

**RODRIGO DE FREITAS JACOB**

**SUPLEMENTAÇÃO DE ENZIMAS EXÓGENAS EM DIETAS COM  
REDUÇÕES DE NUTRIENTES E ENERGIA PARA FRANGOS DE CORTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Luiz Frenando Teixeira Albino  
Coorientadores: Arele Arlindo Calderano e  
Horácio Santiago Rostagno

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

J15s  
2021

Jacob, Rodrigo de Freitas, 1991-  
Suplementação de enzimas exógenas em dietas com  
reduções de nutrientes e energia para frangos de corte / Rodrigo  
de Freitas Jacob. – Viçosa, MG, 2021.  
1 tese eletrônica (66 f.): il.

Orientador: Luiz Fernando Teixeira Albino.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Zootecnia, 2021.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.185>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Frangos de corte - Nutrição. 2. Enzimas. 3. Frangos de  
corte - Registros de desempenho. 4. Metabolismo energético.  
5. Digestibilidade. 6. Aminoácidos na nutrição animal.  
I. Albino, Luiz Fernando Teixeira, 1953-. II. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 636.50852

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

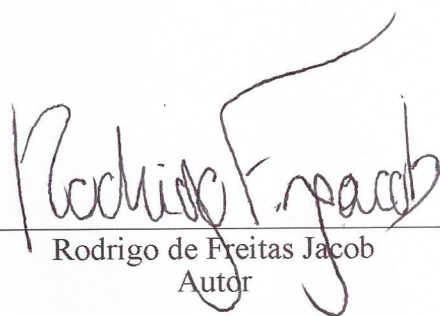
**RODRIGO DE FREITAS JACOB**

**SUPLEMENTAÇÃO DE ENZIMAS EXÓGENAS EM DIETAS COM  
REDUÇÕES DE NUTRIENTES E ENERGIA PARA FRANGOS DE CORTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

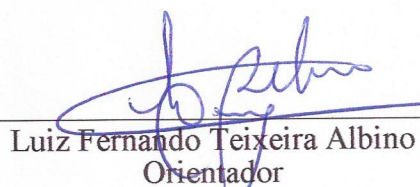
APROVADA: 29 de julho de 2021

Assentimento:



---

Rodrigo de Freitas Jacob  
Autor



---

Luiz Fernando Teixeira Albino  
Orientador

*Aos meus pais Marcos Antônio Jacob e Sônia  
Maria Ladeira de Freitas.  
Ao meu irmão Marcos Henrique de Freitas Jacob.  
Aos meus avós Sebastião Lopes de Freitas e  
Venância Ladeira de Freitas.  
A todos os demais familiares e amigos.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por sempre fortalecer minha fé, por ser o alicerce para que eu pudesse me apoiar nos maus e bons momentos e, conseqüentemente, ter me guiado até esta conquista.

À minha mãe Sônia, por ser uma guerreira, sempre lutando por mim e pelo meu irmão, pelas orações, pela paciência, por sempre estar ao meu lado, por depositar sua confiança em mim e por acreditar na minha competência.

Ao meu pai Marcos Antônio, por estar sempre procurando o meu bem e por me ajudar em todos os momentos em que precisei.

Ao meu irmão Marcos Henrique, por ser um exemplo de luta e perseverança.

A todos os meus demais familiares, em especial aos meus Avós Sebastião “Tatão Paraíso” e Venância, por serem exemplos de bondade, humildade e generosidade e por conseguirem manter minha família unida.

Ao Professor Luiz Fernando Teixeira Albino, por ser um ótimo orientador. Por isso, merece agradecimento especial, pois suas críticas, sugestões e seus conselhos foram fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Professor Horácio Santiago Rostagno, por ser um ótimo coorientador, pela atenção e dedicação para comigo e por ter depositado sua confiança em mim para realizar diversas atividades.

Ao Professor Arele Arlindo Calderano, pela disposição e pelos grandes ensinamentos, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos Professores Luciana Navajas Renno e Marcelo Dias Carvalho, pelos conselhos e sugestões durante a realização desta tese e por participarem da banca examinadora.

Aos meus amigos de equipe, Maurílio, Thiago, Rafael, Romário, Pedro Aleixo, Kelly, Carlos, Samuel, Bruno, Tobias e Pedro Condé, por terem me proporcionado momentos de alegrias e muitos ensinamentos que me ajudaram no meu crescimento como pessoa e profissional.

Aos meus amigos do Departamento de Zootecnia, Bruna, Marcos, Catarina e Rayanne.

A Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização do Curso.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa e Aves, pelo apoio durante os experimentos. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os meus amigos de Viçosa, pela torcida.

À Turma de Zootecnia 2009, pelos bons momentos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

RODRIGO DE FREITAS JACOB, filho de Marcos Antônio Jacob e Sônia Maria Ladeira de Freitas, nasceu em 30 de julho de 1991 em Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 2009, iniciou o Curso de Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em julho de 2014.

Em outubro de 2013, ingressou no Programa de Estágio da empresa Agroceres Multimix, concluindo-o em janeiro de 2014.

Em janeiro de 2015, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa da dissertação em 17 de março de 2017.

Em agosto de 2017, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa da tese em 29 de julho de 2021.

*“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”.*

(John F. Kennedy)

## RESUMO GERAL

JACOB, Rodrigo de Freitas, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **Avaliação de enzimas exógenas suplementadas em dietas reduzidas em nutrientes e energia para frangos de corte.** Orientador: Luiz Fernando Teixeira Albino. Coorientadores: Arele Arlindo Calderano e Horácio Santiago Rostagno.

Foram realizados dois experimentos com o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação de fitase ou fitase + complexo multienzimático em dietas, à base de milho e de farelo de soja, com redução de cálcio (Ca), fósforo disponível (Pd) e energia metabolizável (EM) sobre o desempenho, a retenção de energia e a digestibilidade de aminoácidos em frangos de corte. No total, foram utilizados 3.056 frangos de corte Cobb 500, divididos em dois ensaios de desempenho, dois de metabolismo e dois de digestibilidade. Em cada experimento, um total de 1.528 frangos de corte de 1 a 42 dias de idade foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com 5 tratamentos, 10 repetições de 20 aves por unidade experimental. Os tratamentos avaliados no primeiro experimento foram: controle positivo, atendendo às recomendações nutricionais (CP); dois controles negativos (CN) com redução de 0,16% de Ca, 0,15% de Pd, 68 kcal/kg de EM no CN1 e 100 kcal/kg de EM no CN2; CN1 + 500 FTU/kg de fitase (*Escherichia coli*); e CN2 + 500 FTU/kg de fitase + 15.000 U/kg de xilanase + 2.400 U/kg de  $\beta$ -glucanase + 2.400 U/kg de  $\beta$ -mananase + 1.200 U/kg de celulase + 150 U/kg de  $\alpha$ -amilase + 100 U/kg de  $\alpha$ -galactosidase + 1.500 U/kg de pectinase + 2.500 U/kg de protease. No segundo experimento, os tratamentos foram compostos pelo controle positivo, atendendo às recomendações nutricionais (CP); dois controles negativos (CN) com redução de 0,16% de Ca, 0,15% de Pd, 80 kcal/kg de EM no CN1 e 100 kcal/kg de EM no CN2; CN1 + 1.000 FTU/kg de fitase; e CN2 + 1.000 FTU/kg de fitase + 15.000 U/kg de xilanase + 2.400 U/kg de  $\beta$ -glucanase + 2.400 U/kg de  $\beta$ -mananase + 1.200 U/kg de celulase + 150 U/kg de  $\alpha$ -amilase + 100 U/kg de  $\alpha$ -galactosidase + 1.500 U/kg de pectinase + 2.500 U/kg de protease. Tanto no primeiro quanto no segundo experimento, as reduções nutricionais afetaram negativamente o desempenho de frangos de corte e a retenção de energia. A adição de fitase ou fitase mais complexo multienzimático às dietas CN restaurou o desempenho das aves aos mesmos níveis da dieta CP. No ensaio de desempenho do primeiro experimento, o menor nível de nutrientes e energia reduziu a digestibilidade dos aminoácidos estudados, o que não foi observado no segundo ensaio. Em ambos os experimentos, a inclusão de enzimas melhorou a digestibilidade da maioria dos aminoácidos para níveis superiores aos do CN, e no segundo experimento ela

aumentou para níveis acima do CP. A suplementação enzimática aumenta a digestibilidade de aminoácidos e restaura o desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis nutricionais reduzidos.

**Palavras-chave:** Frangos de corte. Desempenho. Fitase. Metabolismo. Digestibilidade de aminoácidos. Complexo multienzimático.

## GENERAL ABSTRACT

JACOB, Rodrigo de Freitas, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2021. **Evaluation of exogenous enzymes supplemented in nutrient and energy-reduced diets for broiler chickens.** Advisor: Luiz Fernando Teixeira Albino. Co-advisors: Arele Arlindo Calderano and Horácio Santiago Rostagno.

The objective of this study was to evaluate the effects of supplementation of phytase or phytase + multienzymatic complex in diets of corn and soybean meal with reduction of Ca, available phosphorus (AP) and energy on performance, energy retention and digestibility of amino acids to broilers. In total, 3056 Cobb 500 broilers were used in two experimental tests. In each experiment, a total of 1528 broilers from 1 to 42 days of age were distributed in a completely randomized experimental design (DIC) with 5 treatments, 10 repetitions and 20 birds per experimental unit. The treatments evaluated in the first experiment were: positive control according to nutritional recommendations (PC); two negative controls (NC) with a reduction of 0.16% of Ca, 0.15% of AP, 68 kcal/kg of ME in NC1 and 101 kcal/kg of ME in NC2; NC1 + 500 FTU/kg phytase (*Escherichia coli*) and NC2 + 500 FTU/kg phytase + 15,000 U/kg xylanase + 2,400 U/kg  $\beta$ -glucanase + 2,400 U/kg  $\beta$ -mannanase + 1,200 U/kg of cellulose + 150 U/kg of  $\alpha$ -amylase + 100 U/kg of  $\alpha$ -galactosidase + 1,500 U/kg of pectinase + 2,500 U/kg of protease. In the second experiment, the treatments consisted of a PC, meeting the nutritional recommendations; two NC with a reduction of 0.16% of Ca, 0.15% of Pd, 80 kcal/kg of ME in NC1 and 100 kcal/kg of ME in NC2; NC1 + 1,000 FTU/kg phytase (*Aspergillus niger*) and NC2 + 1,000 FTU/kg phytase + 15,000 U/kg xylanase + 2,400 U/kg  $\beta$ -glucanase + 2,400 U/kg  $\beta$ -mannanase + 1,200 U/kg cellulase + 150 U/kg of  $\alpha$ -amylase + 100 U/kg of  $\alpha$ -galactosidase + 1,500 U/kg of pectinase + 2,500 U/kg of protease. In both the first and the second experiment, nutritional reductions did negatively affect broiler performance and energy retention. The addition of phytase or phytase more multienzymatic complex to the NC diets restored the performance of the birds to the same levels as the PC diet. In the first experiment, the lower level of nutrients and energy reduced the digestibility of the studied amino acids, which was not observed in the second experiment. In both experiments, the inclusion of enzymes improved the digestibility of most of the amino acids to levels higher than those of the CN, and in the second experiment it increased to levels above the CP. Enzymatic supplementation increases the digestibility of amino acids and restores the performance of broilers fed diets containing reduced nutritional levels.

**Keywords:** Broilers. Performance. Phytase. Metabolism. Multienzyme complex.

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO I

Tabela 1 - Composição e valores nutricionais calculados de dietas Controle Positivo (CP) e Controles Negativos (NC).....	22
Tabela 2 - Definição e Propriedades enzimáticas das enzimas adicionadas às rações .....	24
Tabela 3 - Composição da dieta isenta de proteínas .....	25
Tabela 4 - Efeito da suplementação de enzimas exógenas no desempenho de frangos de corte.....	26
Tabela 5 - Energia metabolizável aparente corrigida para o balanço de nitrogênio em dietas para frangos de corte suplementadas com enzimas exógenas.....	29
Tabela 6 - Efeito da suplementação com enzimas exógenas sobre o coeficiente de digestibilidade ileal standardizado de aminoácidos em frangos de corte .....	32

### ARTIGO II

Tabela 1 - Composição e valores nutricionais calculados de dietas Controle Positivo (CP) e Controles Negativos (NC) .....	48
Tabela 2 - Definição e Propriedades enzimáticas das enzimas adicionadas às rações .....	50
Tabela 3 - Composição da dieta isenta de proteínas .....	51
Tabela 4 - Efeito de enzimas exógenas no desempenho de frangos de corte .....	52
Tabela 5 - Energia metabolizável aparente corrigida para o balanço de nitrogênio em dietas para frangos de corte suplementadas com enzimas exógenas .....	54
Tabela 6 - Efeito da suplementação com enzimas exógenas sobre o coeficiente de digestibilidade ileal standardizado de aminoácidos em frangos de corte.....	56

## SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO GERAL .....	12
CAPÍTULO I – ARTIGO CIENTÍFICO I.....	14
RESUMO.....	15
1-INTRODUÇÃO .....	18
2-MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
4-CONCLUSÃO .....	33
REFERÊNCIAS .....	34
CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO II.....	40
RESUMO.....	41
ABSTRACT .....	43
I-INTRODUÇÃO .....	44
2-MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
4-CONCLUSÃO .....	59
5-CONCLUSÃO GERAL .....	60
REFERÊNCIAS .....	61

## 1-INTRODUÇÃO GERAL

Os crescentes preços do milho e do farelo de soja têm levado o custo da alimentação de frangos de corte a patamares próximos aos dos 80% dos custos totais de produção. Isso tem impulsionado o setor avícola a buscar estratégias que minimizem as adversidades econômicas e mantenham a atividade competitiva e com alta rentabilidade. Nesse contexto, a adição de enzimas nas rações avícolas tem surgido como uma das principais alternativas para reduzir os custos de produção e melhorar a eficiência de produção.

Rações para aves utilizam altas proporções de milho e de farelo de soja no Brasil e no mundo, devido à sua abundância e alta qualidade nutricional. No entanto, além do preço elevado, estes alimentos apresentam certos componentes antinutricionais, como polissacarídeos não amiláceos, mas principalmente ácido fítico, que representa cerca de dois terços do fósforo (P) em grãos de cereais maduros e sementes oleaginosas (Cheryan, 1980; Eeckhout e de Paepe, 1994; Harland e Oberleas, 1999; Adeola e Sands, 2003).

Outros aspectos além dos econômicos devem ser destacados nos atuais programas alimentares e nutricionais, como o cuidado ambiental – demanda essa cada vez maior pelo mercado consumidor (Scramim e Batalha, 2004). Foi demonstrado que os níveis de P e cálcio (Ca) comumente usados na dieta interferem negativamente na degradação do fitato no trato digestivo de frangos de corte e aumentam a excreção de P para o ambiente (Sommerfeld et al., 2018a). Para atender essa demanda, é necessário ajustar a oferta de nutrientes dos alimentos às exigências dos animais, o que tem sido possível pela utilização de enzimas que permitem a elaboração de dietas nutricionalmente mais disponíveis e eficientes (Pomar et al., 2008).

A fitase, uma enzima de ocorrência natural, tem a capacidade de melhorar a disponibilidade de fósforo por meio da hidrólise do P ligado ao fitato, quando incluída em dietas monogástricas (Broz et al., 1994; Kornegay et al., 1996; Dilger et al., 2004). No entanto, a atividade catalítica da fitase é inibida pelo P inorgânico (Greiner et al., 1993), o que indica que uma alta concentração de fósforo disponível (Pd) na dieta pode reduzir a degradação do fitato pela fitase (Woyengo e Nyachoti, 2011). Além disso, a redução desse mineral para até 0,14% na dieta não prejudica o desempenho do animal nem a absorção dos nutrientes e, ainda, contribui para redução da sua excreção para o meio ambiente. Foi demonstrado que aves alimentadas com dietas de baixo nível de P juntamente com fitase tiveram 49% menos P excretado, sem alterações no consumo de ração, na produção de ovos, na taxa de crescimento e na porcentagem de cinza da tíbia (Francesch e Brufau, 2005).

Além disso, a associação de fitase com complexos enzimáticos pode reduzir os efeitos negativos relacionados à molécula de fitato. É sabido que a combinação de fitase e outras enzimas exógenas pode ser uma solução para aumentar a acessibilidade da fitase ao seu substrato e, conseqüentemente, aumentar a digestibilidade de P e outros nutrientes (Gallardo et al., 2019). No entanto, a resposta da combinação de fitase e carboidrase tem sido inconsistente em dietas à base de milho-soja para frangos de corte, o que pode estar relacionado a tipo e dose de enzima usada, níveis de nutrientes na dieta, idade do frango e condições de criação (Cowieson e Adeola, 2005; Olukosi et al., 2007; Lü et al., 2009; Tiwari et al., 2010; Woyengo e Nyachoti, 2011). Ademais, efeitos sinérgicos de combinações de enzimas são mais comumente vistos em frangos alimentados com uma dieta mais reduzida em nutrientes (Woyengo e Nyachoti, 2011).

Diante disso, hipotetiza-se que a combinação de fitase e complexo enzimático (MEZ) tem efeito complementar e pode favorecer o processo de digestão, além de permitir a redução de energia e nutrientes em dietas à base de milho e farelo de soja sem comprometer o desempenho produtivo de frangos de corte. Portanto, objetivou-se com este estudo avaliar os efeitos da suplementação de fitase, isolada ou combinada com um complexo enzimático, em dietas deficientes em Pd, Ca e energia metabolizável (EM) sobre o desempenho de frangos de corte e sobre os valores de EM e digestibilidade de aminoácidos.

**CAPÍTULO I – ARTIGO CIENTÍFICO I****RAÇÕES PARA FRANGOS FORMULADAS COM DEFICIÊNCIAS DE FÓSFORO,  
DE CÁLCIO E DE ENERGIA SUPLEMENTADAS COM ENZIMAS EXÓGENAS**

*Publicado na Semina: Ciências Agrárias, v. 42, n. 5, p. 3029-3046, set./out. 2021*

*Recebido: 02 de março de 2021; Aprovado 01 de junho de 2021*

*doi: 10.5433/1679-0359.2021v42n5p3029*

## RESUMO

Um experimento foi conduzido para determinar o efeito da enzima fitase, isolada ou associada a um complexo enzimático, em dietas a base de milho e farelo de soja deficientes em fósforo disponível (Pd), cálcio (Ca) e energia metabolizável (EM) sobre o desempenho de frangos de corte, os valores de EM e a digestibilidade de aminoácidos das dietas. Para isso, 1.538 frangos Cobb 500 machos foram alocados em cinco tratamentos: controle positivo (CP), controle negativo 1 (CN1, CP menos 0,15% de Pd, 0,16% Ca e 68 kcal kg<sup>-1</sup> EM), controle negativo 2 (CN2, CP menos 0,15% de Pd, 0,16% de Ca e 101 kcal kg<sup>-1</sup> de ME em relação à dieta CP), CN1 mais fitase (CN1 + F) e CN2 mais fitase mais complexo multienzimático (CN2 + F + E). O ganho de peso corporal e o consumo de ração foram medidos de 1 a 21 dias e de 1 a 42 dias de idade, e a taxa de conversão alimentar (CA) corrigida para mortalidade foi calculada. No segundo e terceiro ensaios, foram analisados os valores de energia metabolizável aparente corrigida para o balanço de nitrogênio (EMAn) e de digestibilidade estandardizada de aminoácidos, respectivamente, em adição à fitase e ao complexo enzimático. No ensaio de desempenho, a suplementação enzimática aumentou ( $P < 0,05$ ) o ganho de peso (GP) aos 21 dias e 42 dias de idade em relação aos controles negativos. A inclusão de fitase melhorou ( $P < 0,05$ ) a taxa de conversão alimentar na fase inicial, em comparação com a dieta CN1. No segundo ensaio, a suplementação enzimática não afetou ( $P > 0,05$ ) os valores de EMAn. No terceiro ensaio, ambos os tratamentos enzimáticos melhoraram ( $P < 0,05$ ) a digestibilidade dos aminoácidos nas dietas experimentais, em comparação com as dietas deficientes. A suplementação de fitase e carboidrases preserva o desempenho de frangos alimentados com dietas deficientes em Pd, Ca e EM e melhora a digestibilidade dos aminoácidos.

**Palavras-chave:** Frangos de corte. Desempenho. Fitase, Metabolismo. Complexo enzimático.

**FEEDS FOR BROILERS FORMULATED WITH PHOSPHORUS, CALCIUM AND  
ENERGY DEFICIENCIES SUPPLEMENTED WITH EXOGENOUS ENZYMES**

## ABSTRACT

An experiment was carried out to verify the effect of the phytase enzyme, alone or associated with an enzymatic complex, in diets deficient in available phosphorus (Ap), calcium (Ca) and metabolizable energy (ME) on broiler performance, in the ME values and in dietary amino acids digestibility. 1,538 broilers, Cobb 500, male, were allocated in 5 treatments: positive control (PC), negative control 1 (NC1, PC minus 0.15% of Ap, 0.16% Ca and 68 kcal kg<sup>-1</sup> ME), negative control 2 (NC2, PC minus 0.15% of Ap, 0.16% of Ca and 101 kcal kg<sup>-1</sup> of ME in relation to the PC diet), NC1 plus phytase (NC1 + F) and NC2 plus phytase plus enzymatic complex (NC2 + F + E). Body weight gain and feed intake were measured from 1 to 21 days and from 1 to 42 days, and the corrected feed conversion rate (FCR) for mortality was calculated. In the second and third trials, the values of apparent metabolizable energy corrected for the nitrogen balance (AMEn) and standardized digestibility of amino acids, respectively, in addition to phytase and the enzymatic complex. In the first experiment, enzyme supplementation increased ( $P < 0.05$ ) the weight gain (GP) at 21 days and 42 days in relation to the negative controls. The inclusion of phytase improved ( $P < 0.05$ ) the rate of feed conversion in the initial phase, compared to the NC1 diet. In the second trial, enzyme supplementation did not affect ( $P > 0.05$ ) the values of AMEn. In the third experiment, both enzymatic treatments improved ( $P < 0.05$ ) the digestibility of amino acids in experimental diets, compared to deficient diets. Supplementation of phytase and carbohydrases preserves the performance of broilers fed diets deficient in Ap, Ca and ME and improves the digestibility of amino acids.

**Keywords:** Broilers. Performance. Phytase. Metabolism. Enzymatic complex.

## 1-INTRODUÇÃO

O milho e o farelo de soja, que representam os ingredientes mais importantes na alimentação de frangos de corte, contêm concentrações variadas de fatores antinutricionais que podem contribuir substancialmente para a piora na digestibilidade dos nutrientes dietéticos e, por conseguinte, no desempenho animal. As enzimas exógenas são adicionadas à ração desses animais na tentativa de contrapor os efeitos adversos desses fatores e melhorar o valor nutricional da dieta.

As fitases são enzimas que, ao catalisarem a reação de hidrólise das ligações fosfo-éster do fitato, não só promovem aumento na biodisponibilidade de P, como também afetam positivamente os valores de energia e aminoácidos em dietas para frangos de corte (Dersjant-Li, Awati, Schulze e Partridge, 2015; Bournazel et al., 2018). As informações sobre a interação de fitases e carboidrases são variadas. No entanto, sabe-se que, embora os substratos-alvo dessas enzimas sejam diferentes no milho e no farelo de soja, as carboidrases podem melhorar a acessibilidade de enzimas exógenas e endógenas aos conteúdos celulares das matrizes vegetais. Assim, a quebra mais completa das paredes celulares dos vegetais pelas carboidrases pode desencadear efeitos sinérgicos com outras enzimas em dietas à base de milho e farelo de soja para frangos de corte (Schramm et al., 2017).

As proteases exógenas são enzimas com crescente potencial para uso em dietas para animais não ruminantes. Elas atenuam os impactos negativos de fatores como lectinas, inibidores de tripsina e proteínas alergênicas e podem melhorar a utilização de energia, bem como promover o aumento nos valores de aminoácidos em dietas para frangos de corte (Cowieson & Roos, 2016b). A influência da combinação de enzimas no desempenho e na digestibilidade de aminoácidos e energia em dietas para frangos de corte foi avaliada por diversos autores. Na maioria dos casos, as enzimas foram adicionadas às dietas contendo níveis deficientes de cálcio (Ca), fósforo disponível (Pd) e energia, particularmente quando fitase, xilanase e protease foram avaliadas (Walk & Poernama, 2018).

Dessa forma, a hipótese deste estudo é de que a suplementação com fitase isolada, ou em combinação com carboidrases e protease, pode melhorar o aproveitamento de nutrientes e energia na dieta e preservar o desempenho de frangos alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja, deficientes em nutrientes e energia. Assim, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação de fitase, isolada ou combinada com um complexo enzimático, em dietas deficientes em fósforo disponível (Pd), cálcio (Ca) e energia metabolizável (EM) sobre o desempenho de frangos de corte e sobre os valores de EM e de digestibilidade de aminoácidos.

## 2-MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Produção e Nutrição de Aves do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Estado de Minas Gerais, Brasil (20 ° 45'57,19 "S, 42° 51'35,42" W e 682 m de altitude). Todos os procedimentos experimentais adotados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Produção (processo nº 0107/2018), de acordo com os princípios éticos de experimentação animal estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e legislação vigente.

No ensaio de desempenho, duas dietas basais foram formuladas à base de milho e de farelo de soja para as fases inicial e de crescimento/terminação, seguindo as recomendações nutricionais de Rostagno et al. (2017; Tabela 1). Os mesmos cinco tratamentos foram usados nos três ensaios: controle positivo (CP), controle negativo 1 (CN1, redução de 0,15% Pd, 0,16% de Ca e 68 kcal kg<sup>-1</sup> EM em relação ao CP), controle negativo 2 (CN2, redução de 0,15% de Pd, 0,16% de Ca e 101 kcal kg<sup>-1</sup> de EM em relação à dieta CP), CN1 com a adição de fitase (CN1 + Phy) e CN2 com a adição de fitase e complexo enzimático (CN2 + Phy + E).

O complexo enzimático (SQzyme CEM, Suntaq International Limited, Shenzhen, China), contendo predominantemente carboidrases, é composto de  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -mananase, pectinase, xilanase, celulase ácida,  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -glucanase e protease (Tabela 2). O complexo enzimático, originário de *Trichoderma reesei* (601-17), foi aplicado, na dose de 100 g/t de dieta, para fornecer um mínimo garantido de 100, 1.500, 1.500, 15.000, 1.200, 150, 2.400 e 2.500 unidades por kg da dieta de  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -mananase, pectinase, xilanase, celulase ácida,  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -glucanase e protease, respectivamente. A fitase foi derivada de *Escherichia coli* (EC 3.1.3.26), modificada por *Pichiapastoris*, e fornecida a uma taxa de 500 FTU kg<sup>-1</sup> de dieta.

No ensaio de desempenho, um total de 1.000 pintos machos Cobb 500 de um dia de idade foram pesados ( $43,78 \pm 0,025$  g cada) e distribuídos em cada tratamento, com pesos corporais médios semelhantes. As aves foram casualmente distribuídas em cinco tratamentos, com 10 repetições de 20 pintinhos cada. Cada baía contendo 20 pintinhos foi considerada uma unidade experimental e consistiu de um boxe com piso de concreto, com dimensões de 1,25 × 1,80 m e total de 2,25 m<sup>2</sup>. Os animais foram manejados em galpões de alvenaria de 3 m de altura com telhas de cimento-amianto, paredes baixas de 50 cm e tela de 1,27 cm adaptada para experimentos com animais. A cama de frango consistia de serragem nova. Os parâmetros de desempenho avaliados foram consumo de ração (CR, g), ganho de peso (GP, g) e taxa de conversão alimentar (CA, g g<sup>-1</sup>). O peso corporal e o CR foram registrados aos 21 e 42 d. A mortalidade foi registrada

diariamente, para posterior correção do CR, segundo Sakomura e Rostagno (2016). Ração e água foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental.

No segundo experimento (metabolismo), 240 frangos de corte machos Cobb 50 foram alojados em gaiolas contendo bandejas revestidas com plástico, para coleta total das excretas. Cada gaiola metabólica foi equipada com um comedouro e um bebedouro para aves, para acesso *ad libitum* à ração e água. As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, oito repetições e seis aves por unidade experimental. Os frangos foram alimentados com dieta comercial inicial à base de milho e de farelo de soja por 13 dias e, posteriormente, introduzidos nas dietas experimentais.

O procedimento da coleta total de excreta foi realizado do dia 19 ao dia 23, a fim de determinar os valores da energia metabolizável aparente corrigida para o balanço de nitrogênio (EMAn). Foi considerado um período de adaptação de quatro dias (dias 14-18), seguido pela coleta de excretas, realizada duas vezes ao dia (8h e 18h), por quatro dias consecutivos (dias 19-23). Ao final do período de coleta de excretas, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas, sendo as subamostras acondicionadas em recipientes plásticos e armazenadas em freezer a 18°C até a análise.

Amostras de excreta e da ração foram secas a 55 °C em estufa de ventilação forçada por 72 horas. As amostras foram moídas em tela de 1 mm. O teor de matéria seca (MS) foi determinado secando-se as amostras em estufa durante a noite a 105°C (método INCT-CA G-003/1; Detmann et al., 2012). O método de Kjeldahl foi utilizado para determinar o nitrogênio nas dietas e excretas de acordo com os métodos oficiais de análise (método INCT-CA N-001/1; Detmann et al., 2012). O nitrogênio excretado (NE) foi calculado multiplicando-se a quantidade total excretada na MS pela porcentagem de nitrogênio na excreta, também na MS. O mesmo foi aplicado ao cálculo do nitrogênio (NC) consumido. O balanço de nitrogênio (BN) foi obtido a partir da quantidade de nitrogênio consumido menos o nitrogênio excretado. O conteúdo de energia bruta (EB) foi medido por uma bomba calorimétrica adiabática C5001 (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemanha). Os valores de EMAn foram calculados com base na análise das dietas e excretas, segundo Sakomura e Rostagno (2016).

No terceiro experimento (digestibilidade), 288 frangos de corte machos Cobb 500 foram alojados em gaiolas, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, oito repetições e seis aves por unidade experimental. Para determinar os coeficientes da digestibilidade ileal estandardizada de aminoácidos (CDIEAA), uma dieta livre de proteínas (DIP) foi usada para determinar a excreção endógena de aminoácidos (Tabela 3). As aves receberam a dieta experimental dos 16 aos 20 dias de idade. Celite® (Celite Corp., Lompoc,

CA, EUA), uma fonte de cinza ácida insolúvel (CAI), foi adicionada a todas as dietas a 10 g kg<sup>-1</sup> como um marcador indigestível, e as concentrações de CAI foram determinadas pelo método de Van Keulen e Young (1977).

Após uma adaptação de cinco dias, todas as aves foram mortas por deslocamento cervical, e a cavidade abdominal foi aberta imediatamente, para expor o trato digestivo. O segmento terminal do íleo de 15 cm foi seccionado a 4 cm da junção ileocecal, a fim de acessar a digesta ileal. As amostras ileais foram congeladas e armazenadas a -20 ° C até serem liofilizadas por 72 h a -40°C (LH 0401, Terroni, São Carlos, Brasil).

**Tabela 1.** Composição e valores nutricionais calculados de dietas Controle Positivo (CP) e Controles Negativos (NC)

Ingredientes (%)	1 a 21 dias de idade			1 a 42 dias de idade		
	CP <sup>1</sup>	CN1 <sup>2</sup>	CN2 <sup>3</sup>	CP	CN1	CN2
Milho	50,531	55,338	57,398	59,240	64,048	66,964
Farelo de soja	41,22	39,363	38,307	32,86	30,627	28,823
Óleo de soja	3,846	1,867	1,045	4,500	2,526	1366
Fosfato bicálcico	1,786	0,981	0,985	1,491	0,685	0,694
Calcário	0,924	1,039	0,860	0,715	0,831	0,840
Sal	0,515	0,427	0,427	0,472	0,384	0,384
DL-Metionina (99%)	0,318	0,304	0,304	0,253	0,239	0,245
Lisina HCl (79%)	0,135	0,171	0,171	0,160	0,196	0,218
L-Treonina (98%)	0,048	0,035	0,028	0,033	0,019	0,021
Suplemento Vitamina <sup>4</sup>	0,130	0,30	0,130	0,100	0,100	0,100
Suplemento Mineral <sup>5</sup>	0,130	0,130	0,130	0,100	0,100	0,100
Cloreto de Colina (60%)	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Salinomicina <sup>6</sup> (12%)	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055
Avilamicina (10%)	0,010	0,010	0,010	-	-	-
BHT <sup>7</sup>	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
Amido	0,040	0,040	0,040	0,050	0,050	0,050
Total	100	100	100	100	100	100
Composição nutricional calculada (%)						
Energia Metabolizável kcal/kg	3000	2942	2899	3150	3092	3049
Proteína bruta %	23,228	22,703	22,383	19,934	19,409	18,854
Cálcio %	0,930	0,777	0,777	0,758	0,598	0,598
Fósforo disponível %	0,440	0,290	0,290	0,374	0,224	0,224
Sódio %	0,218	0,183	0,183	0,200	0,165	0,165
Lisina dig. %	1,256	1,241	1,218	1,070	1,055	1,032
Metionina + Cisteína dig. %	0,929	0,906	0,900	0,792	0,769	0,763
Treonina dig. %	0,829	0,799	0,782	0,706	0,676	0,659

<sup>1</sup>CP = controle positivo (dieta atendendo os requerimentos nutricionais de frangos de corte).

<sup>2</sup>CN1 = controle negativo 1 (CP menos 68 kcal/kg de EM, 0,15% de Pd e 0,16% de Ca).

<sup>3</sup>CN2 = controle negativo 2 (CP menos 101 kcal/kg de EM, 0,15% de Pd e 0,16% de Ca).

<sup>4</sup>Vit. A 9.375 UI; Vit. D3, 2.375 UI/kg; Vit. E, 35 UI/kg; Vit. B1, 2,50 mg/kg; Vit. B2, 6,25 mg/kg; Vit. B6, 3,5 mg/kg; Vit. B12, 0,015 mg/kg; Ácido Nicotínico, 37,5 mg/kg; Ácido Pantotênico, 12,5 mg/kg; Vit. K3, 1,88 mg/kg; Ácido Fólico, 0,875 mg/kg; Biotina, 0,088 mg/kg.

<sup>5</sup>Selênio, 0,375 mg/kg; Manganês, 88 mg/kg; Ferro, 62,5 mg/kg; Zinco, 81,3 mg/kg; Cobre, 12,5 mg/kg; Iodo, 1,25 mg/kg.

<sup>6</sup>Anticoccidiano.

<sup>7</sup>Antioxidante Butil Hidroxi Tolueno.

As análises da MS (método INCT-CA G-003/1; Detmann et al., 2012), das rações e da digesta ileal coletada do frango foram realizadas para os cálculos de digestibilidade. As análises laboratoriais para determinação do teor de aminoácidos das dietas e excretas foram feitas pela CBO - Análises Laboratoriais (Campinas, São Paulo, Brasil), por meio de HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho). A digestibilidade dos aminoácidos foi calculada com base na análise das dietas e da digesta ileal, segundo Sakomura e Rostagno (2016).

Os dados de desempenho, energia metabolizável e digestibilidade de aminoácidos foram analisados pela ANOVA, usando o software R. Os boxes ou as gaiolas foram considerados unidades experimentais. Um valor de probabilidade de  $P < 0,05$  foi considerado para ser estatisticamente significativo. O teste de Tukey no nível de significância  $P < 0,05$  foi usado para identificar diferenças significativas entre as médias.

O modelo estatístico usado foi:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij},$$

em que  $Y_{ij}$  é a observação do  $i$ -ésimo tratamento na  $j$ -ésima unidade experimental (variável-resposta),  $\mu$  é a média geral,  $\tau_i$  é o efeito do tratamento e  $\varepsilon_{ij}$  é o erro experimental.

**Tabela 2.** Definição e Propriedades enzimáticas das enzimas adicionadas às rações

Enzimas	Definição <sup>1</sup>				
	Molécula liberada	Substrato	Tempo de reação	pH	Temperatura
Fitase	1 µmol de P inorgânico	Fitato de Sódio	1 min	5.5	37°C
α-Galactosidase	1 µmol de <i>p</i> -Nitrofenol	<i>p</i> -Nitrofenil-α-D-Galactopiranosídeo	1 min	6.0	37°C
β-Mananase	1 µmol de Manose	Galactomanano	1 min	5.0	70°C
Pectinase	1 µmol de Ácido D-Galacturônico	Ácido Poligalacturônico	1 min	5.0	37°C
Xilanase	1 µmol de Xilose	Xilano	1 min	5.0	50°C
Celulase	1 µmol de Glicose	Filtrado de papel	1 min	4.8	50°C
α-Amylase	1 µmol de glicose	Amido	5 min	6.9	40°C
β-Glucanase	1 µmol de glicose	Carboximetilcelulose	1 min	4.8	50°C
Protease	1 µmol de Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-N-succinil Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> -nitroanilida	<i>p</i> -Nitroanilina	1 min	9.0	37°C

<sup>1</sup>Quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de determinada molécula do substrato em determinado tempo, pH e temperatura.

**Tabela 3.** Composição da dieta isenta de proteínas

Ingredientes	DIP (%)
Amido	81,240
Açúcar	5,000
Óleo de soja	5,000
Fosfato bicálcico	2,100
Calcário	0,80
Sal	0,450
Sabugo de milho <sup>1</sup>	4,000
Vitamina <sup>2</sup>	0,150
Mineral <sup>3</sup>	0,150
Cloreto de colina (60%)	0,200
BHT <sup>4</sup>	0,010
Cinza ácida insolúvel (Celite <sup>TM</sup> )	1,000
Total	100,000

<sup>1</sup>Considerando sabugo com 4, 4% de proteína bruta.

<sup>2</sup>Vit. A 9.375 UI; Vit. D3, 2.375 UI/kg; Vit. E, 35 UI/kg; Vit. B1, 2,50 mg/kg; Vit. B2, 6,25 mg/kg; Vit. B6, 3,5 mg/kg; Vit. B12, 0,015 mg/kg; Ácido Nicotínico, 37,5 mg/kg; Ácido Pantotênico, 12,5 mg/kg; Vit. K3, 1,88 mg/kg; Ácido Fólico, 0,875 mg/kg; Biotina, 0,088 mg/kg.

<sup>3</sup>Selênio, 0,375 mg/kg; Manganês, 88 mg/kg; Ferro, 62,5 mg/kg; Zinco, 81,3 mg/kg; Cobre, 12,5 mg/kg; Iodo, 1,25 mg/kg.

<sup>4</sup>Antioxidante Butil Hidroxi Tolueno.

3-

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Desempenho

No período de 1 a 21 dias de idade, apenas as aves do tratamento CN1 tiveram consumo de ração (CR) menor em relação ao tratamento CP ( $P < 0,05$ ; Tabela 4). Além disso, o CR das aves no tratamento CN2 + Phy + E foi maior ( $P < 0,05$ ) do que nas aves no CN2. A redução nos valores de EM geralmente são compensadas pelo aumento no CR. Contudo, a redução do fósforo atua de forma oposta, diminuindo o CR (Walk & Rama Rao, 2020).

**Tabela 4.** Efeito da suplementação de enzimas exógenas no desempenho de frangos de corte

Variável	Tratamento					CV(%)	P-valor
	CP	CN1	CN2	CN1 + fitase	CN2 + fitase + MEZ		
1-21 dias de idade							
GP (g)	986a	856b	882b	990a	975a	4,32	0,001
CR (g)	1263ab	1171c	1191bc	1237abc	1309a	4,83	0,001
CA	1,285ab	1,369c	1,353bc	1,250a	1,343bc	4,89	0,001
1-42 dias							
GP (g)	2995a	2916b	2915b	2997a	2998a	2,45	0,010
CR (g)	5066	4812	4995	5077	5061	4,20	0,047
CA	1,68	1,65	1,71	1,69	1,69	4,31	0,437

<sup>a-c</sup> Médias na mesma linha com letras diferentes diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Abreviações: MEZ, complexo multienzimático; GP, ganho de peso (g); CR, consumo de ração (g); CA, conversão alimentar (g/g).

<sup>1</sup>CP = controle positivo (dieta atendendo os requerimentos nutricionais de frangos de corte).

<sup>2</sup>CN1 = controle negativo 1 (CP menos 68 kcal/kg de EM, 0,15% de Pd e 0,16% de Ca).

<sup>3</sup>CN2 = controle negativo 2 (CP menos 101 kcal/kg de EM, 0,15% de Pd e 0,16% de Ca).

Esses efeitos, no entanto, dependem do grau de redução do Pd na dieta. Ziarat, Kermanshahi, Mogaddam e Heravi (2020), por exemplo, não observaram redução no CR de frangos na fase

inicial alimentados com dietas deficientes em fósforo e relacionaram a ausência de resposta à insuficiente deficiência de fósforo na dieta, que foi de apenas 0,11% de Pd em relação ao CP.

O ganho de peso (GP) das aves nos tratamentos CN1 e CN2 foi menor no período de 1 a 21 dias de idade, em comparação com as aves dos tratamentos CP, CN1 + Phy e CN2 + Phy + E ( $P < 0,05$ ). O efeito negativo da redução de Pd não é observado apenas na ingestão de alimentos pelas aves. Foi demonstrado que a deficiência de Pd pode levar à anorexia e, portanto, a um menor ganho de peso (Neto, Ceccantini & Fernandes, 2012; Rahimi, Modirsanei & Mansoori, 2020).

No entanto, como hipotetizado, quando as aves receberam dietas com adição de fitase e complexo fitase + multienzima, o GP foi preservado em relação às aves no tratamento controle. Os resultados do presente estudo são semelhantes com os apresentados por Dessimoni et al. (2019), que também observaram melhora no desempenho após adição de fitase a dietas com deficiência de fósforo. Da mesma forma, Ribeiro et al. (2016) observaram efeito positivo no CR e no GP corporal com a adição de fitase em dietas deficientes em fósforo. Em outro estudo, Walk, Pirgozliev, Juntunen, Paloheimo & Ledoux (2019) observaram que a adição de fitase, fitase + xilanase, ou da combinação de fitase + xilanase + protease, a dietas deficientes em fósforo e Ca restaurou o CR e GP e melhorou a eficiência alimentar das aves. Esse efeito pode ser explicado pelo efeito das enzimas na liberação de nutrientes da dieta. De acordo com Walk, Santos & Bedford (2014), melhorias na taxa de conversão alimentar podem ser atribuídas à degradação do fitato pela fitase e ao uso de inositol. Outros estudos também mostraram que a inclusão de fitase em dietas para frangos de corte pode melhorar a digestibilidade ileal de P, aminoácidos, proteínas e EM (Rutherford, Chung, Thomas, Zou & Moughan, 2012; Pieniazek et al., 2017).

Além disso, os efeitos benéficos no desempenho das aves com a inclusão de carboidratos junto à fitase podem ser justificados pelo aumento no valor nutricional da dieta, que ocorre a partir do momento em que a deficiência de fósforo é superada pela fitase e a ingestão de nutrientes é restaurada, permitindo compensar a redução no valor de EM (Francesch & Geeraert, 2009). O milho e o farelo de soja são ingredientes altamente digestíveis, mas podem apresentar quantidades significativas de polissacarídeos não amiláceos (PNAs; 8% a 29%). No milho, os principais PNAs correspondem aos arabinoxilanos e  $\beta$ -galactomanano, enquanto no farelo de soja predominam os  $\alpha$ -galactosídeos e o  $\beta$ -galactomanano (Choct, 1997; Malathi & Devegowda, 2001; Jamroz, Jakobsen, Knudsen, Wiliczkiwicz & Orda, 2002; Amerah, 2015; Jaworski, Lærke, Bach Knudsen & Stein, 2015). As carboidrases, em dietas à base de milho e de farelo de soja, têm sido associadas à ruptura da matriz da parede celular, facilitando a liberação de nutrientes encapsulados e o acesso tanto de enzimas endógenas quanto de enzimas exógenas, como no caso da fitase à molécula de fitato (Olukosi, Cowieson & Adeola, 2007;

Diana et al., 2020). Essas evidências corroboram a hipótese de que o uso de uma combinação de carboidrases e fitase em dietas para frangos de corte pode potencializar seus efeitos, os quais podem ser aditivos ou subaditivos, em dietas baseadas em milho e farelo de soja (Cowieson & Bedford, 2009; Schramm et al., 2017).

Foi postulado que a ação de proteases exógenas sobre proteínas dietéticas pode melhorar o desempenho, bem como aumentar a digestibilidade da proteína e a absorção de aminoácidos em frangos de corte (Fru-Nji, Klunter, Fischer & Pontoppidan, 2011; Mahmoud et al., 2017). Contudo, espera-se que os efeitos no desempenho sejam evidentes apenas em situações em que a digestibilidade da proteína é naturalmente prejudicada ou quando os aminoácidos da dieta são reduzidos (Amerah, Romero, Awati & Ravindran, 2016). No presente estudo, a atividade de protease incluída, de apenas 2.500 U/kg, não parece ter sido suficiente para promover aditividade nas respostas de desempenho das aves. Além disso, o fornecimento de ração *ad libitum* pode ter dificultado a detecção do efeito da enzima. Similarmente, Yuan, Wang, Zhang & Wang (2017) não observaram melhorias significativas no desempenho de frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja, suplementadas com carboidrases (xilanasase, beta-glucanase e celulase) e protease (50.000 U/kg).

No período de 1 a 42 dias de idade, a redução nos níveis de Pd, de Ca e de EM, nas dietas de controle negativo, resultou em GP significativamente pior ( $P > 0,05$ ) das aves em comparação ao das aves do CP ( $P < 0,05$ ). No entanto, embora numericamente inferiores ao CP, respostas significativas da redução de nutrientes no CR ou na CA não foram observadas. A suplementação de fitase ou complexo enzimático na dieta deficiente fez com que o ganho de peso corporal das aves se tornasse semelhante ao das aves alimentadas com a dieta padrão. Esses resultados estão de acordo com trabalhos anteriores que relataram que fitases ou complexos enzimáticos, adicionados a dietas deficientes em Pd, Ca e ME, melhoram a taxa de crescimento em frangos alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja (Lu et al., 2013; Dessimoni et al., 2019; Rahimi, Modirsanei e Mansoori, 2020).

## Metabolismo

Não houve efeito dos tratamentos ( $P > 0,05$ ) sobre os valores de energia metabolizável corrigida para o balanço de nitrogênio (EMAn). A ausência do efeito da fitase nos valores de EMAn da dieta é compatível com o observado em trabalhos anteriores (Rutherford, Chung, Thomas, Zou & Moughan, 2012; Akter, Graham & Iji, 2017). Contudo, isso está em desacordo com autores que observaram que o uso de fitase pode promover efeitos positivos na retenção de energia

pelas aves (Pieniasek et al., 2017; Gallardo et al., 2018). Esses resultados conflitantes podem ser devido a vários fatores, como concentração de ácido fítico na dieta, tipo de ingrediente usado, idade das aves e coeficientes de digestibilidade de gordura, amido e aminoácidos (Cowieson, Aureli, Guggenbuhl & Fru-Nji, 2015). Ademais, é interessante mencionar que a fitase pode melhorar a energia líquida para produção em frangos de corte sem causar efeitos significativos na EMAn (Olukosi & Adeola, 2008). Segundo Akter, Graham & Iji (2017), isso ocorre porque uma quantidade de energia permanece ligada como proteína e gordura no corpo, não se refletindo no valor de EMA, mas sim no valor de energia líquida. Isso indica ainda que a medição de energia líquida poderia ser mais apropriada para avaliar o efeito da energia da fitase.

Também não houve efeito da combinação (fitase + MEZ) nos valores de EMAn (tabela 5). Entretanto, vários estudos demonstraram melhora na retenção de nutrientes e de energia com a suplementação de fitase + carboidrase, ou fitase + carboidrase + protease, em dietas avícolas (Romero, Parsons, Utterback, Plumstead & Ravindran, 2013; Murugesan, Romero & Persla, 2014; Gallardo, Dadalt, Kiarie & Neto, 2017; Gallardo, Dadalt & Neto, 2019). As principais razões atribuídas a essas observações podem estar associadas ao melhor acesso de enzimas digestivas às matrizes das células vegetais e à redução de fatores antinutricionais e de perdas endógenas (Meng & Slominsky, 2005; Olukosi & Adeola, 2008; Gallardo, Dadalt, Kiarie Neto, 2017). De acordo com Amerah, Plumstead, Barnard e Kumar (2014), a resposta às enzimas na melhoria energética pode variar dependendo do conteúdo energético da dieta basal, do nível de substrato e digestibilidade inerente, da saúde intestinal e do efeito das enzimas no perfil da microbiota. Dessa forma, a alta digestibilidade dos ingredientes utilizados nas dietas do presente estudo pode ter contribuído para ausência de respostas na utilização de energia.

## Digestibilidade

Para obtenção dos resultados de coeficientes de digestibilidade ileal de aminoácidos (CDIEAA) para as diferentes dietas, uma dieta livre de proteínas (DIP) foi usada para determinar as perdas de aminoácidos endógenos (g/kg de MS). Os coeficientes de digestibilidade dos aminoácidos arginina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, valina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina e serina foram semelhantes entre os tratamentos CP, CN1 e CN2 (Tabela 6). No entanto, a suplementação do tratamento CN1 com enzima fitase melhorou a digestibilidade dos aminoácidos arginina, isoleucina, leucina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutâmico e se-

rina, em oposição à dieta CN1 sozinha. A adição das enzimas combinadas (fitase + MEZ) melhorou a digestibilidade dos aminoácidos arginina, isoleucina, lisina, fenilalanina, treonina, ácido aspártico e serina, em relação à dieta CN2 ( $P < 0,05$ ).

Os coeficientes de digestibilidade dos aminoácidos histidina e alanina na dieta do tratamento CP foram maiores do que nos tratamentos CN1 e CN2. O uso de fitase isolada e em combinação (fitase + MEZ) aumentou significativamente o coeficiente de digestibilidade da histidina, em relação aos respectivos controles negativos; entretanto, apenas a fitase melhorou a digestibilidade da alanina, quando comparada ao seu controle negativo ( $P < 0,05$ ).

Para os aminoácidos metionina, treonina, cistina, prolina e tirosina, houve diferença significativa nos valores de digestibilidade entre as dietas CP e CN2. Contudo, quando CP e CN1 foram comparados, os valores dos coeficientes de digestibilidade desses aminoácidos foram semelhantes.

**Tabela 5.** Energia metabolizável aparente corrigida para o balanço de nitrogênio em dietas para frangos de corte suplementadas com enzimas exógenas

Variável	Tratamento					CV(%)	P-valor
	CP <sup>1</sup>	CN1 <sup>2</sup>	CN2 <sup>3</sup>	CN1 + fitase	CN2 + fitase + MEZ		
	EMAn (kcal/kg na MN)						
Calculado	3000	2942	2899	3000	3000		
Determinado	3062	3023	3012	3049	3061	2,72	0,665

<sup>a-c</sup> Médias na mesma linha com letras diferentes diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Abreviações: MEZ, complexo multienzimático; EMAn, energia metabolizável aparente corrigida para o balanço de nitrogênio.

<sup>1</sup>CP = controle positivo (dieta atendendo os requerimentos nutricionais de frangos de corte).

<sup>2</sup>CN1 = controle negativo 1 (CP menos 68 kcal/kg de EM, 0,15% de Pd e 0,16% de Ca).

<sup>3</sup>CN2 = controle negativo 2 (CP menos 101 kcal/kg de EM, 0,15% de Pd e 0,16% de Ca).

Quando as enzimas foram fornecidas, a fitase foi capaz de aumentar significativamente o coeficiente de digestibilidade do aminoácido treonina, em contraste com CN1 ( $P < 0,05$ ), enquanto a combinação (fitase + MEZ) melhorou significativamente a digestibilidade dos aminoácidos metionina e treonina, em contraste com a dieta CN2 ( $P < 0,05$ ).

No geral, a combinação (fitase + MEZ) aumentou os coeficientes de digestibilidade dos aminoácidos em 2,55% (88,97% a 91,30%), ao contrário do CN2, enquanto o efeito da fitase individual foi 2,63% maior do que o do CN1 (89,27% a 91,68%).

Os efeitos positivos da fitase no uso de proteínas, observados neste trabalho, são consistentes com os de estudos anteriores, que relataram melhorias na digestibilidade ileal de aminoácidos em frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja (Santos, Hruby, Pierson, Remus & Sakomura, 2008; Rutherfurd, Chung, Thomas, Zou & Moughan, 2012; Pieniasek et al., 2017). Segundo Rutherfurd, Chung, Thomas, Zou & Moughan (2012), os efeitos negativos do fitato na digestibilidade dos aminoácidos são baseados na associação direta entre os grupos fosfato do fitato e as cadeias laterais de aminoácidos básicos das proteínas dietéticas, que reduz a solubilidade e digestibilidade desses nutrientes, e também causados pela inibição de enzimas digestivas, incluindo pepsina e tripsina, pelo fitato.

No entanto, foi sugerido que os efeitos adversos do fitato na utilização dos aminoácidos está amplamente associado a aumento na perda endógena de aminoácidos no intestino, em vez de um impacto direto na retenção de proteínas na dieta (Selle, Creswell, Cadagon, Partridge & Scott, 2006; Cowieson et al., 2017). Foi proposto que o fitato pode aumentar as secreções gástricas de pepsina e HCl em decorrência da formação de complexos binários de proteína-fitato no trato digestivo de frangos de corte (Selle et al., 2012).

Além disso, o aumento da secreção de pepsina pode desencadear saídas de mucoprotetoras adicionais, resultando em aumento da secreção de mucina nas aves (Cowieson, Acamovic & Bedford, 2004). A suplementação de fitase, neste estudo, reduziu os aportes endógenos para digestão de proteínas, o que resultou em melhora no coeficiente de digestibilidade ileal estandardizado dos aminoácidos treonina, leucina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina e serina, que predominam nas proteínas endógenas (Truong et al., 2015; Siegert et al., 2019; Walk & Poernama, 2018).

Assim, a digestibilidade de aminoácidos, como treonina, serina, ácido aspártico, glicina e leucina, que são substancialmente melhorados pela fitase pode ter grande parte do benefício explicada por um fluxo endógeno reduzido. No entanto, as melhorias relatadas na digestibilidade da alanina e da histidina, sugeridas pelos dados deste estudo, não são mediadas pela redução do fluxo endógeno de aminoácidos, mas devem ser devidas a um dos outros mecanismos propostos por Rutherfurd, Chung, Thomas, Zou e Moughan (2012). Além disso, alguns autores consideram a cisteína, que pode ser encontrada no domínio secundário da mucina, o aminoácido mais responsivo à fitase (Cowieson et al., 2017; Dersjant-li & Kwakernaak, 2019). No entanto, respostas significativas para esse aminoácido não foram observadas neste estudo. A variação nas respostas dos aminoácidos pode ser influenciada por diversos fatores animais e alimentares, como idade da ave, tipo de ingrediente, nível de Ca dietético, fonte e concentração da fitase e presença de fatores antinutricionais na dieta (Selle & Ravindram, 2007). No presente estudo, embora a combinação de fitase, carboidrases e protease tenha sido suplementada em

dietas com maiores reduções nas especificações dos aminoácidos, o uso combinado dessas enzimas manteve a digestibilidade ileal estandardizada dos aminoácidos similar à do tratamento com a fitase isolada e à da dieta padrão. Da mesma forma, os efeitos da combinação da fitase com complexos de enzimas na melhora do “valor” dos aminoácidos foram observados em estudos anteriores (Francesch & Geraert, 2009; Gallardo, Dadalt & Neto, 2019). Essa melhora foi associada quebra total ou parcial da matriz da parede celular para liberar amido, gordura, proteína, minerais e fitato, permitindo o acesso de enzimas endógenas e fitase (Slominski, 2011; Karimi et al., 2013; Kiarie, Romero & Ravindran, 2014).

**Tabela 6.** Efeito da suplementação com enzimas exógenas sobre o coeficiente de digestibilidade ideal estandardizado de aminoácidos em frangos de corte

Variável	Tratamento					CV(%)	P-valor
	CP	CN1	CN2	CN1 + fitase	CN2 + fitase + MEZ	EPM	P-valor
<b>Aminoácidos essenciais (%)</b>							
Arginina	91,92abc	91,31bc	90,95c	93,22a	92,91ab	1,27	0,001
Histidina	90,65a	87,92b	88,13b	90,63a	90,62a	1,67	0,001
Isoleucina	91,00abc	89,44bc	89,06c	91,62a	91,19ab	1,62	0,004
Leucina	90,37ab	88,83b	88,65b	91,22a	90,47ab	1,64	0,005
Lisina	92,21ab	91,59ab	90,77b	93,01a	93,74a	1,24	0,003
Metionina	99,55ab	99,06bc	98,47c	99,45	100,04a	0,66	0,001
Fenilalanina	90,29abc	89,37bc	89,19c	91,69a	91,50ab	1,65	0,003
Treonina	89,20ab	86,91bc	85,88c	90,49a	89,24ab	2,53	0,001
Valina	90,25a	88,78a	88,41a	90,77a	90,74a	1,94	0,022
Aminoácidos essenciais totais	91,38abc	90,07bc	89,61c	92,19a	91,78ab	1,54	0,005
<b>Aminoácidos não essenciais (%)</b>							
Alanina	89,87a	87,32b	87,07b	90,13a	89,55ab	2,98	0,001
Ácido aspártico	89,26ab	87,64b	87,41b	90,95a	91,41a	1,98	0,001
Cisteína	87,51a	85,42ab	83,60b	87,40a	86,84ab	1,89	0,019
Ácido glutâmico	91,63abc	91,13c	91,29bc	93,24a	92,94ab	2,95	0,002
Glicina	87,79a	85,26a	85,32a	88,13a	87,43a	1,32	0,015
Prolina	90,22a	87,83ab	86,99b	90,26a	88,85ab	2,40	0,002
Serina	89,21ab	86,84b	87,10b	90,89a	90,29a	1,97	0,001
Tirosina	91,05a	88,73ab	87,78b	90,70a	90,28ab	2,17	0,003
Aminoácidos não essenciais totais	90,16ab	88,57b	88,41b	91,23a	90,88a	1,99	0,002
Total de aminoácidos (%)	90,73abc	89,27bc	88,97c	91,68a	91,30ab	1,75	0,002

<sup>a-c</sup> Médias na mesma linha com letras diferentes diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Abreviações: MEZ, complexo multienzimático.

<sup>1</sup>CP = controle positivo (dieta atendendo os requerimentos nutricionais de frangos de corte).

<sup>2</sup>CN1 = controle negativo 1 (CP menos 68 kcal/kg de EM, 0,15% de Pd e 0,16% de Ca).

<sup>3</sup>CN2 = controle negativo 2 (CP menos 101 kcal/kg de EM, 0,15% de Pd e 0,16% de Ca).

#### **4-CONCLUSÃO**

A suplementação com fitase preserva o desempenho de frangos alimentados com dietas deficientes em Pd, Ca e EM e melhora a digestibilidade dos aminoácidos. A adição de fitase em combinação com um complexo multienzimático preserva o desempenho das aves.

## REFERÊNCIAS

- Adeola, O. and Cowieson, A. J. 2011. Opportunities and challenges in using exogenous enzyme to improve non ruminant animal production. *Journal of Animal Science* 89:3189-3218. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3715>
- Amerah, A. M.; Plumstead, P. W.; Barnard, L. P. and Kumar, A. 2014. Effect of calcium level and phytase addition on ileal phytate degradation and amino acid digestibility of broilers fed corn-based diets. *Poultry Science* 93:906–915. <https://dx.doi.org/10.3382/ps.2013-03465>
- Amerah, A. M.; Romero, L. F.; Awati, A. and Ravindran. 2016. Effect of exogenous xylanase, amylase, and protease as single or combined activities on nutrient digestibility and growth performance of broilers fed corn/soy diets. *Poultry Science* 0:1–10. <https://dx.doi.org/10.3382/ps/pew297>
- Angel, C. R.; Saylor, W.; Vieira, S. L. and Ward, N. 2011. Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7-to 22 day-old broiler chickens. *Poultry Science* 90(10):2281-2286. <https://dx.doi.org/10.3382/ps.2011-01482>
- Akter, M. M.; Graham, H. and Iji, P. A. 2017. Influence of different levels of calcium, non-phytate phosphorus and phytase on apparent metabolizable energy, nutrient utilization, plasma mineral concentration and digestive enzyme activities of broiler chickens. *Journal of Applied Animal Research* 46:278-86. <https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1295972>
- Bedford, M. R. 1996. The effects of enzymes on digestion. *Journal of Applied Poultry Research* 5:370-378. <https://doi.org/10.1093/japr/5.4.370>
- Bournazel, M.; Lessire, M.; Klein, S.; Mème, N.; Peyronnet, C.; Quinsac, A.; Duclos, M. J. and Narcy, A. 2018. Phytase supplementation in diets rich in fiber from rapeseed enhances phosphorus and calcium digestibility but not retention in broiler chickens. *Poultry Science* 97:1627-1640. <https://doi.org/10.3382/ps/pex446>
- Cowieson, A.J.; Acamovic, T. and Bedford, M.R., 2004. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *British Poultry Science* 45: 101–108. <https://doi.org/10.1080/00071660410001668923>
- Cowieson, A. J. and Ravindran, V. 2007. Effect of phytic acid and microbial phytase on the flow and amino acid composition of endogenous protein at the terminal ileum of growing broiler chickens. *British Journal of Nutrition* 98:745-752. <https://doi:10.1017/S0007114507750894>
- Cowieson, A. J. and Bedford, M. R. 2009. The effect of phytase and carbohydrase on ileal amino acid digestibility in monogastric diets: complimentary mode of action?. *World's Poultry Science Journal* 65(4):609-624. <https://doi.org/10.1017/S0043933909000427>

- Cowieson, A. J.; Aureli, R.; Guggenbuhl, P. and Fru-Nji, F. 2015. Possible involvement of myo-inositol in the physiological response of broilers to high doses of microbial phytase. *Animal Production Science* 55(6):710-719. <https://doi.org/10.1071/AN14044>
- Cowieson, A. J. and Roos, F. F. 2016b. Toward optimal value creation through the application of exogenous mono-component protease in the diets of non-ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 221:331-340. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.04.015>
- Cowieson, A. J.; Ruckebusch, J. -P.; Sorbara, J.O.B.; Wilson, J. W.; Guggenbuhl, P. and Roos, F. F. 2017. A systematic view on the effect of phytase on ileal amino acid digestibility in broilers. *Animal Feed Science and Technology* 225:182-194. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.01.008>
- Dersjant-Li, Y.; Awati, A.; Schulze, H. and Partridge, G. 2015. Phytase in non-ruminant animal nutrition: A critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95(5):878–896. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6998>
- Dessimoni, G. V.; Sakomura, N. K.; Donato, D. C. Z.; Goldflus, F. Ferreira, N. T. and Dalólio, F. S. 2019. Effect of supplementation with *Escherichia coli* phytase for broilers on performance, nutrient digestibility, minerals in the tibia and diet cost. *Semina: Ciências Agrárias* 40(2):767-780. <https://doi:10.5433/1679-0359.2019v40n2p767>
- Detmann, E.; Souza, M. A. de; Valadares Filho, S. C.; Queiroz, A. C.; Berchielli, T. T.; Saliba, E. O. S.; Cabral, L. S.; Pina, D. S.; Ladeira, M. M.; Azevedo, J. A. G. 2012. Métodos para análise de alimentos. 1st ed. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal. Suprema, Visconde do Rio Branco, MG, Brazil.
- Dilger, R. N.; Onyango, E. M.; Sands, J. S. and Adeola, O. 2004. Evaluation of microbial phytase in broiler diets. *Poultry Science* 83:962-970. <https://doi.org/10.1093/ps/83.6.962>
- Douglas, M. W.; Parsons, C. M. and Bedford, M. R. 2000. Effect of various soybean meal sources and Avizyme on chick growth and ileal digestible energy. *Journal of Applied Poultry Research* 9(1):74-80. <https://doi.org/10.1093/japr/9.1.74>
- Ferreira, E. B.; Cavalcanti, P. P. and Nogueira, D. A. 2014. ExpDes.pt: An R package for ANOVA and Experimental Designs. *Applied Mathematics* 05(19):2952-2958. <https://doi:10.4236/am.2014-519280>
- Francesch, M. and Geraert, P. A. 2009. Enzyme complex containing carbohydrases and phytase improves growth performance and bone mineralization of broilers fed reduced nutrient corn-soybean-based diets. *Poultry Science* 88:1915-1924. <https://doi:10.3382/ps.2009-00073>

- Freitas, D. M.; Vieira S. L.; Angel, C. R.; Favero, A. and Maiorka, A. 2011. Performance and nutrient utilization of broilers fed diets supplemented with a novel mono-component protease. *The Journal of Applied Poultry Research* 20(3):322-334. <https://doi.org/10.3382/japr.2010-00295>
- Gallardo, C.; Dadalt, J. C.; Kiarie, E. and Neto, M. A. T. 2017. Effects of multi carbohydrase and phytase on standardized ileal digestibility of amino acids and apparent metabolizable energy in canola meal fed to broiler chicks. *Poultry Science* 0:1–9. <https://dx.doi.org/10.3382/ps/pex141>
- Gallardo, C.; Dadalt, J. C. and Neto, M. A. T. 2018. Nitrogen retention, energy, and amino acid digestibility of wheat bran, without or with multicarbohydrase and phytase supplementation, fed to broiler chickens. *Journal of Animal Science* 96:2371-2379. <https://doi.org/10.1093/jas/sky062>
- Hahn-Didde, D. and Purdum, S. E. 2014. The effects of an enzyme complex in moderate and low nutrient-dense diets with drieddistillers grains with solubles in laying hens. *Journal of Applied Poultry Research* 23(1): 23-33. <https://doi.org/10.3382/japr.2013-00764>
- Kamel, N. F.; Naela.; Ragaa, M.; El-Banna, R. A. and Mohamed, F. F. 2015. Effects of a Mono-component Protease on Performance Parameters and Protein Digestibility in Broiler Chickens. *Agriculture and Agricultural Science* 6:216-225. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.08.062>
- Karimi, A.; Min, Y.; Lu, C.; Coto, C.; Bedford, M. R. and Waldroup, P. W. 2013. Assessment of potential enhancing effects of a carbohydrase mixture on phytase efficacy in male broiler chicks fed phosphorus-deficient diets from 1 to 18 days of age. *Poultry Science* 92 :192–198. <https://dx.doi.org/10.3382/ps.2012-02558>
- Lien, K. A.; Sauer, W. A. and Fenton, M. 1997. Mucin output in ileal digesta of pigs fed a protein-free diet. *Journal of Animal Science* 72:1737–1743. <https://doi.org/10.1007/bf01611398>
- Lu, H.; Adedokun, S. A.; Preynat, A.; Legrand-Defretin, V.; Geraert, P. A.; Adeola, O. and Ajuwpon, K. M. 2013. Impact of exogenous carbohydrases and phytase on growth performance and nutrient digestibility in broilers. *Canadian Journal of Animal Science* 93: 243-249. <https://doi.org/10.4141/cjas2012-138>
- Olukosi, O.A.; Cowieson, A. J. and Adeola, O. 2007. Age-related influence of a cocktail of xylanase, amylase, and protease or phytase individually or in combination in broilers. *Poultry Science* 86: 77–86. <https://doi.org/10.1093/ps/86.1.77>
- Olukosi, O. A. and Adeola, O. 2008. Whole body nutrient accretion, growth performance and total tract nutrient retention responses of broilers to supplementation of xylanase and phytase individually or in combination in wheat-soybean meal based diets. *Journal of Poultry Science* 45:192–198. <https://doi.org/10.2141/jpsa.45.192>

- Olukosi, O. A.; Cowieson, A. J. and Adeola, O. 2010. Broiler responses to supplementation of phytase and admixture of carbohydrases and protease in maize\_soyabean meal diets with or without maize distillers' dried grain with solubles. *British Poultry Science* 51: 434-443. <https://doi.org/10.1080/00071668.2010.493170>
- Olukosi, O. A.; González-Ortiz, G.; Whitfield, H. and Bedford, M. R. 2020. Comparative aspects of phytase and xylanase effects on performance, mineral digestibility, and ileal phytate degradation in broilers and turkeys. *Poultry Science* 99:1528–1539. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.018>
- Onyango, E.M.; Bedford, M. R. and Adeola, O. 2005. Efficacy of an evolved *Escherichia coli* phytase in diets of broiler chicks. *Poultry Science* 84:248-255. <https://doi.org/10.1093/ps/84.2.248>
- Pieniasek, J.; Smith, K. A.; Williams, M. P.; Manangi, M. K.; Vazquez-Anon, M.; Solbak, A.; Miler, M. and Lee, T. 2017. Evaluation of increasing levels of a microbial phytase in phosphorus deficient broiler diets via live broiler performance, tibia bone ash, apparent metabolizable energy, and amino acid digestibility. *Poultry Science* 96:370-382. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew225>
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ribeiro Junior, V.; Salguero, S. C.; Gomes, G.; Barros, V. R. S. M.; Silva, D. L.; Barreto, S. L. T.; Rostagno, H. S.; Hannas, M. I. and Albino, L. F. T. 2016. Efficacy and phosphorus equivalency values of two bacterial phytases (*Escherichia coli* and *Citrobacter braakii*) allow the partial reduction of dicalcium phosphate added to the diets of broiler chickens from 1 to 21 days of age. *Animal Feed Science and Technology* 221:226-233. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.09.008>
- Romero L. F.; Parsons C. M.; Utterback P. L.; Plumstead P. W. and Ravindran V. 2013. Comparative effects of dietary carbohydrases without or with protease on the ileal digestibility of energy and amino acids and AMEn in young broilers. *Animal Feed Science Technology* 181:35-44. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.02.001>
- Rostagno, H. S.; Albino, L. F. T.; Hannas, M. I.; Donzele, J. L.; Sakomura, N. K.; Perazzo, F. G.; Saraiva, A.; Teixeira, M. V.; Rodrigues, P. B.; Oliveira, R. F.; Barreto, S. L. T. and Brito, C. O. 2017. *Brazilian Tables For Poultry And Swine: Composition of Feedstuffs and Nutritional Requirements*. 4th ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.
- Rutherford, S. M.; Chung, T. K.; Thomas, D. V.; Zou, M. L. and Moughan, P. J. 2012. Effect of a novel phytase on growth performance, apparent metabolizable energy, and the availability of minerals and amino acids in a low-phosphorus corn-soybean meal diet for broilers. *Poultry Science* 91:1118-1127. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2011-01702>
- Sakomura, N. K. and Rostagno, H. S. *Research Methods in Monogastric Nutrition*. 2th ed.

FUNEP, Jaboticabal, SP, Brazil.

Schramm, V. G.; Durau, J. F.; Barrilli, L. N. E.; Sorbara, J. O. B.; Cowieson, A. J.; Felix, A. P.; Maiorka, A. 2017. Interaction between xylanase and phytase on the digestibility of corn and a corn/soy diet for broiler chickens. *Poultry Science* 96(5):1204-1211. <https://doi.org/10.3382/ps/pew356>

Santos, F. R.; Hruby, M.; Pierson, E. E. M.; Remus, J. C. and Sakomura, N. K. 2008. Effect of phytase supplementation in diets on nutrient digestibility and performance in broiler chicks. *Journal of Applied Poultry Research* 17(2):191-201. <https://doi.org/10.3382/japr.2007-00028>

Siegert, W.; Zuber, T.; Sommerfeld, V.; Krieg, J.; Feuerstein, D.; Kurrle, U. and Rodehutsord, M. 2019. Prececal amino acid digestibility and phytate degradation in broiler chickens when using different oilseed meals, phytase and protease supplements in the feed. *Poultry Science*, 98:5700–5713. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez355>

Selle, P. H.; Creswell, D. C.; Cadagon, D. J.; Partridge, G. G. and Scott, T. 2006. Phytase supplementation of wheatbased broiler diets reduces dependence on meat and bone meal. *Journal of Poultry Science* 43:330-338. <https://doi.org/10.2141/jpsa.43.330>

Selle, P. H. and Ravindran, V. 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology* 135:1-41. <https://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.010>

Selle, P. H.; Cowieson, A. J.; Cowieson, N. P. and Ravindran, V. 2012. Protein-phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. *Nutrition Research Reviews* 25:1-17. <https://doi.org/10.1017/s0954422411000151>

Van Keulen, J. and Young, B.A. 1977. Evaluation of acid-insoluble ash as natural marker in ruminant digestibility studies. *Journal of Animal Science* 4:282-287. <https://doi.org/10.2527/jas1977.442282x>

Walk, C. L.; Santos, T. T. and Bedford, M. R. 2014. Influence of superdoses of a novel microbial phytase on growth performance, tibia ash, and gizzard phytate and inositol in young broilers. *Poultry Science* 93(5): 1172-1177. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03571>.

Walk, C. L.; Pirgozliev, V.; Juntunen, K.; Paloheimo, M. and Ledoux, D. R. 2018. Evaluation of novel protease enzymes on growth performance and apparent ileal digestibility of amino acids in poultry: enzyme screening. *Poultry Science* 97(6):2123-2138. <https://doi.org/10.3382/ps/pey080>

Walk, C. L. and Poernama, F. 2018. Evaluation of Phytase, Xylanase, and Protease in Reduced Nutrient Diets Fed to Broilers. *Journal Applied Poultry Research* 28:85-93. <http://dx.doi.org/10.3382/japr/pfy022>

Yuan, L.; Wang, M.; Zhang, X. and Wang, Z. 2017. Effects of protease and non-starch polysaccharide enzyme on performance, digestive function, activity and gene expression of endogenous enzyme of broilers *PLoS ONE* 12(3): e0173941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173941>

Zhou, Y.; Jiang, Z. Lv, D. and Wang, T. 2009. Improved energy-utilizing efficiency by enzyme preparation supplement in broiler diets with different metabolizable energy levels. *Poultry Science* 88(2):316-322. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00231>

Ziarat, M. M.; Kermanshahi, H.; Mogaddam, H. N. and Heravi, R. M. 2020. Performance of an *Escherichia coli* phytase expressed in *Lactococcus lactis* on nutrient retention, bone traits and intestinal morphology in broiler chickens. *Journal of Animal Physiology Animal Nutrition* 00:1–9. <https://doi:10.1111/jpn.13332>.

## **CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO II**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE FÚNGICA COM OU SEM ASSOCIAÇÃO COM UM COMPLEXO ENZIMÁTICO EM DIETAS COM REDUÇÃO NUTRICIONAL PARA FRANGOS DE CORTE**

## RESUMO

Um experimento foi conduzido para avaliar os efeitos da suplementação de fitase ou fitase + complexo multienzimático em dietas de milho e farelo de soja com redução de Ca, fósforo disponível (Pd) e energia sobre o desempenho, a retenção de energia e a digestibilidade de aminoácidos em frangos de corte. Um total de 1.528 frangos de corte machos Cobb 500 foram distribuídos aleatoriamente em um dos cinco tratamentos: controle positivo atendendo às recomendações nutricionais (CP); dois controles negativos (CN) com redução de 0,16% de Ca, 0,15% de Pd, 80 kcal/kg de EM no CN1 e 100 kcal/kg de EM no CN2; CN1 + 1.000 FTU/kg de fitase; e CN2 + 1.000 FTU/kg de fitase + 15.000 U/kg de xilanase + 2.400 U/kg de  $\beta$ -glucanase + 2.400 U/kg de  $\beta$ -mananase + 1.200 U/kg de celulase + 150 U/kg de  $\alpha$ -amilase + 100 U/kg de  $\alpha$ -galactosidase + 1.500 U/kg de pectinase + 2.500 U/kg de protease. Foram realizados três ensaios: avaliação do desempenho das aves, determinação dos valores de EMAn e de digestibilidade dos aminoácidos das dietas. Os resultados demonstraram que, nos períodos de 1 a 21 e de 1 a 42 dias de idade, as reduções nutricionais afetaram negativamente o desempenho de frangos de corte e os valores de energia da dieta. A adição de fitase ou fitase mais complexo multienzimático às dietas CN restaurou o desempenho das aves aos mesmos níveis da dieta CP. No entanto, para os valores de energia, as respostas à suplementação enzimática foram intermediárias às das dietas CP e CN. A inclusão de enzimas melhorou a digestibilidade da maioria dos aminoácidos para níveis superiores aos do CP e CN. A suplementação enzimática melhorou a utilização de aminoácidos e o desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis nutricionais reduzidos.

**Palavras-chave:** Frangos de corte, desempenho, fitase, digestibilidade de aminoácidos, complexo multienzimático.

**EFFECT OF SUPPLEMENTATION OF A FUNGIC PHYTASE ALONE OR IN COMBINATION WITH A MULTIENZYMATIC COMPLEX IN REDUCED NUTRIENTS DIETS FED TO BROILER ON GROWTH PERFORMANCE, APPARENT METABOLIZABLE ENERGY, AND AMINO ACID DIGESTIBILITY**

## ABSTRACT

An experiment was carried out to evaluate the effects of phytase or phytase + multienzymatic complex in diets with reduced Ca, available phosphorus (Ap) and energy on performance, energy retention and amino acid digestibility in broilers. A total of 1528 male Cobb 500 broilers were randomly assigned to one of five treatments: positive control according to nutritional recommendations (PC); two negative controls (NC) with a reduction of 0.16% of Ca, 0.15% of Pd and ME (80 kcal/kg of ME in NC1 and 100 kcal/kg of ME in NC2); NC1 + 1,000 FTU/kg of phytase and NC2 + 1,000 FTU/kg of phytase + 15,000 U/kg xylanase + 2,400 U/kg  $\beta$ -glucanase + 2,400 U/kg  $\beta$ -mannanase + 1,200 U/kg cellulase + 150 U/kg of  $\alpha$ -amylase + 100 U/kg of  $\alpha$ -galactosidase + 1,500 U/kg of pectinase + 2,500 U/kg of protease. The results showed that, in the periods from 1 to 21 and from 1 to 42 days of age, nutritional reductions negatively affected broiler performance and energy values. The addition of phytase or phytase more multi-enzyme to the NC diets restored the performance of the birds to the same levels as the PC diet. However, for energy values, responses to enzyme supplementation were intermediate to PC and NC diets. The inclusion of enzymes increased the digestibility of most amino acids to levels higher than those of CP and NC. Enzymatic supplementation improved the use of amino acids and the performance of broilers fed diets with reduced levels of Ca, Ap and energy.

**Keywords:** Broilers, performance, phytase, amino acid digestibility, multienzymatic complex.

## I-INTRODUÇÃO

O milho e o farelo de soja contêm quantidades significativas de fitato (55% a 85% do fósforo total) e polissacarídeos não amiláceos (PNAs; 8 a 29%) que afetam negativamente os valores nutricionais das rações para aves (Bach Knudsen, 1997; Malathi e Devegowda, 2001; Choct et al., 2010; Jaworski et al., 2015). As aves não possuem as enzimas endógenas necessárias para hidrolisar adequadamente o ácido fítico, tornando parte do fósforo orgânico nos grãos e sementes oleaginosas indisponível. Assim, a inclusão dietética dispendiosa de fontes desse mineral em rações para frangos de corte tem sido uma prática de rotina, uma vez que se busca o atendimento dos requerimentos por esse mineral (Scholey et al., 2018). Dessa forma, a inclusão de fitase exógena nas dietas das aves pode oferecer uma oportunidade para hidrolisar o fitato, aumentar o aproveitamento dos nutrientes e reduzir os níveis de inclusão de ingredientes onerosos às rações (Dersjant-Li et al., 2015; Pieniazek et al., 2017; Santos et al., 2019).

Combinar a fitase com complexos multienzimáticos (MEZ) pode ser uma alternativa para aumentar a acessibilidade dela ao substrato (Roofchaei et al., 2019). As carboidrases presentes nesses complexos quebram a matriz da parede celular, principalmente de componentes insolúveis, facilitando a liberação de nutrientes encapsulados e o maior acesso da fitase ao fitato (Schramm et al., 2017; Gallardo et al., 2018). Contudo, a resposta da combinação de fitase e outras enzimas exógenas tem sido inconsistente em dietas à base de milho e farelo de soja para frangos de corte, sendo seus efeitos sinérgicos mais comumente encontrados em frangos alimentados com dietas com redução de nutrientes (Woyengo e Nyachoti, 2011).

Tem sido observado efeitos positivos da suplementação de fitase no desempenho e na utilização de nutrientes, o que permite a redução dos níveis de energia, P e Ca nas dietas de aves (Ravindran et al., 2008; Walk e Rama Rao, 2020; Broch et al., 2020). Nesse contexto, o efeito complementar da adição combinada de complexos multienzimáticos e fitase pode permitir redução adicional de energia, o que precisa ser posteriormente demonstrado no desempenho e na utilização de energia e aminoácidos em frangos de corte.

Em vista do potencial benefício da combinação de enzimas exógenas em dietas avícolas e devido à falta de conhecimentos relacionados aos efeitos da combinação entre multienzimas e fitase sobre o desempenho e utilização de nutrientes em frangos de corte alimentados com dietas de milho e farelo de soja, foi hipotetizado que a combinação de fitase e do complexo enzimático (MEZ) pode permitir a redução de energia, cálcio e fósforo na dieta sem afetar a utilização de nutrientes e o desempenho das aves. Portanto, objetivou-se com este estudo avaliar os efeitos da fitase ou da associação entre fitase e MEZ, suplementadas em dietas deficientes em fósforo disponível (Pd), cálcio

(Ca) e energia metabolizável (EM), sobre o desempenho de frangos de corte e sobre os valores de ME e digestibilidade de aminoácidos.

## 2-MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Produção e Nutrição de Aves do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Estado de Minas Gerais, Brasil (20 ° 45'57,19" S, 42 51'35,42" W e 682 m de altitude). Todos os procedimentos experimentais adotados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Produção (processo nº 0107/2018), de acordo com os princípios éticos de experimentação animal estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e legislação vigente.

### Aves e desenho experimental

Duas dietas basais foram formuladas para os experimentos à base de milho e farelo de soja, nas fases inicial e de crescimento/terminação, seguindo as recomendações nutricionais de Rostagno et al. (2017; Tabela 1). Os mesmos cinco tratamentos foram usados nos três experimentos: controle positivo (CP), controle negativo 1 (CN1, redução de 0,15% Pd, 0,16% de Ca e 80 kcal kg<sup>-1</sup> EM em relação ao CP), controle negativo 2 (CN2, redução de 0,15% de Pd, 0,16% de Ca e 100 kcal kg<sup>-1</sup> de EM em relação à dieta CP), CN1 com a adição de fitase (CN1 + Phy) e CN2 com a adição de fitase e complexo multienzimático (CN2 + Phy + E).

O complexo multienzimático (SQzyme CEM, Suntaq International Limited, Shenzhen, China), contendo predominantemente carboidrases, é composto de  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -mananase, pectinase, xilanase, celulase ácida,  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -glucanase e protease (Tabela 2). O complexo multienzimático, originário de *Trichoderma reesei* (601-17), foi aplicado, na dose de 100 g/t de dieta, para fornecer um mínimo garantido de 100, 1.500, 1.500, 15.000, 1.200, 150, 2.400 e 2.500 unidades por kg da dieta de  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -mananase, pectinase, xilanase, celulase ácida,  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -glucanase e protease, respectivamente. A fitase foi derivada de *Aspergillus niger* (EC 3.1.3.26), modificada por *Pichiapastoris*, e fornecida a uma taxa de 1.000 FTU kg<sup>-1</sup> de dieta.

## Procedimentos experimentais

No experimento de desempenho, um total de 1.000 pintos machos Cobb 500 de um dia de idade foram pesados ( $42,34 \pm 0,11$  g cada) e distribuídos em cada tratamento com pesos corporais médios semelhantes. As aves foram casualmente distribuídas em cinco tratamentos, com 10 repetições de 20 pintinhos cada. Cada baia contendo 20 pintinhos foi considerada uma unidade experimental e consistiu de um boxe com piso de concreto, com dimensões de  $1,25 \times 1,80$  m e total de  $2,25$  m<sup>2</sup>. Os animais foram manejados em galpões de alvenaria de 3 m de altura, com telhas de cimento-amianto, paredes baixas de 50 cm e tela de 1,27 cm adaptada para experimentação animal. A cama de frango consistia de serragem nova. Os parâmetros de desempenho avaliados foram consumo de ração (CR, g), ganho de peso (GP, g) e taxa de conversão alimentar (CA, g g<sup>-1</sup>). O peso corporal e o CR foram registrados aos 21 e 42 d. A mortalidade foi registrada diariamente para posterior correção do CR, segundo Sakomura e Rostagno (2016). Ração e água foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental.

No segundo experimento (metabolismo), 240 frangos de corte machos Cobb 500 foram alojados em gaiolas contendo bandejas revestidas com plástico, para coleta das excretas totais. Cada gaiola metabólica foi equipada com um comedouro e um bebedouro para aves, para acesso *ad libitum* à ração e água. As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, oito repetições e seis aves por unidade experimental. Os frangos foram alimentados com dieta comercial inicial à base de milho e farelo de soja por 13 dias e, posteriormente, introduzidos nas dietas experimentais.

A excreta total foi coletada do dia 19 ao dia 23 para determinar os valores da energia metabolizável aparente corrigida para nitrogênio (EMAn), considerando um período de adaptação de quatro dias (dias 14-18) e as excretas, coletadas duas vezes ao dia (8h e 18h), por quatro dias consecutivos (dias 19-22). Ao final da coleta de excretas, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas, sendo as subamostras acondicionadas em recipientes plásticos e armazenadas em freezer a 18°C até a análise.

No terceiro experimento (digestibilidade), 288 frangos de corte machos Cobb 500 foram alojados em gaiolas, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, oito repetições e seis aves por unidade experimental. Para medir os coeficientes da digestibilidade ileal estandardizada de aminoácidos (CDIEAA), uma dieta livre de proteínas (DIP) foi usada para determinar a excreção endógena de aminoácidos (Tabela 3). As aves receberam a dieta experimental dos 16 aos 20 dias de idade. Celite® (Celite Corp., Lompoc, CA, EUA), uma fonte de cinza ácida insolúvel (CAI), foi adicionada a todas as dietas a 10 g kg<sup>-1</sup> como um marcador

indigestível, e as concentrações de CAI foram determinadas pelo método de Van Keulen e Young (1977).

Após uma adaptação de cinco dias, no 21º dia, todas as aves foram mortas por deslocamento cervical, e a cavidade abdominal foi aberta imediatamente, para expor o trato digestivo. O segmento terminal do íleo de 15 cm foi seccionado a 4 cm da junção ileocecal, a fim de acessar a digesta ileal. As amostras ileais foram congeladas e armazenadas a -20 °C até o processamento. Amostras ileais foram liofilizadas por 72 horas a -40°C (LH 0401, Terroni, São Carlos, Brasil).

### Análises químicas

Amostras de excreta e ração foram secas a 55 °C em estufa de ventilação forçada por 72 horas. As amostras foram moídas em tela de 1 mm. O teor de matéria seca (MS) foi determinado secando-se as amostras em estufa durante a noite a 105 °C (método INCT-CA G-003/1; Detmann et al., 2012). O método de Kjeldahl foi utilizado para determinar o nitrogênio nas dietas e excretas, de acordo com os métodos oficiais de análise (método INCT-CA N-001/1; Detmann et al., 2012). O nitrogênio excretado (NE) foi calculado multiplicando-se a quantidade total excretada na MS pela porcentagem de nitrogênio na excreta, também na MS. O mesmo foi aplicado ao cálculo do nitrogênio (NC) consumido. O balanço de nitrogênio (BN) foi obtido a partir da quantidade de nitrogênio consumido menos o nitrogênio excretado. O conteúdo de energia bruta (EB) foi medido por uma bomba calorimétrica adiabática C5001 (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemanha). Os valores de EMAn foram calculados com base na análise das dietas e excretas, segundo Sakomura e Rostagno (2016).

As análises da MS (método INCT-CA G-003/1; Detmann et al., 2012), das rações e da digesta ileal coletada do frango no terceiro experimento, foram realizadas para os cálculos de digestibilidade. As análises laboratoriais para determinação do teor de aminoácidos das dietas e excretas foram realizadas pela CBO - Análises Laboratoriais (Campinas, São Paulo, Brasil) por meio de HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho). A digestibilidade dos aminoácidos foi calculada com base na análise das dietas e da digesta ileal, segundo Sakomura e Rostagno (2016).

## Análise estatística

Os dados de desempenho, energia metabolizável e digestibilidade de aminoácidos foram analisados pela ANOVA, usando-se o software R. Boxes ou gaiolas foram considerados unidades experimentais. Um valor de probabilidade de  $P < 0,05$  foi considerado para ser estatisticamente significativo.

O teste de Tukey no nível de significância  $P < 0,05$  foi utilizado para identificar diferenças significativas entre as médias.

O modelo estatístico usado foi:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij},$$

em que  $Y_{ij}$  é a observação do  $i$ -ésimo tratamento na  $j$ -ésima unidade experimental (variável-resposta),  $\mu$  é a média geral,  $\tau_i$  é o efeito do tratamento e  $\epsilon_{ij}$  é o erro experimental.

**Tabela 1.** Composição e valores nutricionais calculados de dietas Controle Positivo (CP) e Controles Negativos (NC)

Ingredientes (%)	1 a 21 dias de idade				22 a 42 dias de idade	
	CP1	CN1	CN2	CP	CN1	CN2
Milho	50,496	53,834	54,192	59,220	62,470	62,928
Farelo de soja	41,420	40,900	40,825	32,689	32,164	32,090
Óleo de soja	3,830	1,810	1,427	4,490	2,470	2,086
Fosfato bicálcico	1,790	0,970	0,969	1,490	0,675	0,674
Calcário	0,920	1,033	1,034	0,715	0,825	0,825
Sal	0,515	0,415	0,515	0,472	0,472	0,471
DL-Metionina (99%)	0,318	0,315	0,314	0,253	0,250	0,248
Lisina-sulfato (54,6%)	0,197	0,211	0,212	0,160	0,169	0,170
L-Treonina (98%)	0,048	0,046	0,046	0,032	0,032	0,031
Vitamina4	0,130	0,130	0,130	0,130	0,130	0,130
Mineral5	0,130	0,130	0,130	0,130	0,130	0,130
Cloreto de Colina (60%)	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Salinomicina6 (12%)	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055
BHT7	0,001	0,001	0,001	0,010	0,010	0,010
Amido	0,050	0,050	0,050	-	-	-
Total	100	100	100	100	100	100

## Composição nutricional calculada (%)

Energia	Metabolizável					
kcal/kg	3000	2920	2900	3150	3070	3050
Proteína bruta %	23,23	23,3	22,153	19,94	19,964	19,967
Cálcio %	0,937	0,777	0,777	0,758	0,598	0,598
Fósforo disponível %	0,440	0,290	0,290	0,374	0,224	0,224
Sódio %	0,218	0,218	0,218	0,200	0,200	0,200
Lisina dig. %	1,256	1,256	1,256	1,070	1,070	1,070
Metionina + Cisteína dig. %	0,929	0,929	0,929	0,790	0,792	0,792
Treonina dig. %	0,829	0,829	0,829	0,706	0,706	0,706
Triptopano dig. %	0,268	0,268	0,268	0,222	0,221	0,221

<sup>1</sup>CP = controle positivo (dieta atendendo os requerimentos nutricionais de frangos de corte).

<sup>2</sup>CN1 = controle negativo 1 (CP menos 68 kcal/kg de EM, 0,15% de Pd e 0,16% de Ca).

<sup>3</sup>CN2 = controle negativo 2 (CP menos 101 kcal/kg de EM, 0,15% de Pd e 0,16% de Ca).

<sup>4</sup>Vit. A 9.375 UI; Vit. D3, 2.375 UI/kg; Vit. E, 35 UI/kg; Vit. B1, 2,50 mg/kg; Vit. B2, 6,25 mg/kg; Vit. B6, 3,5 mg/kg; Vit. B12, 0,015 mg/kg; Ácido Nicotínico, 37,5 mg/kg; Ácido Panto-totênico, 12,5 mg/kg; Vit. K3, 1,88 mg/kg; Ácido Fólico, 0,875 mg/kg; Biotina, 0,088 mg/kg.

<sup>5</sup>Selênio, 0,375 mg/kg; Manganês, 88 mg/kg; Ferro, 62,5 mg/kg; Zinco, 81,3 mg/kg; Cobre, 12,5 mg/kg; Iodo, 1,25 mg/kg.

<sup>6</sup>Anticoccidiano.

<sup>7</sup>Antioxidante Butil Hidroxi Tolueno.

**Tabela 2.** Definição e Propriedades enzimáticas das enzimas adicionadas às rações.

Enzimas	Definição <sup>1</sup>				
	Molécula liberada	Substrato	Tempo de reação	pH	Temperatura
Fitase	1 µmol de P inorgânico	Fitato de Sódio	1 min	5.5	37°C
α-Galactosidase	1 µmol de <i>p</i> -Nitrofenol	<i>p</i> -Nitrofenil-α-D-Galactopiranosídeo	1 min	6.0	37°C
β-Mananase	1 µmol de Manose	Galactomanano	1 min	5.0	70°C
Pectinase	1 µmol de Ácido D-Galacturônico	Ácido Poligalacturônico	1 min	5.0	37°C
Xilanase	1 µmol de Xilose	Xilano	1 min	5.0	50°C
Celulase	1 µmol de Glicose	Filtrado de papel	1 min	4.8	50°C
α-Amylase	1 µmol de glicose	Amido	5 min	6.9	40°C
β-Glucanase	1 µmol de glicose	Carboximetilcelulose	1 min	4.8	50°C
Protease	1 µmol de Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-N-succinil Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida	<i>p</i> -Nitroanilina	1 min	9.0	37°C

<sup>1</sup>Quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de determinada molécula do substrato em determinado tempo, pH e temperatura.

**Tabela 3.** Composição da dieta isenta de proteínas

Ingredientes	PFD (%)
Amido	81,240
Açúcar	5,000
Óleo de soja	5,000
Fosfato bicálcico	2,100
Calcário	0,700
Sal	0,450
Sabugo de milho <sup>1</sup>	4,000
Vitamina <sup>2</sup>	0,150
Mineral <sup>3</sup>	0,150
Cloreto de colina (60%)	0,200
BHT <sup>4</sup>	0,010
Cinza ácida insolúvel (Celite™)	1,000
Total	100,000
Proteína bruta (%)	0,174

<sup>1</sup>Considerando sabugo com 4,4% de proteína bruta.

<sup>2</sup>Vit. 9.375 IU; Vit. D3, 2.375 IU; Vit. E, 35 IU; Vit. B1, 2,50 mg; Vit. B2, 6,25 mg; Vit. B6, 3,5 mg; Vit. B12, 0,015 mg; Ácido Nicotínico, 37,5 mg; Ácido Pantotênico, 12,5 mg; Vit. K3, 1,88 mg; Ácido Fólico, 0,875 mg; Biotina, 0,088 mg.

<sup>3</sup>Selênio, 0,375 mg; Manganês, 88 mg; Ferro, 62,5 mg; Zinco, 81,3 mg; Cobre, 12,5 mg; Iodo, 1,25 mg.

<sup>4</sup>Antioxidante Butil Hidroxi Tolueno.

### 3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Desempenho

Durante a fase inicial (d 1 a 21) e total (d 1 a 42), o GP foi menor ( $P < 0,05$ ) nas aves alimentadas com as dietas CN, em comparação àquelas que receberam a dieta CP (Tabela 4). O CR de d 1 a 21 e total foi menor ( $P < 0,05$ ) para aves que receberam a dieta CN2, em relação àquelas que se alimentaram com todas as outras dietas. A maior redução de energia (100 *versus* 80 kcal/kg) nas dietas de baixo Ca e Pd resultou em maiores reduções no CR e GP, em comparação ao PC, em ambas as fases de avaliação. Para demonstrar o potencial de utilização de enzimas exógenas em dietas à base de milho e farelo de soja, torna-se fundamental demonstrar uma diminuição significativa no desempenho de aves alimentadas com dietas con-

tendo níveis reduzidos de nutrientes. De fato, o GP e o CR foram diminuídos em aves alimentadas com dietas CN, em comparação com aquelas alimentadas com dietas contendo níveis adequados de nutrientes. Isso está de acordo com o relatado anteriormente para diferentes tipos de ingredientes e graus de deficiência nutricional em dietas para frangos de corte (Neto, 2012; Amerah et al., 2014; Dessimoni et al., 2019).

**Tabela 4.** Efeito de enzimas exógenas no desempenho de frangos de corte

Variável	Tratamento					CV(%)	P-valor
	CP	CN1	CN2	CN1 + fitase	CN2 + fitase + MEZ		
1-21 dias de idade							
GP (g)	970a	874b	787c	963a	977a	4,45	0,001
CR (g)	1264ab	1208b	1078c	1290a	1300a	3,80	0,001
CA	1,30a	1,38c	1,37bc	1,34abc	1,33ab	3,03	0,001
1-42 dias de idade							
GP (g)	3226a	3031b	2844c	3208a	3173 <sup>a</sup>	2,78	0,001
CR (g)	5013a	4856a	4354b	4932a	4949 <sup>a</sup>	4,16	0,001
CA	1,55ab	1,61b	1,54a	1,54a	1,56ab	3,53	0,016

<sup>a-c</sup> Médias na mesma linha com letras diferentes diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Abreviações: MEZ, complexo multienzimático; GP, ganho de peso (g); CR, consumo de ração (g); CA, conversão alimentar (g/g).

<sup>1</sup>CP = controle positivo (dieta atendendo os requerimentos nutricionais de frangos de corte).

<sup>2</sup>CN1 = controle negativo 1 (CP menos 80 kcal/kg de EM, 0,15% de Pd e 0,16% de Ca).

<sup>3</sup>CN2 = controle negativo 2 (CP menos 100 kcal/kg de EM, 0,15% de Pd e 0,16% de Ca).

A suplementação com fitase no CN1 ou a suplementação com fitase mais complexo multienzimático no CN2 melhorou ( $P < 0,05$ ) o GP e o CR para níveis acima daqueles de aves alimentadas com as dietas CN e não foram diferentes daqueles de aves alimentadas com a dieta PC. Segundo Broch et al. (2020), a fitase atenua os efeitos negativos da redução nutricional em dietas para frangos de corte, o que está relacionado ao aumento da disponibilidade de P, outros minerais e nutrientes, como resultado da ação de hidrólise sobre o ácido fítico. Isso está de acordo com outros estudos, segundo os quais níveis baixos de nutrientes e energia, quando associados à suplementação de fitase, podem ser fornecidos sem ter quaisquer efeitos prejudiciais no desempenho das aves (Rutherford et al., 2012).

A CA de aves alimentadas com as duas dietas CN, aos 21 dias de idade, foi significativamente pior ( $P < 0,05$ ) em comparação à CA daquelas alimentadas com as dietas CP, e isso foi relatado anteriormente em aves alimentadas com dietas deficientes em nutrientes e energia (Walk e Rama Rao, 2020; Poernama et al., 2021). No entanto, embora tenha sido observado efeito numérico, a suplementação com fitase no CN1 ou a suplementação com fitase mais complexo multienzimático no CN2 não melhoraram a CA em comparação às dietas CN, que também não diferiram da dieta CP. Entretanto, na fase total, a CA de aves alimentadas com CP não diferiu da CA daquelas alimentadas com as dietas CN; apenas as aves que receberam CN1 + fitase exibiram menor ( $P < 0,05$ ) CA, em comparação àquelas alimentadas com CN1 sem enzimas. Santos et al. (2017) relataram melhorias significativas na eficiência alimentar de frangos de corte alimentados com dietas com a adição de fitase isolada ou adição da combinação de fitase mais xilanase mais protease, mas esse efeito foi perdido no dia 42, e ali não houve benefício significativo das combinações de enzimas no desempenho. Da mesma forma, ficou evidente no estudo atual que, quando o complexo multienzimático foi usado em combinação com a fitase, seu benefício na CA não foi percebido aos 42 dias de idade das aves.

No entanto, o MEZ não foi avaliado individualmente no estudo atual, e outros estudos relataram que frangos de corte alimentados com dietas deficientes em nutrientes e energia tiveram desempenho mais eficiente quando as dietas eram suplementadas com fitase (Karimi et al., 2013), fitase mais multienzimas (Roofchaei et al., 2019) ou somente complexo de carboidrases (Yuan et al., 2017). Esses resultados inconsistentes se devem, principalmente, a ingredientes variados usados na dieta e sua inerente digestibilidade, teor de fatores antinutricionais, tipos de atividade enzimática e combinações selecionadas, além dos níveis de redução de nutrientes em diferentes estudos (Wang et al., 2021). Nesse contexto, tendo em vista que a maioria das dietas comerciais para aves contém uma fitase, uma carboidrase ou uma protease e, na maioria das vezes, a combinação dessas enzimas, seria interessante avaliar a possibilidade dos efeitos aditivos da combinação dessas enzimas em uma abordagem fatorial (Walk e Poernama, 2019).

Nenhum impacto na CA foi observado entre CN1 e CN2 na fase inicial, ao passo que, na fase total, a CA de aves que receberam a dieta CN1 foi pior ( $P < 0,01$ ) do que a CA de aves alimentadas com a dieta CN2. Aparentemente, a melhor CA apresentada pelas aves que se alimentaram da dieta CN2 foi impulsionada por decréscimo significativo no CR e diminuição simultânea no GP, o que não foi observado nos frangos de corte que receberam a dieta CN1, e isso pode estar associado à dinâmica da redução de energia e de Pd nas dietas. De acordo com Sharma et al. (2018), os valores de EM dietéticos podem influenciar o desempenho dos frangos de corte, estando isso relacionado aos níveis de Pd na dieta.

## Metabolismo

Foi postulado que o benefício da adição de fitase ou da combinação de fitase com outras enzimas na retenção de energia em frangos de corte alimentados com dietas de milho e farelo de soja só pode ser plenamente obtido com a redução da densidade dos nutrientes da ração, levando em consideração a energia da dieta e a digestibilidade dos aminoácidos aumentados pela suplementação enzimática (Francesch e Geraert, 2009). No presente estudo, a menor concentração de Ca, Pd e energia nas dietas CN reduziu ( $P < 0,05$ ) o valor de EMAn das dietas em comparação com a dieta CP (tabela 5), o que está de acordo com estudos anteriores (Tiwari et al., 2010; Amerah et al., 2014; Wang et al., 2021).

A adição de fitase à dieta CN1 ou em combinação com o complexo multienzimático à dieta CN2 resultou em valores de EMAn similares aos obtidos com a dieta CP. No entanto, a suplementação enzimática às dietas CN não aumentou os valores de EMAn comparada às dietas CN isoladas. Alguns estudos apontam que a suplementação de fitase pode (Pieniazek et al., 2017) ou não (Akter et al., 2018) aumentar a retenção de EMAn em frangos de corte. Isso pode estar relacionado a variação na concentração de ácido fítico nas dietas, tipo de ingrediente, grau de redução nutricional e idade das aves utilizadas nos diferentes estudos (Cowieson et al., 2015).

**Tabela 5.** Energia metabolizável aparente corrigida para o balanço de nitrogênio em dietas para frangos de corte suplementadas com enzimas exógenas

Variável	Tratamento					CV(%)	P-valor
	CP	CN1	CN2	CN1 + fitase	CN2 + fitase + MEZ		
	EMAn						
Calculado	3000	2920	2900	3000	3000		
Determinado	3071 <sup>a</sup>	2983 <sup>b</sup>	2982 <sup>b</sup>	3058 <sup>ab</sup>	3032 <sup>ab</sup>	1,94	0,008

<sup>a-c</sup>Médias na mesma linha com letras diferentes diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Abreviações: MEZ, complexo multienzimático; EMAn, energia metabolizável aparente corrigida para o balanço de nitrogênio.

<sup>1</sup>CP = controle positivo (dieta atendendo os requerimentos nutricionais de frangos de corte).

<sup>2</sup>CN1 = controle negativo 1 (CP menos 80 kcal/kg de EM, 0,15% de Pd e 0,16% de Ca).

<sup>3</sup>CN2 = controle negativo 2 (CP menos 100 kcal/kg de EM, 0,15% de Pd e 0,16% de Ca).

A associação de fitase com multienzimas pode proporcionar benefícios complementares e, de quebra, permitir maiores reduções nas especificações nutricionais das dietas (Jlali et al., 2020). Foi demonstrado que a associação de fitase, xilanase e  $\beta$ -glucanase melhorou a utilização de energia em frangos alimentados com dietas deficientes em EM, proteína bruta, Ca e Pd (Lu et al., 2013; Shramm et al., 2017). Gallardo et al. (2019) também relataram melhorias significativas nos valores de EMAn em frangos de corte alimentados com fitase mais carboidratos, o que subsequentemente melhorou o desempenho. No entanto, quando houve adição do complexo multienzimático juntamente com a fitase em uma dieta com maior redução de energia, como no presente estudo, não foi observado benefício adicional nos valores de EMAn, em comparação com a adição de fitase isoladamente.

### Digestibilidade

A adição de fitase à dieta CN1 ou a suplementação de fitase mais complexo multienzimas na dieta CN2 aumentaram ( $P < 0,05$ ) o coeficiente de digestibilidade de todos os aminoácidos medidos, em comparação com as dietas CN não suplementadas, porém não diferiram entre si (Tabela 6). Outros estudos têm da mesma forma demonstrado que a adição de fitase (Amerah et al., 2014; Pieniazek et al., 2017; Walk e Olukosi, 2020), bem como de fitase mais complexos multienzimáticos (Gallardo et al., 2017; 2018; 2019), melhora a utilização de aminoácidos em frangos de corte.

A suplementação de fitase mais complexo multienzimático à dieta CN2 aumentou a digestibilidade ileal dos aminoácidos arginina, histidina, isoleucina, lisina e fenilalanina para níveis superiores aos obtidos com a dieta CP. Contudo, a adição de fitase isoladamente à dieta CN1 não resultou em diferenças na digestibilidade ileal estandardizada dos aminoácidos, em relação à dieta CP. Foi relatado que o fitato pode complexar aminoácidos livres diretamente nos aminoácidos no trato digestivo de frangos de corte (Selle et al., 2012; Bao et al., 2013; Gallardo et al., 2017).

Dessa forma, a hidrólise do fitato por fitase adicionada às rações pode aumentar a digestibilidade de aminoácidos, sendo a extensão dessas respostas dependente da concentração do fitato na dieta, da concentração e fonte da fitase e da acessibilidade ao fitato pela fitase (Rutherford et al., 2012; Dadalt et al., 2017). Essa última é determinada pela presença de PNAs, que, nos ingredientes convencionais, correspondem aos arabinoxilanos e  $\beta$ -galactomanano no milho e  $\alpha$ -galactosídeos e  $\beta$ -galactomanano no farelo de soja (Choct, 1997; Jamroz et al., 2002; Amerah et al., 2015).

**Tabela 6.** Efeito da suplementação com enzimas exógenas sobre o coeficiente de digestibilidade ideal estandardizado de aminoácidos em frangos de corte

Variável	Tratamento					CV	P-valor
	CP	CN1	CN2	CN1 + fitase	CN2 + fitase + MEZ		
Aminoácidos essenciais (%)							
Arginina	82,17bc	77,75c	82,29bc	87,42ab	89,015a	5,04	0,001
Histidina	89,58abc	86,25c	88,61bc	91,14ab	91,99a	2,61	0,001
Isoleucina	88,07c	85,53c	88,15bc	91,62ab	92,89a	2,76	0,001
Leucina	89,93abc	86,64c	89,10bc	92,25ab	92,76a	2,58	0,001
Lisina	91,11bc	88,30c	90,59bc	93,28ab	94,07a	2,23	0,001
Metionina	95,04ab	92,35c	93,90bc	96,69a	96,49a	1,72	0,001
Fenilalanina	89,54bc	86,00d	88,69cd	92,27ab	93,59a	2,62	0,001
Treonina	89,06abc	85,17c	87,40bc	90,68ab	92,67a	3,31	0,001
Valina	88,01bc	85,16c	88,57abc	91,14ab	92,30a	2,95	0,001
Aminoácidos essenciais totais	89,28bc	86,01c	88,66bc	91,86ab	92,88a	2,77	0,001
Aminoácidos não essenciais (%)							
Alanina	90,19a	86,37b	89,23ab	91,96a	92,50a	2,93	0,001
Ác. Aspártico	90,06ab	85,98c	86,53bc	91,51a	91,92a	2,82	0,001
Cisteína	82,40abc	76,63c	79,86bc	83,47ab	88,48a	5,36	0,001
Ác. glutâmico	92,01ab	87,38c	90,91b	93,92a	94,38a	2,08	0,001
Glicina	84,08ab	80,50b	82,97ab	85,79a	87,34a	3,98	0,001
Prolina	88,37abc	84,75c	86,98bc	89,54ab	91,87a	2,88	0,001
Serina	89,76ab	85,06c	87,36bc	91,30ab	91,87a	3,19	0,001
Tirosina	88,95ab	85,27b	88,56ab	91,49a	92,04a	2,96	0,001
Aminoácidos não essenciais	89,77ab	86,02c	88,03bc	91,46ab	92,30a	2,73	0,001
Totais							
Total de aminoácidos (%)	89,56ab	86,02c	88,31bc	91,63ab	92,56a	2,74	0,001

<sup>a-c</sup>Médias na mesma linha com letras diferentes diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Abreviações: MEZ, complexo multienzimático; Ác., ácido.

<sup>1</sup>CP = controle positivo (dieta atendendo os requerimentos nutricionais de frangos de corte).

<sup>2</sup>CN1 = controle negativo 1 (CP menos 80 kcal/kg de EM, 0,15% de Pd e 0,16% de Ca).

<sup>3</sup>CN2 = controle negativo 2 (CP menos 100 kcal/kg de EM, 0,15% de Pd e 0,16% de Ca).

Assim, os resultados na digestibilidade dos aminoácidos com a combinação alimentar de fitase e complexo multienzimático podem estar associados à clivagem total ou parcial desses PNAs presentes em dietas de milho e farelo de soja e ao aumento do acesso pelas enzimas endógenas e fitase (Woyengo e Nyachoti, 2011; Kiarie et al., 2014; Roofchaei et al., 2019).

Uma grande variação na resposta, que era dependente do aminoácido, foi observada nos valores dos coeficientes de digestibilidade ileal standardizados dos aminoácidos avaliados no presente estudo. O maior efeito positivo da fitase foi observado em arginina, cisteína e serina, enquanto o maior efeito positivo da combinação fitase mais complexo multienzimático foi observado em arginina, cisteína e treonina. Isso está de acordo com estudos anteriores, segundo os quais a arginina pode ser um dos aminoácidos mais responsivos à suplementação de fitase isolada ou em associação com um complexo multienzimático (Gallardo et al., 2018; 2019). O fitato tem acesso praticamente desimpedido para interagir diretamente com aminoácidos básicos na superfície das proteínas, incluindo a arginina, o que facilitaria a formação do complexo proteína-fitato (Selle et al., 2012). Foi demonstrado que o fitato se associa às proteínas  $\beta$ -conglucina e glicina na soja, que são constituídas por frações proteicas ricas em arginina (Riblett et al., 2001; Nishinari et al., 2018). Assim, seria de se esperar que, ao avaliar a digestibilidade dos aminoácidos em dietas ricas em farelo de soja para frangos de corte com adição de fitase, a melhora nos valores da arginina pudesse ser superior à de outros aminoácidos.

A fitase também pode provocar efeitos positivos na digestibilidade dos aminoácidos através de uma redução no fluxo endógeno de aminoácidos (Cowieson et al., 2017). Essa proposição é suportada pelos dados do presente estudo, os quais evidenciaram efeito relativamente fraco da suplementação enzimática na digestibilidade da metionina, que é um aminoácido presente em baixas concentrações nas secreções endógenas e, portanto, com um custo endógeno não tão alto em comparação com o dos demais aminoácidos (Cowieson e Bedford, 2009). Além disso, como na composição da proteína endógena a cisteína, treonina e serina correspondem aos principais aminoácidos (Cowieson e Ravindran, 2007), pode-se dizer que no presente estudo houve perda de aminoácidos endógenos recuperados pela fitase e pela associação de fitase mais complexo multienzimático. Esses achados são consistentes com os de outros estudos, que também consideraram a cisteína o aminoácido mais presente nas perdas endógenas proteicas (Santos et al., 2008; Murugesan et al., 2014; Dersjant-li et al., 2019). Em contraste, a treonina foi o aminoácido mais afetado em outros estudos (Camden et al., 2001; Truong et al., 2015).

As médias da digestibilidade ileal aparente da maioria dos aminoácidos não diferiram entre as dietas CP, CN1 e CN2. No entanto, fenilalanina, metionina, ácido aspártico, ácido glutâmico

e serina foram as exceções. Esses resultados não eram esperados, pois os CNs foram formulados para serem deficientes em Ca, P e EM quando comparados ao CP. Santos et al. (2008) sugeriram que a menor digestibilidade de aminoácidos, em dietas deficientes em Ca, P e EM, pode estar associada ao nível reduzido de Ca em dietas CN, pois a menor concentração desse mineral estaria associada a menor atividade de enzimas proteolíticas (Namkung e Leeson, 1999). Ademais, baixos níveis de gordura na dieta associados a aumentos na taxa de passagem parecem comprometer a digestibilidade de proteínas (Ravindram et al., 2008; Cowieson et al., 2010). A falta de consistência dos resultados do presente estudo com os demais encontrados na literatura pode estar relacionada a variabilidade de ingredientes utilizados, idade da ave, método de ensaio empregado, grau de deficiência e presença de fatores antinutricionais na dieta, perdas endógenas e marcador inerte, adotados nos diferentes estudos (Selle et al., 2012; Cowieson et al., 2017).

#### **4-CONCLUSÃO**

Este estudo confirma que a fitase e sua combinação com o MEZ melhora a digestibilidade dos aminoácidos e o desempenho de frangos de corte alimentados com dietas com baixo teor de Ca, Pd e EM.

## **5-CONCLUSÃO GERAL**

A suplementação enzimática restaura os valores de energia, a digestibilidade dos aminoácidos e o desempenho de frangos de corte alimentados com dietas deficientes em nutrientes e energia.

## REFERÊNCIAS

- Akter, M. M.; Graham, H. and Iji, P. A. 2017. Influence of different levels of calcium, non-phytate phosphorus and phytase on apparent metabolizable energy, nutrient utilization, plasma mineral concentration and digestive enzyme activities of broiler chickens. *Journal of Applied Animal Research* 46:278-86. <https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1295972>
- Amerah, A.M.; Plumstead, P.W.; Barnard, L.P. and Kumar, A., 2014. Effect of calcium level and phytase addition on ileal phytate degradation and amino acid digestibility of broilers fed corn-based diets. *Poult. Sci.* 93:906–915. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03465>
- Amerah, A. Interactions between wheat characteristics and feed enzyme supplementation in broiler diets. 2015. *Animal Feed Science Technology* 199:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.09.012>
- Bach Knudsen, K. E. 1997. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Animal Feed Science Technology* 67:319–338. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00009-6).
- Bao, Y. M.; Romero, L. F. and Cowieson, A. J. 2013. Functional patterns of exogenous enzymes in different feed ingredients. *World's Poultry Science Journal* 69:759-774. <https://doi.org/10.1017/S0043933913000792>
- Broch, J.; Santos, E. C.; Damasceno, J. L.; Nesello, P. O.; Souza, C.; Eyng, C. Pesti, G. M. and Nunes, R. V. Phytase and phytate interactions on broilers' diet at 21 days of age. *Journal of Applied Animal Research* 29:240-250. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2019.10.010>
- Camden, B. J.; Morel, P. C. H.; Thomas, D. V.; Ravindran, V. and Bedford, M. R. 2001. Effectiveness of exogenous microbial phytase in improving the bioavailabilities of phosphorus and other nutrients in maize-soya-bean meal diets for broilers. *Animal Science* 73:289-297. <https://doi.org/10.1017/S1357729800058264>
- Choct M. 1997. Feed non-starch polysaccharides: chemical structures and nutritional significance. *Feed Milling International* 191:13–26. <https://doi.org/10.1071/AN15276>
- Cowieson, A. J. and O. Adeola. 2005. Carbohydrases, protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. *Poultry Science* 84:1860-1867. <https://doi.org/10.1093/ps/84.12.1860>
- Cowieson, A. J. and Ravindran, V. 2007. Effect of phytic acid and microbial phytase on the flow and amino acid composition of endogenous protein at the terminal ileum of growing broiler chickens. *British Journal of Nutrition* 98:745-752. <https://doi:10.1017/S0007114507750894>

- Cowieson, A. J. and Bedford, M. R. 2009. The effect of phytase and carbohydrase on ileal amino acid digestibility in monogastric diets: complimentary mode of action? *World's Poultry Science Journal* 65(4):609-624. <https://doi.org/10.1017/S0043933909000427>
- Cowieson, A. J.; Bedford, M. R. and 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>
- Cowieson, A. J.; Aureli, R.; Guggenbuhl, P. and Fru-Nji, F. 2015. Possible involvement of myo-inositol in the physiological response of broilers to high doses of microbial phytase. *Animal Production Science* 55(6):710-719. <https://doi.org/10.1071/AN14044>
- Cowieson, A. J.; Ruckebusch, J. -P.; Sorbara, J.O.B.; Wilson, J. W.; Guggenbuhl, P. and Roos, F. F. 2017. A systematic view on the effect of phytase on ileal amino acid digestibility in broilers. *Animal Feed Science and Technology* 225:182-194. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.01.008>
- Dadalt, J. C.; Gallardo, C.; Polycarpo, G. V.; Berto, D. A. and Trindade Neto, M. A. 2017. Ileal amino acid digestibility in micronized full fat soybean meal and textured soy flour fed to piglets with or without multicarbohydrase and phytase supplementation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 229:106–116. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.05.006>
- Dersjant-Li, Y.; Awati, A.; Schulze, H. and Partridge, G. 2015. Phytase in non-ruminant animal nutrition: A critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95(5):878–896. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6998>
- Dersjant-Li, Y. and Kwakernaak, C. 2019. Comparative effects of two phytases versus increasing the inorganic phosphorus content of the diet, on nutrient and amino acid digestibility in broilers. *Animal Feed Science and Technology*, 253:166-180. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.05.018>
- Dessimoni, G. V.; Sakomura, N. K.; Donato, D. C. Z.; Goldflus, F. Ferreira, N. T. and Dalólio, F. S. 2019. Effect of supplementation with *Escherichia coli* phytase for broilers on performance, nutrient digestibility, minerals in the tibia and diet cost. *Semina: Ciências Agrárias* 40(2):767-780. <https://doi:10.5433/1679-0359.2019v40n2p767>
- Detmann, E.; Souza, M. A. de; Valadares Filho, S. C.; Queiroz, A. C.; Berchielli, T. T.; Saliba, E. O. S.; Cabral, L. S.; Pina, D. S.; Ladeira, M. M.; Azevedo, J. A. G. 2012. Métodos para análise de alimentos. 1st ed. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal. Suprema, Visconde do Rio Branco, MG, Brazil.

- Ferreira, E. B.; Cavalcanti, P. P. and Nogueira, D. A. 2014. ExpDes.pt: An R package for ANOVA and Experimental Designs. *Applied Mathematics* 05(19):2952-2958. <https://doi:10.4236/am.2014-519280>
- Francesch, M. and Geraert, P. A. 2009. Enzyme complex containing carbohydrases and phytase improves growth performance and bone mineralization of broilers fed reduced nutrient corn-soy-bean-based diets. *Poultry Science* 88:1915-1924. <https://doi:10.3382/ps.2009-00073>
- Gallardo, C.; Dadalt, J. C.; Kiarie, E. and Neto, M. A. T. 2017. Effects of multi carbohydrase and phytase on standardized ileal digestibility of amino acids and apparent metabolizable energy in canola meal fed to broiler chicks. *Poultry Science* 0:1–9. <https://dx.doi.org/10.3382/ps/pex141>
- Gallardo, C.; Dadalt, J. C. and Neto, M. A. T. 2018. Nitrogen retention, energy, and amino acid digestibility of wheat bran, without or with multicarbohydrase and phytase supplementation, fed to broiler chickens. *Journal of Animal Science* 96:2371-2379. <https://doi.org/10.1093/jas/sky062>
- Gallardo, C.; Dadalt, J. C. and Neto, M. A. T. 2019. Carbohydrases and phytase with rice bran, effects on amino acid digestibility and energy use in broiler chickens. *Animal* 14:482-490. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002131>.
- Jamroz, D.; Jakobsen, K.; Knudsen, K. E. B.; Wiliczekiewicz, A. and Orda, J. 2002. Digestibility and energy value of nonstarch polysaccharides in young chickens, ducks and geese, fed diets containing high amounts of barley. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology* 131:657-668. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00517-7](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00517-7)
- Jaworski, N. W.; Lærke, H. N.; Bach Knudsen, K. E. and Stein, H. H. Carbohydrate composition and in vitro digestibility of dry matter and nonstarch polysaccharides in corn, sorghum, and wheat and coproducts from these grains. *Journal of Animal Science* 2015.93:1103–1113. <https://dx.doi.org/10.2527/jas2014-8147>
- Karimi, A.; Min, Y.; Lu, C.; Coto, C.; Bedford, M. R. and Waldroup, P. W. 2013. Assessment of potential enhancing effects of a carbohydrase mixture on phytase efficacy in male broiler chicks fed phosphorus-deficient diets from 1 to 18 days of age. *Poultry Science* 92 :192– 198. <https://dx.doi.org/10.3382/ps.2012-02558>
- Kiarie, E.; Romero, L. F. and Ravindran, V. 2014. Growth performance, nutrient utilization, and digesta characteristics in broiler chickens fed corn or wheat diets without or with supplemental xylanase. *Poultry Science* 93:1186–1196. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2013-03715>

- Kim, M.; Ingale, S. L.; Hosseindoust, A.; Choi, Y.; Kim, K. Y.; Lee, J.; Kim, J. and Chae, B. 2021. Synergistic effect of exogenous multi-enzyme and phytase on growth performance, nutrients digestibility, blood metabolites, intestinal microflora and morphology in broilers fed corn-wheat-soybean meal diets. *Animal Bioscience*. <https://doi.org/10.5713/ab.20.0663>
- Lu, H.; Adedokun, S. A.; Preynat, A.; Legrand-Defretin, V.; Geraert, P. A.; Adeola, O. and Ajuwpon, K. M. 2013. Impact of exogenous carbohydrases and phytase on growth performance and nutrient digestibility in broilers. *Canadian Journal of Animal Science* 93: 243-249. <https://doi.org/10.4141/cjas2012-138>
- Malathi, V. and Devegowda, G. .2001. *In vitro* evaluation of nonstarch polysaccharide digestibility of feed ingredients by enzymes. *Poultry Science* 80:302-305. <https://doi.org/10.1093/ps/80.3.302>
- Murugesan, G. R.; Romero, L. F. and Persla, M. E. 2014. Effects of Protease, Phytase and a *Bacillus* sp. Direct-Fed Microbial on Nutrient and Energy Digestibility, Ileal Brush Border Digestive Enzyme Activity and Cecal Short-Chain Fatty Acid Concentration in Broiler Chickens. *Plos one* 9(7):e101888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101888>
- Namkung, H., and S. Leeson. 1999. Effect of phytase enzyme on dietary nitrogen-corrected apparent metabolizable energy and the ileal digestibility of nitrogen and amino acids in broiler chicks. *Poultry Science* 78:1317–1319. <https://doi.org/10.1093/ps/78.9.1317>
- Neto, R. M., M. L. Ceccantini, and J. I. Fernandes. 2012. Productive performance, intestinal morphology and carcass yield of broilers fed conventional and alternative diets containing commercial enzymatic complex. *Poultry Science* 11:505–516. <https://doi.org/10.3923/ijps.2012.505.516>
- Nishinari, K.; Fang, Y.; Nagano, T.; Guo, S. and Wang, R. 2018. Soy as a food ingredient. In *Proteins in Food Processing* (ed. R. Y. Yada), pp. 149–186. Woodhead Publishing is an imprint of Elsevier, Duxford, UK. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00007-3>
- Olukosi, O.A.; Cowieson, A. J. and Adeola, O. 2007. Age-related influence of a cocktail of xylanase, amylase, and protease or phytase individually or in combination in broilers. *Poultry Science* 86: 77–86. <https://doi.org/10.1093/ps/86.1.77>
- Olukosi, O. A. and Adeola, O. 2008. Whole body nutrient accretion, growth performance and total tract nutrient retention responses of broilers to supplementation of xylanase and phytase individually or in combination in wheat-soybean mealbased diets. *Journal of Poultry Science* 45:192–198. <https://doi.org/10.2141/jpsa.45.192>
- Olukosi, O. A.; González-Ortiz, G.; Whitfield, H. and Bedford, M. R. 2020. Comparative aspects of phytase and xylanase effects on performance, mineral digestibility, and ileal phytate

- degradation in broilers and turkeys. *Poultry Science* 99:1528–1539. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.018>
- Pieniazek, J.; Smith, K. A.; Williams, M. P.; Manangi, M. K.; Vazquez-Anon, M.; Solbak, A.; Miler, M. and Lee, T. 2017. Evaluation of increasing levels of a microbial phytase in phosphorus deficient broiler diets via live broiler performance, tibia bone ash, apparent metabolizable energy, and amino acid digestibility. *Poultry Science* 96:370-382. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew225>
- Poernama, F.; Wibowo, T. A. and Liu, Y. G. 2021. The effect of feeding phytase alone or in combination with nonstarch polysaccharides-degrading enzymes on broiler performance, bone mineralization, and carcass traits. *Journal of Applied of Poultry Research* 30:100134. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2020.100134>
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rahimi, Z. S.; Modirsanei, M. and Mansoori, B. 2020. The effect of enzymatic feed pretreatment on bioavailability of phytate phosphorous, performance, and bone indices of tibia in broilers. *Journal of Applied of Poultry Research* 9:372-382. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2019.12.008>
- Ravindran, V.; Cowieson, A. J. and Selle, P. H. 2008. Influence of dietary electrolyte balance and microbial phytase on growth performance, nutrient utilization and excreta quality of broiler chickens. *Poultry Science* 87:677–688. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00247>
- Riblett, A. L.; Herald, T. J.; Schmidt, K. A. and Tilley, K. A. 2001. Characterization of b-conglycinin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:4983–4989. <https://doi.org/10.1021/jf0105081>
- Roofchaei, A.; Rezaeipour, V.; Vatandour, S. and Zaefarian, F. 2019. Influence of dietary carbohydrases, individually or in combination with phytase or an acidifier, on performance, gut morphology and microbial population in broiler chickens fed a wheat-based diet. *Animal Nutrition* 5:63–67. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.12.001>
- Rostagno, H. S.; Albino, L. F. T.; Hannas, M. I.; Donzele, J. L.; Sakomura, N. K.; Perazzo, F. G.; Saraiva, A.; Teixeira, M. V.; Rodrigues, P. B.; Oliveira, R. F.; Barreto, S. L. T. and Brito, C. O. 2017. *Brazilian Tables For Poultry And Swine: Composition of Feedstuffs and Nutritional Requirements*. 4th ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.
- Rutherford, S. M.; Chung, T. K.; Thomas, D. V.; Zou, M. L. and Moughan, P. J. 2012. Effect of a novel phytase on growth performance, apparent metabolizable energy, and the availability

of minerals and amino acids in a low-phosphorus corn-soybean meal diet for broilers. *Poultry Science* 91:1118-1127. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2011-01702>

Sakomura, N. K. and Rostagno, H. S. *Research Methods in Monogastric Nutrition*. 2th ed. FUP-NEP, Jaboticabal, SP, Brazil.

Sangalli, G. G.; Eyng, C.; Spindola, M.; Nunes, R. V.; Broch, J.; Lenhardt Savaris, V. D.; Rohloff Jr, N. and Köhler, T. L. 2021. Performance, bone characteristics, and physiological parameters of broilers fed nutrient-restricted diets supplemented with multicarbohydase complex associated with high levels of phytase. *Journal of Applied of Poultry Research* 30:100141. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2021.100141>

Santos, F. R.; Hruby, M.; Pierson, E. E. M.; Remus, J. C. and Sakomura, N. K. 2008. Effect of phytase supplementation in diets on nutrient digestibility and performance in broiler chicks. *Journal of Applied Poultry Research* 17:191–201. <https://doi.org/10.3382/japr.2007-00028>

Santos, T. T.; Masey O’Neill, H. V.; Gonzalez- Ortiz, G.; Camacho-Fernandez, D. and Lopez-Coello, C. 2017. Xylanase, protease and superdosing phytase interactions in broiler performance, carcass yield and digesta transit time. *Animal Nutrition* 3:121–126. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.02.001>

Santos, T. S.; Denadai, J. C.; Sartori, M. M. P.; Pizauro Júnior, J. M.; Aoyagi, M. M.; Rezende, J. C. R.; Serpa, P. G.; Muro, E. M.; Santana-Eich, M. R.; Pasquali, G. A. M.; Dornelas, L. C.; Netto, R. G. F.; Zanetti, L. H.; Pezzato, A. C. and Sartori, J. R. 2019. Performance and bone quality of broiler chicken fed a diet with reduced nonphytate phosphorus with bacterial phytases. *Canadian Journal of Animal Science* 99:607–619. <https://doi.org/10.1139/cjas-2018-0158>

Schramm, V. G.; Durau, J. F.; Barrilli, L. N. E.; Sorbara, J. O. B.; Cowieson, A. J.; Felix, A. P.; Maiorka, A. 2017. Interaction between xylanase and phytase on the digestibility of corn and a corn/ soy diet for broiler chickens. *Poultry Science* 96(5):1204-1211. <https://doi.org/10.3382/ps/pew356>

Selle, P. H.; Cowieson, A. J.; Cowieson, N. P. and Ravindran, V. 2012. Protein-phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. *Nutrition Research Reviews* 25:1-17.