

BRUNO FIGUEIREDO DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DE PROTEASES EXÓGENAS EM DIETAS PARA FRANGOS DE
CORTE**

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

Orientador: Luiz Fernando Teixeira Albino

Coorientador: Arele Arlindo Calderano

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2023**

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

T

A447a
2023 Almeida, Bruno Figueiredo de, 1996-
Avaliação de proteases exógenas em dietas para frangos de
corte / Bruno Figueiredo de Almeida. – Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (26 f.): il.

Orientador: Luiz Fernando Teixeira Albino.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Zootecnia, 2023.

Referências bibliográficas: f. 23-26.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.562>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Frango de corte - Alimentação e rações. 2. Frango de
corte - Registros de desempenho. 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. 636.513

BRUNO FIGUEIREDO DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DE PROTEASES EXÓGENAS EM DIETAS PARA FRANGOS DE CORTE


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

APROVADA: 17 de julho de 2023.

Assentimento:



Bruno Figueiredo de Almeida
Autor



Luiz Fernando Teixeira Albino
Orientador

A Deus pela motivação, força e saúde.
À minha família pelo apoio incondicional.
Aos professores, amigos e funcionários
que estiveram comigo em minha trajetória!
Dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por ser meu guardião, meu ponto de paz durante todos os momentos da minha vida, minha motivação e força. Por me dar saúde, coragem e entendimento. Por ser a luz que ilumina minha caminhada.

À minha mãe, Heloisa Helena Figueiredo, e meu pai, Eloísio Antônio de Almeida Júnior, por todo o suporte fornecido durante minha vida. Vocês foram essenciais para a minha formação como pessoa e profissional, sou muito grato.

À minha namorada, Alana Souza Câmara, por ter entrado em minha vida e ocupado um espaço ímpar. Obrigado por fazer tanto por nós e por me inspirar sempre a ser minha melhor versão. Sou muito orgulhoso de você. Amo você.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Universidade Federal de Viçosa por proporcionar a oportunidade de aprimoramento, pela qualidade do ensino do curso de pós-graduação. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento parcial do presente estudo. Sou grato por ter na minha história, essa universidade que tanto contribui para o desenvolvimento brasileiro.

Ao meu orientador, Luiz Fernando Teixeira Albino, e meu coorientador, Arele Arlindo Calderano, pelas inúmeras oportunidades oferecidas, por todo ensinamento e suporte dados ao longo de todos esses anos, auxiliando minha formação profissional e pessoal com muita ética e transparência. Sou grato em ter meus exemplos me orientando, fazendo com que eu me torne cada vez melhor.

Ao Dr. Ideraldo Lima, por todo suporte e disponibilidade de ser membro da banca. Muito obrigado!

Aos meus amigos de república, Rafael Rusth, Bruno Marciano e João Cléber Lima, por todo o companheirismo durante esses anos. Aos amigos que a universidade me proporcionou, Abraão, André, Artur, Charles, Eduardo, Elias, Carlos, Kaique, Kelly, Paula, Romário e Samuel, por toda troca de experiências compartilhadas. Aos demais estagiários e pós-graduandos da UEPE em Produção e Nutrição de Aves.

Aos técnicos e funcionários do setor de avicultura, em especial: André, Carlos, Daniel, Elisson, Gilberto, João e Wilson, pela amizade e todo suporte e atenção para com as pesquisas realizadas.

“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta. ”

(Chico Xavier)

RESUMO

DE ALMEIDA, Bruno Figueiredo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Avaliação de proteases exógenas em dietas para frangos de corte.** Orientador: Luiz Fernando Teixeira Albino. Coorientador: Arele Arlindo Calderano.

Três experimentos foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito da adição de proteases exógenas no desempenho de frangos de corte e nos valores de energia metabolizável e digestibilidade de proteína bruta (PB) das dietas. Foram utilizados 1440, 384 e 432 frangos de corte machos, da linhagem Cobb 500, pesados e distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, nos ensaios de desempenho, metabolismo e digestibilidade, respectivamente. Os tratamentos experimentais utilizados no presente estudo foram os seguintes: Controle positivo (CP, dieta basal); controle negativo (CN = CP – 20%PB); CN adicionado da protease A; CN adicionado da protease B; CN adicionado da protease C; CN adicionado da protease D; CN adicionado da protease E; CN adicionado da protease F. No ensaio de digestibilidade, além dos tratamentos solicitados, houve a inclusão de uma dieta isenta de proteína para mensurar as perdas endógenas basais. As dietas experimentais foram formuladas para atender as exigências dos animais. As dietas controle negativo sofreram redução de PB e os principais aminoácidos utilizando o conceito de proteína ideal. A redução de PB da ração não teve impacto no consumo de ração dos animais, porém, impactou negativamente o ganho de peso médio e a conversão alimentar, em ambas as fases avaliadas no experimento de desempenho. A adição das proteases C e D aumentou o ganho de peso dos animais alimentados com a dieta controle negativo, embora não influenciou a conversão alimentar. No ensaio de metabolismo, não houveram diferenças significativas ($P > 0,05$) para os valores de energia metabolizável aparente e energia metabolizável aparente corrigida para o balanço de nitrogênio. No ensaio de digestibilidade, observou-se que a protease F melhorou a digestibilidade da PB em frangos de corte alimentados com dieta com redução de PB. A utilização de proteases exógenas melhora o desempenho e aumenta a digestibilidade da proteína bruta de frangos de corte alimentados com dieta com deficiência de proteína, não havendo efeitos na energia metabolizável. A adição de proteases exógenas não recuperou o desempenho perdido pela redução de PB.

Palavras-chave: Protease. Frangos de corte. Proteína bruta.

ABSTRACT

DE ALMEIDA, Bruno Figueiredo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2023. **Evaluation of exogenous proteases in broiler diets.** Adviser: Luiz Fernando Teixeira Albino. Co-Adviser: Arele Arlindo Calderano.

Three experiments were carried out with the aim of evaluating the effect of adding exogenous proteases on broiler performance and on the metabolizable energy and crude protein (CP) digestibility values of the diets. 1440, 384 and 432 male broilers of the Cobb 500 strain were used, weighed and distributed in a completely randomized design for the performance, metabolism and digestibility trials, respectively. The experimental treatments used in this study were as follows: Positive control (PC, basal diet); negative control (NC = PC - 20%CP); NC plus protease A; NC plus protease B; NC plus protease C; NC plus protease D; NC plus protease E; NC plus protease F. In the digestibility test, in addition to the treatments requested, a protein-free diet was included to measure basal endogenous losses. The experimental diets were formulated to meet the animals' requirements. The negative control diets were reduced in CP and the main amino acids using the ideal protein concept. The reduction in PB in the feed had no impact on the animals' feed consumption, but it did have a negative impact on average weight gain and feed conversion in both phases evaluated in the performance trial. The addition of proteases C and D increased the weight gain of the animals fed the negative control diet, although it did not influence feed conversion. In the metabolism test, there were no significant differences ($P>0.05$) for apparent metabolizable energy and apparent metabolizable energy corrected for nitrogen balance. In the digestibility test, it was observed that protease F improved the digestibility of CP in broilers fed a reduced CP diet. The use of exogenous proteases improves performance and increases crude protein digestibility in broilers fed a protein-deficient diet, with no effect on metabolizable energy. The addition of exogenous proteases did not recover the performance lost due to the reduction in CP.

Palavras-chave: Protease. Broiler. Crude protein.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização das proteases utilizadas.....	12
Tabela 2. Ingredientes e composição nutricional das dietas experimentais.	13
Tabela 3. Resultados observados para consumo médio de ração (CR), ganho de peso médio (GP) e conversão alimentar na fase inicial (1 a 21 dias).	18
Tabela 4. Resultados observados para consumo médio de ração (CR), ganho de peso médio (GP), conversão alimentar (CA) e viabilidade (VIAB) na fase total (1 a 35 dias).	19
Tabela 5. Resultados observados para consumo de matéria seca (CMS), energia metabolizável aparente (EMA), energia metabolizável aparente corrigida para o balanço de nitrogênio (EMAn), nitrogênio ingerido (Ning) nitrogênio excretado (Nexc) e nitrogênio retido (NR).	19
Tabela 6. Resultados observados para coeficiente de digestibilidade estandardizada da proteína bruta (CDPB).....	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1	Comitê de ética.....	12
2.2	Proteases.....	12
2.3	Delineamento experimental, dietas e aves	12
2.4	Desempenho zootécnico.....	15
2.5	Ensaio de metabolismo.....	15
2.6	Ensaio de digestibilidade	16
2.7	Análises estatísticas	17
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4	CONCLUSÃO.....	23
	REFERÊNCIAS.....	23

1 INTRODUÇÃO

A inclusão de aditivos nas dietas para frangos de corte é uma estratégia nutricional para reduzir os custos de produção, uma vez que a nutrição representa a maior parte dos custos de produção. Devido a um alto impacto econômico e os efeitos prejudiciais da excreção de nitrogênio (N), a proteína bruta tem sido bastante estudada, visando reduzir sua inclusão nas dietas para frangos de corte (Borda-Molina *et al.*, 2019).

A utilização de enzimas na nutrição animal tem como finalidade reduzir fatores antinutricionais, aumentar a digestibilidade e disponibilidade de nutrientes e suplementar a produção endógena de proteínas (Sheppy, 2001).

As proteases pertencem ao grupo das hidrolases e desempenham um papel crucial na quebra das ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. Além disso, têm uma importante função ao inativar fatores antinutricionais presentes em alimentos utilizados na nutrição animal (Cowieson *et al.*, 2006), ocasionando em um melhor aproveitamento de proteínas e aminoácidos pelos animais (Aderibigbe *et al.*, 2020).

Estudos envolvendo a utilização de proteases exógenas em dietas para frangos de corte com redução de proteína bruta relataram benefícios em parâmetros de desempenho e também aumento na digestibilidade de nutrientes da ração (Stefanello *et al.*, 2016; Cowieson *et al.*, 2018; Bernardes *et al.*, 2022). Entretanto, outros autores não observaram diferenças na digestibilidade de proteína bruta ou aminoácidos ileais (Erdaw *et al.*, 2017; Borda-Molina *et al.*, 2019). Essas incongruências de resultados podem ser relacionadas à uma menor produção de enzimas endógenas, a presença de outras enzimas na dieta e também da composição da ração (Walk *et al.*, 2018; Borda-Molina *et al.*, 2019).

O presente estudo foi desenvolvido com a hipótese de que a utilização de proteases exógenas recupera o desempenho de frangos de corte alimentados com dietas com redução de proteína bruta. Dessa forma, o objetivo foi avaliar o efeito de diferentes proteases exógenas em dietas de frangos de corte no desempenho dos animais e nos valores de energia metabolizável e digestibilidade de proteína bruta das dietas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Comitê de ética

Os procedimentos realizados neste estudo foram previamente avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP/UFV), sob o número de protocolo 061/2021, estando de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os experimentos foram realizados 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), no período de novembro a dezembro de 2021, na cidade de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20°45'57.19"S, 42°51'35.42"W; e 682 m de altitude).

2.2 Proteases

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas seis proteases de seis empresas diferentes que atuam no cenário brasileiro. A caracterização quanto a origem das proteases está descrita na tabela 1, juntamente com a dosagem utilizada segundo as recomendações das empresas fabricantes.

Tabela 1. Caracterização das proteases utilizadas.

Enzima	Dosagem	Origem	Espécie
PROTEASE A	50 g/ton	Fúngica	<i>Trichoderma longibrachiarum</i> e <i>Aspergillus niger</i>
PROTEASE B	250 g/ton	Bacteriana	<i>Bacillus subtilis</i>
PROTEASE C	300 g/ton	Fúngica	<i>Aspergillus niger</i>
PROTEASE D	200 g/ton	Bacteriana	<i>Bacillus licheniformis</i>
PROTEASE E	200 g/ton	Bacteriana	<i>Bacillus licheniformis</i>
PROTEASE F	300 g/ton	Fúngica	<i>Aspergillus niger</i>

2.3 Delineamento experimental, dietas e aves

Os tratamentos experimentais utilizados no presente estudo foram: Controle positivo (CP, dieta basal); controle negativo (CN, redução de 20% de proteína bruta e

principais aminoácidos); CN com adição da protease A; CN com adição da protease B; CN com adição da protease C; CN com adição da protease D; CN com adição da protease E; CN com adição da protease F.

As dietas experimentais (Tabela 2) foram formuladas para atender as exigências das recomendações nutricionais segundo Rostagno *et al.* (2017). A dieta CN sofreu redução de 20% proteína bruta e os principais aminoácidos utilizando o conceito de proteína ideal na fase inicial, e de 10% na fase crescimento. O período experimental foi dividido em duas fases: Inicial, de 1 a 21 dias de idade; Crescimento, de 22 a 35 dias de idade. Os teores de lisina digestível do CN foram de 1,00% para a fase inicial e 0,90% para a fase de crescimento, respectivamente. As proteases utilizadas foram adicionadas “*on the top*” nas dietas.

Tabela 2. Ingredientes e composição nutricional das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	Inicial (1-21 dias)		Crescimento (22-35 dias)	
	CP	CN	CP	CN
Milho	57,335	66,442	65,256	72,858
Farelo de soja	36,000	28,335	22,104	15,468
Farinha de carne e ossos	-	-	3,000	3,000
Farinha de vísceras de aves	-	-	3,000	3,000
Farinha de penas	-	-	3,000	3,000
Óleo de soja	3,004	1,510	1,689	0,792
Fosfato bicálcico	1,280	1,330	-	-
Calcário	1,034	1,066	0,511	0,549
Sal Comum	0,491	0,493	0,414	0,415
Lisina HCL. 79%	0,266	0,213	0,267	0,237
DL-Methionina. 99%	0,134	0,165	0,211	0,146
L-Treonina. 98%	0,021	0,011	0,013	-
Suplemento vitamínico ¹	0,130	0,130	0,130	0,130
Suplemento mineral ²	0,130	0,130	0,130	0,130
Cloreto de Colina. 60%	0,100	0,100	0,100	0,100
Carbonato de Potássio (K ₂ CO ₃)	-	-	0,100	0,100
Salinomicina ³ (12%)	0,055	0,055	0,055	0,055
Antioxidante (BHT)	0,010	0,010	0,010	0,010
Fitase	0,010	0,010	0,010	0,010
Total	100	100	100	100
Composição nutricional calculada				
Energia Metabolizável, Kcal/kg	3050	3050	3150	3150
Proteína bruta, %	23,23	18,54	20,58	18,46
Cálcio, %	0,937	0,937	0,800	0,800
Fósforo disponível. %	0,440	0,440	0,441	0,440
Arginina digestível. %	1,344	1,107	1,203	1,025
Lisina digestível. %	1,256	1,000	1,124	0,900
Met. + cist. digestível %	0,929	0,739	0,832	0,662

Treonina digestível . %	0,829	0,659	0,742	0,612
Triptofano digestível. %	0,226	0,207	0,202	0,162

¹Suplemento Vitaminico – Níveis de garantia por kg de ração: Vit. A - 9375 UI; Vit. D3 - 2375 UI; Vit E - 35 UI; 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; Ac. Pantotênico - 12,5mg; Vit. K3 - 1,88mg; Ác. Fólico - 0,875mg; Biotina - 0,088 mg. ²Suplemento Minera l– Níveis de garantia por kg de ração: Selênio - 0,375 mg; Manganês - 88 mg; Ferro –62,5 mg; Zinco – 81,3 mg; Cobre- 12,5 mg; Iodo- 1,25 mg. ³Anticoccidiano.

Para a avaliação do desempenho zootécnico, foram utilizados 1440 pintos machos Cobb 500, no período de 1 a 35 dias de idade, com peso médio inicial de 45,4g ($\pm 4,5$ g). As aves foram pesadas e distribuídas em oito tratamentos seguindo um delineamento inteiramente casualizado, com 9 repetições e 20 aves por unidade experimental. Os animais foram alojados em um galpão de alvenaria dividido em boxes de 1.0 x 2.0 m forrados com cama de maravalha. Na primeira semana de vida, foi utilizado um programa de luz de 24 horas a 32°C, posteriormente, houve redução gradual com base nas recomendações do manual da linhagem. Durante todo o período experimental, água e ração foram fornecidos à vontade. As temperaturas mínimas e máximas foram aferidas diariamente pela manhã utilizando termômetros localizados à altura dos animais.

Um total de 816 aves foram utilizadas em experimentos a fim de se determinar os valores de energia metabolizável aparente (EMA), energia metabolizável aparente corrigida para o balanço de nitrogênio (EMAn) e a digestibilidade da proteína bruta. Os animais foram criados em círculos de proteção equipados com comedouros e bebedouros pendulares com livre acesso para água fresca e ração, até atingirem a idade ideal para a realização dos ensaios. Durante esse período, as aves receberam dietas iniciais, formuladas segundo recomendações de Rostagno *et al.* (2017) e foram criadas de acordo com o manual da linhagem.

Aos 14 dias de idade, 384 aves foram pesadas e transferidas para baterias metálicas com compartimentos em dois andares, dispostas em uma sala de 68 m², com pé-direito de aproximadamente 2,8 m. As gaiolas continham bebedouro tipo *nipple* e um comedouro tipo calha. As aves foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado com 8 tratamentos, 8 repetições e 6 aves por unidade experimental. As dietas fornecidas aos animais foram as mesmas descritas inicialmente, para a fase de 1 a 21 dias, na tabela 2. Durante o período experimental, foi utilizado aves de 14 a 23 dias de idade, sendo 5 dias o período de adaptação às dietas e 5 dias de coleta total de excretas em cada unidade experimental.

Para determinar o coeficiente de digestibilidade estandardizado da proteína bruta (CDPB) das dietas, 432 aves de 23 a 28 dias de idade, foram pesadas e distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, com 9 tratamentos, 8 repetições e 6 aves por unidade experimental. Os tratamentos adotados, compreenderam a todas as dietas experimentais utilizadas para a determinação do desempenho na fase inicial, além de uma dieta isenta de proteína (DIP), utilizada para a determinação das perdas endógenas basais. Em todas as dietas foram adicionadas 1% de Celite (cinza ácida insolúvel – CIA) como um marcador indigestível

2.4 Desempenho zootécnico

Todas as aves, as rações e as sobras de ração foram pesadas aos 1, 21 e 35 dias de idade para determinação do desempenho zootécnico. Foram avaliados o consumo de ração médio (CR), o ganho de peso médio (GP), e a conversão alimentar (CA) aos 21 e aos 35 dias de idade. Além disso, a viabilidade (VIAB, %) das aves foi mensurada aos 35 dias.

2.5 Ensaio de metabolismo

O consumo de ração foi mensurado durante todo o período de coleta de excretas. As coletas foram realizadas duas vezes por dia, às 08 e 16 horas, a fim de evitar fermentação e perda de nutrientes. As excretas coletadas foram armazenadas em sacos plásticos devidamente identificados para cada unidade experimental e mantidas em freezer à -20°C, durante o período de coleta até as posteriores análises.

Para a determinação dos valores de energia, as excretas coletadas de cada parcela foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas ao final do período experimental a fim de se retirar uma amostra representativa de cada unidade. Foram arranjadas em amostras de 200 gramas, que posteriormente foram pré-secas a 55°C por 72 horas e moídas em moinho de bola (Tecnal Equipamentos para Laboratório. TE-350, São Paulo, Brasil), por cinco minutos até que formasse uma mistura fina bem homogênea.

Amostras representativas de excretas e dietas experimentais foram analisadas de acordo com a Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC) para matéria seca (MS; AOAC, 934.01, 2006) e nitrogênio (N; AOAC, 990.03, 2006). A energia bruta

(EB) foi determinada por uma bomba colorimétrica adiabática C500 (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemanha).

A proteína bruta ($N \times 6,25$) foi determinada pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1990). Para calcular a quantidade de nitrogênio ingerido (Ning), a quantidade de total de ração da amostra foi multiplicada pelo valor do nitrogênio encontrado na ração, com base na matéria seca. Seguindo o mesmo método, os valores de nitrogênio excretado (Nexc) foram calculados. O nitrogênio retido foi determinado subtraindo o nitrogênio excretado do ingerido (Ning - Nexc). Os valores em porcentagem da retenção de nitrogênio foram calculados considerando a quantidade total de nitrogênio consumido.

Os valores de Energia Metabolizável Aparente (EMA) e Energia Metabolizável Aparente Corrigida para Nitrogênio (EMAn) foram obtidos com base nos valores de energia bruta encontrados para as rações e excretas, utilizando a equação proposta por Sakomura e Rostagno (2016). As equações utilizadas foram:

$$EMA = (EBing - EBexc)/MSing ;$$

$$EMAn = (EBing - EBexc - (8,22 \cdot BN))/MSing$$

$$BN = Ning - Nexc$$

Onde:

EBing: energia bruta ingerida

EBexc: energia bruta excretada

MSing: matéria seca ingerida

BN: balanço de nitrogênio

2.6 Ensaio de digestibilidade

Para a determinação do coeficiente de digestibilidade aparente e estandardizada da proteína bruta, os animais submetidos ao ensaio de digestibilidade foram abatidos por meio de deslocamento cervical, aos 23 dias de idade, conforme as normas do comitê de ética, para a coleta da digesta ileal. Para tal, a cavidade abdominal foi exposta a fim de coletar o conteúdo intestinal e íleo foi identificado como a seção do intestino entre o divertículo de Meckel e a junção ileocecal. A digestas foram removidas por lavagem com água destilada, colocadas em potes plásticos devidamente identificados de acordo com suas respectivas unidades experimentais e

armazenadas em freezer à -20°C. Para as análises realizadas, as digestas foram liofilizadas e moídas em moinho de bola.

Amostras representativas das digestas foram analisadas de acordo com a Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC) para matéria seca (MS; AOAC, 934.01, 2006), nitrogênio (N; AOAC, 990.03, 2006), cinzas (AOAC, 942.05, 2006) e o conteúdo de cinza ácida insolúvel foi analisado por meio da metodologia adaptada descrita por Van Keulen e Young (1977). A proteína bruta ($N * 6,25$) foi determinada pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1990)

Os coeficientes de digestibilidade estandardizado da proteína foram calculados com base no marcador indigestível Celite, nas rações e digesta, por meio do cálculo do fator de indigestibilidade (FI), de acordo com as equações propostas por Sakomura e Rostagno (2016):

Fator de indigestibilidade ileal:

$$FI\ 1 = \frac{[CAI]\ na\ dieta}{[CAI]\ na\ digesta\ ileal}$$

[CAI] na digesta ileal

$$FI\ 2 = \frac{[CAI]\ na\ Dieta\ Isenta\ de\ Proteína}{[CAI]\ na\ digesta\ ileal}$$

[CAI] na digesta ileal

$$CDPB = \frac{PB_{dieta} - ((PB_{dig} * FI1) - (PB_{end} * FI2)) * 100}{(PB_{dieta})}$$

Onde:

FI1: fator de indigestibilidade 1

FI2: fator de indigestibilidade 2

CDPB: coeficiente de digestibilidade estandardizado da proteína bruta

PB_{dieta}: proteína bruta contida na dieta

PB_{dig}: proteína bruta contida nas excretas

PB_{end}: proteína bruta endógena contida na digesta ileal do tratamento DIP

2.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ao nível de significância de 5% utilizando o pacote ExpDes.pt do software estatístico R (R Software v. 4.0.4). Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para determinar a normalidade dos resíduos; em seguida, foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O teste SNK foi realizado ao nível de 5% de significância para a

comparação entre todos os tratamentos experimentais. Posteriormente, realizou-se o teste Dunnett ao nível de 5% de significância para a comparação entre o tratamento controle negativo e os demais tratamentos com inclusão das proteases

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferenças significativas ($P>0,05$) para CR dos animais na fase inicial. Os animais alimentados com o tratamento controle positivo obteve as melhores médias para GP e CA. Entre os tratamentos com dieta controle negativo, a protease C melhorou o GP dos animais. A adição de proteases exógenas na fase inicial não foi capaz de melhorar a conversão alimentar das aves (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados observados para consumo médio de ração (CR), ganho de peso médio (GP) e conversão alimentar na fase inicial (1 a 21 dias).

Tratamentos	CR (kg)	GP (kg)	CA
Controle Positivo (CP)	1.488	1.168 a	1.273 a
Controle Negativo (CN)	1.535	1.051 c	1.446 b
CN + Protease A	1.467	1.044 c	1.405 b
CN + Protease B	1.533	1.073 bc	1.428 b
CN + Protease C	1.550	1.090 b *	1.422 b
CN + Protease D	1.500	1.072 bc	1.399 b
CN + Protease E	1.503	1.048 c	1.434 b
CN + Protease F	1.515	1.070 bc	1.415 b
P-valor	0.18	0.001	0.001
CV (%)	4.27	2.64	3.11

Médias na mesma coluna com letras diferentes, diferem significativamente entre si pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) ($P<0,05$). Médias seguidas por * na mesma coluna diferem do controle negativo (CN) pelo teste de Dunnett ($P<0,05$). CR = consumo médio de ração; GP = ganho de peso médio; CA = conversão alimentar; CV = coeficiente de variação.

Na fase total (1 a 35 dias), não houve diferenças significativas para CR e VIAB ($P>0,05$). As proteases C e D se mostraram capazes de melhorar o GP de frangos de corte de 1 a 35 dias de idade. A adição de proteases exógenas na fase inicial não foi capaz de melhorar a conversão alimentar das aves alimentadas com dietas com redução proteica em comparação com os animais do tratamento controle positivo. (Tabela 3).

Tabela 4. Resultados observados para consumo médio de ração (CR), ganho de peso médio (GP), conversão alimentar (CA) e viabilidade (VIAB) na fase total (1 a 35 dias).

Tratamentos	CR (kg)	GP (kg)	CA	VIAB (%)
Controle Positivo (CP)	3.855	2.638 a	1.461 a	94.27
Controle Negativo (CN)	3.779	2.357 c	1.603 b	93.88
CN + Protease A	3.670	2.391 bc	1.534 b	93.33
CN + Protease B	3.734	2.415 bc	1.546 b	94.50
CN + Protease C	3.816	2.450 b *	1.557 b	96.66
CN + Protease D	3.736	2.436 b *	1.533 b	95.52
CN + Protease E	3.719	2.379 bc	1.563 b	96.66
CN + Protease F	3.740	2.408 bc	1.553 b	95.55
P-valor	0.11	0.001	0.001	0.33
CV (%)	3.93	2.39	3.39	4.67

Médias na mesma coluna com letras diferentes, diferem significativamente entre si pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) ($P < 0,05$). Médias seguidas por * na mesma coluna diferem do controle negativo (CN) pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$). CR = consumo médio de ração; GP = ganho de peso médio; CA = conversão alimentar; VIAB = viabilidade; CV = coeficiente de variação.

Os valores de EMA e EMAn não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos avaliados. A dieta CP obteve os maiores valores de Ning, seguido pelas dietas CN com a inclusão da protease A e B. A dieta CP registrou o maior valor de Nexc, enquanto, entre os tratamentos com dieta controle negativo, a dieta com a inclusão da protease C se diferenciou dos demais ao obter o maior valor para essa variável ($P < 0,05$). As proteases A e B aumentaram a taxa de nitrogênio retido pelas aves que receberam as dietas CN (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados observados para consumo de matéria seca (CMS), energia metabolizável aparente (EMA), energia metabolizável aparente corrigida para o balanço de nitrogênio (EMAn), nitrogênio ingerido (Ning) nitrogênio excretado (Nexc) e nitrogênio retido (NR).

Tratamentos	CMS (kg)	EMA (kcal/kg)	EMAn (kcal/kg)	Ning (g/ave)	Nexc (g/ave)	NR (%)
Controle Positivo (CP)	0.421	3587.75	3377.14	17.73 a	4.79 a	72.92 ab
Controle Negativo (CN)	0.427	3644.06	3477.12	12.42 c	3.74 c	69.79 b
CN + Protease A	0.435	3713.91	3490.03	15.47 b*	3.62 c	76.50 a*
CN + Protease B	0.431	3692.48	3467.04	15.46 b*	3.64 c	76.39 a*
CN + Protease C	0.423	3599.96	3423.65	13.43 c	4.20 bc*	67.66 b
CN + Protease D	0.404	3611.76	3424.78	13.51 c	3.93 c	70.42 b
CN + Protease E	0.414	3600.11	3432.81	12.99 c	3.81 c	69.46 b
CN + Protease F	0.421	3643.97	3469.08	12.76 c	3.79 c	70.22 b
P-valor	0.711	0.096	0.095	0.001	0.001	0.001
CV (%)	5.99	2.35	2.06	6.44	7.30	4.59

Médias na mesma coluna com letras diferentes, diferem significativamente entre si pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) ($P < 0,05$). Médias seguidas por * na mesma coluna diferem do controle negativo (CN) pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$). CMS = consumo médio de matéria seca; EMA = energia

metabolizável aparente; EMAn = energia metabolizável aparente corrigida para o balanço de nitrogênio; Ning = nitrogênio ingerido; Nexc = nitrogênio excretado; NR = nitrogênio retido; CV = coeficiente de variação.

Os valores dos coeficientes de digestibilidade da proteína bruta (CDPB) das dietas apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos avaliados. A dieta CN com a inclusão da protease E obteve o menor valor de CDPB. Por outro lado, entre as dietas CN, a protease F melhorou a digestibilidade da proteína bruta em frangos de corte (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados observados para coeficiente de digestibilidade estandardizada da proteína bruta (CDPB).

Tratamentos	CDPB
Controle Positivo (CP)	89.68 a
Controle Negativo (CN)	86.84 ab
CN + Protease A	88.63 ab
CN + Protease B	87.26 ab
CN + Protease C	86.04 ab
CN + Protease D	86.97 ab
CN + Protease E	85.03 b
CN + Protease F	89.47 ab*
P-valor	0.0351
CV (%)	2.80

Médias na mesma coluna com letras diferentes, diferem significativamente entre si pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) ($P < 0,05$). Médias seguidas por * na mesma coluna diferem do controle negativo (CN) pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$). CDPB = coeficiente de digestibilidade estandardizada da proteína bruta; CV = coeficiente de variação.

As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas entre as proteínas. A classificação das proteases ocorre em função do local de clivagem das ligações peptídicas. Endopeptidases agem hidrolisando a proteína em moléculas menores, enquanto as exopeptidases agem hidrolisando a porção carboxil-terminal, liberando um único aminoácido ou um dipeptídeo (Sakomura *et al.*, 2014). Proteases inativam fatores antinutricionais dos alimentos (Cowieson *et al.*, 2006), resultando em um melhor aproveitamento de proteínas e aminoácidos pelos animais (Aderibigbe *et al.*, 2020).

Como visto no estudo, a redução de proteína bruta das dietas impacta negativamente no desempenho de frangos de corte, reduzindo o ganho de peso e piorando a conversão alimentar. Resultados semelhantes foram encontrados por Chrystal *et al.* (2020), onde mostrou que a redução proteica dietética contribuiu para

aumentos associados na deposição de gordura, comprometendo a conversão alimentar.

As proteases C e D aumentam o ganho de peso médio dos animais alimentados com dietas com redução proteica, recuperando parte do desempenho perdido, embora nenhuma protease testada foi capaz de melhorar os valores de conversão alimentar para ambas as fases avaliadas. Há relatos na literatura que mostram diferentes resultados acerca dos efeitos das proteases sobre o desempenho e a digestibilidade de nutrientes em frangos de corte (Romero et al., 2014; Kamel et al., 2015; Stefanello et al., 2016; Cowieson et al., 2018). Cowieson *et al.* (2018) observaram que a utilização de protease exógena não foi capaz de influenciar o ganho de peso, porém reduziu significativamente o consumo de ração e a conversão alimentar.

As inconsistências de resultados dos estudos envolvendo proteases é diretamente ligada a falta de conhecimento das características das enzimas e a interação de mais de uma atividade enzimática em um mesmo produto enzimático (Stefanello *et al.*, 2016). Além disso, fatores como a composição da ração, utilizando diferentes ingredientes, contribuem para esses resultados divergentes (Simbaya *et al.*, 1996; Marsman *et al.*, 1997; Walk *et al.*, 2018; Borda-Molina *et al.*, 2019).

As dietas a base de milho e soja, apesar de apresentarem alta digestibilidade dos nutrientes (Rostagno *et al.*, 2017) possuem uma quantidade significativa de fatores antinutricionais como por exemplo, o fitato, polissacarídeos não-amiláceos, inibidores de tripsina, lectinas e proteínas antigênicas (de Jesus Benevides *et al.*, 2011; Jacob *et al.*, 2021). Kamel *et al.* (2015), observou melhora de parâmetros como ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e a digestibilidade de nutrientes. Esses benefícios foram associados à uma melhor digestibilidade das proteínas da dieta devido a atuação das proteases em degradar rapidamente os fatores antinutricionais presentes na dieta, aumentando a disponibilidade de aminoácidos para a utilização pelo animal (Kamel *et al.*, 2015). Bernardes et al. (2022), trabalhando com a suplementação de fitase e protease para frangos de corte alimentados com dietas com redução de nutrientes, observaram melhoras nos parâmetros de desempenho como ganho de peso e conversão alimentar. Os efeitos da inclusão de protease exógena no desempenho de frangos de corte são mais evidenciados quando se utiliza dietas com redução de aminoácidos, proteína bruta ou mesmo quando há algum fator natural que compromete a digestibilidade da proteína

(Amerah *et al.*, 2017). Amerah *et al.* (2017) avaliaram os efeitos da adição de enzimas exógenas (xilanase, amilase e protease), em combinação ou sozinhas, na digestibilidade de nutrientes e no desempenho de frangos de corte e foi concluído que a combinação dos efeitos sinérgicos das enzimas contribuiu para um maior ganho de peso e melhorou a conversão alimentar, além de melhorar a digestibilidade do amido, nitrogênio e da energia bruta. Os resultados encontrados no presente estudo corroboram para a avaliação dos efeitos da protease exógena no desempenho de frangos de corte alimentados com dietas com redução de PB. Por outro lado, relatos na literatura evidenciam efeitos potencializados quando em utilização com outras enzimas exógenas (Jacob *et al.*, 2021; Bernardes *et al.*, 2022)

Os resultados encontrados para os valores de EMA e EMAn não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos analisados. A ausência desses efeitos nos valores de energia metabolizável está compatível com outros estudos (Cowieson e Adeola, 2005; Amerah *et al.*, 2017; Mahmood *et al.*, 2017; Jacob *et al.*, 2021) e pode ser atrelada ao uso de ingredientes de alta digestibilidade (Jacob *et al.*, 2021). Amerah *et al.* (2017) observaram resultados semelhantes ao analisarem o efeito da inclusão de carboidrases e protease, sozinhas ou em combinação. Esses autores mostraram que a adição de protease sozinha não aumentou os valores de EMAn, embora quando em combinação, houve efeito positivo. A combinação entre essas enzimas impacta no valor de EMAn devido a uma maior digestibilidade do amido no intestino delgado, devido a ação das carboidrases (Amerah *et al.*, 2017). Entretanto, estudos anteriores relatam melhorias na retenção de energia e nutrientes com a adição de protease + fitase, protease, carboidrases + proteases (Kalmendal e Tauson, 2012; Romero *et al.*, 2013; Murugesan, Romero e Persia, 2014; Stefanello *et al.*, 2016). Esses efeitos são atribuídos a um melhor acesso das enzimas digestivas aos nutrientes das rações, uma vez que agem reduzindo os fatores antinutricionais dos ingredientes, minimizando a perda endógena e trazendo melhores benefícios na utilização da energia e nutrientes (Olukosi e Adeola, 2008; Dourado *et al.*, 2014; Cowieson *et al.*, 2017; Gallardo *et al.*, 2020). Os efeitos do uso de enzimas exógenas na melhora da utilização da energia variam conforme o estado de saúde intestinal, perfil da microbiota intestinal e conteúdo energético da dieta (Amerah *et al.*, 2014).

Analisando o coeficiente de digestibilidade da proteína bruta das dietas, foi possível observar que a protease F melhorou em 3,02% o CDPB da dieta CN, em comparação com os demais tratamentos com a dieta controle negativo. O resultado

encontrado está de acordo com estudos anteriores, onde mostraram que a protease exógena melhorou a digestibilidade da proteína bruta e aminoácidos (Fru-Nji *et al.*, 2011; Kamel *et al.*, 2015; Mahmood *et al.*, 2017). Isso pode ser explicado pelo fato das proteases em dietas para frangos de corte aumentarem a hidrólise de proteínas, melhorando a digestibilidade e a absorção de nutrientes da ração, assim como o valor nutricional dos alimentos, impactando no desempenho e na melhoria da utilização do nitrogênio (Dornellas, 2017). Além disso a protease pode competir por sítios de ligação com inibidores de tripsina, melhorando a utilização da proteína e dos aminoácidos pelo animal (Aderibigbe *et al.*, 2020).

Como visto, há estudos evidenciando os efeitos benéficos de proteases exógenas no desempenho de frangos de corte, assim como na melhoria da digestibilidade de nutrientes, retenção de energia e melhoria na morfometria intestinal. Os resultados encontrados no presente estudo, corroboram para esse acervo de informações, mostrando o impacto de algumas proteases testadas no aumento de ganho de peso e de digestibilidade de proteína bruta de frangos de corte alimentados com dietas com redução proteica.

4 CONCLUSÃO

Entre os animais alimentados com as dietas controle negativo, as proteases C e D melhoraram o ganho de peso, enquanto a protease F melhorou o coeficiente de digestibilidade da proteína bruta. Não houve influência das proteases nos valores de energia metabolizável das dietas. Contudo, esses efeitos não foram suficientes para recuperar o desempenho de frangos de corte perdido pela redução de proteína.

REFERÊNCIAS

- ADERIBIGBE, A. *et al.* Growth performance and amino acid digestibility responses of broiler chickens fed diets containing purified soybean trypsin inhibitor and supplemented with a monocomponent protease. **Poultry Science**, v. 99, n. 10, p. 5007-5017, 2020.
- AMERAH, A. M. *et al.* Effect of calcium level and phytase addition on ileal phytate degradation and amino acid digestibility of broilers fed corn-based diets. **Poultry Science**, v. 93, n. 4, p. 906-915, 2014.

AMERAH, A. M. et al. 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**, v. 96, n. 4, p. 807-816, 2017.

AOAC, AOAC. Official Methods of analysis. th ed. **Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, EUA**, v. 997, 1970.

BERNARDES, Romário Duarte et al. Effect of phytase and protease combination on performance, metabolizable energy, and amino acid digestibility of broilers fed nutrient-restricted diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 51, 2022.

BORDA-MOLINA, Daniel et al. Effects of protease and phytase supplements on small intestinal microbiota and amino acid digestibility in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 98, n. 7, p. 2906-2918, 2019.

CHRYSTAL, Peter V. et al. Effects of reduced crude protein levels, dietary electrolyte balance, and energy density on the performance of broiler chickens offered maize-based diets with evaluations of starch, protein, and amino acid metabolism. **Poultry Science**, v. 99, n. 3, p. 1421-1431, 2020.

COWIESON, A. J. et al. A systematic view on the effect of phytase on ileal amino acid digestibility in broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 225, p. 182-194, 2017.

COWIESON, A. J. et al. The effect of a mono-component exogenous protease and graded concentrations of ascorbic acid on the performance, nutrient digestibility and intestinal architecture of broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 235, p. 128-137, 2018.

COWIESON, A. J.; ADEOLA, O. Carbohydrases, protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. **Poultry science**, v. 84, n. 12, p. 1860-1867, 2005.

COWIESON, A. J.; HRUBY, M.; PIERSON, EE M. Evolving enzyme technology: impact on commercial poultry nutrition. **Nutrition research reviews**, v. 19, n. 1, p. 90-103, 2006.

DE JESUS BENEVIDES, Clícia Maria et al. Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Segurança Alimentar e nutricional**, v. 18, n. 2, p. 67-79, 2011.

DORNELAS, Livia Carrasco. **Efeito da temperatura ambiente e suplementação da dieta com protease no desempenho e utilização de nutrientes em frangos de corte**. Orientador: José Roberto Sartori. 2017. 50 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

DOURADO, L. R. B.; BARBOSA, N. A. A.; SAKOMURA, N. K. Enzimas na nutrição de monogástricos. **SAKOMURA, NK; SILVA, JHV; COSTA, FGP; FERNANDES, JBK**, p. 466-484, 2014.

ERDAW, Mammo M.; WU, Shubiao; IJI, Paul A. Growth and physiological responses of broiler chickens to diets containing raw, full-fat soybean and supplemented with a high-impact microbial protease. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 30, n. 9, p. 1303, 2017.

FRU-NJI, Fidelis et al. A feed serine protease improves broiler performance and increases protein and energy digestibility. **The Journal of Poultry Science**, v. 48, n. 4, p. 239-246, 2011.

GALLARDO, Connie; DADALT, Julio Cezar; NETO, MA Trindade. Carbohydrases and phytase with rice bran, effects on amino acid digestibility and energy use in broiler chickens. **Animal**, v. 14, n. 3, p. 482-490, 2020.

JACOB, Rodrigo de Freitas et al. Broiler feed formulated with phosphorus, calcium, and energy deficiencies supplemented with exogenous enzymes. **Semina Ci. agr.**, p. 3029-3046, 2021.

KALMENDAL, R.; TAUSON, R. Effects of a xylanase and protease, individually or in combination, and an ionophore coccidiostat on performance, nutrient utilization, and intestinal morphology in broiler chickens fed a wheat-soybean meal-based diet. **Poultry Science**, v. 91, n. 6, p. 1387-1393, 2012.

KAMEL, N. F. et al. Effects of a monocomponent protease on performance parameters and protein digestibility in broiler chickens. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 6, p. 216-225, 2015.

MAHMOOD, T. et al. Effect of supplementing exogenous protease in low protein poultry by-product meal based diets on growth performance and nutrient digestibility in broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 228, p. 23-31, 2017.

MARSMAN, G. J. et al. The effect of thermal processing and enzyme treatments of soybean meal on growth performance, ileal nutrient digestibilities, and chyme characteristics in broiler chicks. **Poultry science**, v. 76, n. 6, p. 864-872, 1997.

MURUGESAN, Ganapathi R.; ROMERO, Luis F.; PERSIA, Michael E. 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**, v. 9, n. 7, p. e101888, 2014.

OLUKOSI, Oluyinka A.; ADEOLA, Olayiwola. 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. **The journal of poultry science**, v. 45, n. 3, p. 192-198, 2008.

ROMERO, L. F. et al. 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 and technology**, v. 181, n. 1-4, p. 35-44, 2013.

ROMERO, L. F. et al. Contribution of protein, starch, and fat to the apparent ileal digestible energy of corn-and wheat-based broiler diets in response to exogenous xylanase and amylase without or with protease. **Poultry science**, v. 93, n. 10, p. 2501-2513, 2014.

Rostagno, H. S.; Albino, L. F. T.; Hannas, M. I.; Donzele, J. L.; Sakomura, N. K.; Perazzo, F. G.; Saraiva, A.; Teixeira, M. L.; Rodrigues, P. B.; Oliveira, R. F.; Barreto, S. L. T. and Brito, C. O. 2017. Tabelas Brasileira Para Aves e Suínos. 4^o ed. Viçosa.

Sakomura, N. K. and Rostagno, H. S. 2016. Métodos de Pesquisa em Nutrição de Monogástricos. 2^o ed. Funep, Jaboticabal.

SAKOMURA, Nilva Kazuel et al. Nutrição de não ruminantes. **Jaboticabal, SP: Editora Funep**, 2014.

SHEPPY, C. et al. The current feed enzyme market and likely trends. **Enzymes in farm animal nutrition**, p. 1-10, 2001.

SIMBAYA, J. et al. The effects of protease and carbohydrase supplementation on the nutritive value of canola meal for poultry: In vitro and in vivo studies. **Animal Feed Science and Technology**, v. 61, n. 1-4, p. 219-234, 1996.

STEFANELLO, C. et al. Energy and nutrient utilization of broilers fed soybean meal from two different Brazilian production areas with an exogenous protease. **Animal Feed Science and Technology**, v. 221, p. 267-273, 2016.

VAN KEULEN, J. Y. B. A.; YOUNG, B. A. Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. **Journal of Animal Science**, v. 44, n. 2, p. 282-287, 1977.

WALK, C. L. et al. Evaluation of novel protease enzymes on growth performance and apparent ileal digestibility of amino acids in poultry: enzyme screening. **Poultry science**, v. 97, n. 6, p. 2123-2138, 2018.