	0,000	0,010	0,000	0,000	0,010	0,000
Protease	0,000	0,000	0,0125	0,000	0,0125	0,000
Fitase	0,000	0,000	0,000	0,010	0,010	0,000
Aditivos ³	0,420	0,420	0,420	0,420	0,420	0,420
Valores nutricionais calculados ⁴						
Proteína bruta, %	15,00	15,00	14,42	14,97	14,88	14,88
Energia Met, Kcal	3.230	3.130	3.205	3.160	3.080	3.080
Lisina dig, %	0,907	0,907	0,875	0,892	0,860	0,860
Met+Cis dig, %,	0,535	0,535	0,511	0,525	0,501	0,501
Treonina dig, %	0,590	0,590	0,569	0,581	0,560	0,560
Triptofano dig, %	0,163	0,163	0,158	0,157	0,152	0,152
Valina dig, %	0,626	0,626	0,610	0,618	0,610	0,610
Cálcio, %	0,627	0,627	0,627	0,435	0,435	0,435
Fósforo dig %,	0,295	0,295	0,295	0,143	0,143	0,143
Sódio, %	0,180	0,180	0,180	0,178	0,178	0,178

3 ¹Dietas: Controle positivo (CP); Controle negativo (CN) sem adição de enzimas; Blend: inclusão de xilanase + protease + fitase;
 4 Xilanase: dieta com xilanase; Protease: dieta com protease; Fitase: dieta com fitase. ²Conteúdo por kg de produto: vitamina A (min):
 5 5.000.000 UI, vitamina D3 (min): 1.000.000 UI, vitamina E (min): 25.000 UI/kg, vitamina K3 (min): 3.000 mg/kg, vitamina B1 (min):
 6 1.500 mg/kg, vitamina B2 (min): 4.000 mg/kg, vitamina B6 (min): 1.500 mg/kg, vitamina B12 (min): 18.000 mg/kg, niacina (min):
 7 18g/kg, ácido pantotênico (min): 9.200 mg/kg, ácido fólico (min): 500 mg/kg, selênio (min): 300 mg/kg, ferro (min): 100 g/kg,
 8 cobre (min): 30 g/kg, Manganês (min): 80 g/kg, zinco (min): 160 g/kg, iodo (min): 2000 mg/kg ³Aditivos: Tiamulina: 0,050 g/kg;
 9 Lincomicina: 0,020 g/kg; Adsorvente: 0,100 g/kg e Acidificante: 0,250 g/kg. ⁴Valores calculados com base na composição nutricional
 10 das matérias-primas (Rostagno et al., 2011).⁵ Valores considerando valorização nutricional de cada enzima.
 11

1 Tabela 5 - Composições centesimal e nutricional das dietas experimentais de suínos machos
 2 castrados dos 50 aos 70 kg

Ingredientes	Dietas ²					
	CP	Xilanase	Protease	Fitase	Blend	CN
Milho grão 7,86 %	76,02	76,02	76,02	76,02	76,02	76,02
F. soja, 46,5 %	17,18	17,18	17,18	17,18	17,18	17,18
Óleo de soja	1,205	0,000	1,195	0,382	0,000	0,000
Fosfato bicálcico	0,820	0,820	0,820	0,000	0,000	0,000
Carbonato de cálcio	0,567	0,567	0,567	0,594	0,594	0,594
L-Lisina HCL	0,287	0,287	0,245	0,267	0,226	0,226
Sal comum	0,400	0,400	0,400	0,396	0,396	0,396
Premix vit+min ¹	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
Inerte (caulim)	3,118	4,324	3,208	4,774	5,220	5,252
L-Treonina	0,073	0,073	0,052	0,063	0,042	0,042
DL-Metionina	0,051	0,051	0,027	0,041	0,016	0,016
L-Triptofano	0,006	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000
Xilanase	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000
Protease	0,000	0,000	0,0125	0,000	0,0125	0,000
Fitase	0,000	0,000	0,000	0,010	0,010	0,000
Aditivos ³	0,120	0,120	0,120	0,120	0,120	0,120
Valores nutricionais calculados ⁴						
Proteína bruta, %	14,30	14,30	13,8	14,27	14,08	14,08
Energia Met, Kcal	3.230	3.130	3.205	3.160	3.080	3.080
Lisina dig, %	0,804	0,804	0,772	0,789	0,757	0,757
Met+Cis dig, %,	0,474	0,474	0,450	0,464	0,440	0,440
Treonina dig, %	0,523	0,523	0,502	0,514	0,493	0,493
Triptofano dig, %	0,145	0,145	0,140	0,157	0,139	0,139
Valina dig, %	0,587	0,587	0,562	0,579	0,554	0,554
Cálcio, %	0,503	0,503	0,503	0,313	0,313	0,313
Fósforo dig %,	0,244	0,244	0,244	0,114	0,114	0,114
Sódio, %	0,170	0,170	0,170	0,168	0,168	0,168

3 ¹Dietas: Controle positivo (CP); Controle negativo (CN) sem adição de enzimas; Blend: inclusão de xilanase + protease + fitase;
 4 Xilanase: dieta com xilanase; Protease: dieta com protease; Fitase: dieta com fitase. ²Conteúdo por kg de produto: vitamina A (min):
 5 5.000.000 UI, vitamina D3 (min): 1.000.000 UI, vitamina E (min): 25.000 UI/kg, vitamina K3 (min): 3.000 mg/kg, vitamina B1 (min):
 6 1.500 mg/kg, vitamina B2 (min): 4.000 mg/kg, vitamina B6 (min): 1.500 mg/kg, vitamina B12 (min): 18.000 mg/kg, niacina (min):
 7 18g/kg, ácido pantatênico (min): 9.200 mg/kg, ácido fólico (min): 500 mg/kg, selênio (min): 300 mg/kg, ferro (min): 100 g/kg,
 8 cobre (min): 30 g/kg, Manganês (min): 80 g/kg, zinco (min): 160 g/kg, iodo (min): 2000 mg/kg ³Aditivos: Tiamulina: 0,050 g/kg;
 9 Lincomicina: 0,020 g/kg; Adsorvente: 0,100 g/kg e Acidificante: 0,250 g/kg. ⁴Valores calculados com base na composição nutricional
 10 das matérias-primas (Rostagno et al., 2011).⁵ Valores considerando valorização nutricional de cada enzima.
 11

1 Tabela 6 - Composições centesimal e nutricional das dietas experimentais de suínos machos
 2 castrados dos 70 aos 100 kg

Ingredientes	Dietas ²					
	CP	Xilanase	Protease	Fitase	Blend	CN
Milho grão 7,86 %	79,98	79,98	79,98	79,98	79,98	79,98
F. soja, 46,5 %	13,03	13,03	13,03	13,03	13,03	13,03
Óleo de soja	1,205	0,000	1,257	0,382	0,000	0,000
Fosfato bicálcico	0,690	0,690	0,690	0,000	0,000	0,000
Carbonato de cálcio	0,551	0,551	0,551	0,746	0,746	0,746
L-Lisina HCL	0,305	0,305	0,264	0,286	0,244	0,244
Sal comum	0,376	0,376	0,376	0,372	0,372	0,372
Premix vit+min ¹	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
Inerte (caulim)	3,558	4,763	3,586	4,915	5,368	5,400
L-Treonina	0,087	0,087	0,066	0,077	0,056	0,056
DL-Metionina	0,046	0,046	0,021	0,035	0,011	0,011
L-Triptofano	0,012	0,012	0,007	0,007	0,001	0,001
Xilanase	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000
Protease	0,000	0,000	0,0125	0,000	0,0125	0,000
Fitase	0,000	0,000	0,000	0,010	0,010	0,000
Aditivo ³	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010

Valores nutricionais calculados⁴

Proteína bruta, %	12,71	12,71	12,14	12,68	12,48	12,48
Energia Met, Kcal/kg	3.230	3.130	3.205	3.160	3.080	3.080
Lisina dig, %	0,718	0,718	0,686	0,703	0,671	0,671
Met+Cis dig, %,	0,431	0,431	0,407	0,421	0,397	0,397
Treonina dig, %	0,481	0,481	0,460	0,472	0,451	0,451
Triptofano dig, %	0,129	0,129	0,124	0,123	0,118	0,118
Valina dig, %	0,516	0,516	0,491	0,508	0,483	0,483
Cálcio, %	0,451	0,451	0,451	0,360	0,360	0,360
Fósforo dig %,	0,219	0,219	0,219	0,123	0,123	0,123
Sódio, %	0,160	0,160	0,160	0,158	0,158	0,158

¹Dietas: Controle positivo (CP); Controle negativo (CN) sem adição de enzimas; Blend: inclusão de xilanase + protease + fitase; Xilanase: dieta com xilanase; Protease: dieta com protease; Fitase: dieta com fitase. ²Conteúdo por kg de produto: vitamina A (min): 5.000.000 UI, vitamina D3 (min): 1.000.000 UI, vitamina E (min): 25.000 UI/kg, vitamina K3 (min): 3.000 mg/kg, vitamina B1 (min): 1.500 mg/kg, vitamina B2 (min): 4.000 mg/kg, vitamina B6 (min): 1.500 mg/kg, vitamina B12 (min): 18.000 mg/kg, niacina (min): 18g/kg, ácido pantotênico (min): 9.200 mg/kg, ácido fólico (min): 500 mg/kg, selênio (min): 300 mg/kg, ferro (min): 100 g/kg, cobre (min): 30 g/kg, Manganês (min): 80 g/kg, zinco (min): 160 g/kg, iodo (min): 2000 mg/kg ³Aditivos: Tiamulina: 0,050 g/kg; Lincomicina: 0,020 g/kg; Adsorvente: 0,100 g/kg e Acidificante: 0,250 g/kg. ⁴Valores calculados com base na composição nutricional das matérias-primas (Rostagno et al., 2011). ⁵Valores considerando valorização nutricional de cada enzima.

3
4
5
6
7
8
9
10
11

1 Os ajustes nutricionais foram realizados com as inclusões das enzimas em
2 substituição ao material inerte (caulim), mantendo o percentual do milho e do farelo de
3 soja constantes e variando a inclusão percentual dos demais ingredientes nas dietas. Os
4 animais receberam as dietas a vontade dos 30 aos 100 kg e o período experimental teve
5 duração de 84 dias.

6 A temperatura ambiente e a umidade relativa do ar foram registradas
7 diariamente, às 08:00 e 16:00 horas, por meio de um conjunto de termômetros de bulbo
8 seco, bulbo úmido e globo negro, instalados no centro do galpão, a altura do corpo dos
9 animais. Determinou-se o índice de temperatura de globo negro e umidade (ITGU) de
10 acordo com Buffington et al. (1977).

11 As variáveis de desempenho estudadas foram o peso final (PF), consumo de ração
12 diário (CRD), proteína bruta (CPBd), lisina digestível (CLISd), energia metabolizável
13 (CEMd), ganho de peso diário (GPD) e conversão alimentar (CA).

14 As pesagens dos animais foram realizadas no início e no final de cada fase do
15 período experimental. Foram quantificados diariamente as sobras e desperdícios de
16 ração (kg) para quantificação do CRD. O GPD foi obtido pela diferença entre o PF e PI dos
17 suínos por ocasião do início do experimento, dividido pelo número de dias.

18 Os CPBd, CLISd e CEMd, foram obtidos por meio da multiplicação CRD (kg) no
19 período pelos respectivos conteúdos em cada dieta considerando o aporte de nutriente
20 das enzimas. A CA foi calculada considerando-se o CRD dividido pelo ganho de peso no
21 período experimental.

22 Após a pesagem final os animais foram submetidos a jejum de alimentos sólidos
23 de oito horas. Posteriormente, foram transportados para o frigorífico, onde
24 permaneceram em baias de repouso por quatro horas. Em seguida foram abatidos de

1 acordo com os padrões de manejo e procedimentos de abate em vigor estabelecidos pela
2 legislação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

3 Ao final da linha de abate e antes do resfriamento as carcaças foram pesadas para
4 obtenção PCQ e separadas em duas metades por um corte longitudinal na linha dorso-
5 lombar, que corresponde à coluna vertebral. Na 13^a costela, foram mensuradas a ET, CM
6 e PM *Longissimus dorsi*, com o auxílio da pistola Hennessy Grading System. As variáveis
7 de carcaça analisadas foram o peso de carcaça quente (PCQ), espessura de toucinho
8 (ET), porcentagem e quantidade de carne magra (CM), profundidade do músculo
9 *Longissimus dorsi* (PM) e índice de bonificação de carcaça (IB).

10 A porcentagem e quantidade de CM na carcaça foi determinada por meio da
11 equação proposta por Bridi e Silva (2007): $CM (\%) = 60 - (ET \times 0,58) + (PM \times 0,10)$; CM
12 (kg): $PCQ \times CM (\%) / 100$. O IB foi calculado por meio da equação: $IB = 23,6 + (0,286 \times$
13 $PCQ) + (CM, \%)$, propostas por Bridi e Silva (2007).

14 As variáveis estudadas foram submetidas à análise de variância pelo procedimento
15 GLM do programa Statistical Analysis System (SAS, 2009). Foi utilizado o modelo
16 estatístico:

$$17 \quad Y_{ij}: \mu + d_i + b_j + e_{ij}$$

18 onde: Y_{ij} = estimativa das variáveis estudadas; μ = média geral; d_i = efeito da i-ésima
19 dieta; b_j = efeito do bloco j; e_{ij} = erro aleatório associado a observação Y_{ij} . O teste Scheffé
20 foi utilizado para comparação entre as dietas. Os contrastes estudados foram: C1: CP x
21 CN; C2: CP x Xilanase; C3: CP x Protease; C4: CP x Fitase; C5: CP x Blend; C6: Blend x
22 Xilanase + Protease + Fitase e C7: Blend x CN. Adotou-se o nível de 5% de significância.

23

Resultados

A temperatura média de globo negro calculada durante o período experimental foi de $31,13 \pm 0,60$ °C e o ITGU médio calculado foi de $79,07 \pm 4,66$, com umidade relativa do ar de $73,66 \pm 2,21\%$.

Suíños alimentados com dieta CP apresentaram melhores valores ($P < 0,05$) de PF, CLISd, GPD e CA em comparação com a dieta CN (Tabela 7). Não houve diferença ($P > 0,05$) para nenhuma das variáveis de desempenho avaliadas entre os animais que foram alimentados com CP e com as dietas contendo as enzimas isoladas e associadas (C2, C3, C4 e C5), assim como entre as dietas blend e enzimas isoladas (C6). Animais alimentados com a dieta Blend apresentaram maior ($P < 0,05$) PF, CRD, CLISd, CEMd e GPD e melhor ($P < 0,05$) CA em relação aqueles alimentados com a dieta CN (C7).

Constatou-se melhores ($P < 0,05$) PCQ, CM, QCM e IB (C1) para suínos alimentados com a dieta CP quando comparados aqueles alimentados com a dieta CN. Não foi observado efeito ($P > 0,05$) para as variáveis de carcaça entre as dietas CP e as dietas contendo as enzimas isoladas e associadas (C2, C3, C4 e C5), exceto para a CM ($P < 0,05$) no C4, em que a dieta fitase proporcionou maior porcentagem de carne magra nas carcaças dos animais em comparação com os alimentados com dieta CP.

Animais que receberam a dieta blend (C6 e C7) apresentaram aumento da ET ($P < 0,05$) em comparação aqueles alimentados com as dietas contendo as enzimas isoladas e CN. Foi observado redução ($P < 0,05$) do CM e IB do blend em comparação a enzimas isoladas. Foi observado aumento ($P < 0,05$) do PCQ, CM e QCM dos animais alimentados com a dieta blend em comparação aqueles alimentados com CN (C7).

1 Tabela 7– Desempenho de suínos, machos castrados, dos 30 aos 100 kg alimentados com dietas contendo xilanase, protease, fitase isoladas ou
2 associadas

Dietas*	Variáveis**							
	PI, kg	PF, kg	CRD, kg	CPBd, g	CLISd, g	CEMd, g	GPD, kg	CA
Controle Positivo	28,80	107,81	2,64	345,50	19,83	8,10	1,098	2,41
Xilanase	28,81	107,82	2,68	351,99	19,52	7,99	1,096	2,45
Protease	27,70	104,13	2,58	332,01	19,09	8,04	1,081	2,39
Fitase	27,13	101,82	2,57	335,21	18,92	7,72	1,053	2,45
Blend	27,68	103,14	2,72	354,60	19,46	8,06	1,070	2,55
Controle Negativo	28,34	90,85	2,51	331,49	17,59	7,48	0,855	2,96
CV (%) ¹	18,86	9,28	9,12	9,52	9,59	9,47	7,18	10,1
	Contrastes ortogonais ²							
C1 (CP x CN)		0,000	0,250	0,383	0,014	0,089	<,000	<,000
C2 (CP x Xilanase)		0,959	0,924	0,919	0,898	0,559	0,937	0,840
C3 (CP x Protease)		0,315	0,672	0,553	0,572	0,935	0,059	0,995
C4 (CP x Fitase)		0,149	0,637	0,730	0,469	0,431	0,057	0,602
C5 (CP x Blend)		0,143	0,350	0,277	0,935	0,751	0,409	0,178
C6 (Blend x Xilanase+Protease+Fitase)		0,398	0,137	0,091	0,559	0,344	0,838	0,167
C7 (Blend x CN)		0,021	0,039	0,052	0,010	0,043	<,000	0,002

3 *Controle positivo; Xilanase: redução de 100 Kcal de EM kg ração⁻¹; Fitase: controle + inclusão 100 g/t de fitase (1000 FTU / kg); Protease: controle + inclusão de
4 125 g/t de protease (U / kg); Blend: dieta contendo xilanase + protease + fitase; Controle negativo: sem adição de enzimas.

5 **PI: peso inicial; PF: peso final; CRD: consumo diário de ração; CPBd: consumo de proteína bruta diário; CLISd: consumo de lisina digestível diário; CEMd:
6 consumo de energia metabolizável diário; GPD: ganho de peso diário; CA: conversão alimentar.

7 ¹CV = coeficiente de variação; ²P<0,05 é significativo para análise de contrastes ortogonais ao teste de Scheffé.

Tabela 8 – Características de carcaça de suínos, machos castrados, alimentados dos 30 aos 100 kg alimentados com dietas contendo xilanase, protease, fitase isoladas ou associadas

Dietas*	Variáveis**					
	PCQ, kg	ET, mm	PM, mm	CM, %	QCM, kg	IB, %
Controle Positivo	84,56	16,77	51,07	55,38	46,68	103,16
Xilanase	84,00	15,39	58,30	56,91	47,75	104,53
Protease	80,47	15,68	58,20	56,73	45,65	103,34
Fitase	80,42	13,69	56,40	57,70	46,39	104,30
Blend	80,66	17,76	56,35	55,33	47,78	101,99
Controle Negativo	66,52	13,57	54,15	57,55	38,37	100,17
CV (%) ¹	7,88	23,92	15,74	3,79	8,53	2,80
Contrastes ortogonais ²						
C1 (CP x CN)	<,0001	0,075	0,496	0,037	<,0001	0,047
C2 (CP x Xilanase)	0,932	0,376	0,094	0,117	0,384	0,220
C3 (CP x Protease)	0,213	0,583	0,084	0,207	0,639	0,867
C4 (CP x Fitase)	0,332	0,097	0,181	0,029	0,831	0,290
C5 (CP x Blend)	0,151	0,582	0,302	0,898	0,239	0,322
C6 (Blend x Xilanase+Protease+Fitase)	0,359	0,049	0,455	0,024	0,083	0,025
C7 (Blend x CN)	<,0001	0,020	0,794	0,026	0,002	0,285

*Controle positivo; Xilanase: redução de 100 Kcal de EM kg ração⁻¹; Fitase: controle + inclusão 100 g/t de fitase (1000 FTU / kg); Protease: controle + inclusão de 125 g/t de protease (U / kg); Blend: dieta contendo xilanase + protease + fitase; Controle negativo: sem adição de enzimas.

**PCQ: peso de carcaça quente; ET: espessura de toucinho; PM: profundidade de músculo; CM: carne magra; QCM: quantidade carne magra em kg IB: índice de bonificação.

¹CV = coeficiente de variação; ²P<0,05 é significativo para análise de contrastes ortogonais ao teste de Scheffé.

Discussão

O ITGU durante o período experimental foi acima ao registrado para ambiente de estresse por calor de 66,9 (Orlando et al., 2006). Dessa forma, pode-se inferir que os animais, em alguns momentos, não estiveram totalmente em zona de conforto térmico. No entanto, o desempenho dos animais não foi prejudicado pelas temperaturas ambientais elevadas quando comparado aos padrões estabelecidos pelas tabelas brasileiras (Rostagno et al., 2017), provavelmente pela presença de lâmina d'água nas baias e também pela baixa densidade de criação, permitindo que os animais fizessem a troca de calor de forma eficiente.

A melhora observada no PF, GPD e CA dos animais alimentados com a dieta CP em relação a dieta CN pode ser explicada considerando que a dieta CP apresentou maior densidade nutricional, uma vez que foi formulada para atender as exigências nutricionais dos suínos. Além disso, pode-se inferir que a igualdade de respostas de desempenho e carcaça entre CP e as dietas com as enzimas adicionadas de forma isolada ou associadas foi consequência do incremento da digestibilidade nas dietas com menores níveis nutricionais a partir da ação das enzimas.

Estes resultados indicam que a inclusão das enzimas exógenas às dietas beneficiou o desempenho dos suínos, considerando sua capacidade em degradar compostos antinutricionais que dificultam a digestão dos nutrientes (Ruiz et al., 2008), mesmo numa dieta baseada em milho e farelo de soja, considerados como alimentos de alta qualidade.

A igualdade de respostas de animais alimentados com as dietas, observada nos contrastes C1, C2, C3, C4, C5 e C6, evidencia o fato de que suínos alimentados com dietas com reduções nutricionais e suplementadas com enzimas não foram

prejudicados em relação ao CRD, CLISd, CPBd e CEMd, uma vez que a densidade energética da dieta pode influenciar o consumo voluntário dos animais (Quiniou e Noblet, 2012), demonstrando que as enzimas exógenas isoladas ou associadas foram capazes de disponibilizar nutrientes e energia dos ingredientes das dietas conforme evidenciado por Ruiz et al. (2008). Resultados semelhantes foram observados por Park et al. (2003) e Silva et al. (2013) que não identificaram diferenças no CRD para suínos nas fases de crescimento e terminação quando alimentados com complexos enzimáticos em dietas a base de milho e farelo de soja.

Para a dieta CN, esperava-se maior CRD dos animais em relação àqueles alimentados com as dietas contendo enzimas associadas, uma vez que, suínos alimentados com dietas com menor densidade nutricional, principalmente de energia, necessita consumir mais alimento para suprir suas necessidades (Gonçalves et al., 2015). No entanto, este efeito não foi observado no presente estudo.

O maior CRD observado pelos animais que consumiram a dieta blend em relação a CN pode ser explicado pelo fato de que suínos em crescimento e terminação possuem pH mais ácido no estômago beneficiando a produção de enzimas endógenas como a pepsina, o que pode ter prejudicado a atividade do complexo enzimático (xilanase+protease+fitase), ocasionando a desnaturação parcial dessas enzimas e conseqüentemente, reduzindo sua ação no trato gastrointestinal (Ruiz et al., 2008), resultando em maior consumo de ração pelos animais, para atender suas exigências.

Além disso, repostas semelhantes entre a dieta CP e com enzimas isoladas ou na forma de blend, demonstram que é possível reduzir o nível energético nas fases de crescimento e terminação em até 150 kcal de EM, 0,15% no total dos

aminoácidos lisina, met + cis, treonina, triptofano e valina, 0,096% de P, 0,091% de Ca e 0,002% de Na, sem prejudicar o desempenho dos suínos desde que essas enzimas sejam utilizadas. Esse efeito pode estar relacionado ao fato de que a adição de enzimas na dieta de suínos possibilita menor gasto energético para a produção de enzimas endógenas, e desta forma a energia é aproveitada para melhora do desempenho.

Neste sentido a inclusão de xilanase nas dietas pode ter melhorado a digestibilidade dos nutrientes do milho e farelo de soja por meio da ação sobre os PNA's, favorecendo a absorção de nutrientes (Willamil et al., 2012).

Mesmo que o milho possua alta digestibilidade para os suínos, há diferenças na digestibilidade do amido, e acredita-se que isso está relacionado aos fatores antinutricionais, principalmente quanto ao conteúdo de PNA's que pode ocasionar limitação no aproveitamento de nutrientes, diminuindo a disponibilidade de energia oriunda da dieta (Cowieson et al., 2010) e, portanto, qualquer aumento percentual na digestibilidade dos nutrientes é válida, sendo que este propósito pode ser alcançado por meio da xilanase.

A xilanase pode aumentar a digestibilidade de nutrientes energéticos como o amido e a gordura, por reduzir os efeitos dos PNA's, permitindo que as enzimas endógenas tenham acesso a seus substratos (Adeola e Bedford, 2004). A melhora na utilização de energia se dá pela mudança na absorção de nutrientes que ocorre em maior quantidade no intestino delgado, diminuindo a competição pelos microrganismos, concentrando os nutrientes no órgão onde há maior possibilidade de absorção (Adeola e Cowieson, 2011).

O mecanismo de ação da xilanase em dietas para suínos sugere reduzir a viscosidade da digesta na borda em escova do intestino delgado gerando melhora

digestibilidade da matéria seca, energia, fibra, através da hidrólise dos PNA's, facilitando dessa forma a ação das enzimas endógenas e possibilitando maior aproveitamento de nutrientes (Passos et al., 2015; Duarte et al., 2019).

No mesmo sentido, pode-se inferir que o complexo enzimático correspondente a dieta blend (xilanase + protease + fitase) proporcionou efeito aditivo da ação individualizada de cada enzima, podendo ser utilizado na dieta na forma de complexo enzimático, uma vez que houve desempenho similar entre as dietas CP e as demais enzimas. Isto é evidente, pois, não foi observado no presente estudo efeito entre as dietas CP e blend para as variáveis de desempenho. Esse fato pode ser explicado devido aos consumos de CRD, CLISd e CEMd e GPD semelhantes pelos animais alimentados com a dieta blend e, conseqüentemente, adequada ingestão dos nutrientes da dieta. Essa resposta também pode indicar a existência de sinergismo entre as enzimas, pois cada enzima irá agir sobre diferentes substratos e, conseqüentemente, irão liberar compostos distintos para serem aproveitados pelos animais.

Acredita-se que a adição da enzima protease na dieta de suínos possa melhorar a digestibilidade dos aminoácidos levando a capacidade de manter o GPD dos animais em relação a dieta CP (Guggenbuhl et al., 2012; Cowieson et al., 2012, Min et al., 2019).

De mesmo modo, entende-se que a fitase pode melhorar o ganho dos suínos, pois o ácido fítico além de aprisionar o fósforo, pode prejudicar a proteólise dificultando a ação de enzimas endógenas como a pepsina, tripsina e α -amilase (Cowieson et al., 2008). A fitase promove a degradação do mio-inositol a fósforo inorgânico, ocorrendo a liberação do grupo ortofosfato e, conseqüentemente, o grupamento amino de aminoácidos básicos e demais cátions para serem

absorvidos (Ludke et al., 2002), aumentando a digestibilidade da proteína, aminoácidos, energia e também de minerais contidos nas dietas (Camiruaga et al., 2001, Nortey et al., 2007).

A utilização de enzimas na alimentação de suínos também permite que ingredientes onerosos como o óleo de soja, fosfato bicálcico e aminoácidos industriais comumente utilizados em dietas sejam substituídos parcialmente ou até totalmente na formulação reduzindo o custo de alimentação.

Diversos trabalhos que divergem em relação os efeitos das enzimas sobre o desempenho dos animais. A divergência de resposta pode estar relacionada aos ingredientes utilizados na composição das dietas como a cevada, trigo e canola que possuem maiores quantidades de fatores antinutricionais como por exemplo, os PNA's (Mavromichalis et al., 2000; Yin et al., 2001; Barrera et al., 2004; O'Connell et al., 2005).

A melhora do PCQ, QCM, e IB dos animais alimentados com a dieta CP em relação ao CN (C1) era esperada uma vez que a dieta CN foi formulada com reduções nutricionais significativas em relação as exigências dos animais. No entanto, a menor porcentagem de CM da dieta CP em relação a dieta CN e a dieta fitase (C4), se deve ao fato de os animais destas dietas apresentarem menor PF e menor valor de ET e assim apresentaram maior valor de CM. No entanto, ao compararmos a quantidade QCM podemos observar maior valor para os animais na dieta CP em relação a CN e valores semelhantes para a dieta com fitase.

Do mesmo modo, a semelhança entre as dietas CP e com adições de enzimas isoladas ou associadas (C2, C3, C4 e C5) é respaldada pelos dados de desempenho, e confirma o papel das enzimas em manter os ajustes nutricionais sem prejudicar as características de carcaça de suínos. Também, pode-se inferir que as dietas com

adição de enzimas isoladas ou associadas podem ser potenciais substitutos a ingredientes onerosos na alimentação de suínos.

O efeito aditivo de cada enzima é considerado como uma hipótese que pode melhorar a capacidade dos animais em converter nutrientes em ganho de forma mais eficiente, assim esperava-se que a dieta blend proporcionasse melhora na ET e CM comparados com as dietas contendo enzimas isoladas e CN. Contudo, este efeito não foi observado no presente estudo.

Os complexos enzimáticos podem resultar diferentes respostas pelos animais, considerando fatores como os diferentes microrganismos que dão origem as enzimas, o desconhecimento de como ocorre a relação de sinergismo do complexo enzimático no organismo animal (O'Shea et al., 2014). As diversas condições no trato gastrintestinal também podem ditar como as enzimas irão se comportar como a taxa de passagem, temperatura corporal, pH, comprimento do trato gastrintestinal, concentração do produto em razão da hidrólise da enzima e concentração das enzimas endógenas, além dos diferentes tipos de ingredientes utilizados nas dietas (Acomovic e McCleary, 1996).

Alguns trabalhos demonstram que a adição de enzimas em dietas de suínos não influencia negativamente as características de carcaça, conseguindo manter a qualidade de carcaças em dietas com ajustes nutricionais (O'Shea et al., 2014; Choe et al., 2017), confirmando a hipótese de que há neutralização dos fatores antinutricionais, como inibidores de enzimas e melhorar a digestibilidade dos nutrientes (Zuo et al., 2015). No entanto, estudos avaliando o efeito de enzimas isoladas e associadas na carcaça de suínos desde o crescimento a terminação ainda são escassos.

Conclusões

A inclusão de xilanase, protease e fitase de maneira isolada ou associada com suas respectivas matrizes nutricionais em dietas para suínos de 30 a 100 kg gera desempenho e carcaças similares à animais alimentados com dieta com maiores níveis de nutrientes.

É possível considerar a matriz nutricional da xilanase, protease e fitase nas dietas sem que haja decréscimo de desempenho e de carcaça dos suínos.

A redução do nível energético em até 150 kcal de EM, 0,15% no total dos aminoácidos lisina, met + cis, treonina, triptofano e valina, 0,096% de P, 0,091% de Ca e 0,002% de Na não prejudica o desempenho de suínos dos 30 a 100 kg de peso vivo com a adição das enzimas xilanase, fitase e protease de forma isoladas ou associadas.

Referências

- Acomovic, T.; McClerary, B. V. 1996. Optimising the response. Feed Mix 4: 14-19.
- Adeola, O.; Bedford, M. R. 2004. Exogenous dietary xylanase ameliorates viscosity induced anti-nutritional effects in wheat-based diets for White Pekin ducks (*Anas platyrinchos domestica*). British Journal of Nutrition 92:87-94. <https://doi.org/10.1079/BJN20041180>
- Adeola, O.; Cowieson, A. J. 2011. Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. Journal of Animal Science 89:3189-3218. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3715>
- Barrera, M.; CERVANTES, M.; SAUER, W. C.; Araiza, A. B.; Torrentera, N.; Cervantes, M. 2004. Ileal amino acid digestibility and performance of growing pigs fed wheat-based diets supplemented with xylanase. Journal of Animal Science 82:1997-2003. <https://doi.org/10.2527/2004.8271997x>
- Bavaresco, C.; Krabbe, E.; Gopinger, E.; Sandi, A. J.; Martinez, F. N. I.; Wernik, B.; Roll, V. F.B. 2020. Hybrid phytase and carbohydrases in corn and soybean meal-based diets for broiler chickens: performance and production Costs. Brazilian Journal of Poultry Science 22:1-8. <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2019-1178>
- Buffington, D. E.; Collazo-Arocho, A.; Canton, G.H.; Pitt, D.; Thatcher, W. W.; Collier, R. J. 1981. Black globe humidity index (bghi) as comfort equation for dairy cows. American Society Agricultural Engineers 24:711-714. [doi: 10.13031/2013.34325](https://doi.org/10.13031/2013.34325)
- Camiruaga, M.; Garcia, F.; Elera, R.; Simonetti, C. 2001. Productive response of broiler chickens to exogenous enzyme combinations added to diets based on corn or triticale. International Journal of Agriculture and Natural Resources 28:23-36. <http://dx.doi.org/10.7764/rcia.v28i1.432>
- Childers, D. L.; Corman, J.; Edwards, M.; Elser, J.J. 2011. Sustainability challenges of phosphorus and food: Solutions from closing the human phosphorus cycle. BioScience 61:117-124. <https://doi.org/10.1525/bio.2011.61.2.6>
- Choe, J.; Kim, K. S.; Kim, H. B.; Park, S.; Kim, J.; Kim, S.; Kim, B.; Cho, S. H.; Cho, J. Y.; Park, H.; Cho, J. H.; Song, M. ano? Effects of protease on growth performance and

carcass characteristics of growing finishing pigs. *South African Journal of Animal Science* 47:697-703. <http://dx.doi.org/10.4314/sajas.v47i5.13>

Cowieson A. J.; Ravindran V.; Selle, P. H. 2008. Influence of dietary phytic acid and source of microbial phytase on ileal endogenous amino acids flows in broilers chickens. *Poultry Science* 87:2287–2299. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00096>

Cowieson, A. J.; Bedford, M. R.; Ravindran, V. 2010. Interactions between xylanase and glucanase in maize-soy-based diets for broilers. *British Poultry Science* 51:246–257. <https://doi.org/10.1080/00071661003789347>

Duarte, M. E.; Zhou, F. X.; Dutra, W. M.; Kim, S. W. 2019. Dietary supplementation of xylanase and protease on growth performance, digesta viscosity, nutrients digestibility, immune and oxidative stress status, and gut health of newly weaned pigs. *Animal Nutrition* 5: 351-358. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.04.005>

Gonçalves, L. M. P.; Kiefer, C.; Souza, K. M. R.; Marçal, D. A.; Abreu, R. C.; Silva, A. M. P. S.; Alencar, S. A. S. Níveis de energia líquida para suínos machos castrados em terminação. 2015. *Ciência Rural* 45:464-469. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20131573>

Guggenbuhl, P.; Waché, Y.; Wilson, J. W. 2012. Effects of dietary supplementation with a protease on the apparent ileal digestibility of the weaned piglet. *Journal of Animal Science* 90:152–154. <https://doi.org/10.2527/jas.53835>

Jayasena, D. D.; Jo, C. 2013. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology* 34:96-108. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.09.002>

Ludke, M. C. M. M.; López J.; Ludke, J. V. 2002. Phytase in diets for growing pigs: (i) environmental impact. *Ciência Rural* 32:97–102. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000100017>

Mavromichalis, I.; Hancock, J. D.; Senne, B. W.; Gugle, T. L.; Kennedy, G. A.; Hines, R. H.; Wyatt, C. L. 2000. Enzyme supplementation and particle size of wheat in diets for nursery and finishing pigs. *Journal of Animal Science* 78:3086-3095. <https://doi.org/10.2527/2000.78123086x>

Min, Y.; Choi, Y.; Kim, Y.; Jeong, Y.; Kim, D.; Kim, J.; Jungand, H.; Song, M. 2019. Effects of protease supplementation on growth performance, blood constituents, and carcass characteristics of growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science and Technology* 61:272-277. <https://doi.org/10.5187/jast.2019.61.5.272>

- Nortey, T. N.; Patience, J. F.; Simmins, P. H.; Trottier, N. L.; Zilstra, R. T. 2007. Effects of individual or combined xylanase and phytase supplementation on energy, amino acid, and phosphorus digestibility and growth performance of grower pigs fed wheat-based diets containing wheat millrun. *Journal of Animal Science* 85:1432-1443. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-613>
- Ndou, S. P., E. Kiarie, A. K. Agyekum, J. M. Heo, L. F. Romero, S. Arent, R. Lorentsen, and C. M. Nyachoti. 2015. Comparative efficacy of xylanases on growth performance and digestibility in growing pigs fed wheat and wheat bran- or corn and corn DDGS-based diets supplemented with phytase. *Animal Feed Science Technology* 209:230– 239. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.08.011>
- O'Connell, J. M.; Callan, J. J.; O'Doherty, J. V. 2005. The effect of dietary crude protein level and exogenous enzyme supplementation on nutrient digestibility, nitrogen excretion, faecal volatile fatty acid concentration and ammonia emissions from pigs. *Animal Science* 81:357-364. <https://doi.org/10.1079/ASC42040357>
- Orlando, U. A. D.; Oliveira, R. F. M.; Donzele, J. P.; Ferreira, R. A.; Silva, C. O.; Vaz, R. M. V.; Siqueira, J. C. 2006. Níveis de proteína bruta e suplementação de aminoácidos em rações para leitoas mantidas em ambiente termoneutro dos 60 aos 100kg. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35:478-484. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000200020>
- O'Shea, C. J.; Mc Alpine, P. O.; Solan, P.; Curran, T.; Varley, P. F.; Walsh, A. M.; Doherty, J. V. O. 2014. The effect of protease and xylanase enzymes on growth performance, nutrient digestibility, and manure odour in grower–finisher pigs. *Animal Feed Science and Technology* 189:88–97. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.11.012>
- Pan, L.; Zhao, P. F.; Yang, Z. Y.; Long, S. F.; Wang, H. L.; Tian, Q. Y.; Xu, Y. T.; Xu, X.; Zhang, Z. H.; Piao, X. S. 2016. Effects of coated compound proteases on apparent total tract digestibility of nutrients and apparent ileal digestibility of amino acids for pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 29:1761-1767. <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.16.0041>
- Park, J. S.; Kim, I. H.; Hancock, J. D.; Wyatt, C. L.; Behnke, K. C.; Kennedy, G. A. 2003. Effects of Expander Processing and Enzyme Supplementation of Wheat-based Diets for Finishing Pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 16:248-256. <https://doi.org/10.5713/ajas.2003.248>

- Passos, A. A.; Park, I.; Ferket, Peter.; Heimendahl, Elke.; Kim, S. W. 2015. Effect of dietary supplementation of xylanase on apparent ileal digestibility of nutrients, viscosity of digesta, and intestinal morphology of growing pigs fed corn and soybean meal based diet. *Animal Nutrition* 1:119–23. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.02.006>
- Petry, A. L.; Masey O'Neill, H. V.; Patience, J. F. 2019. Rapid Communication: xylanase, and the role of digestibility and hindgut fermentation in pigs on energetic differences among high and low energy corn samples. *Journal of Animal Science* 97:4293–4297. <https://doi.org/10.1093/jas/skz261>
- Quiniou, N and Noblet, J. 2012. Effect of the dietary net energy concentration on feed intake and performance of growing-finishing pigs housed individually. *Journal of Animal Science* 90:4362-4372. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4004>
- Rao, S. V. R.; Raju, M. V. L. N.; Reddy, M. R.; Panda, A. K. 2004. Replacement of Yellow Maize with Pearl Millet (*Pennisetum typhoides*), Foxtail Millet (*Setaria italica*) or Finger Millet (*Eleusine coracana*) in Broiler Chicken Diets Containing Supplemental Enzymes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 17:836-842. <https://doi.org/10.5713/ajas.2004.836>
- Rostagno, H. S.; Albino, L. F. T.; Donzele, J. L.; Gomes, P. C.; Oliveira, R. F.; Lopes, D. C.; Ferreira, A. S.; Barreto, S. L. T.; Euclides, R. F. 2011. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 195p
- Rostagno, H. S.; Albino, L. F. T.; Donzele, J. L.; Gomes, P. C.; Oliveira, R. F.; Lopes, D. C.; Ferreira, A. S.; Barreto, S. L. T.; Euclides, R. F. 2017. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2017. 256-257p.
- Ruiz, U. S.; Thomaz, M. C.; Hannas, M. I.; Fraga, A. L.; Watanabe, P. H.; Silva, S. Z. 2008. Complexo enzimático para suínos: digestão, metabolismo, desempenho e impacto ambiental. *Revista Brasileira de Zootecnia* 37: 458-468. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008000300011>
- Sampaio C. A.P.; Cristani, J.; Dubiela, J. A.; Boff, C. E.; Oliveira, M. A. 2004. Evaluation of the thermal environment in growing and finishing swine housing using thermal comfort indexes under tropical conditions. *Ciência Rural* 34:785-790. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000300020>

- Selle, P. H.; Cowieson, A. J.; Ravindran, V. 2009. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. *Livestock Science* 124:126–141. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.01.006>
- Silva, C. A.; Vinokurovas, S. L.; Bridi, A. M.; Oba, A.; Pacheco, G. D.; Lozano, A. P.; Silva, R. A. M.; Dalto, D. B.; Silva, A. P. 2013. Utilização de um complexo enzimático para rações contendo farelo de gérmen de milho desengordurado para suínos em fase de crescimento e terminação. *Semina: Ciências Agrárias* 34:4065-82. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p4065>
- Silva, Y. L.; Rodrigues, P. B.; Freitas, R. T. F.; Bertechini, A. G.; Fialho, E. T.; Fassani, E. J.; Pereira, R. C. 2006. Redução de proteína e fósforo em rações com fitase para frangos de corte no período de 1 a 21 dias de idade. Desempenho e teores de minerais na cama. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35: 840-848. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000300029>
- Varley, P. F.; Callan, J. J.; O'Doherty. 2011. Effect of dietary phosphorus and calcium level and phytase addition on performance, bone parameters, apparent nutrient digestibility, mineral and nitrogen utilization of weaner pigs and the subsequent effect on finisher pig bone parameters. *Animal Feed Science and Technology* 165: 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.02.017>
- Willamil, J.; Badiola, I.; Devillard, E.; Geraert, P. A.; Torrallardona, D. 2012. Wheat-barley-rye- or corn-fed growing pigs respond differently to dietary supplementation with a carbohydrase complex. *Journal of Animal Science* 90:824-832. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3766>
- Wu, F. Z.; M. D.; Tokach, S. S.; Dritz, J. C.; Woodworth, J. M.; DeRouchey, R. D. Goodband, M. A. D.; Goncalves, J. R. 2018. Effects of dietary calcium to phosphorus ratio and addition of phytase on growth performance of nursery pigs. *Journal of Animal Science* 96:1825-1837. <https://doi.org/10.1093/jas/sky101>
- Yin, Y. L.; McEvoy, J. D. G.; Schulze, H.; McCracken, K. J. 2001. Effects of xylanase and antibiotic addition on ileal and faecal apparent digestibilities of dietary nutrients and evaluating HCl-insoluble ash as a dietary marker in growing pigs. *Animal Science*, 72:95-103. <https://doi.org/10.1017/S1357729800055594>
- Zuo, J.; Ling, B.; Long, L.; Li, T.; Lahaye, L.; Yang, C, F, D. 2015. Effect of dietary supplementation with protease on growth performance, nutrient digestibility,

intestinal morphology, digestiveenzymes and gene expression of weaned piglets. *Animal Nutrition* 1:276-282. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.10.003>.