

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Efeito da suplementação de proteases sobre a digestibilidade e desempenho de suínos nas fases pré-inicial e inicial

Leury Jesus de Souza

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2021

Leury Jesus de Souza
Zootecnista

**Efeito da suplementação de proteases sobre a digestibilidade e desempenho de suínos na
fase de creche**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **URBANO DOS SANTOS RUIZ**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

Piracicaba
2021

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Souza, Leury Jesus de

Efeito da suplementação de proteases sobre a digestibilidade e desempenho de suínos na fase de creche / Leury Jesus de Souza. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - Piracicaba, 2021.

44 p.

Dissertação (Mestrado) - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Desempenho 2. Digestibilidade dos aminoácidos 3. Proteases 4. Suplementação I. Título

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, em especial meus pais, Jesus e Suzie, e meus irmãos, Eric, Kevyn e Kauan, por sempre me apoiarem nas minhas decisões e fornecer todo o suporte que eu precisei e preciso para seguir em frente. Sem vocês a caminhada até aqui seria impossível.

Ao Alysson, pelo auxílio na realização desta pesquisa, pelo apoio emocional e, também por tornar essa caminhada mais feliz e leve.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Urbarno, pelos ensinamentos, por todo o apoio, paciência e a oportunidade de adquirir experiência durante minha caminhada no mestrado e, principalmente, na elaboração e desenvolvimento deste trabalho. À Universidade de São Paulo – USP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ, por toda a estrutura necessária para trilhar minha vida acadêmica.

À minha colega e amiga de pós-graduação, Cândida, pela amizade, companheirismo, e, claro, os momentos de estudo e diversão. Obrigado pelos conselhos e motivação.

À Agrocerec Multímix, principalmente ao Francisco Alves Pereira, por me apoiar e permitir que fosse possível a realização do meu mestrado. Obrigado pelos recursos e estrutura que permitiram o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos professores da ESALQ pelos ensinamentos adquiridos durante as aulas ao longo do meu mestrado.

Aos colegas de pós graduação pela oportunidade do trabalho em equipe, compartilhamento de conhecimentos e experiências.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste estudo. Muito obrigado.

BIOGRAFIA

LEURY JESUS DE SOUZA – São José do Rio Preto, 13 de janeiro de 1993. Zootecnista graduado pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista em 2016. No ano de 2018, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Pastagens da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, onde atualmente é mestrando na linha de pesquisa de nutrição de não ruminantes. Em 2019 ingressou no curso de Master Business Administration em Gestão de Projetos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. Proteínas	11
2.2. Fatores antinutricionais.....	12
2.3. Enzimas	13
2.4. Uso de proteases para suínos	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Instalações e animais	15
3.2. Dietas experimentais, análises laboratoriais e parâmetros avaliados	15
3.3. Análise Estatística e delineamento experimental	22
4. RESULTADOS	23
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS	40

RESUMO

Efeito da suplementação de proteases sobre a digestibilidade e desempenho de suínos nas fases pré-inicial e inicial

As proteases são enzimas capazes de melhorar a digestibilidade da proteína, reduzir o impacto de fatores antinutricionais, melhorando o desempenho de leitões na creche. O objetivo do presente estudo foi avaliar a suplementação de duas fontes de proteases sobre as digestibilidades e desempenho de leitões desmamados. Para a avaliação, dois experimentos foram realizados. No experimento I foram avaliadas as digestibilidades, ileal e total, de nutrientes e energia do milho e do farelos de soja em 90 leitões, com peso vivo inicial de $13,52 \pm 1,96$ kg. Os tratamentos foram: (i) dieta isenta de proteína (DIP); (ii) milho; (iii) milho com 0,05% de protease 1 (P1); (iv) milho com 0,01% de protease 2 (P2); (v) DIP+30% de farelo de soja com 46% de proteína bruta (FS46%); (vi) DIP+30% de FS 46%+P1; (vii) DIP+30% de FS46%+P2; (viii) DIP+30% de farelo de soja com 48% de proteína bruta (FS48%); (ix) DIP+30% de FS48%+P1 e (x) DIP+30% de FS48%+P2. No experimento II foi avaliado o desempenho de 288 leitões desmamados, com peso vivo de $6,49 \pm 0,91$ kg. Os tratamentos foram: (i) dieta com baixa inclusão de farelo de soja; (ii) Dieta com alta inclusão de farelo de soja; (iii) Dieta com alta inclusão de farelo de soja + P1; (iv) Dieta com alta inclusão de farelo de soja + P2. Todos os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as avaliações dos efeitos das enzimas sobre os farelos de soja no experimento de digestibilidade foram efetuadas num esquema fatorial 2x3 (FS46% e FS48% x sem enzima, com P1 ou P2). Para os dois experimentos, quando indentificado diferença na ANOVA, foi aplicado teste de Tukey para comparação das médias, ao nível de significância de 5%. No experimento I a digestibilidade ileal estandarizada dos aminoácidos dos farelos de soja foi superior ($P < 0,05$) quando os leitões foram suplementados com a P2 (88,9% vs. 82,7%), quando comparado à dietas sem enzimas. No entanto, as proteases não melhoraram ($P > 0,05$) a digestibilidade dos nutrientes do milho. No experimento II o peso dos leitões, aos 49 dias de idade, foi superior ($P < 0,05$) quando se utilizou a protease ácida, em relação a dieta com alta inclusão de soja, sem enzima (15,09kg vs. 14,66kg). Porém aos 70 dias de idade não houve diferença entre os tratamentos no desempenho dos leitões. A protease ácida foi capaz de melhorar a digestibilidade do farelo de soja, principalmente quando se utilizou o FS46%. Além disso, o uso de protease ácida melhora o desempenho de leitões até os 49 dias de idade.

Palavras-chave: Enzimas, Farelo de soja, Milho, Protease ácida

ABSTRACT

Effect of protease supplementation on pig digestibility and performance in the pre-initial and initial phases

Proteases are enzymes capable of improving protein digestibility, reducing the impact of anti-nutritional factors, improving the performance of piglets in the nursery phase. The aim of the present study was to evaluate the supplementation of two sources of proteases on the digestibility and performance of weaned piglets. For the evaluation, two experiments were carried out. In experiment I, ileal and total digestibilities for corn and of two sources of soybean meal were evaluated in 90 weaned piglets, with an initial live weight of 13.52 ± 1.96 kg. The treatments were: (i) protein-free diet (PFD); (ii) corn; (iii) corn with 0.05% protease 1 (P1); (iv) corn with 0.01% protease 2 (P2); (v) PFD + 30% soybean meal with 46% crude protein (SM46%); (vi) PFD + 30% SM46% + P1; (vii) PFD + 30% SM46% + P2; (viii) PFD + 30% soybean meal with 48% crude protein (SM48%); (ix) PFD + 30% SM48% + P1 and (x) PFD + 30% SM48% + P2. The diets with soybean meal were evaluated in a 2x3 factorial scheme (SM46% and SM48% x without enzyme, P1 and P2). In experiment II, the performance of 288 weaned piglets, with 6.49 ± 0.91 kg of live weight, fed diets with low (15 to 26%) or high (22 to 35%) inclusion of SM46%, with or without P1 and P2 was evaluated. The treatments were: (i) diet with low inclusion of soybean meal; (ii) Diet with high inclusion of soybean meal; (iii) Diet with high inclusion of soybean meal + P1; (iv) Diet with high inclusion of soybean meal + P2. All data was submitted to ANOVA, and when differences were identified, the Tukey test was applied, at a significance level of 5%. In experiment I, the standardized ileal digestibility of the amino acids in soybean meal was improved ($P < 0.05$) when the piglets were supplemented with P2 (88.9% vs. 82.7%). However, there was no effect when using proteases in corn diets. In experiment II, the weight of the piglets, at 49 days of age, was higher ($P < 0.05$) when acid protease was used, in relation to a diet with high soy inclusion, without enzyme (15.09 kg vs. 14, 66kg). However, at 70 days of age, there was no difference between treatments in piglet performance. The acid protease was able to improve the digestibility of soybean meal, especially when SM46% was used. In addition, the use of acid protease improves the performance of piglets up to 49 days of age.

Keywords: Acid protease, Corn, Enzymes, Soybean meal

1. INTRODUÇÃO

Na suinocultura, o desmame é considerado um momento crítico para os leitões, pois reúne diversos fatores estressantes para os animais, tais como: a redução da imunidade passiva, adquirida pela ingestão do colostro nas primeiras horas de vida, e a imunidade ativa ainda está em desenvolvimento, não sendo suficiente para garantir o suporte imunológico necessário (Blecha et al., 1983); mudança de ambiente, da maternidade para a sala de creche; formação de novos grupos sociais, pela mistura de animais de outras leitegadas; e troca na alimentação, de uma dieta predominantemente composta pelo leite materno, muito nutritivo, digestível e palatável para os leitões, para outra sólida, composta principalmente por ingredientes vegetais, menos digestíveis e palatáveis, causando alterações nas vilosidades intestinais e demandando enzimas diferentes das comumente exigidas enquanto alimentados pelo leite materno (Wiese et al., 2003).

As dietas fornecidas aos suínos após o desmame contêm alguns ingredientes especiais, como sucedâneos do leite e plasma sanguíneo seco, porém são majoritariamente compostas por vegetais, no caso brasileiro principalmente milho e farelo de soja. Vale ressaltar que os derivados da soja, apesar de serem submetidos a processamento térmico, ainda podem apresentar alguns fatores antinutricionais (FANs), como os inibidores de tripsina, que prejudicam a digestibilidade do próprio farelo de soja e de outros ingredientes que compõe a ração (Huishman & Tolman, 1992).

Adicionalmente, como os ingredientes vegetais não são totalmente digeridos por leitões devido a imaturidade de seu sistema digestório (Soares, 2004), restarão frações não digeridas no intestino dos animais que poderão servir como substrato para microrganismos. Ou seja, estas mudanças na alimentação criam condições favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos que podem levar à ocorrência de diferentes doenças, entre elas, a desenteria suína, que leva à piora na conversão alimentar e redução no ganho de peso diário (Dong et al., 1996). Este cenário resulta em um aumento na utilização de antibióticos como medida corretiva, impactando no custo de produção em uma fase em que a dieta fornecida aos animais já apresenta um custo relativamente alto devido à inclusão de lácteos.

Algumas medidas podem ser tomadas para reduzir os efeitos mencionados. A adaptação dos animais a dietas sólidas é de extrema importância, e deve ser iniciada ainda na maternidade pelo fornecimento de ração a partir do sétimo dia de vida dos leitões, com o objetivo de estimular a produção de enzimas que atuarão na digestão dos ingredientes presentes nessas dietas. Uma alternativa passível de ser utilizada é a suplementação de enzimas exógenas às dietas pois, além de potencialmente melhorarem a digestibilidade dos alimentos, podem alterar a estrutura dos FANs, como inibidores de tripsina, que podem ser neutralizados pela presença de proteases na dieta.

O uso de enzimas exógenas na alimentação de suínos vem se apresentando, cada vez mais, como uma ferramenta para potencializar o aproveitamento de ingredientes com valor nutricional menor, buscando reduzir o custo de produção. Dentre as enzimas adicionadas às dietas, as proteases exógenas melhoram a digestibilidade dos aminoácidos de ingredientes proteicos, conseqüentemente reduzindo a excreção de nitrogênio (Thorpe & Beal, 2001). Estas enzimas também têm a função de auxiliar a ação das enzimas equivalentes endógenas, principalmente em leitões recém-desmamados, por apresentarem uma produção insuficiente de enzimas digestivas (Junior, 2009). Além disso, as proteases melhoram a degradação de fatores antinutricionais de origem proteica, e proteínas alergênicas (Classen, 1996).

Na maioria dos estudos o fornecimento de proteases se deu na forma de coquetéis enzimáticos, não se explicitando os efeitos específicos das proteases para monogástricos (Kocher et al., 2002; Omogbenigun et al., 2004;

Cowieson & Adeola, 2005). Outro fator relevante é que o aumento na digestibilidade de aminoácidos potencialmente proporcionado pelo uso de enzimas proteolíticas deve ser bem definido e quantificado, estruturando matrizes nutricionais de diferentes ingredientes quando suplementados com as enzimas. Em outras palavras, a digestibilidade dos aminoácidos dos ingredientes pode ser melhorada em decorrência do emprego de proteases, o que necessita ser criteriosamente determinado, possibilitando a valorização nutricional destes ingredientes. Tais pontos permitiram a redução na inclusão de aminoácidos cristalinos ou de fontes proteicas nas dietas, formulando-as com menores teores de proteína bruta, aproximando-se do conceito de proteína ideal, reduzindo o custo na formulação (Olukosi et al., 2015; Vieira et al., 2016).

A criação de uma matriz nutricional baseada na inclusão de proteases exógenas, também poderá permitir a utilização de produtos com menor valor nutricional. Isso garantirá que os efeitos benéficos da utilização desta enzima sejam considerados, gerando reais benefícios ambientais e econômicos.

Objetivou-se no presente estudo, avaliar a suplementação de duas fontes de proteases sobre as digestibilidades, ileal e total de nutrientes e energia, do milho e dos farelos de soja convencional e de alta proteína, assim como o desempenho de suínos alimentados com dietas contendo as proteases nas fases pré-inicial e inicial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Proteínas

As proteínas são substâncias quaternárias compostas por carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, às vezes associados a minerais como, ferro, enxofre, cobre e zinco. A sequência dos aminoácidos presentes em sua estrutura determina suas propriedades químicas, físicas e biológicas (Zardo & Lima, 1999). A qualidade da proteína de um alimento pode ser comparada com a de outro com base em seu valor biológico, escore químico, razão de eficiência proteica e saldo de utilização proteica (Cozzolino & Cominetti, 2013).

No estômago se inicia a digestão das proteínas, onde são desnaturadas pelo baixo pH e são expostas à ação da enzima pepsina. O processo de ação enzimática continua no lúmen do intestino delgado por ação das proteases pancreáticas, tendo como produtos, polipeptídeos, dipeptídeos e aminoácidos livres. Na mucosa intestinal, as aminopeptidases, degradam os poli à aminoácidos livres, que são então absorvidos e transportados para o fígado pela veia porta (Dourado et al., 2014).

No organismo as proteínas exercem diferentes funções como, por exemplo, estrutural, transporte (hemoglobina, apoferritina e calbindina), proteção (coágulos e imunoglobulinas), regulação do pH sanguíneo, função enzimática, hormonal e fonte de energia (Marzocco e Torres, 1999). Porém, o uso de proteínas para produção de energia tem alto preço para o produtor de suínos, além do custo elevado para o organismo do animal e para o ambiente.

Quando há excesso de aminoácidos disponíveis, é necessário a excreção do nitrogênio oriundo dos aminoácidos excedentes (Marzocco e Torres, 1999). Isso causa uma sobrecarga metabólica, pois o organismo necessita excretar na forma de ureia, como, por exemplo, no caso dos suínos, isso reflete em prejuízo pelo alto custo para essa metabolização, além de estar descartando um nutriente de alto valor na dieta. Dessa forma, o ideal é que a proteína seja utilizada apenas para sua função específica, pois, na excreção de nitrogênio pela urina, têm-se um custo elevado de 2 ATP/mol de nitrogênio, o que corresponde a quatro ATP's para cada molécula de ureia (Noblet et al., 2001). Por isso, é importante considerar, no momento da formulação, a quantidade de proteína fornecida pelos ingredientes proteicos em relação à idade, linhagem e função produtiva do suíno (crescimento, manutenção, gestação ou lactação).

Em leitões jovens a digestão proteica muitas vezes é ineficiente, fazendo com que proteínas intactas cheguem ao intestino grosso, podendo resultar na ocorrência de diarreias pela formação de metabólitos da fermentação microbiana da proteína não digerida (Bertschinger et al., 1979). Esta situação é agravada pelo alto teor de proteína bruta nas rações, geralmente adotada na formulação das dietas que são fornecidas para os animais nas fases iniciais, além de fatores antinutricionais que podem estar presentes em alguns ingredientes da ração, principalmente no farelo de soja.

Já se sabe da possibilidade de se adotar a estratégia de utilização de dietas com níveis de proteína bruta reduzidos, sem afetar o desempenho e a saúde dos leitões (Tang et al., 2019), porém o sucesso dessa estratégia está associada à suplementação de aminoácidos industriais para suprir a redução na inclusão de farelo de soja (Peng et al., 2016; Tang et al., 2019), pois caso não seja realizado essa suplementação, a redução no teor de proteína bruta, pode resultar em piora no desempenho e digestibilidade de nutrientes (Yu et al., 2020).

Uma outra estratégia que pode potencializar o aproveitamento de aminoácidos, em dietas de baixa proteína, é a suplementação de proteases. O uso de enzimas exógenas na dieta pode melhorar a digestibilidade das proteínas, propiciando aporte adequado de aminoácidos para bom desempenho, diminuir a incidência de diarreia pela redução

de proteína não digerida que chega ao intestino grosso e, conseqüentemente, de substrato para a fermentação microbiana, minimizando efeitos de alguns fatores antinutricionais de natureza proteica.

2.2. Fatores antinutricionais

Por definição, fatores antinutricionais (FANs) são compostos oriundos de alimentos de origem vegetal que, ao serem ingeridos, causam efeitos que prejudicam a digestão, além da absorção e aproveitamento dos nutrientes, seja do alimento fonte dos FANs, seja de outros ingredientes presentes na dieta (Alves, 2019). Desta forma, dietas com quantidades significativas destes fatores, têm seu valor nutritivo prejudicado, podendo causar danos à saúde dos animais como, por exemplo, diarreias e redução no desempenho produtivo.

Segundo Yasothai (2016), os principais FANs presentes nos farelos de soja são:

- Inibidores de tripsina: São os fatores de Kunitz e Bowman-Birk (Winiarska-Mieczan, 2007), comumente encontrados na soja crua. Atuam na inibição de proteases como a tripsina e a quimotripsina.
- Fatores goitrogênicos: São glicosídeos do grupo isoflavínico, com atividade bócio-patogênica, que causam um aumento da glândula tireoide, tendo como consequência a redução da atividade da tiroxina que é secretada pela tireoide.
- Saponinas: Pode causar a redução na palatabilidade da ração.
- Fatores raquitogênicos: Componente de cerca de 0,1% da soja crua. Esses fatores interferem na calcificação dos ossos, sendo os perus a espécie mais sensível.
- Antígenos: As glicinina e β -conglucina são as principais proteínas antigênicas presente na soja.
- Lectinas: São glicoproteínas que aglutinam eritrócitos e ligam componentes de açúcar. Não são digeridas, e se aderem a parede intestinal, prejudicando a absorção de nutrientes.

O farelo de soja, amplamente utilizado como fonte de proteína nas dietas para os suínos, pode conter em sua composição os FANs como os inibidores de tripsina e antígenos que, principalmente para leitões recém-desmamados, podem trazer prejuízos significativos, causando diarreias e redução no desenvolvimento e adaptação dos animais nesta fase produtiva (Leite et al., 2012).

Os inibidores de tripsina estão entre os principais FANs do farelo de soja, pois inativam a protease tripsina, prejudicando a digestão de proteínas (Aderibigbe et al., 1997). A redução na atividade de enzimas pancreáticas, causa um aumento na produção e secreção de tripsina e quimotripsina, resultando em maiores perdas de nitrogênio endógeno, sobretudo de aminoácidos que contém em sua composição o enxofre (Schneeman & Gallaher, 1986).

Muitos dos FANs presentes no farelo de soja são termolábeis, podendo ser neutralizados por tratamentos térmicos, entre eles: tostagem por tambores rotativos; tostagem por calor úmido; jet-sploder; tostagem por calor seco; extrusão seca e úmida; micronização e cozimento (Zardo e Lima, 1999). Falhas no processamento não são comumente identificadas no farelo de soja tostado que chega até o produtor, não garantindo que os FANs tenham sido totalmente eliminados no processo, alguns podem resistir e estar presentes na ração dos animais. No caso de antígenos presentes na soja, sua inativação é menos eficiente quando comparado à inativação dos inibidores de tripsina ou lectinas (Van Eys et al., 2004). No caso dos inibidores de tripsina, por serem de origem proteica, uma alternativa que vem sendo adotada é a utilização de enzimas exógenas que podem amenizar os efeitos dos FANs no farelo de soja, além de potencializar a utilização das proteínas presentes na dieta dos animais.

2.3. Enzimas

Enzimas são proteínas com função catalizadora, de estrutura terciária ou quaternária, que podem ter como cofatores vitaminas e minerais (Freitas et al., 2011). Bioquimicamente, as classes de enzimas que existem são: isomerases, hidrolases, ligases, transferases, liases e oxidorreduções (Marzocco e Torres, 1999), porém, as de importância para o uso como aditivos para suínos são as hidrolases, que são as enzimas digestivas, como, por exemplo, proteases, fosfatases e glicosidases.

A utilização de enzimas na nutrição animal é uma ferramenta que pode contribuir para melhor digestão das rações, atuando em compostos que não seriam digeridos apenas com as enzimas endógenas, degradando os FAN's, reduzindo a disponibilidade de substrato para ação de bactérias potencialmente nocivas ao desempenho dos animais. Por essas características, o uso de enzimas exógenas nas dietas de suínos melhora a digestibilidade dos nutrientes e, conseqüentemente, há uma redução na proliferação de bactérias patogênicas no intestino, diminuindo a incidência de diarreias, principalmente em leitões recém-desmamados (Adeola & Cowieson, 2011).

A adição de enzimas exógenas na alimentação de suínos como, por exemplo, fitases, proteases, lipases, é comum. Estas enzimas exógenas têm a função de auxiliar a ação das enzimas equivalentes endógenas, principalmente em leitões recém-desmamados, por apresentarem uma produção insuficiente de enzimas digestivas (Silva Junior, 2009), além disso, segundo Classen (1996), as proteases potencializam o aproveitamento das proteínas de baixa digestibilidade e inativam as FANs de origem proteica.

Para que as enzimas sejam empregadas na alimentação animal de forma eficiente, devem apresentar as seguintes características: baixo custo de produção; segurança toxicológica; atividade altamente específica; interação conhecida com a matriz do alimento para facilitar a determinação quantitativa de enzima na dieta completa; especificidade em promover os efeitos esperados; resistência à inativação por calor, baixo pH e enzimas proteolíticas; e boa vida de prateleira (Marquardt & Bedford, 2001).

A redução no custo também é um argumento para a utilização de enzimas exógenas, pois existe a possibilidade de reduzir a inclusão de ingrediente de alto custo, como boa parte dos ingredientes ricos em proteínas e dos aminoácidos industriais, e de maior utilização de ingredientes de qualidade inferior com custo relativamente menor. De modo geral, as enzimas podem promover uma digestão mais eficiente, melhorando o aproveitamento do alimento até o intestino delgado, diminuindo, assim, o que chega no intestino grosso e reduzindo a poluição ambiental causada por nutrientes excretados (Thorpe & Beal, 2001).

2.4. Uso de proteases para suínos

As proteases, também chamadas de enzimas peptidases ou proteolíticas, são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de proteínas e polipeptídeos em compostos mais simples. O uso de proteases exógenas em dietas de suínos pode melhorar a digestibilidade da proteína dietética e o desempenho, de modo geral (Upadhaya et al., 2016; Tactacan et al., 2016). Além disso, as proteases exógenas podem ser uma alternativa eficiente quando se usa ingredientes com proteínas de baixa qualidade, por melhorarem seus valores nutricionais, e podem degradar FANs de constituição proteica (Wang et al., 2008). Outro benefício está associado ao efeito da protease sobre o estímulo do crescimento intestinal e maturação do trato gastrointestinal em animais jovens, pode estar associada com um efeito direto da enzima, mas também indireto, pela alteração na microbiota (Prykhodko et al., 2015).

Em relação à saúde intestinal dos suínos, a protease pode auxiliar na redução da incidência de diarreia (Zhang et al., 2014), principalmente de leitões recém-desmamados, que apresentam digestão deficiente dos ingredientes que compõem a ração. A deficiência na digestão está relacionada à baixa produção de ácido clorídrico no estômago, e a produção insuficiente de enzimas digestivas (Soares, 2004).

A diarreia causada devido ao alimento ingerido, geralmente ocorre no desmame dos leitões, pois o leite, antes a principal fonte de alimento enquanto lactentes, deixa de ser fornecido aos leitões, sendo sua fonte de nutrientes alterada para dietas a base de milho e farelo de soja, exigindo do animal a digestão de compostos diferentes daqueles que compõem o leite, podendo levar a diarreia no período em que estes leitões estão se adaptando a nova dieta. Essa condição leva ao comprometimento do desempenho do suíno, impossibilitando que ele expresse seu máximo potencial genético, além de estar intimamente relacionado ao aumento da mortalidade na creche (Fairbrother et al., 2005). É comprovado que o uso de enzimas exógenas pode reduzir a incidência de diarreia (Heo et al., 2013). Zuo et al. (2015) concluíram que a adição de protease na dieta de leitões reduziu a porcentagem de animais que apresentaram diarreia. Os autores atribuíram este efeito às seguintes observações: melhora no desenvolvimento intestinal; aumento de atividade das enzimas digestivas; e melhor digestibilidade dos nutrientes presentes na dieta.

As enzimas exógenas que são adicionadas como aditivos na dieta de suínos podem apresentar feedback negativo no que se refere a produção das enzimas correspondentes endógenas e a expressão gênica dos suínos quando utilizadas a longo prazo (Mcalpine et al., 2012a, 2012b; Guggenbuhl et al., 2012; Zuo et al., 2015). Os benefícios da utilização de proteases ainda são conflitantes, do ponto de vista científico. Nery et al. (2000) observaram que a adição de 0,025% de protease em dieta a base de milho e farelo de soja de leitões, com média de 35 dias de idade, influenciou positivamente na conversão alimentar, sendo 6% melhor que a mesma dieta sem a inclusão da enzima. Eles atribuíram essa melhora ao melhor aproveitamento da proteína na formação tecidual dos leitões que foram suplementados pela protease. Já Barros et al. (2014), avaliaram a adição de 0,012% de proteases e proteases com amilase (0,012% e 0,06%, respectivamente), em dietas isonutritivas sobre a digestibilidade de nutrientes em dietas para leitões com 25 dias de idade, contendo milho duro. Estes autores concluíram que a adição de protease isolada ou combinada com amilase, não influenciou na digestibilidade dos nutrientes nas dietas para leitões.

Outro estudo conduzido por Tactacan et al. (2016), em que os autores avaliaram a digestibilidade e desempenho de leitões desmamados aos 28 dias de idade, com peso médio de 6.42 ± 0.12 kg, suplementados com protease até os 70 dias de idade, observaram que o uso da protease melhorou a digestibilidade aparente total da matéria seca em 3,45% em relação ao controle. Além disso, os animais chegaram aos 70 dias de idade com peso corporal 1,29kg superior.

Min et al. (2019) também demonstraram efeitos positivos na utilização de proteases, estes autores avaliaram o desempenho zootécnico, constituintes do sangue e características de carcaça de suínos em crescimento e terminação. Foram avaliadas duas dietas a base de milho e farelo de soja, uma dieta controle e outra com a adição de 0,01% de protease. Neste experimento foi observado uma melhora no ganho médio diário de peso (910,96 vs. 866,30 g), além de melhora na eficiência alimentar (0,363 vs. 0,345 g), mas sem alterações nos parâmetros sanguíneos, ou carcaça.

As proteases contribuem não apenas para melhorar a digestibilidade e desempenho dos suínos, seu uso também promove efeito positivo na redução de poluentes como a redução de nitrogênio presente nas fezes dos animais (Tactacan et. al, 2016).

De forma geral, os melhores resultados são encontrados quando se utiliza 200ppm de inclusão de protease (Zuo et al., 2015; Silva, 2013). Porém, na prática, há uma grande variação no que se refere à indicação dosagem que deve ser incluída na dieta, podendo chegar à 500ppm, de acordo com o fabricante da protease isolada ou blend.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Instalações e animais

Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais pertencente à ESALQ/USP (nº do protocolo 2018.5.1576.11.5).

Experimento I

O estudo de digestibilidade foi conduzido no galpão experimental do Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), localizado no município de Piracicaba, estado de São Paulo, Brasil.

Foram utilizados 90 suínos machos castrados, oriundos de cruzamento AGPIC 337 X Camborough (Agrocere PIC, Patos de Minas, MG, Brasil), com peso vivo inicial de $13,52 \pm 1,96$ kg, dividido em três grupos de 30. Os animais foram alojados individualmente em baias de 3 m², com piso parcialmente ripado, e equipadas com comedouro semiautomático e bebedouro do tipo chupeta. A temperatura ambiente foi monitorada com o auxílio de dois aparelhos do tipo Dataloggers NTC Testo 174H (Texto Inc, 2012, Alemanha), distribuídos dentro do galpão experimental.

Experimento II

O estudo de desempenho foi conduzido no galpão de creche do Centro de Pesquisas “Professor José Maria Lamas da Silva”, localizado no município de Patrocínio, estado de Minas Gerais, Brasil.

Foram utilizados 288 suínos, fêmeas e machos castrados, oriundos de cruzamento AGPIC 337 X Camborough (Agrocere PIC, Pastos de Minas – MG, Brasil), com média de 21 dias de idade e peso vivo inicial de $6,49 \pm 0,91$ kg, alojados em baias de 2,6m², com piso ripado. Foram alojados oito leitões por baia, e para o controle da temperatura, foi utilizado sistema de aquecimento a lenha com painel controlador de temperatura, bebedouro tipo chupeta convencional e comedouros lineares. A temperatura foi monitorada por software SITRAD versão 4.13 (Full Gauge Controls, Canoas, Brasil).

3.2. Dietas experimentais, análises laboratoriais e parâmetros avaliados

Experimento I

Foram utilizadas dez dietas (Tabela 1), que contiveram um dos ingredientes teste, milho e farelos de soja convencional (46% de proteína bruta) ou de alta proteína (48% de proteína bruta), como fonte única de proteína, com ou sem a adição das proteases, além de uma dieta isenta de proteína (DIP). As dietas foram formuladas para suprir as exigências nutricionais em minerais, vitaminas e energia dos suínos, conforme o NRC (2012). O milho foi incluído às dietas em 95,74% e os farelos de soja em 30%. Os tratamentos com milho foram formulados com 95,74% de milho para que se evidenciasse as proteínas presente neste ingrediente, isto é, para que existisse o máximo possível de substrato para ação das enzimas. Após a análise das dietas contendo milho, verificou-se 9,2% de proteína bruta, em média. A DIP foi composta principalmente por amido de milho e açúcar, e utilizada para determinação das perdas endógenas basais de aminoácidos. A protease 1 (P1), obtida por meio de *Bacillus licheniformis* PWD-1 e com atividade enzimática de 600.000 u/g, foi incluída às dietas em 0,05%; a protease 2 (P2), denominada como “protease ácida” por

ter maior eficiência em pH abaixo de 5, apresenta atividade enzimática de 50.000 u/g e foi adicionada em 0,01% às dietas. Óxido de cromo foi incluído em todas às dietas em 0,5%, como indicador indigestível.

Tabela 1. Composição centesimal de ingredientes das dietas experimentais contendo milho sem (SE) ou com protease 1 (P1) ou protease 2 (P2), farelo de soja com 46% de proteína bruta (PB) sem ou com P1 ou P2, farelo de soja com 48% de proteína bruta sem ou com P1 ou P2.

Ingredientes, kg/t	DIP	Milho			Farelo de soja 46% PB			Farelo de soja 48% PB		
		SE	P1	P2	SE	P1	P2	SE	P1	P2
Farelo de soja 46% PB	-	-	-	-	30,000	30,000	30,000	-	-	-
Farelo de soja 48%PB	-	-	-	-	-	-	-	30,000	30,000	30,000
Milho	-	95,740	95,740	95,740	-	-	-	-	-	-
Protease 1	-	-	0,050	-	-	0,050	-	-	0,050	-
Protease 2	-	-	-	0,010	-	-	0,010	-	-	0,010
Caulim	-	0,050	-	0,040	0,050	-	0,040	0,050	-	0,040
Carbonato de potássio	0,600	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Magnésio	0,120	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido	67,070	-	-	-	46,378	46,378	46,378	46,378	46,378	46,378
Açúcar	20,000	-	-	-	13,830	13,830	13,830	13,830	13,830	13,830
Lignocelulose	4,000	-	-	-	2,766	2,766	2,766	2,766	2,766	2,766
Óleo de soja degomado	4,000	-	-	-	2,766	2,766	2,766	2,766	2,766	2,766
Fosfato bicálcico	2,100	2,100	2,100	2,100	2,100	2,100	2,100	2,100	2,100	2,100
Sal comum	0,720	0,720	0,720	0,720	0,720	0,720	0,720	0,720	0,720	0,720
Calcário	0,600	0,600	0,600	0,600	0,600	0,600	0,600	0,600	0,600	0,600
Óxido de cromo	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
Colina	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Px mineral ¹	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Px vitamínico ²	0,090	0,090	0,090	0,090	0,090	0,090	0,090	0,090	0,090	0,090
Total, kg	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Nutrientes (calculado)										
Proteína bruta, %	0,268	7,233	7,233	7,233	13,953	13,953	13,953	14,96	14,96	14,96
Extrato etéreo, %	3,980	3,897	3,897	3,897	3,202	3,202	3,202	3,468	3,468	3,468

Fibra bruta, %	3,946	1,324	1,324	1,324	4,35	4,35	4,35	3,831	3,831	3,831
Matéria mineral, %	3,435	4,466	4,417	4,456	5,314	5,266	5,305	5,424	5,376	5,415
Cálcio total, %	0,792	0,794	0,794	0,794	0,879	0,879	0,879	0,884	0,884	0,884
Fósforo disp, %	0,426	0,465	0,465	0,465	0,483	0,483	0,483	0,499	0,499	0,499
Protease, U/g	-	-	300	10	-	300	10	-	300	10
Energia metabolizável, kcal/kg	3474,908	3238,071	3238,071	3238,071	3367,746	3367,746	3367,745	3281,925	3281,925	3281,924
Lisina, %	-	0,164	0,164	0,164	0,775	0,775	0,775	0,798	0,798	0,798
Metionina, %	-	0,128	0,128	0,128	0,171	0,171	0,171	0,177	0,177	0,177
Metionina + Cistina, %	-	0,261	0,261	0,261	0,352	0,352	0,352	0,375	0,375	0,375
Treonina, %	-	0,234	0,234	0,234	0,474	0,474	0,474	0,5	0,5	0,5
Triptofano, %	-	0,042	0,042	0,042	0,175	0,175	0,175	0,186	0,186	0,186

¹Agrocerec Multimix, Composição: Ferro 100,00 mg/kg, Manganês 60,00 mg/kg, Zinco 119,00 mg/kg, Cobre 15,00 mg/kg, Iodo 1,50 mg/kg, Selênio 0,63 mg/kg

²Agrocerec Multimix, Composição: Vit. A 9,90 UI/g, Vit. D3 3,15 UI/g, Vit. E 45,00 mg/kg, Vit. K 5,40 mg/kg, Vit. B1 4,50 mg/kg, Vit. B2 11,70, Vit. B6 6,30 mg/kg, Vit. B12 54,00 mcg/kg, Vit. B3 63,00 mg/kg, Vit. B5 36,00 mg/kg, Vit. B9 1,26 mg/kg, Vit. B7

As quantidades de ração oferecidas aos animais foram calculadas individualmente, considerando-se o peso vivo (PV) dos suínos no início do experimento, de modo a suprir em 2,8 vezes suas exigências diárias em energia digestível para manutenção (106 kcal energia digestível x kg PV^{0.75}), segundo o NRC (2012). As quantidades diárias de ração foram divididas em duas porções iguais, disponibilizadas para os animais às sete e às 16 horas, por um período de 50 minutos. A água foi fornecida *ad libitum* ao longo de todo o período experimental.

O período experimental teve a duração total de 12 dias, sendo sete para adaptação dos animais às dietas e instalações, seguidos por quatro dias para coleta parcial de fezes e um dia para coleta de digesta ileal, após sacrifício dos animais. Durante a coleta de fezes, os animais ficaram em observação das sete às 19 horas e as fezes foram recolhidas do piso das baias logo após a defecação, armazenadas em sacos plásticos e congeladas. Fezes que tenham se misturado a pelos, urina e restos de ração foram descartados. A coleta de digesta ileal foi efetuada de acordo com Donkoh et al (1994), sendo os animais sacrificados após aproximadamente 11 horas da última refeição, para que apresentassem digesta no íleo.

Os animais foram insensibilizados por eletronarcose (1,3A, à 240V, por 3 segundos) e sacrificados por sangria. Sequencialmente, efetuou-se incisão longitudinal ventral nos suínos para exposição do trato digestivo. A junção ileocecal foi identificada e a partir dela em direção ao jejuno, uma porção de aproximadamente um metro linear do íleo foi separada. Toda a digesta contida nesta fração do íleo foi coletada e armazenada em recipiente contendo solução de ácido fórmico (5%) e congelada.

Ao final do período de coleta, as amostras de fezes foram descongeladas, homogeneizadas por animal, subamostradas e secas a 55°C em estufa com circulação de ar forçada (modelo MA035, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) por 72 horas e, assim como as amostras de ingredientes e de ração, foram moídas em moinho de facas (modelo MA680, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) com peneira de 1mm. Sequencialmente, todas estas amostras foram submetidas às determinações de matéria seca (MS) [método 934.01 (AOAC, 2006)]; energia bruta (EB) por combustão em bomba calorimétrica adiabática (modelo 6400, Parr Instrument Company, Moline, IL, EUA); nitrogênio total [método 990.03 (AOAC, 2006)], para estimação do conteúdo de proteína bruta (PB); extrato etéreo (EE) [método 2003.06 (AOAC, 2006)]; fibra em detergente neutro (FDN) (Van Soest et al., 1991); e fibra em detergente ácido (FDA) [método 920.39 (AOAC, 1996)]. As amostras de digesta foram liofilizadas (modelo LH 0401, Terroni, São Carlos, SP, Brasil), moídas em moinho analítico (A11 Basic, IKA, Shanghai, China) à fração de 2 milímetros de diâmetro. Na sequência foram submetidas às determinações de MS e nitrogênio, como descrito para as demais amostras. Os ingredientes, rações e digestas foram analisados quanto aos seus conteúdos em aminoácidos (AA) [método 994.12 (AOAC, 2005)] como descrito por Gallardo et al. (2018). Nas amostras de ração, digesta e fezes foram efetuadas quantificações de cromo, após digestão em solução contendo ácidos nítrico e perclórico, e peróxido de hidrogênio (4:2:2 v/v) sob aquecimento em bloco digestor (modelo MA 850, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) e as leituras de cromo foram realizadas em espectrofotômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (modelo Optima 8300, Perkin Elmer, Shelton, CT, EUA). A pré secagem, e moagem das fezes foram realizadas no laboratório ESALQLAB, do Departamento de Zootecnia Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, Piracicaba, SP); as análises de MS, PB, EE, EB, FDN e FDA, foram realizadas no laboratório de bromatologia da Agrocerec Multimix, em Rio Claro, SP; as análises de aminograma foram realizadas no laboratório CBO, em Valinhos, SP.

Os coeficientes de digestibilidade da MS, AA, PB, EE e EB, das dietas experimentais foram calculados pelo método do indicador, utilizando-se a seguinte fórmula (Kong e Adeola, 2014):

Digestibilidade aparente ileal/total da dieta (%) = $100 - [100 \times ((\text{concentração do indicador na dieta} \times \text{concentração do componente na digesta/fezes}) / (\text{concentração do indicador na digesta/fezes} \times \text{concentração do componente na dieta}))]$.

As digestibilidades da MS, EE e EB dos farelos de soja foram calculados por diferença, utilizando-se os valores calculados das digestibilidades das dietas contendo os farelos de soja e da DIP, neste caso empregada como dieta referência, da seguinte forma (Kong e Adeola (2014)):

Digestibilidade aparente ileal/total do ingrediente (%) = $[\text{Digestibilidade aparente ileal/total da dieta referência} + ((\text{Digestibilidade aparente ileal/total da dieta teste} - \text{Digestibilidade aparente ileal/total da dieta referência}) / (\text{g alimento} / \text{g ração}))]$.

A DIP foi utilizada também para determinação das perdas endógenas basais (Pbe) de AA e PB e cálculo das digestibilidades ileais standardizadas (DIE) dos AA e da PB, conforme segue (Stein et al., 2007):

$\text{Pbe (g/kg MS)} = [\text{aminoácido/proteína na digesta} \times (\text{indicador na dieta} / \text{indicador na digesta})]$; $\text{DIE (\%)} = [(\text{Digestibilidade ileal aparente} + (\text{Pbe de AA} / \text{AA na dieta})) \times 100]$.

Experimento II

Foi avaliado o desempenho zootécnico de leitões nas fases pré-inicial e inicial, alimentados com dietas com diferentes inclusões de farelo de soja convencional (46% de PB), baixa (15 a 26%) ou alta (22 a 35%), com ou sem adição de proteases nas dietas de alta inclusão de farelo de soja com ou sem a suplementação de diferentes proteases (Tabela 2). As enzimas utilizadas foram as mesmas descritas no experimento I (P1 e P2) e nas mesmas concentrações (0,05 e 0,01%, respectivamente). As dietas foram formuladas para atender ou exceder as recomendações nutricionais para suínos de acordo com NRC (2012). O plano nutricional dos animais foi dividido em três fases: Pré-inicial (de 21 a 35 dias de idade), inicial 1 (de 36 a 49 dias de idade) e inicial 2 (de 50 a 70 dias de idade).

Para o cálculo do ganho de peso acumulado e do ganho diário de peso, os animais foram pesados individualmente no início do experimento e ao final de cada fase. O ganho de peso total da baía foi dividido pelo número de animais e dias da fase para o cálculo. A conversão alimentar foi calculada pela razão entre o consumo diário de ração e o ganho diário de peso de cada unidade experimental. A incidência de diarreia foi avaliada diariamente por um único observador pela manhã, e à tarde (8h e 15h), atribuindo os seguintes escores: fezes normais (0), fezes pastosas (1), fezes líquidas (2) e fezes hemorrágicas (3).

Diariamente foi observado a ocorrência de sobras de ração no chão das baias, bem como se os animais urinaram ou defecaram sobre a ração dentro do comedouro. Quando confirmado a ocorrência, as rações no chão das baias foram recolhidas e pesadas para serem consideradas como sobra no cálculo de consumo de ração dos animais. Ração molhada por urina ou fezes foi retirada do comedouro, colocadas para secar e pesadas como sobra para descontar da ração fornecida aos animais.

Tabela 2. Composição centesimal de ingredientes das dietas experimentais contendo baixa ou alta inclusão de farelo de soja

Ingredientes, kg/t	Pré inicial		Inicial 1		Inicial 2	
	BFS ¹	AFS ²	BFS	AFS	BFS	AFS
Milho	46,3392	40,1436	58,1007	50,6447	67,1054	59,0583
Farelo de soja	15	22	22	30	26	35
Soro de leite em pó	17,5	17,5	8,9333	8,9333		
Leite em Pó Integral	6,8	6,7				
Farinha de peixe	5,45	5,45				
Açúcar	5	5	3	3		
Óleo de soja degomado	1	1	3,139	3,3304	2,665	2,6713
Fosfato bicálcico	0,13	0,12	1,2523	1,1395	1,2184	1,1
Calcário	0,2626	0,2141	0,9707	0,98	0,8916	0,7647
Sal	0,4645	0,4551	0,7499	0,7376	0,6932	0,6264
DL-Metionina	0,2969	0,2259	0,2874	0,2117	0,1813	0,1217
L-Lisina	0,7422	0,5186	0,7072	0,4615	0,6501	0,3725
L-Treonina	0,3221	0,219	0,2743	0,1616	0,2324	0,1048
L-Triptofano	0,1379	0,0487	0,0767	0,0282	0,0569	0,0023
L-Valina	0,249	0,0994	0,2029	0,0661	0,1276	
Antioxidante	0,0856	0,0856	0,0856	0,0856	0,008	0,008
Halquinol	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Px vitamínico mineral ³	0,2	0,2	0,2	0,2	0,15	0,15
Total, kg	100	100	100	100	100	100
Nutrientes (calculado)						
Proteína Bruta, %	18,962	21,2852	17,5303	20,2643	18,8806	22,0185
Extrato Etéreo, %	5,2166	5,0824	5,627	5,6796	5,3821	5,2452
Fibra Bruta, %	1,5941	1,7435	2,0221	2,1857	2,3401	2,5309
Materia Mineral, %	4,0404	3,9678	3,4522	3,3479	2,7041	2,406
Cálcio total, %	0,85	0,85	0,85	0,85	0,75	0,7
Fósforo Total, %	0,6386	0,6695	0,6233	0,6379	0,6057	0,6248
Fósforo Disponível, %	0,49	0,5074	0,425	0,425	0,375	0,3769
Energia metabolizável, kcal/kg	3507,396	3494,079	3450	3450	3419,052	3414,831
Lisina Dig. Suínos, %	1,508	1,5	1,35	1,35	1,328	1,3278
Metionina Dig. Suínos, %	0,5837	0,5452	0,5124	0,4738	0,4342	0,4166
Met + Cis Dig. Suínos, %	0,8294	0,825	0,7425	0,7425	0,7038	0,7303
Treonina Dig. Suínos, %	0,8897	0,885	0,7965	0,7965	0,7835	0,7834
Triptofano Dig Suínos, %	0,3016	0,255	0,22	0,22	0,2125	0,2124

¹BFS: Baixo farelo de soja; ²AFS: Alto farelo de soja; ³Agrocerec Multimix, Composição: Ácido Pantotênico 13.750 mg/kg, Ácido Fólico 825,00mg/kg, Biotina 110,00 mg/kg, Cobre 11.000,00 mg/kg, Ferro 55.000,00 mg/kg, Iodo 150,00 mg/kg, Manganês 16.500,00 mg/kg, Niacina 41.250,00 mg/kg, Selênio 150,00 mg/kg, Vit. A 4.400,00 UI/kg, Vit. B2 4.125,00 mg/kg, Vit. B6 1.100,00 UI/kg, Vit. B12 19.250,00 mcg/kg, Vit. D3 1.100,00 UI/kg, Vit. E 33.000,00 UI/kg, Vit. K 2.200,00 mg/kg, Zinco 55.000,00 mg/kg.

3.3. Análise Estatística e delineamento experimental

Em ambos os experimentos os animais foram distribuídos em delineamento em blocos casualizados em função do peso vivo inicial. Efetuou-se verificações quanto a presença de dados discrepantes, distribuição normal dos erros, e homogeneidade das variâncias.

Experimento I

Satisfeitas as pressuposições, os tratamentos com milho foram analisados separadamente dos tratamentos com farelo de soja. Para os tratamentos com milho efetuou-se apenas Análise de Variância (ANOVA), já para os tratamentos com farelo de soja, foi considerado um esquema fatorial 2x3, sendo os fatores os farelos de soja (alta e baixa proteína) x tipo de protease (SE, P1 e P2), os dados foram submetidos a Análise da Variância (ANOVA), sendo que para a comparação das médias, quando identificadas diferenças significativas, foi aplicado o teste de Tukey ao nível de significância de 5%. O animal foi considerado a unidade experimental.

Experimento II

No teste de desempenho zootécnico, a unidade experimental foi a baía com oito animais. Os resultados foram submetidos a Análise da Variância (ANOVA) e quando identificadas diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Todos os dados foram analisados no Software R (R Core Team, 2020).

4. RESULTADOS

Experimento I

As concentrações de proteína bruta na matéria seca do milho, FS46% e FS48% (Tabela 3) foram 9,2%, 50,2% e 55%, respectivamente. Quanto aos totais de aminoácidos na matéria seca do milho, FS46% e FS48%, os valores foram 9,58%, 47,81%, 52,51%, respectivamente.

Tabela 3. Composição analisada de nutrientes (expressos na matéria seca) do milho, farelo de soja com 46% de proteína bruta (PB) e farelo de soja com 48% de PB.

	Milho	Farelo de soja 46% PB	Farelo de soja 48% PB
Umidade, %	11,61	10,94	10,49
Proteína bruta, %	9,2	50,2	55
Energia bruta, kcal/kg	4574,29	4720,04	4746,83
Extrato etéreo, %	6,11	3,12	2,83
FDN ¹ , %	12,8	12,7	9,1
FDA ² , %	2,87	7,22	4,12
AA essenciais, %			
Arginina	0,46	3,59	3,85
Histidina	0,26	1,27	1,44
Isoleucina	0,37	2,27	2,61
Leucina	1,3	3,87	4,18
Lisina	0,27	3,23	3,51
Metionina	0,19	0,45	0,6
Fenilalanina	0,49	2,59	2,76
Treonina	0,37	2	2,13
Triptofano	0,09	0,73	0,74
Valina	0,48	2,44	2,67
AA não-essenciais, %			
Alanina	0,71	2,23	2,47
Asparagina	0,63	5,56	6,22
Cistina	0,15	0,85	0,66
Glutamina	1,86	8,66	9,82
Glicina	0,33	2,09	2,28
Prolina	0,87	2,49	2,69
Serina	0,44	2,43	2,67
Tirosina	0,38	1,79	1,93
Total AA	9,58	47,81	52,51

¹FDN = Fibra em detergente neutro; ²FDA=Fibra em detergente ácido

As dietas experimentais contendo milho apresentaram de 10,8 a 11,4 % de PB, 8,29 a 9,0% de aminoácidos totais, de 4,28 a 4,29 Mcal de energia bruta (EB)/kg, de 3,44 a 3,72% de extrato etéreo (EE), de 8 a 8,9 % de fibra em detergente neutro (FDN) e de 1,64 a 2,26% de fibra em detergente ácido (FDA). Nas dietas com os farelos de soja foram observados os teores de 13,6 a 18,0 % de PB, 12,2 a 15,7% de aminoácidos totais, 4,24 a 4,31 Mcal de EB/kg,

3,50 a 4,83% de EE, 5,28 a 7,40% de FDN e 3,00 a 4,26% de FDA, sendo todos os valores expressos em base seca (Tabela 4).

Tabela 4. Composição química analisada (valores expressos na matéria seca) das dietas experimentais contendo milho, farelos de soja com 46% e com 48% de proteína bruta (PB), sem enzima (SE) ou suplementadas com dois tipos de proteases (P1 e P2) e da dieta isenta de proteína (DIP).

Itens	DIP	Dietas								
		Milho			Farelo de soja 46% PB			Farelo de soja 48% PB		
		SE	P1	P2	SE	P1	P2	SE	P1	P2
Umidade, %	8,61	10,8	11,4	11,1	9,00	8,70	8,90	8,70	8,30	8,30
Proteína bruta, %	0,82	9,00	9,20	9,30	15,8	15,8	13,6	16,0	18,0	15,9
Energia bruta, Mcal/kg	4,27	4,29	4,29	4,28	4,26	4,24	4,27	4,31	4,26	4,25
Extrato etéreo, %	4,25	3,71	3,44	4,42	3,50	3,51	3,99	4,83	4,31	4,00
FDN ¹ , %	3,21	8,90	8,90	8,00	6,60	7,40	6,20	5,28	5,90	5,44
FDA ² , %	1,64	1,91	2,26	1,64	4,26	4,31	3,64	3,00	3,38	3,05
Aminoácidos essenciais, %										
Arginina	0,02	0,46	0,45	0,45	1,00	0,90	0,78	1,07	1,08	1,12
Histidina	0,02	0,28	0,27	0,26	0,36	0,33	0,42	0,38	0,36	0,37
Isoleucina	0,02	0,34	0,34	0,33	0,66	0,61	0,78	0,74	0,75	0,74
Leucina	0,04	1,12	1,15	1,10	1,14	1,06	1,30	1,20	1,23	1,28
Lisina	0,09	0,27	0,27	0,24	0,78	0,79	0,99	0,94	0,95	0,93
Metionina	0,02	0,21	0,18	0,18	0,21	0,19	0,25	0,23	0,24	0,26
Fenilalanina	0,04	0,45	0,43	0,41	0,68	0,66	0,80	0,77	0,77	0,80
Treonina	-	0,36	0,35	0,34	0,59	0,56	0,68	0,65	0,65	0,59
Triptofano	0,03	0,04	0,03	0,03	0,18	0,11	0,10	0,16	0,15	0,13
Valina	0,02	0,44	0,45	0,44	0,69	0,64	0,8	0,74	0,74	0,76
Aminoácidos não-essenciais, %										
Alanina	0,02	0,65	0,64	0,64	0,63	0,57	0,74	0,66	0,66	0,77
Asparagina	0,03	0,57	0,52	0,461	1,52	1,31	1,76	1,72	1,56	1,71
Cistina	0,10	0,18	0,15	0,12	0,22	0,20	0,31	0,28	0,32	0,4
Glutamina	0,04	1,67	1,59	1,56	2,41	2,18	2,85	2,60	2,63	2,51
Glicina	-	0,35	0,33	0,33	0,58	0,54	0,68	0,61	0,61	0,67
Prolina	0,02	0,87	0,81	0,81	0,70	0,64	0,82	0,74	0,75	0,83
Serina	-	0,43	0,39	0,39	0,66	0,59	0,76	0,68	0,69	0,74
Tirosina	0,02	0,36	0,34	0,34	0,49	0,45	0,59	0,55	0,54	0,59
Total AA	0,54	9,00	8,67	8,39	13,32	12,2	15,67	14,57	14,54	15,08

¹FDN = Fibra em detergente neutro; ²FDA=Fibra em detergente ácido.

As proteases P1 ou P2 não afetaram ($P>0,05$) as digestibilidades da MS, PB e energia do milho. De modo similar, não houve efeito ($P>0,05$) das enzimas sobre as digestibilidades ileais, aparente e estandarizada, para nenhum dos parâmetros estudados no milho (Tabela 5 e 6). Conseqüentemente, este mesmo comportamento foi observado nos teores de nutrientes digestíveis do milho, quando suplementado com as diferentes proteases (Tabelas 7 e 8).

Tabela 5. Digestibilidades ileais aparentes (DIA) da matéria seca (MS) e dos aminoácidos, e total aparente (DTA) da MS, proteína bruta (PB) e energia bruta (EB) do milho, sem enzima (SE) ou suplementado com dois tipos de protease (P1 e P2), para leitões com $13,52 \pm 1,96$ kg.

Itens	Dietas			EPM ⁴	Valores de P
	SE ¹	P1 ²	P2 ³		
DIA MS, %	74,44	76,81	79,36	1,42	0,374
DTA MS, %	92,76	91,52	92,66	0,13	0,793
DTA PB, %	83,37	84,25	85,50	0,67	0,444
DTA EB, %	92,27	92,03	92,88	8,55	0,425
<i>Digestibilidades ileais aparentes, %</i>					
Aminoácidos essenciais					
Treonina	56,23	59,67	61,26	2,18	0,637
Valina	65,33	70,84	74,69	1,99	0,140
Metionina	76,33	74,00	82,13	1,65	0,116
Isoleucina	65,28	70,34	73,72	2,00	0,212
Leucina	74,82	79,12	82,89	1,62	0,113
Fenilalanina	71,26	73,85	76,58	1,72	0,448
Lisina	50,11	53,66	53,45	2,54	0,838
Histidina	71,95	73,67	76,54	1,60	0,493
Arginina	68,22	73,06	77,70	1,86	0,086
Triptofano	39,51	22,74	39,98	5,03	0,353
Aminoácidos não-essenciais					
Asparagina	64,08	69,59	67,03	2,48	0,697
Serina	60,70	62,92	69,20	1,97	0,179
Glutamina	75,97	78,79	83,40	1,54	0,124
Prolina	64,22	66,82	69,12	1,82	0,548
Glicina	33,24	39,15	41,80	3,46	0,596
Alanina	70,31	74,18	77,33	1,74	0,249
Cistina	60,57	53,97	59,10	2,76	0,626
Tirosina	66,65	69,19	73,62	1,91	0,312

¹SE: Dieta contendo milho sem adição de proteases; ²P1: Dieta contendo milho com adição da Protease 1; ³P2: Dieta contendo milho com adição da Protease 2; ⁴EPM: Erro padrão da média.

Tabela 6. Digestibilidades ileais estandardizadas (DIE) dos aminoácidos do milho, sem enzima (SE) ou suplementado com dois tipos de protease (P1 e P2), para leitões com $13,52 \pm 1,96$ kg.

Itens	Dietas			EPM ⁴	Valores de P
	SE ¹	P1 ²	P2 ³		
<i>Digestibilidades ileais estandardizadas, %</i>					
Aminoácidos essenciais					
Treonina	66,76	69,90	71,86	2,18	0,635
Valina	71,50	76,82	80,84	1,99	0,142
Metionina	80,08	78,42	86,57	1,66	0,102
Isoleucina	71,49	76,51	80,12	2,01	0,199
Leucina	78,52	82,72	86,66	1,62	0,109
Fenilalanina	76,26	79,08	82,12	1,73	0,380
Lisina	62,67	57,99	67,75	2,67	0,329
Histidina	76,59	78,48	72,58	1,61	0,438
Arginina	76,18	81,17	85,83	1,87	0,080
Triptofano	70,99	61,23	77,21	4,89	0,435
Aminoácidos não-essenciais					
Asparagina	69,34	75,39	73,55	2,49	0,630
Serina	70,23	73,20	79,51	1,99	0,140
Glutamina	79,23	81,06	86,88	1,55	0,098
Prolina	87,15	95,34	93,87	1,93	0,194
Glicina	59,10	66,61	69,35	3,51	0,476
Alanina	75,16	79,08	82,24	1,75	0,243
Cistina	68,22	63,33	70,19	2,76	0,603
Tirosina	73,21	76,14	80,60	1,93	0,277

¹SE: Dieta contendo milho sem adição de proteases; ²P1: Dieta contendo milho com adição da Protease 1; ³P2: Dieta contendo milho com adição da Protease 2; ⁴EPM: Erro padrão da média.

Tabela 7. Teores de aminoácidos digestíveis ileais aparentes na matéria seca do milho, sem enzima (SE) ou suplementado com dois tipos de protease (P1 e P2), para leitões com $13,52 \pm 1,96$ kg.

Itens	Diets			EPM ⁴	Valores de P
	SE ¹	P1 ²	P2 ³		
<i>Aminoácidos digestíveis ileais aparentes, %</i>					
Aminoácidos essenciais					
Treonina	0,210	0,223	0,229	0,008	0,637
Valina	0,310	0,337	0,355	0,009	0,140
Metionina	0,147	0,142	0,158	0,003	0,116
Isoleucina	0,244	0,263	0,275	0,007	0,212
Leucina	0,973	1,029	1,078	0,021	0,113
Fenilalanina	0,347	0,359	0,373	0,008	0,448
Lisina	0,136	0,146	0,145	0,007	0,838
Histidina	0,187	0,192	0,199	0,004	0,493
Arginina	0,316	0,339	0,360	0,009	0,086
Triptofano	0,041	0,020	0,033	0,005	0,226
Aminoácidos não-essenciais					
Asparagina	0,406	0,441	0,425	0,016	0,697
Serina	0,268	0,278	0,305	0,009	0,179
Glutamina	1,409	1,462	1,547	0,028	0,124
Prolina	0,559	0,582	0,602	0,016	0,548
Glicina	0,109	0,128	0,137	0,011	0,596
Alanina	0,501	0,529	0,551	0,012	0,249
Cistina	0,089	0,079	0,087	0,004	0,626
Tirosina	0,256	0,266	0,283	0,007	0,312

¹SE: Dieta contendo milho sem adição de proteases; ²P1: Dieta contendo milho com adição da Protease 1; ³P2: Dieta contendo milho com adição da Protease 2; ⁴EPM: Erro padrão da média.

Tabela 8. Teores de aminoácidos digestíveis ileais estandardizados na matéria seca do milho, sem enzima (SE) ou suplementado com dois tipos de protease (P1 e P2), para leitões com $13,52 \pm 1,96$ kg.

Itens	Dietas			EPM ⁴	Valores de P
	SE ¹	P1 ²	P2 ³		
<i>Aminoácidos digestíveis ileais estandardizados, %</i>					
Aminoácidos essenciais					
Treonina	0,249	0,261	0,268	0,008	0,635
Valina	0,340	0,365	0,384	0,009	0,142
Metionina	0,154	0,151	0,166	0,003	0,102
Isoleucina	0,267	0,286	0,299	0,007	0,199
Leucina	1,022	1,076	1,127	0,021	0,109
Fenilalanina	0,371	0,385	0,399	0,008	0,380
Lisina	0,170	0,157	0,194	0,007	0,329
Histidina	0,199	0,204	0,212	0,004	0,438
Arginina	0,353	0,376	0,398	0,009	0,080
Triptofano	0,069	0,054	0,068	0,005	0,357
Aminoácidos não-essenciais					
Asparagina	0,439	0,478	0,466	0,016	0,630
Serina	0,310	0,323	0,351	0,009	0,140
Glutamina	1,470	1,504	1,612	0,029	0,098
Prolina	0,759	0,830	0,818	0,017	0,194
Glicina	0,194	0,219	0,228	0,012	0,476
Alanina	0,536	0,564	0,586	0,012	0,243
Cistina	0,100	0,093	0,103	0,004	0,603
Tirosina	0,282	0,293	0,310	0,007	0,277

¹SE: Dieta contendo milho sem adição de proteases; ²P1: Dieta contendo milho com adição da Protease 1; ³P2: Dieta contendo milho com adição da Protease 2; ⁴EPM: Erro padrão da média.

Na avaliação das digestibilidades dos farelos de soja (Tabela 9), houve interação ($P < 0,05$) entre os fatores em estudo para as digestibilidades totais aparentes da matéria seca e da energia bruta. O FS48% sem enzimas apresentou as digestibilidades totais aparentes da MS e da EB superiores ($P < 0,05$) às dos FS48% com P1 e com P2, que não diferiram ($P > 0,05$) e que foram maiores ($P < 0,05$) do que as verificadas nos FS46%, com ou sem as proteases, e estas similares entre si ($P > 0,05$).

Com relação ao fator ingrediente, verificou-se que as digestibilidades, total aparente da PB, ileal aparente da prolina e cistina e ileal estandardizada da prolina do FS48% foram superiores ($P < 0,05$) as do FS46%. De modo similar, com exceção do triptofano e da cistina, os teores digestíveis, aparentes e estandardizados, de todos os demais AA foram maiores ($P < 0,05$) no FS48% do que no FS46%.

Nas tabelas 9 e 10, observa-se que a utilização da P2 aumentou ($P < 0,05$) as DIA e DIE da metionina, fenilalanina, lisina e glutamina, a DIA da arginina e a DIE da leucina, alanina e cistina em relação aos farelos de soja com a P1 ou sem protease. Adicionalmente, as DIA e DIE da isoleucina, histidina, asparagina e serina, a DIA da leucina e a DIE da arginina dos ingredientes com a P2 foram maiores do que as verificadas com o uso da P1, porém não diferiram ($P > 0,05$) das verificadas nos ingredientes sem as enzimas.

Tabela 9. Digestibilidades ileais aparentes (DIA) da matéria seca (MS) e dos aminoácidos, e totais aparentes (DTA) da MS, proteína bruta (PB) e energia bruta de dietas com farelos de soja com 46 % e 48 % de PB, sem enzima (SE) ou suplementadas com dois tipos de proteases (P1 e P2), para leitões com $13,52 \pm 1,96$ kg.

Itens	Dietas						EPM ¹	Valores de P		
	Farelo de soja 46% PB			Farelo de soja 48% PB				ING ²	ENZ ³	I x E ⁴
	SE	P1	P2	SE	P1	P2				
DIA MS, %	83,01	79,44	82,36	83,46	81,69	84,81	0,83	0,430	0,358	0,859
DTTA MS, %	93,43 ^c	93,39 ^c	93,58 ^c	94,65 ^a	93,95 ^b	93,84 ^b	0,09	<0,001	0,085	0,042
DTTA PB, %	91,31	91,55	91,00	92,97	92,89	91,83	0,18	<0,001	0,063	0,526
DTTA EB, %	92,94 ^c	90,44 ^c	93,63 ^c	95,07 ^a	94,22 ^b	94,10 ^b	6,57	<0,001	0,056	0,005
<i>Digestibilidades Ileais Aparentes, %</i>										
Aminoácidos essenciais										
Treonina	71,85	64,50	81,02	75,00	76,76	73,45	1,66	0,647	0,356	0,065
Valina	78,33 ^{ab}	71,40 ^b	84,02 ^a	78,50 ^{ab}	78,85 ^b	84,68 ^a	1,33	0,546	0,027	0,485
Metionina	82,32 ^b	78,51 ^b	89,25 ^a	84,95 ^b	85,80 ^b	92,34 ^a	1,10	0,088	0,002	0,610
Isoleucina	81,13 ^{ab}	75,60 ^b	86,18 ^a	82,35 ^{ab}	82,55 ^b	87,74 ^a	1,13	0,300	0,023	0,527
Leucina	80,08 ^{ab}	74,27 ^b	84,25 ^a	80,22 ^{ab}	81,06 ^b	86,68 ^a	1,16	0,345	0,030	0,504
Fenilalanina	80,39 ^b	76,14 ^b	87,05 ^a	81,89 ^b	82,44 ^b	88,21 ^a	1,12	0,286	0,008	0,578
Lisina	71,83 ^b	71,30 ^{ab}	84,36 ^a	76,96 ^b	79,40 ^{ab}	86,36 ^a	1,69	0,183	0,012	0,757
Histidina	79,29 ^{ab}	73,14 ^b	86,34 ^a	80,70 ^{ab}	79,54 ^b	85,51 ^a	1,32	0,576	0,021	0,535
Arginina	83,39 ^b	80,87 ^b	89,87 ^a	84,94 ^b	84,00 ^b	91,23 ^a	1,13	0,551	0,012	0,942
Triptofano	84,04	64,79	77,10	73,90	74,85	74,85	1,89	0,823	0,431	0,205
Aminoácidos não-essenciais										
Asparagina	78,25 ^{ab}	73,48 ^b	86,71 ^a	82,16 ^{ab}	80,37 ^b	87,11 ^a	1,35	0,301	0,011	0,608
Serina	72,49 ^{ab}	63,28 ^b	83,81 ^a	74,66 ^{ab}	76,58 ^b	79,40 ^a	1,68	0,362	0,024	0,093
Glutamina	78,53 ^b	79,73 ^{ab}	87,82 ^a	81,75 ^b	83,81 ^{ab}	89,24 ^a	1,33	0,365	0,021	0,919
Prolina	69,22	59,82	70,28	74,80	72,67	84,67	1,94	0,015	0,090	0,533
Glicina	50,80	22,85	57,01	54,13	63,39	61,72	3,26	0,075	0,193	0,059
Alanina	74,21 ^b	66,32 ^b	83,81 ^a	74,56 ^b	76,73 ^b	83,41 ^a	1,53	0,420	0,004	0,266
Cistina	65,96 ^b	61,93 ^b	83,94 ^a	74,89 ^b	77,49 ^b	87,03 ^a	1,90	0,019	<0,001	0,298
Tirosina	78,58 ^{ab}	73,81 ^b	84,56 ^a	82,10 ^{ab}	81,71 ^b	85,93 ^a	1,10	0,115	0,028	0,481

^{ab}Médias seguidas por letras diferentes nas linhas diferem ($P < 0,05$) entre si pelo teste de Tukey. ¹EPM: Erro padrão da média; ²ING: Fator ingrediente; ³ENZ: Fator enzima; ⁴I x E: Interação entre os fatores enzima e ingrediente.

Tabela 10. Digestibilidades ileais estandardizadas (DIE) dos aminoácidos dos farelos de soja com 46 % e 48 % de proteína bruta (PB), sem enzima (SE) ou suplementados com dois tipos de protease (P1 e P2), para leitões com 13,52 ± 1,96 kg.

Itens	Diets						EPM ¹	Valores de P		
	Farelo de soja 46% PB			Farelo de soja 48% PB				ING ²	ENZ ³	I x E ⁴
	SE	P1	P2	SE	P1	P2				
<i>Digestibilidades ileais estandardizadas, %</i>										
Aminoácidos essenciais										
Treonina	77,88	70,90	86,28	80,53	82,23	79,53	1,64	0,676	0,382	0,102
Valina	82,23 ^{ab}	76,65 ^b	87,39 ^a	82,13 ^{ab}	82,50 ^b	88,22 ^a	1,31	0,590	0,039	0,534
Metionina	86,15 ^b	82,81 ^b	92,42 ^a	88,43 ^b	89,14 ^b	95,29 ^a	1,07	0,128	0,005	0,701
Isoleucina	84,29 ^{ab}	79,00 ^b	88,86 ^a	85,15 ^{ab}	85,33 ^b	90,55 ^a	1,12	0,351	0,031	0,581
Leucina	83,71 ^b	78,18 ^b	89,34 ^a	83,67 ^b	86,75 ^b	89,93 ^a	1,15	0,384	0,020	0,542
Fenilalanina	83,69 ^b	79,55 ^b	89,85 ^a	84,82 ^b	85,34 ^b	91,02 ^a	1,11	0,345	0,012	0,621
Lisina	76,17 ^b	75,58 ^{ab}	87,78 ^a	80,55 ^b	82,97 ^{ab}	90,01 ^a	1,67	0,226	0,016	0,820
Histidina	82,88 ^{ab}	77,10 ^b	89,46 ^a	84,10 ^{ab}	83,16 ^b	89,02 ^a	1,30	0,576	0,028	0,595
Arginina	87,05 ^{ab}	84,94 ^b	93,08 ^a	88,35 ^{ab}	87,39 ^b	94,48 ^a	1,12	0,624	0,019	0,974
Triptofano	90,73	75,82	89,10	81,39	83,07	83,79	1,90	0,345	0,398	0,295
Aminoácidos não-essenciais										
Asparagina	80,24 ^{ab}	75,76 ^b	88,42 ^a	83,91 ^{ab}	82,30 ^b	88,87 ^a	1,34	0,325	0,015	0,646
Serina	78,65 ^{ab}	70,15 ^b	89,17 ^a	80,64 ^{ab}	82,49 ^b	84,87 ^a	1,64	0,411	0,042	0,121
Glutamina	80,80 ^b	82,23 ^{ab}	89,73 ^a	83,85 ^b	85,88 ^{ab}	91,42 ^a	1,32	0,378	0,024	0,954
Prolina	97,74	91,39	94,62	101,7	99,33	108,8	1,82	0,036	0,439	0,476
Glicina	66,24	39,59	70,22	68,78	78,11	75,23	3,20	0,086	0,312	0,075
Alanina	79,24 ^b	71,85 ^b	88,10 ^a	79,36 ^b	81,47 ^b	87,47 ^a	1,50	0,494	0,009	0,304
Cistina	72,21 ^b	68,90 ^b	88,41 ^a	79,71 ^b	81,83 ^b	90,43 ^a	1,80	0,057	<0,001	0,391
Tirosina	83,35	78,82	88,53	86,40	86,03	89,93	1,07	0,150	0,051	0,554

^{ab}Médias seguidas por letras diferentes nas linhas diferem (P<0,05) entre si pelo teste de Tukey. ¹EPM: Erro padrão da média; ²ING: Fator ingrediente; ³ENZ: Fator enzima; ⁴I X E: Interação entre os fatores enzima e ingrediente.

Nas tabelas 11 e 12, verifica-se que os teores digestíveis ileais, aparentes e estandardizados, da metionina, isoleucina, fenilalanina, lisina, arginina, serina, glutamina, alanina, cistina e tirosina foram maiores (P<0,05) nos farelos de soja com adição da P2 do que com adição da P1 ou sem adição das proteases. O emprego da P2 não alterou (P>0,05) os teores digestíveis da valina, histidina e asparagina em relação aos farelos de soja sem as enzimas, no entanto foram superiores (P<0,05) aos verificados nos ingredientes que tiveram adição da P1.

Tabela 11. Teores de aminoácidos digestíveis ileais aparentes na matéria seca dos farelos de soja com 46 % e 48 % de proteína bruta (PB), sem enzima (SE) ou suplementados com dois tipos de protease (P1 e P2), para leitões com $13,52 \pm 1,96$ kg.

Itens	Ingredientes						EPM ¹	Valores de P		
	Farelo de soja 46% PB			Farelo de soja 48% PB				ING ²	ENZ ³	I x E ⁴
	SEM	P1	P2	SE	P1	P2				
<i>Aminoácidos digestíveis ileais aparentes, %</i>										
Aminoácidos essenciais										
Treonina	1,436	1,289	1,619	1,600	1,638	1,567	0,036	0,057	0,397	0,075
Valina	1,908 ^{ab}	1,740 ^b	2,099 ^a	2,096 ^{ab}	2,105 ^b	2,261 ^a	0,037	0,002	0,012	0,424
Metionina	0,370 ^b	0,353 ^{ab}	0,401 ^a	0,513 ^b	0,518 ^{ab}	0,557 ^a	0,012	<0,001	0,002	0,677
Isoleucina	1,840 ^b	1,715 ^b	1,998 ^a	2,153 ^b	2,158 ^b	2,294 ^a	0,037	<0,001	0,009	0,487
Leucina	3,102 ^b	2,877 ^b	3,337 ^a	3,352 ^b	3,387 ^b	3,621 ^a	0,052	<0,001	0,011	0,468
Fenilalanina	2,085 ^b	1,975 ^b	2,258 ^a	2,260 ^b	2,275 ^b	2,434 ^a	0,033	0,001	0,009	0,621
Lisina	2,323 ^b	2,306 ^{ab}	2,728 ^a	2,700 ^b	2,785 ^{ab}	3,030 ^a	0,062	0,002	0,013	0,813
Histidina	1,037 ^{ab}	0,928 ^b	1,096 ^a	1,197 ^{ab}	1,191 ^b	1,279 ^a	0,021	<0,001	0,003	0,278
Arginina	2,300 ^b	2,955 ^{ab}	3,229 ^a	3,274 ^b	3,426 ^{ab}	3,558 ^a	0,046	<0,001	0,013	0,589
Triptofano	0,615	0,474	0,564	0,550	0,557	0,557	0,014	0,892	0,441	0,213
Aminoácidos não-essenciais										
Asparagina	4,498 ^{ab}	4,084 ^b	4,819 ^a	5,113 ^{ab}	5,001 ^b	5,420 ^a	0,088	<0,001	0,012	0,631
Serina	1,758 ^b	1,535 ^b	1,997 ^a	1,993 ^b	2,045 ^b	2,191 ^a	0,046	<0,001	0,010	0,234
Glutamina	6,799 ^b	6,902 ^{ab}	7,602 ^a	8,028 ^b	8,229 ^{ab}	8,763 ^a	0,151	<0,001	0,024	0,966
Prolina	1,725	1,491	1,752	2,014	1,956	2,279	0,055	<0,001	0,081	0,508
Glicina	1,061	0,448	1,191	1,234	1,445	1,407	0,073	0,012	0,216	0,065
Alanina	1,658 ^b	1,482 ^b	1,873 ^a	1,841 ^b	1,894 ^b	2,059 ^a	0,040	<0,001	0,005	0,324
Cistina	0,563 ^b	0,529 ^b	0,716 ^a	0,494 ^b	0,511 ^b	0,574 ^a	0,016	<0,001	<0,001	0,120
Tirosina	1,358 ^b	1,220 ^b	1,510 ^a	1,539 ^b	1,528 ^b	1,669 ^a	0,030	<0,001	0,006	0,551

^{ab}Médias seguidas por letras diferentes nas linhas diferem ($P < 0,05$) entre si pelo teste de Tukey. ¹EPM: Erro padrão da média; ²ING: Fator ingrediente; ³ENZ: Fator enzima; ⁴I x E: Interação entre os fatores enzima e ingrediente.

Tabela 12. Teores de aminoácidos digestíveis ileais estandardizados na matéria seca dos farelos de soja com 46 % (FS 46%) e 48 % (FS 48%) de PB, sem enzima (SE) ou suplementados com dois tipos de protease (P1 e P2), para leitões com $13,52 \pm 1,96$ kg.

Itens	Ingredientes						EPM ¹	Valores de P		
	Farelo de soja 46% PB			Farelo de soja 48% PB				ING ²	ENZ ³	I x E ⁴
	SEM	P1	P2	SE	P1	P2				
<i>Aminoácidos digestíveis ileais estandardizados, %</i>										
Aminoácidos essenciais										
Treonina	1,557	1,417	1,724	1,718	1,755	1,697	0,035	0,048	0,421	0,115
Valina	2,004 ^{ab}	1,843 ^b	2,181 ^a	2,193 ^{ab}	2,203 ^b	2,355 ^a	0,037	0,002	0,017	0,477
Metionina	0,387 ^b	0,372 ^{ab}	0,415 ^a	0,533 ^b	0,538 ^{ab}	0,575 ^a	0,012	<0,001	0,005	0,727
Isoleucina	1,912 ^b	1,836 ^{ab}	2,059 ^a	2,226 ^b	2,289 ^{ab}	2,367 ^a	0,036	<0,001	0,027	0,470
Leucina	3,243 ^b	3,029 ^b	3,461 ^a	3,496 ^b	3,528 ^b	3,827 ^a	0,052	<0,001	0,006	0,520
Fenilalanina	2,171 ^b	2,063 ^b	2,330 ^a	2,340 ^b	2,355 ^b	2,512 ^a	0,033	0,001	0,013	0,659
Lisina	2,463 ^b	2,444 ^{ab}	2,839 ^a	2,825 ^b	2,910 ^{ab}	3,157 ^a	0,061	0,002	0,017	0,863
Histidina	1,082 ^{ab}	0,978 ^b	1,135 ^a	1,246 ^{ab}	1,243 ^b	1,330 ^a	0,021	<0,001	0,004	0,299
Arginina	3,128 ^b	3,101 ^{ab}	3,344 ^a	3,405 ^b	3,556 ^{ab}	3,684 ^a	0,046	<0,001	0,019	0,642
Triptofano	0,663	0,554	0,652	0,606	0,619	0,624	0,014	0,588	0,407	0,304
Aminoácidos não-essenciais										
Asparagina	4,608 ^{ab}	4,211 ^b	4,915 ^a	5,221 ^{ab}	5,121 ^b	5,530 ^a	0,088	<0,001	0,016	0,656
Serina	1,908 ^b	1,701 ^b	2,163 ^a	2,153 ^b	2,202 ^b	2,337 ^a	0,047	<0,001	0,014	0,237
Glutamina	6,995 ^b	7,119 ^{ab}	7,768 ^a	8,234 ^b	8,433 ^{ab}	8,977 ^a	0,152	<0,001	0,027	0,986
Prolina	2,436	2,278	2,358	2,739	2,674	2,930	0,054	<0,001	0,416	0,451
Glicina	1,383	0,827	1,466	1,567	1,780	1,714	0,072	0,009	0,343	0,082
Alanina	1,771 ^b	1,605 ^b	1,968 ^a	1,959 ^b	2,011 ^b	2,160 ^a	0,039	<0,001	0,010	0,363
Cistina	0,616 ^b	0,588 ^b	0,754 ^a	0,525 ^b	0,539 ^b	0,596 ^a	0,016	<0,001	<0,001	0,186
Tirosina	1,443 ^b	1,314 ^b	1,609 ^a	1,622 ^b	1,612 ^b	1,766 ^a	0,030	<0,001	0,006	0,536

^{ab}Médias seguidas por letras diferentes nas linhas diferem ($P < 0,05$) entre si pelo teste de Tukey. ¹EPM: Erro padrão da média; ²ING: Fator ingrediente; ³ENZ: Fator enzima; ⁴I X E: Interação entre os fatores enzima e ingrediente.

De modo geral, a utilização da P2 foi capaz de melhorar, em média 8,6% da DIA dos aminoácidos em relação as dietas sem a presença da enzima. Quanto a DIA dos aminoácidos essenciais, a melhora foi de 7,4%. A DIE dos aminoácidos dos farelos de soja suplementados com P2 foi em torno de 7% superior às observadas nas dietas sem suplementação de proteases. A DIE dos aminoácidos essenciais nos farelos de soja com P2 melhorou, em média, 6,2%.

Experimento II

O peso aos 35 dias e os ganhos de peso dos 21 aos 35, 42 e 49 dias dos animais que receberam a dieta com elevada inclusão de farelo de soja e com a P2 foram de 4 a 17% maiores ($P < 0,05$) do que os verificados nos suínos submetidos à dieta com menor inclusão do farelo de soja, e ambos não diferiram ($P > 0,05$) dos animais alimentados com as dietas de alto farelo soja, com a P1 ou sem enzimas. Os pesos aos 42 e 49 dias dos suínos que receberam a dieta com alta inclusão de farelo de soja e a P2 foram de 3 a 4 % superiores ($P < 0,05$) aos encontrados nos leitões alimentados com as dietas sem protease, de alta ou baixa inclusão de farelo de soja. Os animais submetidos à dieta de alto farelo de soja com a P1 apresentaram pesos similares ($P > 0,05$) aos demais.

Tabela 13. Desempenho de leitões dos 21 aos 70 dias de vida alimentados com dietas com alta inclusão de farelo de soja, com ou sem a suplementação de diferentes proteases.

Itens	Dietas				EPM ⁵	Valores de P
	BFS ¹	AFS ²	AFS + P1 ³	AFS + P2 ⁴		
Peso vivo, kg						
21 dias	6,50	6,49	6,50	6,49	0,13	0,954
28 dias	7,01	7,12	7,10	7,08	0,13	0,179
35 dias	8,56 ^b	8,76 ^{ab}	8,82 ^{ab}	8,92 ^a	0,15	0,028
42 dias	10,95 ^b	11,01 ^b	11,27 ^{ab}	11,40 ^a	0,16	0,006
49 dias	14,64 ^b	14,66 ^b	15,01 ^{ab}	15,09 ^a	0,19	0,008
56 dias	18,56	18,59	18,60	18,84	0,20	0,520
63 dias	23,66	23,42	23,54	23,59	0,25	0,969
70 dias	28,17	27,90	28,23	28,22	0,29	0,487
Ganho de peso diário, kg						
21 a 28 dias	0,073	0,090	0,086	0,081	0,003	0,192
21 a 35 dias	0,147 ^b	0,162 ^{ab}	0,165 ^{ab}	0,172 ^a	0,003	0,046
21 a 42 dias	0,212 ^b	0,222 ^{ab}	0,227 ^{ab}	0,233 ^a	0,003	0,018
21 a 49 dias	0,291 ^b	0,297 ^{ab}	0,304 ^{ab}	0,306 ^a	0,003	0,036
21 a 56 dias	0,345	0,350	0,352	0,345	0,003	0,529
21 a 63 dias	0,409	0,406	0,407	0,406	0,003	0,958
21 a 70 dias	0,442	0,446	0,443	0,439	0,004	0,834
Consumo de ração diário, kg						
21 a 28 dias	0,138	0,138	0,142	0,136	0,003	0,772
21 a 35 dias	0,256	0,257	0,258	0,268	0,004	0,626
21 a 42 dias	0,357	0,360	0,362	0,351	0,004	0,828
21 a 49 dias	0,471	0,458	0,470	0,464	0,004	0,265
21 a 56 dias	0,539	0,523	0,536	0,529	0,004	0,091
21 a 63 dias	0,639	0,615	0,626	0,621	0,006	0,352
21 a 70 dias	0,710	0,692	0,704	0,699	0,007	0,716
Conversão alimentar						
21 a 28 dias	1,985 ^b	1,593 ^a	1,835 ^{ab}	1,617 ^a	0,061	0,012
21 a 35 dias	1,740 ^b	1,585 ^a	1,617 ^{ab}	1,595 ^a	0,021	0,016
21 a 42 dias	1,683 ^b	1,581 ^a	1,595 ^a	1,549 ^a	0,014	0,002
21 a 49 dias	1,622 ^b	1,532 ^a	1,549 ^a	1,545 ^a	0,012	0,019
21 a 56 dias	1,564 ^b	1,491 ^a	1,520 ^{ab}	1,524 ^{ab}	0,010	0,047
21 a 63 dias	1,565 ^b	1,490 ^a	1,553 ^{ab}	1,533 ^{ab}	0,010	0,022
21 a 70 dias	1,605	1,552	1,588	1,608	0,009	0,091

^{ab}Médias seguidas de letras diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). ¹BFS: Dieta com baixa inclusão de farelo de soja; ²AFS: Dieta com alta inclusão de farelo de soja; ³P1: Dieta com alta inclusão de farelo de soja e com adição da protease 1; ⁴P2: Dieta com alta inclusão de farelo de soja e com adição da protease 2; ⁵EPM: Erro padrão da média

As conversões alimentares dos animais alimentados com as dietas com alta inclusão de farelo de soja, sem enzima ou com a P2, foram melhores (P<0,05) dos que as observadas nos suínos que consumiram a dieta com baixa inclusão de farelo de soja dos 21 aos 28, 35, 56 e 63 dias. Nos períodos de 21 a 42 e 49 dias, a conversão alimentar dos

animais que ingeriram a dieta com alta inclusão de farelo de soja e a P1 também foram melhores do que as dos animais submetidos à dieta com baixo farelo de soja.

Para o consumo diário de ração não houve qualquer diferença ($P > 0,05$) entre os animais submetidos às diferentes dietas. Observou-se apenas uma tendência ($P < 0,10$) de maior consumo pelos suínos alimentados com a dieta com baixa inclusão de farelo de soja no período de 21 a 56 dias.

5. DISCUSSÃO

Experimento I

Poucos trabalhos foram conduzidos para estudar os efeitos das proteases exógenas sobre a digestibilidade dos nutrientes do milho. Porém, considerando-se que os grânulos de amido são revestidos por uma matriz proteica (Duvick, 1961), cuja função é contê-los, aumentando a rigidez do endosperma (Narváez-González et al., 2006), esperava-se que as proteases poderiam auxiliar na digestão da matriz proteica, melhorando a digestibilidade tanto da energia quanto da proteína. Ou seja, a protease ao degradar a matriz proteica do endosperma aumentaria a exposição do amido à amilase e, conseqüente, melhora a digestão do amido e da energia. Entretanto, tais efeitos não foram verificados no presente estudo.

Adicionalmente, esperava-se a melhora na digestibilidade da proteína presente no milho. No entanto, não houve diferença para nenhum dos parâmetros avaliados na digestibilidade do milho.

A ausência de efeito das proteases sobre a digestibilidade dos aminoácidos do milho pode estar relacionada aos tipos de proteínas presentes no milho e ao teor de proteína bruta, de 9 a 9,3% da matéria seca do grão, que foi utilizado nesta pesquisa. Considerando-se o baixo teor de proteína no milho, pode-se inferir que as enzimas endógenas dos suínos sejam suficientes para degradar as proteínas do ingrediente em questão, sendo a adição de proteases desnecessária. Em outras palavras, possivelmente não haveria substrato suficiente para a ação das proteases exógenas. Adicionalmente, pode-se supor que as proteases testadas não sejam específicas para as proteínas do milho.

Apesar de estudos mostrarem que em uma dieta com redução de até 2% no teor de proteína bruta, a protease contribuiu para suprir essa deficiência, aumentando a eficiência na digestibilidade das fontes de aminoácidos (Yu et al., 2020), na presente pesquisa a digestibilidade das dietas com milho não foram melhoradas com a adição de proteases. Isso pode estar associado a fonte de proteína, pois no experimento com os farelos de soja, foi possível observar efeitos positivos na utilização de proteases, sobretudo protease com ação em meio ácido. Tais aspectos evidenciam a necessidade da identificação dos tipos de proteína e das proteases específicas para degradá-las.

A utilização da P2 contribuiu para a melhora na digestibilidade da maioria dos aminoácidos nas dietas que continham farelo de soja, destacando a importância de que mais estudos sejam realizados para entender o potencial de proteases que atuam em pH ácido. Resultados similares foram obtidos por Tactacan et al. (2016), que observaram que a protease foi capaz de melhorar a digestibilidade aparente total da matéria seca da dieta em 3,45% em leitões desmamados, além de reduzir a emissão de NH₃. O'Shea et al. (2014) também relataram que o uso isolado da protease melhorou a digestibilidade aparente de proteína, porém estes autores relataram uma piora na eficiência de xilanase em dietas contendo proteases, pelo fato de que as proteases podem limitar a ação de carboidrases (Saleh et al., 2004).

Hu et al. (2020) avaliaram o efeito da suplementação de protease ácida em dietas para frangos de corte, e concluíram que esta enzima pode melhorar o ganho de peso diário e a digestibilidade de aminoácidos, mostrando que o melhor resultado foi encontrado com a inclusão de 0,09% da enzima. Outros autores (Liu et al., 2013; Adebisi e Olukosi, 2015) relataram que as proteases não são capazes de melhorar a digestibilidade de ingredientes em leitões. O tipo de protease utilizada e o tipo de substrato (proteína) pode contribuir para a ineficiência da presença da protease, pois algumas enzimas podem ser inativadas ainda no estômago por ação da pepsina (Yu et al., 2016), ou até mesmo perder eficiência quando as dietas são submetidas a altas temperaturas durante o processamento. No presente estudo, a inclusão de 0,01% de protease ácida melhorou as digestibilidades de proteína e aminoácidos, deixando claro que estudo com níveis mais elevados de inclusão de protease ácida são necessários para elucidar o nível ótimo de inclusão.

Há relatos na literatura (Mahagna et al., 1995; Kaczmarek et al., 2014) de que o uso de proteases exógenas na alimentação de monogástricos pode levar a uma piora expressiva na digestibilidade de proteína, atribuindo esse efeito negativo a redução da produção de protease pancreática, reduzindo a digestão proteica. Porém, no presente estudo, não houve piora na digestibilidade atribuído à presença das proteases exógena.

Experimento II

Recentemente o número de pesquisas que mostram os benefícios que as proteases podem oferecer na nutrição animal aumentaram expressivamente. Contudo, boa parte destes estudos são voltados para a produção de aves devido à sua capacidade limitada de digestão das proteínas e menor tempo de trânsito da digesta nas aves comparativamente a suínos. Entretanto, o desmame precoce de leitões causa mudanças no trato gastrointestinal que afetam a digestibilidade de nutrientes, como, por exemplo, proteínas e aminoácidos (Hedemann e Jensen, 2004). Por esses motivos, estudos com proteases para leitões recém desmamados são relevantes para o desenvolvimento da suinocultura mundial.

Apesar de já relatado na literatura que altos níveis de proteína bruta podem causar diarreia (Aumaitre et al., 1995), isso não foi verificado no presente trabalho. O motivo pelo desempenho adequado, mesmo com os animais submetidos a altos níveis de farelo de soja, pode estar relacionado ao fato de que os animais estavam em ambiente com temperatura controlada e com medicação via ração, nas fases em que a granja tem maior desafio (amoxicilina dos 28 aos 35 dias de idade, e florfenicol dos 49 aos 70 dias de idade). O peso vivo e o ganho de peso diário dos leitões foram influenciados pela presença da protease, demonstrando que mesmo em altas inclusões do farelo de soja, a ação da enzima se mostra eficiente. Este resultado corrobora os encontrados por Yu et al. (2020), demonstrando que a presença de protease melhora o ganho de peso e peso vivo de leitões na fase de creche. Outro estudo conduzido por Tactacan et al. (2016), os autores avaliaram o desempenho de leitões desmamados com 6.42 ± 0.12 kg, aos 28 dias de idade, e concluíram que a utilização de proteases foi capaz de melhorar o ganho de peso dos animais, sendo que aqueles alimentados com ração contendo protease chegaram aos 70 dias com peso 1,29kg superior em relação aos suínos sem a suplementação de proteases.

O consumo de ração não foi afetado ($P > 0,05$) pelo nível de inclusão de farelo de soja, ou pelo tipo e/ou presença da protease. Este resultado diverge dos encontrados por Lee et al. (2018), que em estudo meta-analítico com o uso isolado de proteases, observaram que a presença da enzima causa uma redução de 0,78% no consumo de ração. Em contraste Torres Pitarch et. al (2017), também em estudo meta-analítico, constataram que a presença da protease pode contribuir com o aumento do consumo de ração de leitões desmamados.

No presente estudo, as dietas foram formuladas para atender a exigência nutricional dos animais, mesmo sem a presença da protease, isso pode demonstrar efeitos extra nutricionais que a protease pode contribuir. Prykhodko et al. (2015) observaram durante um estudo com ratos neonatos, que as proteases são capazes de acelerar o processo de maturação do trato gastrointestinal, eles associaram essa constatação à mudanças que ocorreram no fenótipo funcional do tipo neonatal para o adulto, sendo que estas mudanças são observadas após o desmame, com a mudança na dieta de leite para alimentos sólidos.

A conversão alimentar foi influenciada positivamente pelo nível de farelo de soja mais alto, porém a presença das proteases não alterou este parâmetro entre os animais que consumiram as dietas com maior teor de farelo de soja. Em contraste, Nery et al. (2000) estudaram o efeito da inclusão de 0,025% de protease em dieta a base de milho e farelo de soja para suínos machos e fêmeas, com médias de 35 dias de idade, constatando que a suplementação da protease melhorou em 6% a conversão alimentar em relação aos animais que receberam a mesma dieta sem a

inclusão da protease. Segundo estes autores, a melhora na conversão alimentar foi relacionada ao aproveitamento da proteína de forma mais eficiente para a deposição proteica.

No caso da presente pesquisa, a similaridade das conversões alimentares dos animais submetidos às diferentes dietas pode ser associada ao fato de a protease ter sido adicionada às dietas sem se considerar a valorização nutricional dos ingredientes pelo uso das enzimas e das dietas terem sido formuladas para atender as exigências nutricionais dos animais. Os aminoácidos potencialmente disponibilizados pelo emprego das proteases podem ter sido, simplesmente, metabolizados e excretados na forma de ureia, considerando que aminoácidos em excesso não são depositados, sendo excretados.

Os resultados encontrados nesta pesquisa se mostram relevantes, pois indicam que a utilização de alta inclusão de farelo de soja em dietas para leitões, desde que em boas condições de higiene, ambiente e manejo, como as adotadas na presente pesquisa, propiciam desempenho satisfatório dos suínos. Isso demonstra que em condições adequadas há a possibilidade da utilização de dietas mais simples, sem que se tenha prejuízos no desempenho dos animais. Faz-se necessário mais estudos com níveis elevados de farelo de soja para entender se os níveis praticados hoje não estão abaixo do potencial de uso deste ingrediente, podendo reduzir o custo da dieta, em condições adequadas de criação de suínos.

6. CONCLUSÃO

A suplementação de proteases na dieta de suínos pode melhorar o desempenho dos animais, principalmente em leitões, por contribuir com o desenvolvimento intestinal, melhorar a digestibilidade de proteínas, possibilitando o uso de ingredientes de qualidade inferior em relação à sua digestibilidade, reduzindo o custo da alimentação, contribuindo para uma suinocultura mais sustentável e melhorando a lucratividade na suinocultura.

REFERÊNCIAS

- Adeola, O., Cowieson, A.J., 2011. Board-Invited Review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *J. Anim. Sci.* 89, 3189-3218.
- Adebisi, A.O., Olukosi, O.A., 2015. Apparent and standardised ileal amino acid digestibility of wheat distillers dried grains with solubles with or without exogenous protease in broilers and turkeys. *Br. Poult. Sci.* 56, 239–246.
- Aderibigbe, A.O., Johnson, C.O.L.E., Makkar, H.P.S., Becker, K., Foidl, N., 1997. Chemical composition and effect of heat on organic matter- and nitrogen-degradability and some antinutritional components of *Jatropha* meal. *Anim. Feed Sci. Technol.* 67, 223–243.
- Alves, B., 2019. Fatores antinutricionais dos alimentos. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Disponível em <http://www.codeagro.sp.gov.br/cesans/artigo/197/Fatores%20antinutricionais%20dos%20alimentos> > Acesso em 08/04/2020.
- Aumaitre, A., Peiniau, J., Madec, F., 1995: Digestive adaptation after weaning and nutritional consequences in the piglet. *Pig News and Information.* 16, 73–79.
- AOAC. Association of official analytical chemists. Official methods of analysis. 18. ed. Washington: AOAC, 2006.
- Barros, P.C., Oliveira, V., Gewehr, C.E., Nunes, R.V., 2014. Efeito da adição de enzimas na digestibilidade total aparente de dietas para leitões desmamados. *Semana: Ciências Agrárias, Londrina.* 35, 2211-2218.
- Bertschinger, H.U., Enggenberger, E., Jucker, H., Pfirter, H.P., 1979. Evaluation of low nutrient, high fiber diets for the prevention of porcine *Escherichia coli* enterotoxaemia. *Vet. Microbiol.* 3, 281–290.
- Blecha, F., Pollman, D.S., Nichols, D.A., 1983. Weaning Pigs at an Early Age Decreases Cellular Immunity. *J. Anim. Sci.* 56, 396–400.
- Classen, H.L., 1996. Enzymes in action. *Feed Mix.* 4, 2.
- Cowieson, A.J., Adeola, O., 2005. Carbohydrases, protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. *Poult. Sci.* 84, 1389-1397.
- Dong, G., Zhou, A., Yang, F., Chen K., Wang, K., Dao, D., 1996. Effect of dietary protein levels on the bacterial breakdown of protein in the large intestine, and diarrhea in early-weaned piglets. *Acta Vet. Zootec. Sin.* 27, 293-302.
- Donkoh, A., Moughan, P.J., Smith, W.C., 1994. Comparison of the slaughter method and simple T-piece cannulation of the terminal ileum for determining ileal amino acid digestibility in meat and bone meal for the growing pig. *Anim. Feed Sci. Technol.* 49, 43–56.
- Dourado, L.R.B., Barbosa, N.A.A., Sakomura, N.K., 2014. In: Sakomura, N.K., Silva, J.H.V., Costa, F.G.P., Fernandes, J.B.K., Hauschild, L. (Eds.) *Nutrição de Não Ruminantes*, Funep, Jaboticabal, SP, pp.468-481.
- Duvick, D.N., Snyder, R.J., Anderson, E.G., 1961. The chromosomal location of Rfl, a restorer gene for cytoplasmic pollen sterile maize. *Genet.* 46, 1245-1252.
- Hedemann, M. S., Jensen, B. B., 2004. Variations in enzyme activity in stomach and pancreatic tissue and digesta in piglets around weaning. *Arch. Anim. Nutr.* 58, 47-59.
- Embrapa Swine & Poultry, 2017. Central de inteligência de aves e suínos. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/suinos-e-aves/cias/custos/icpsuino> > Acesso em 25/10/2018.
- Fairbrother, J.M., Nadeau, E., Gyles, C.L., 2005. *Escherichia coli* postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim. Health Res. Rev.* 6, 17-39.

- Freitas, D.M., Vieira, S.L., Angel, C.R., Favero, A., Maiorka, A., 2011. Performance and nutrient utilization of broilers fed diets supplemented with a novel mono-component protease. *J. Appl. Poult. Res.* 20, 322-334.
- Heo, J.M., Opapeju, F.O., Pluske, J.R., Kim, J.C., Hampson, D.J., Nyachoti, C.M., 2013. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhea without using in-feed antimicrobial compounds. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97, 207-237.
- Hu, J., Ingale, S., Rathi, P., Zhang, J.Y., Kim, I.H., 2020. Influence of exogenous acid protease in broiler chickens fed corn-soybean meal-based diets. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 104, 204– 211.
- Huisman, J., Tolman, G.H., 1992. Antinutritional factors in the plant proteins of diets for non-ruminants. In: Garnsworthy, P. C.; Haresign, W.; Cole, D. J. A. (Ed). *Recent Advances in Animal Nutrition*. Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, pp. 3.
- Kaczmarek, S.A., Rogiewicz, A., Mogielnicka, M., Rutkowski, A., Jones, R.O., Slominski, B.A., 2014. The effect of protease, amylase, and non-starch polysaccharide-degrading enzyme supplementation on nutrient utilization and growth performance of broiler chickens fed corn-soybean meal-based diets. *Poult. Sci.* 93, 1745–1753.
- Kocher, A., Choct, M., Porter, M.D., Broz, J., 2002. Effects of feed enzymes on nutritive value of soyabean meal fed to broilers, *Br. Poult. Sci.* 43, 54-63.
- Kong, C., Adeola, O., 2014. Evaluation of amino Acid and energy utilization in feedstuff for Swine and poultry diets. *Asian-Australas J Anim Sci.* 27, 917-925.
- Le Bellego, L., Milgen, J.V., Dubois, S., 2001. Energy utilization of low-protein diets in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 79, 1259-1271.
- Lee, S. A., Bedford, M. R., Walk, C. L., 2018. Meta-analysis: explicit value of monocomponent proteases in monogastric diets. *Poult. Sci.* 0, 1-8.
- Leite, P.R.S.C., Mendes, F.R., Pereira, M.L.R., Lacerda, M.J.R., 2012. Limitações da utilização da soja integral e farelo de soja na nutrição de frangos de corte. *Enciclopédia Biosfera.* 8, 1138-1157.
- Liu, S., Selle, P., Court, S., Cowieson, A., 2013. Protease supplementation of sorghum-based broiler diets enhances amino acid digestibility coefficients in four small intestinal sites and accelerates their rates of digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.* 183, 175–183.
- Mahagna, M., Nir, I., Larbier, M., Nitsan, Z., 1995. Effect of age and exogenous amylase and protease on development of the digestive tract, pancreatic enzyme activities and digestibility of nutrients in young meat-type chicks. *Reprod. Nutr. Dev.* 35, 201-212.
- Mahmood, T., Mirza, M.A., Nawaz, H., Shahid, M., 2018. Exogenous protease supplementation of poultry by-product meal-based diets for broilers: Effects on growth, carcass characteristics and nutrient digestibility. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 102, e233-e241.
- Marquardt, R.R., Bedford, M.R., 2001. Enzymes in farm animal nutrition. Future horizons. In: Bedford M.R. & Partridge G.G. (ed). Oxford, CAB Publishing, pp. 389- 398.
- Marzocco, A., Torres, B.B., 1999. *Bioquímica Básica*, 2a ed., Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro.
- Mcalpine, P.O., O'shea, C.J., Varley, P.F., O'doherty, J.V., 2012a. The effect of protease and xylanase enzymes on growth performance and nutrient digestibility in finisher pigs. *J. Anim. Sci.* 90, 375-377.
- Mcalpine, P.O., O'shea, C.J., Varley, P.F., Solan, P., Curran, T., O'doherty, J.V., 2012b. The effect of protease and nonstarch polysaccharide enzymes on manure odor and ammonia emissions from finisher pigs. *J. Anim. Sci.* 90, 369-371.

- Min, Y., Choi, Y., Kim, Y., Jeong, Y., Kim, D., Kim, J., Jung, H., & Song, M., 2019. Effects of protease supplementation on growth performance, blood constituents, and carcass characteristics of growing-finishing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 61, 234–238.
- Moura, A.M.A., 2004. Conceito da proteína ideal aplicada na nutrição de aves e suínos. *Revista Eletrônica Nutritime.* 1, 31-34.
- Narváez-González, E. D., Figueroa-Cárdenas, J. D., Taba, S., Castaño-Tostado, E., Martínez-Peniche, R. A., Rincón-Sánchez, F., 2006. Relationships between the microstructure, physical features and chemical composition of different corn accessions from Latin America. *Cereal Chem.* 83, 595–604.
- Nery, V.L.H., Lima, J.A.F., Melo, R.C.A., Fialho, E.T., 2000. Adição de enzimas exógenas para leitões dos 10 aos 30 kg de peso. *R. Bras. Zootec.* 29, 794-802.
- Nielsen, P.K., Pontoppidan, M.U., Faruk, J., Broz, I., 2013. In vitro degradation of soybean anti-nutritional factors by a mono component protease. *Int. Poult. Sci. Forum.* M80. (Abstr.).
- Noblet, J., Le Bellego, L., Van Milgen, J., 2000. Effects of reduced dietary protein level and fat addition on heat production and nitrogen and energy balance in growing pigs. *Anim. Res.* 50, 227-238.
- Olukosi, O.A., Beeson, L.A., Englyst, K., Romero, L.F., 2015. Effects of exogenous proteases without or with carbohydrases on nutrient digestibility and disappearance of non-starch polysaccharides in broiler chickens. *Poult. Sci.* 94, 2662–2669.
- Omogbenigun, F.O., Nyachoti, C.M., Slominski, B.A., 2004. Dietary supplementation with multienzyme preparations improves nutrient utilization and growth performance in weaned pigs. *J Anim Sci.* 82, 1053-61.
- O’Shea, C.J., Mc Alpine, P.O., Solan, P., Curran, T., Varley, P.F., Walsh, A.M., Doherty J.V.O., 2014. The effect of protease and xylanase enzymes on growth performance, nutrient digestibility, and manure odour in grower–finisher pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 189, 88-97.
- Peng, X., Hu, L., Liu, Y., Yan, C., Fang, Z.F., Lin, Y., Xu, S.Y., Li, J., Wu, C.M., Chen, D.W., Sun, H., Wu, D., Che, L.Q., 2016. Effects of low-protein diets supplemented with indispensable amino acids on growth performance, intestinal morphology and immunological parameters in 13 to 35 kg pigs. *Anim.* 10, 1812-1820.
- Prykhodko, O., Pierzynowski, S.G., Nikpey, E., Sureda, E.A., Fedkiv, O., Weström, B.R., 2015. Pancreatic and Pancreatic-Like Microbial Proteases Accelerate Gut Maturation in Neonatal Rats. Ed. Markus M. Heimesaat. *PLoS ONE.*
- R Core Team., 2020. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.R-project.org/>.
- Saleh, F., Ohtsuka, A., Tanaka, T., Hayashi, K., 2004. Carbohydrases are digested by proteases present in enzyme preparations during in vitro digestion. *J. Poult. Sci.* 41, 229–235.
- Schneeman, B.O, Gallaher, D., 1986. In M. Friedman (Ed.), *Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors in foods.* (Vol. 199). Boston, MA: Springer US.
- Silva, J.L., 2013. Protease e butirato de sódio em dietas pré-inicial e inicial de suínos. Tese de doutorado – Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 78f.
- Silva Junior, A., 2009. Interações químico-fisiológicas entre acidificantes, probióticos, enzimas e lisofosfolípidios na digestão de leitões. *R. Bras. Zootec.* 38, 238-245.
- Soares, T.G., 2004. Efeito da desmama com 12, 15 e 18 dias de idade sobre o desempenho de leitões. Viçosa, Minas Gerais, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, 75p.

- Stein, H.H., Séve, B., Fuller, M.F., Moughan, P.J., De Lange, C.F.M., 2007. Invited review: amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: terminology and application. *J. Anim. Sci.* 85, 172–180.
- Tactacan, G.B., Cho, S.Y., Cho, J.H., Kim, I.H., 2016. Performance Responses, Nutrient Digestibility, Blood Characteristics, and Measures of Gastrointestinal Health in Weanling Pigs Fed Protease Enzyme. *Asian-Australas J Anim Sci.* 29, 998-1003.
- Tang, W., Qian, Y., Yu, B., Zhang, T., Gao, J., He, J., Huang, Z., Zheng, P., Mao, X., Luo, J., Yu, J., Chen, D., 2019. Effects of *Bacillus subtilis* DSM32315 supplementation and dietary crude protein level on performance, gut barrier function and microbiota profile in weaned piglets. *J. Anim. Sci.* 97, 2125-2138.
- Thorpe, J., Beal, J.D., 2001. Vegetable protein meals and the effects of enzymes. In: Bedford M.R., Partridge G.G. (Ed.). *Enzymes in farm animal nutrition*. Londres: Cab International, pp. 353-376.
- Torres-Pitarch, A., D. Hermans, E. G. Manzanilla, J. Bindelle, N. Everaert, Y. Beckers, D. Torrallardona, G. Bruggeman, G. E. Gardiner, and P. G. Lawlor. 2017. Effect of feed enzymes on digestibility and growth in weaned pigs: A systematic review and metaanalysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 233: 145-159.
- Upadhaya, S.D., Yun, H.M., Kim, I.H., 2016. Influence of low or high density corn and soybean meal-based diets and protease supplementation on growth performance, apparent digestibility, blood characteristics and noxious gas emission of finishing pigs. *Anim Feed Sci Technol.* 216, 281-287.
- USDA – United States Department of Agriculture, 2016. *Livestock and Poultry: World Markets and Trade*. Foreign Agricultural Service. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/data/livestock-andpoultry-world-markets-and-trade>>. Acesso em: 24/10/2018.
- Van Eys, J.E., Offner, A., Bach, A., 2004. *Chemical Analysis. Manual of Quality Analysis for Soybean Products in the Feed Industry*. American Soybean Association.
- Vieira, S.L., Stefanello, C., Cemin, H.S., 2016. Lowering the dietary protein levels by the use of synthetic amino acids and the use of a mono component protease. *Anim. Feed Sci. Technol.* 221, 262–266.
- Wang, H., Guo, J., Shih, J.C.H., 2008. Effects of dietary supplementation of keratinase on growth performance, nitrogen retention and intestinal morphology of broiler chickens fed diets with soybean and cottonseed meals. *Anim Feed Sci Technol.* 140, 376-384.
- Wiese, F., Simon, O., Weyrauch, K.D., 2003. Morphology of the small intestine of weaned piglets and a novel method for morphometric evaluation. *Anat. Histol. Embryol.* 32, 102–109.
- Winiarska-Mieczan, A., 2007. Bowman-Birk trypsin inhibitors: Their structure and value in human and animal feeding. *Medycyna Weterynaryjna.* 63. 276-281.
- Yasothai, R., 2016. Antinutritional factors in soybean meal and its deactivation *Int. J. Sci., Environ. Tech.*, 5, 3793-3797.
- Yu, G.X., Chen, D.W., Yu, B., He, J., Zheng, P., Mao, X.B., Huang, Z.Q., Luo, J.Q., Zhang, Z.H., Yu, J., 2016. Coated protease increases ileal digestibility of protein and amino acids in weaned piglets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 214, 142–147.
- Yu, J., Yu, G., Yu, B., Zang, Y., He, J., Zheng, P., Mao, X., Luo, J., Huang, Z., Luo, Y., Yan, H., Wang, Q., Wang, H., Chen, D., 2020. Dietary protease improves growth performance and nutrient digestibility in weaned piglets fed diets with different levels of soybean meal. *Livest. Sci.* 241, 1-28.
- Zardo, A.O., Lima, G.J.M.M., 1999. Alimentos para suínos. *Boletim Informativo BIPERS.* 8, 7-71.

- Zhang, G.G., Yang, Z.B., Wang, Y., Yang, W.R., Zhou, H.J., 2014. Effects of dietary supplementation of multi-enzyme on growth performance, nutrient digestibility, small intestinal digestive enzyme activities, and large intestinal selected microbiota in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 92, 2063-2069.
- Zuo, J., Ling, B., Long, L., Li, T., Lahaye, L., Yang, C., Feng, D., 2015. Effect of dietary supplementation with protease on growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, digestive enzymes and gene expression of weaned piglets. *Anim. Nutr.* 1, 276-282.