

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

FITASE, XILANASE E β -GLUCANASE SOBRE A
DIGESTIBILIDADE DA ENERGIA E NUTRIENTES E
EXCREÇÃO DO NITROGÊNIO E FÓSFORO EM JUVENIS
DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Autora: Jessica Sayuri Ticse Nakamura
Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

FITASE, XILANASE E β -GLUCANASE SOBRE A
DIGESTIBILIDADE DA ENERGIA E NUTRIENTES E
EXCREÇÃO DO NITROGÊNIO E FÓSFORO EM JUVENIS
DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Autora: Jessica Sayuri Ticse Nakamura
Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya

“Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração Produção Animal”

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

N163f Nakamura, Jessica Sayuri Ticse
Fitase, xilanase e β -glucanase sobre a digestibilidade da energia e nutrientes e excreção do nitrogênio e fósforo em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Jessica Sayuri Ticse Nakamura. -- Maringá, 2021.
x, 63 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2021.

1. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) - Nutrição. 2. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) - Digestibilidade. 3. Polissacarídeos não amiláceos (PNAs). 4. Fitato. 5. Enzimas. I. Furuya, Wilson Massamitu, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 23.ed. 639.37



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

FITASE, XILANASE E β -GLUCANASE SOBRE A
DIGESTIBILIDADE DA ENERGIA E NUTRIENTES E
EXCREÇÃO DO NITROGÊNIO E FÓSFORO EM JUVENIS
DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Autora: Jessica Sayuri Ticse Nakamura
Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 26 de fevereiro de 2021.

Prof. Dr. Luiz Vitor Oliveira Vidal

Prof^ª Dr^a Ana Lucia Salaro

Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya
Orientador

“夢がある”

(うずまきナルト)

Aos meus pais, Jesus Orlando Ticse Palacios e Joelma Rosana Kimie Nakamura, por me ensinarem que Deus está acima de todas as coisas.

Aos meus irmãos Jhohans Francisco Kenzi Ticse Nakamura e Jesus Haruyoshi Ticse Nakamura, por me ensinarem o verdadeiro significado do amor fraternal.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção física, mental e espiritual; pela felicidade ao acordar todos os dias, olhar para o céu e observar quantas coisas maravilhosas tem nos proporcionado.

Aos meus pais Jesus Orlando Ticse Palacios e Joelma Rosana Kimie Nakamura, por me incentivarem nos estudos e me ensinarem a importância da ética e moral na vida.

Aos meus irmãos Francisco Ticse Nakamura e Jesus Ticse Nakamura por serem meu alicerce nos tempos difíceis.

Ao meu namorado Lucas Matheus Cordeiro dos Santos, por estar sempre presente me apoiando e por todas as palavras que me incentivam a ser uma pessoa melhor a cada dia que passa.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, por ter-me possibilitado desenvolver este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador professor Dr. Wilson Massamitu Furuya, pela paciência, atenção e ensinamentos.

A Elisa Silva de Macêdo e Luciana de Paula Costa Lima, pela amizade, apoio e ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa Fish Nutrition Johnny Martins de Brito, Tania Cristina Pontes, Paola Aparecida Paulovski Panaczervicz, Allan Vinicius Urbich, Alycia Renata Rudnik, João Antônio Galiotto Miranda, Ana Flávia Moreira, Maytê Vedam Dimbarre, Ângelo Machado Soltes Filho, Luiz Fernando Eirin Cancela Filho, Fernanda Eleutério Miara de Almeida, Milena Antunes Padilha, Andrew Henrique Stahlschimidt Ribas, Josieli Rocha Teixeira, José Carlos Martins Pedro, Joana Pietra Honorato Rocha, Cibelly Carolina Solaro, Emanuely Sedorko Rodrigues e Andrey Ferreira dos Reis que estiveram comigo me ajudando no laboratório, nos experimentos tornando os dias mais leves.

Aos técnicos de laboratório Valquiria Nanuncio Chochel e Antônio do Espírito Santo do Prado pela colaboração durante a execução dos experimentos.

A BASF, pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa, por toda ajuda e dedicação durante o desenvolvimento dos experimentos.

A toda a equipe Aquanutri pela colaboração na confecção das rações e a piscicultura Sozim pelo fornecimento dos alevinos de tilápia do Nilo para o experimento. Meus sinceros agradecimentos.

As minhas amigas da graduação Michelle Almeida, Natália Galoro, Bruna Garcia e Suzana Réia pelos conselhos, amizade durante todos estes anos, vocês são motivo por quem eu sou agora.

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

BIOGRAFIA

JESSICA SAYURI TICSE NAKAMURA, filha de Jesus Orlando Ticse Palacios e Joelma Rosana Kimie Nakamura, nasceu em Lima, Peru, no dia 6 de janeiro de 1997.

Cursou graduação em Zootecnia na Universidade Estadual de Maringá, no período de 2013 a 2017.

Em março de 2018, ingressou no mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, área de concentração Produção animal, subárea Aquicultura sob orientação do Professor Dr. Wilson Massamitu Furuya e coorientação do Professor Dr. Ricardo Pereira Ribeiro.

Em fevereiro de 2021, submeteu-se à banca examinadora para a defesa de dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Zootecnia.

INDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	X
I. INTRODUÇÃO	1
1. Panorama da tilapicultura nacional e internacional	1
2. Fitase na nutrição de peixes	3
2.1 Ácido fítico e seu papel na nutrição de peixes	3
2.2 Enzima: Fitase	8
2.3 Fitase na digestibilidade de nutrientes em peixes	10
3. Xilanase e β -glucanase na nutrição de peixes	16
3.1 Polissacarídeos não amiláceos e seu papel na nutrição de peixes	16
3.1.1 Arabinóxilano	22
3.1.2 Celulose	23
3.1.3 β -glucano de ligação mista	24
3.2 Enzimas: Xilanase e β -glucanase	26

3.3 Xilanase e β - glucanase na digestibilidade de nutrientes em peixes	29
LITERATURA CITADA	33
II. OBJETIVO GERAL	40
III. FITASE, XILANASE E B-GLUCANASE SOBRE A DIGESTIBILIDADE DA ENERGIA E NUTRIENTES E EXCREÇÃO DO NITROGÊNIO E FÓSFORO EM JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>)	41
Resumo	41
Abstract	42
Introdução	43
Materiais e Métodos	44
Dietas	45
Características da fitase, xilanase e β - glucanase	47
Delineamento experimental	48
Peixes e condições experimentais	48
Análises químicas	49
Digestibilidade	50
Excreção fecal de nitrogênio e fósforo	50
Análise estatística	50
Resultados	51
Discussão	59
Conclusões	64
Referências	64

LISTA DE TABELAS

	Páginas
I. INTRODUÇÃO.....	1
TABELA 1. Fósforo total, fitato e atividade da fitase endógena nos principais ingredientes de origem vegetal utilizados em dietas para peixes. Adaptado de Kumar et al. (2012).....	5
TABELA 2. Suplementação de fitase sobre a biodisponibilidade de minerais e digestibilidade de nutrientes em dietas para peixes. Adaptado de Lemos e Tacon (2017).....	12
TABELA 3. Classificação dos polissacarídeos não amiláceos (Sinha et al., 2011).....	18
TABELA 4. Conteúdo dos polissacarídeos não amiláceos (g kg ⁻¹ de matéria seca) nos principais ingredientes de origem vegetal utilizados em dietas para peixes (Sinha et al., 2011).....	20
TABELA 5. Efeito da suplementação de carboidrases em dietas para peixes. Adaptado de Castillo e Gatlin (2015).....	30
III. EFEITO DA FITASE, XILANASE E B-GLUCANASE SOBRE A DIGESTIBILIDADE DA ENERGIA E NUTRIENTES E EXCREÇÃO DO NITROGÊNIO E FÓSFORO EM JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>)	41
TABELA 1. Composição dos ingredientes da dieta controle, com base na matéria natural	45
TABELA 2. Composição química analisada da dieta controle, com base na matéria seca	46
TABELA 3. Coeficiente de digestibilidade aparente (g kg ⁻¹) da matéria seca, energia bruta e nutrientes de dietas sem e com fitase e/ou xilanase-β-glucanase para juvenis de tilápia do Nilo.....	52

TABELA 4. Coeficiente de disponibilidade aparente (g kg^{-1}) dos macro e microminerais analisados de dietas sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase para juvenis de tilápia do Nilo	54
TABELA 5. Coeficiente de digestibilidade aparente (g kg^{-1}) dos aminoácidos de dietas sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase para juvenis de tilápia do Nilo	57

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
I. INTRODUÇÃO.....	1
FIGURA 1. Estrutura química do ácido fítico (A) e radical mostrando o grupo fosfato do ácido fítico (B). Adaptado de Kumar et al. (2010).....	3
FIGURA 2. Interações do ácido fítico com minerais (A), proteínas (B) e amido (C). Adaptado e modificado de Rickard e Thompson (1997).....	7
FIGURA 3. Representação química da hidrólise do fitato, em que a fitase cliva as ligações fosfodiéster (linhas vermelhas) liberando o grupo mio-inositol dos íons, proteínas e grupos fosfato antes ligados (Chen et al., 2015)	9
FIGURA 4. Estrutura da lignocelulose (Nunes and Kunamneni, 2018).....	16
FIGURA 5. Estrutura do grão de trigo. Adaptado de Britannica (1996)	19
FIGURA 6. Estrutura química do arabinoxilano (Sinha et al., 2011).....	22
FIGURA 7. Estrutura química da celulose (A) e interação entre as cadeias de celulose com ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares (B). Adaptado de Sinha et al. (2011)	24
FIGURA 8. Estrutura química do β -glucano de ligação mista com ligações β -1,4 e β -1,3 (Megazyme, 2017a).....	25
FIGURA 9. Ação da endo-1,4- β -xilanase sobre o xilano (A) e ação da β -xilosidase sobre os xilo-oligossacarídeos liberando os monômeros de xilose (B). Adaptado de Megazyme (2017b).....	27
FIGURA 10. Esquema dos principais locais de ação da endo-1,4- β -glucanase, exo-1,4- β -glucanase e 1,4- β -glucosidade no polímero de celulose (Godoy et al., 2018)..	28
FIGURA 11. Modos de ação das carboidrases nos PNAs (Wyatt et al., 2008)	29

III. FITASE, XILANASE E B-GLUCANASE SOBRE A DIGESTIBILIDADE DA ENERGIA E NUTRIENTES E EXCREÇÃO DO NITROGÊNIO E FÓSFORO EM JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>)	41
FIGURA 1. Valores de energia digestível (ED) em dietas para tilápias do Nilo alimentadas com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase	52
FIGURA 2. Valores de proteína digestível (PD) em dietas para tilápias do Nilo alimentadas com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase	53
FIGURA 3. Valores do fósforo disponível (Pd) em dietas para tilápias do Nilo alimentadas com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase	55
FIGURA 4. Excreção fecal [g kg^{-1} de ganho de peso (GP)] de nitrogênio (N) em juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase	58
FIGURA 5. Excreção fecal [g kg^{-1} de ganho de peso (GP)] de fósforo (P) em juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase	59

RESUMO

As altas taxas de inclusão de alimentos vegetais em dietas para peixes tem levado ao aumento de polissacarídeos não amiláceos (PNAs) e fitato. Tanto os PNAs como o fitato são indesejáveis na nutrição de peixes, por suas propriedades antinutricionais. Carboidrases (xilanase e β -glucanase) e fitases são consideradas as principais alternativas frente aos problemas gerados pelos PNAs e fitato, respectivamente. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação isolada e combinada do complexo xilanase- β -glucanase e fitase em dietas exclusivamente vegetais sobre a digestibilidade da energia e nutrientes, incluindo a disponibilidade de minerais e aminoácidos, e excreção fecal do nitrogênio e fósforo em juvenis de tilápia do Nilo. Foram testadas quatro dietas, dieta controle (CON) sem enzimas, dieta com fitase (FT), dieta com xilanase e β -glucanase (XB) e dieta com fitase, xilanase e β -glucanase (FT+XB). Fitase (Natuphos[®] E) foi suplementada a 1000 FTU kg⁻¹ e o complexo xilanase- β -glucanase (Natugrain[®] TS) a 1120 TXU e 500 TGU kg⁻¹ da dieta. O total de 272 tilápias masculinizadas (22,52 \pm 0,65 g) foram distribuídas em delineamento de blocos ao acaso com quatro tratamentos e quatro repetições, em 16 aquários com fundo cônico de 150 L adaptados para a coleta de fezes (sistema Guelph modificado). Os peixes foram alimentados seis vezes ao dia até saciedade aparente com as dietas experimentais contendo 0,5% de óxido de cromo, durante 21 dias. Dietas suplementadas com xilanase e β -glucanase aumentaram a digestibilidade da matéria seca, amido e lipídeos (P < 0,001), e disponibilidade do cobre (P < 0,001). Paralelamente, dietas suplementadas com fitase aumentaram a digestibilidade da matéria seca, energia bruta, amido e cinzas (P < 0,001), e disponibilidade do magnésio, manganês e zinco (P < 0,001). Fitase também melhorou

a disponibilidade da maioria de aminoácidos, entre eles, arginina ($P = 0,019$), fenilalanina ($P = 0,001$), histidina ($P = 0,019$), lisina ($P = 0,019$), metionina ($P = 0,001$) e valina ($P = 0,025$), e quando combinada com a xilanase e β -glucanase potencializou a disponibilidade da isoleucina ($P = 0,004$), leucina ($P = 0,004$), treonina ($P = 0,002$), ácido glutâmico ($P = 0,00$), cistina ($P < 0,001$) e serina ($P = 0,01$). A combinação enzimática (FT+XB) demonstrou ter efeito sinérgico na digestibilidade da proteína ($P < 0,001$) e disponibilidade do cálcio, ferro e fósforo ($P < 0,001$). Quando comparado a dieta controle, a suplementação com fitase, xilanase e β -glucanase demonstrou reduzir a excreção fecal do nitrogênio ($P = 0,007$) e fósforo ($P < 0,001$) em 30 e 49,5%, respectivamente. Em conclusão, a suplementação isolada e combinada do complexo xilanase- β -glucanase e fitase melhora a digestibilidade da energia e nutrientes de dietas à base de vegetais, e reduz a excreção do nitrogênio e fósforo pelos peixes, colaborando para a produção de tilápias com menor impacto ambiental.

Palavras-chave: Polissacarídeos não amiláceos (PNAs), fitato, enzimas, peixes.

ABSTRACT

Increasing the inclusion rate of plant-based feed in fish diets increases the content of non-starch polysaccharides (NSP) and phytate. Both NSP and phytate are undesirable in fish nutrition, due to their anti-nutritional properties. Carbohydrases (xylanase and β -glucanase) and phytases are considered the main alternatives to the problems generated by NSP and phytate, respectively. In this context, this study aimed to evaluate the effect of isolated and combined supplementation of xylanase- β -glucanase complex and phytase in entirely plant-based diets on energy and nutrients digestibility, including minerals and amino acids availability, and fecal excretion of nitrogen and phosphorus in Nile tilapia juveniles. Four diets were tested, a control diet (CON) without enzymes, a phytase diet (PHY), a xylanase- β -glucanase diet (XB), and a diet with phytase, xylanase, and β -glucanase (PHY+XB). Phytase (Natuphos[®] E) was supplemented at 1000 FTU kg⁻¹ and xylanase- β -glucanase complex (Natugrain[®] TS) at 1120 TXU and 500 TGU kg⁻¹. Two hundred seventy-two masculinized fish (22.52 \pm 0.65 g) were distributed in a randomized block design with four treatments and four replications, in sixteen cylindrical-conical fiberglass tanks (150 L), adapted for feces collection (modified Guelph system). Fish were fed six times a day to apparent satiation, with experimental diets containing 0.5% chromium oxide, for 21 days. Diets with xylanase and β -glucanase supplementation increased the dry matter, starch, and lipids digestibility ($P < 0.001$), and copper availability ($P < 0.001$). At the same time, diets with phytase supplementation increased dry matter, crude energy, starch, and ash digestibility ($P < 0.001$), and magnesium, manganese, and zinc availability ($P < 0.001$). Phytase also improved the availability of most amino acids, including arginine ($P = 0.019$), phenylalanine ($P = 0.001$), histidine (P

= 0.019), lysine (P = 0.019), methionine (P = 0.001) and valine (P = 0.025), and when combined with xylanase and β -glucanase enhanced the availability of isoleucine (P = 0.004), leucine (P = 0.004), threonine (P = 0.002), glutamic acid (P = 0.00), cystine (P < 0.001) and serine (P = 0.01). Enzymatic combination (PHY+XB) shows a synergy effect on protein digestibility (P < 0.001) and calcium, iron, and phosphorus availability (P < 0.001). When compared to control diet, xylanase- β -glucanase and phytase supplementation reduce fecal excretion of nitrogen (P = 0.007) and phosphorus (P < 0.001) by 30 and 49.5%, respectively. In conclusion, the isolated and combined supplementation of xylanase- β -glucanase complex and phytase improves energy and nutrients digestibility in plant-based diets and reduces the excretion of nitrogen and phosphorus by fish, contributing to tilapia production with less environmental impact.

Keywords: Non-starch polysaccharides (NSP), phytate, enzymes, fish.

I. INTRODUÇÃO

1. Panorama da tilapicultura nacional e internacional

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a quarta espécie de peixe mais produzida no mundo, com 4.200 toneladas produzidas em 2016 (FAO, 2018). Com representação de 9,9% na produção mundial total de peixes e crescimento de 10% na sua produção, desde 2014, a tilapicultura vem se destacando no cenário piscícola mundial (FAO, 2018). Características da espécie como, produção de alevinos durante o ano todo, capacidade de adaptação em diversos ambientes de cultivo, elevada resistência a condições de estresse e carne branca de boa qualidade, favorecem à tilápia como espécie de produção (PeixeBR, 2020). Sua expansão na última década, também se deve aos avanços na área da nutrição e programas de melhoramento genético (FAO, 2018). Apesar do constante crescimento na tilapicultura, ainda existe demanda por parte do mercado consumidor, visto que em 2016 foi registrado a captura mundial de 1.600 toneladas de tilápias e outros ciclídeos (FAO, 2018). A previsão é que em 2030, países consolidados na produção de peixes de água doce possam elevar a produção de carpas, tilápias e bagres (particularmente *Pangasius* spp.) em 62% da produção aquícola mundial, em comparação aos 58% apresentado em 2016 (FAO, 2018).

A China se destaca na produção mundial de tilápias, com 1.930 mil toneladas produzidas em 2019, seguido pela Indonésia (1.350 mil toneladas), Egito (900.000 toneladas), Brasil (432.149 toneladas) e Tailândia (350.000 toneladas), respectivamente (PeixeBR, 2020). Devido a sua alta produção, a China vem exportando quantidades importantes e cada vez maiores de tilápia para vários países africanos. Por outro lado, os

Estados Unidos e em menor escala a União Europeia vem adquirindo importância como polos importadores de tilápia processada (FAO, 2018).

No Brasil foram produzidas 432.149 toneladas de tilápias em 2019, indicando crescimento de 7,96% na sua produção em relação a 2018 (PeixeBR, 2020). Tendo em vista que a espécie se encontra em 110.072 estabelecimentos agropecuários por todo o Brasil, é notável que 57% da produção nacional de peixes esteja voltada para a tilapicultura (PeixeBR, 2020). Este incremento na produção, vem tornando o Brasil um potencial exportador de tilápias e seus subprodutos, gerando a receita de 9,7 milhões de dólares pelas 5.322,49 toneladas exportadas em 2019 (PeixeBR, 2020). Seu crescimento de 19% em relação as 4.484 toneladas exportadas em 2018, deve-se em maior parte à aprovação da prática de “drawback” pelo MDIC (Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços), em que empresas exportadoras foram capazes de adquirir insumos desonerados de tributos federais para a produção, industrialização e comercialização da tilápia e seus subprodutos (PeixeBR, 2020). Esta prática contribuiu para a exportação de 3.023 toneladas de tilápias, representando 57% do volume total exportado em 2019 (PeixeBR, 2020).

Entre os maiores estados produtores de tilápia no Brasil estão o Paraná (146.212 toneladas), São Paulo (64.900 toneladas), Santa Catarina (38.559 toneladas), Minas Gerais (36.350 toneladas) e Pernambuco (25.421 toneladas), respectivamente (PeixeBR, 2020). O crescimento da tilapicultura no Paraná se deve aos constantes investimentos da agroindústria, já que 95% da produção total de peixes é destinado a criação de tilápias (PeixeBR, 2020). Sobretudo na região oeste do estado (Toledo e Cascavel), onde se concentra 69% da produção do total do estado (IBGE, 2017). Incentivos por parte dos sistemas de integração nas cooperativas para a criação de tilápias em viveiros escavados e a nova legislação do governo estadual na liberação e validade das licenças ambientais estimulam a tilapicultura no Paraná e incentivam sua produção em outros estados (PeixeBR, 2020).

Com a previsão de crescimento na tilapicultura nacional e internacional espera-se o surgimento de novas tecnologias que possam contribuir com a criação da espécie. Haja vista que a nutrição é responsável por 50 a 60% dos custos de produção nas pisciculturas (PeixeBR, 2020). Todavia, faz-se necessário o incentivo à pesquisa em busca de dietas que otimizem o desempenho e saúde dos peixes e, ao mesmo tempo que contribuam para a criação ambientalmente sustentável e ajudem a reduzir o custo de produção.

2. Fitase na nutrição de peixes

2.1 Ácido fítico e seu papel na nutrição de peixes

O ácido fítico [1, 2, 3, 4, 5, 6-hexaquis (dihidrogenofosfato)-mio-inositol] é a principal forma de armazenamento de fósforo das plantas (Kumar et al., 2012). Sua estrutura química é conformada por seis grupos fosfatos ligados ao anel de mio-inositol (Figura 1). O ácido fítico possui 12 prótons substituíveis, sendo capaz de se complexar a cátions multivalentes e proteínas carregadas positivamente (Costello et al., 1976). Por este motivo, é considerado uma molécula instável e sua forma varia conforme a presença de íons metálicos e pH do meio (Oatway et al., 2001).

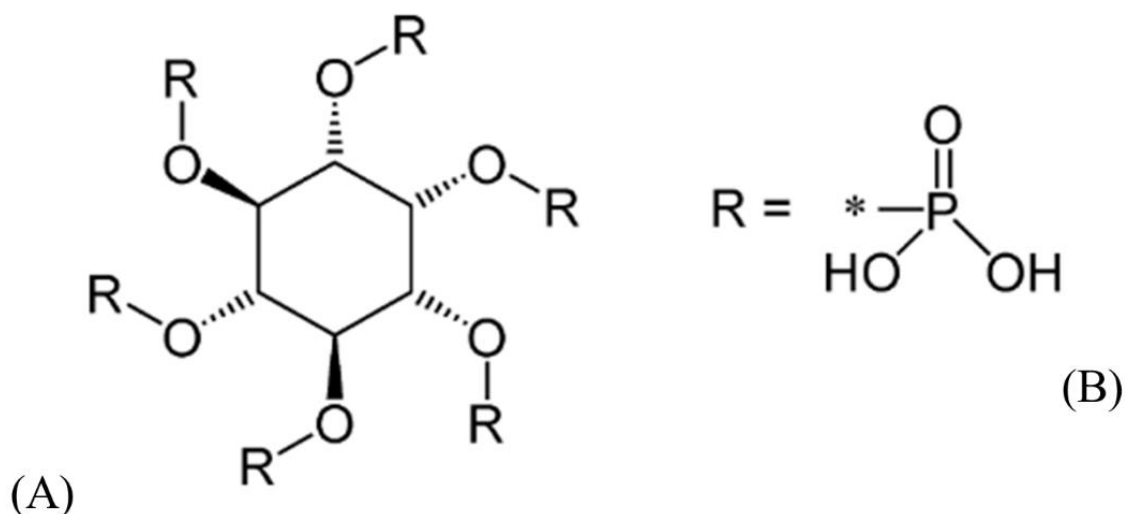


Figura 1. Estrutura química do ácido fítico (A) e radical mostrando o grupo fosfato do ácido fítico (B). Adaptado de Kumar et al. (2010).

O ácido fítico pode existir na forma de ácido livre, fitato ou fitina dependendo da presença de íons metálicos e pH fisiológico (Oatway et al., 2001). O ácido fítico é a forma livre do mio-inositol hexaquisfosfato (IP6), enquanto o fitato é o sal do ácido fítico, podendo estar associado a um ou a vários minerais (Cowieson et al., 2016). Por sua vez, a fitina se refere exclusivamente ao sal misto do ácido fítico comumente associado ao magnésio, potássio e cálcio, encontrado originalmente em grãos de cereais e sementes de leguminosas (Lott et al., 2000). Embora o ácido fítico, fitato e fitina possuam estruturas químicas diferenciadas, sua terminologia têm sido usada indistintamente na maior parte da literatura relacionada aos sistemas de ácido fítico (Oatway et al., 2001).

O fitato é considerado fator antinutricional em dietas para peixes, pois reduz a digestibilidade da energia e nutrientes da dieta, piorando a conversão alimentar e desempenho dos peixes (Kumar et al., 2012). Além disso, o ácido fítico é considerado uma molécula indigestível e, portanto, o fósforo contido na molécula se encontra indisponível para os peixes, sendo totalmente excretado no ambiente aquático (Cowieson et al., 2016). Com a crescente substituição dos ingredientes de origem animal por ingredientes de origem vegetal em dietas para peixes, é esperado a otimização dos alimentos vegetais de forma a aproveitar o fósforo indisponível e reduzir as propriedades antinutricionais do ácido fítico nas dietas (Kumar et al., 2012).

Existe ampla variedade de alimentos vegetais utilizados em dietas para peixes (Tabela 1). Alimentos derivados de grãos de cereais e sementes de leguminosas são os principais ingredientes de origem vegetal utilizados em dietas comerciais para peixes (Eeckhout and De Paepe, 1994). O fitato constitui de 600 a 900 g kg⁻¹ do fósforo total nesses ingredientes, representando a cerca de 1 a 3 g kg⁻¹ do seu peso total (Graf, 1983). O alto teor de fitato em relação ao fósforo total nos alimentos vegetais (Tabela 1) demonstra a importância do ácido fítico em dietas para peixes, pois está diretamente relacionado com a queda no valor nutritivo das dietas, além do impacto causado pelo nitrogênio e fósforo no sistema de produção e no ambiente natural (Amirkolaie, 2011; Kumar et al., 2012).

Diversos fatores afetam o teor de fitato e fósforo disponível em grãos de cereais e sementes de leguminosas (Kumar et al., 2012). Esses fatores podem ser intrínsecos e/ ou extrínsecos à planta, tais como espécie, tipo de cultivar, local de cultivo, flutuações ambientais, condições de irrigação e aplicação de fertilizantes (Reddy et al., 1982). Um estudo feito por Barrier-Guillot et al. (1995) demonstrou que a crescente suplementação de fertilizante fosfatado na planta (P₂O₅) aumenta o teor de fitato sobre o fósforo total, comprovando dessa maneira que o fósforo excedente fornecido à planta é armazenado na forma de ácido fítico. Similarmente, o teor de ácido fítico na planta também é aumentado conforme a maturidade da semente, chegando ao seu ponto máximo quando o grão ou semente está maduro (Reddy et al., 1982).

Tabela 1. Fósforo total, fitato e atividade da fitase endógena nos principais ingredientes de origem vegetal utilizados em dietas para peixes. Adaptado de Kumar et al. (2012).

Ingredientes	Atividade da fitase endógena (FTU kg ⁻¹)	Fósforo total (g kg ⁻¹)	Fitato (g kg ⁻¹)	Proporção de fitato no fósforo total (%)
Milho	24	2,5	1,7	73
Gérmen e farelo de milho desengordurado grosso	41	6,6	4,2	64
Gérmen e farelo de milho desengordurado fino	56	12,1	7,8	65
Farelo de arroz	129 (70 a 190)	17,51	15,83	90,2
Arroz	112	1,2	0,8	65
Quirera de arroz	20	0,85	0,4	47,1
Farelo de trigo	2173 (1700 a 3090)	10,96	8,36	76,3
Subprodutos do trigo	2173 (1700 a 3090)	8,02	7	87,3
Trigo	503 (255 a 840)	3,08	2,2	74,9
Sorgo	35 (10 a 125)	2,92	2,41	82,7
Cevada	348 (130 a 595)	2,73	1,86	67,3
Aveia	38	2,43	2,1	86,4
Aveia, descascada	50	2,25	1,15	51,1
Farelo de amendoim	-	6	4,6	77
Soja	40	5,55	3,08	55,5
Farelo de soja	42 (10-95)	6,66	4,53	68,3
Semente de algodão	<10	6,05	4,25	70,2
Farelo de semente de algodão	11 (5-50)	11,36	9,11	80,5
Farelo de girassol	<10	9,05	7,48	82,8
Farelo de colza	-	11,8	7	59
Farelo de canola	5 (5-35)	8,76	6,69	76,4
Ervilha	58	3,45	1,67	48,4
Feijão fava	-	4,01	2,43	60

Na nutrição de peixes o ácido fítico é considerado uma molécula indigestível, pois animais monogástricos não possuem fosfatases no seu trato gastrointestinal (Cowieson et al., 2016). Na faixa média de pH, os grupos fosfato do ácido fítico possuem carga negativa podendo se ligar a cátions e moléculas com cargas positivas, como proteínas, lipídeos e amido (Kumar et al., 2012). Tais ligações podem interagir de formas diferentes com o ácido fítico, afetando a biodisponibilidade de minerais e digestibilidade de energia e nutrientes em dietas para peixes (Oatway et al., 2001; Sinha et al., 2011).

Íons metálicos podem se ligar a um ou mais grupos fosfato do ácido fítico formando complexos de solubilidade variável (Figura 2A). Paralelamente, esses complexos ainda são capazes de se ligar a outros cátions bivalentes e/ ou trivalentes, como cálcio, sódio, cloro, cobre, ferro, magnésio, manganês, estrôncio e zinco, e formar estruturas mais complexas (Oatway et al., 2001). Um dos minerais mais afetados pela complexação íon-fitato é o zinco, pois a ligação entre o zinco e o ácido fítico gera um complexo altamente insolúvel e estável (Kumar et al., 2012). Estudos em peixes demonstram que o ácido fítico pode afetar a disponibilidade de zinco nas dietas, além de reduzir a reabsorção de zinco endógeno pelos peixes (Cowieson et al., 2016).

Proteínas se ligam ao ortofosfato do ácido fítico por meio de cargas eletrostáticas (Figura 2B), formando complexos que chegam a afetar a solubilidade das proteínas dietéticas e ação das proteases digestivas no trato digestivo dos peixes (Selle et al., 2012). A formação do complexo fitato-proteína depende de vários fatores, como pH, ponto isoelétrico da proteína e níveis de cálcio e magnésio na dieta (Kumar et al., 2012). Em ambiente ácido, como o estômago da tilápia do Nilo (pH 1 a 2), metade da porção fosfato é carregada negativamente contribuindo para ligações eletrostáticas entre o ácido fítico e proteínas solúveis em grupos amino na lisina, grupos de imidazol na histidina e grupos guanidil na arginina, formando complexos binários de proteína-fitato (Selle et al., 2012). Em ambiente alcalino, como o intestino da tilápia do Nilo (pH 8,5 a 8,8), complexos ternários são favorecidos pelos cátions de cálcio e magnésio, os quais favorecem as interações proteína-proteína, formando agregação de proteínas e, quando os complexos proteína-fitato excedem um tamanho crítico, culminam na sua precipitação (Selle et al., 2012). A formação de complexos binários e terciários impede a digestão de proteínas dietéticas e, conseqüentemente, a absorção de aminoácidos pelo intestino do peixe (Kumar et al., 2010).

Lipídeos podem se ligar ao ácido fítico formando as chamadas “lipofitinas” que são um complexo de Ca/Mg-fitato, lipídeos e peptídeos (Kumar et al., 2012). Esses

complexos restringem a utilização da energia derivada de lipídeos, pela formação de sabões metálicos no lúmen intestinal dos animais monogástricos (Kumar et al., 2010). Apesar da sua presença em suínos e aves, ainda há escassez de evidências que apoiam a existência do complexo fitato-lipídeo em peixes (Kumar et al., 2012). Por outro lado, Usmani e Jafri (2002) verificaram menor teor de gordura na carcaça de alevinos de carpa mrigal, *Cirrhinus mrigala*, alimentados com dietas contendo alto teor de fitato em relação aos que foram alimentados com dietas defitinizadas.

O amido pode se ligar diretamente aos grupos fosfato do ácido fítico por meio de ligações de hidrogênio (Figura 2C) ou de forma indireta pela associação às proteínas de ligação que estão intimamente associadas aos grânulos de amido nas plantas (Rickard and Thompson, 1997). Além da complexação entre o ácido fítico e amido, o fitato pode inibir diretamente a atividade da amilase endógena dos peixes ou por meio da quelação do cálcio, que atua como cofator necessário para a formação da amilase (Oatway et al., 2001).

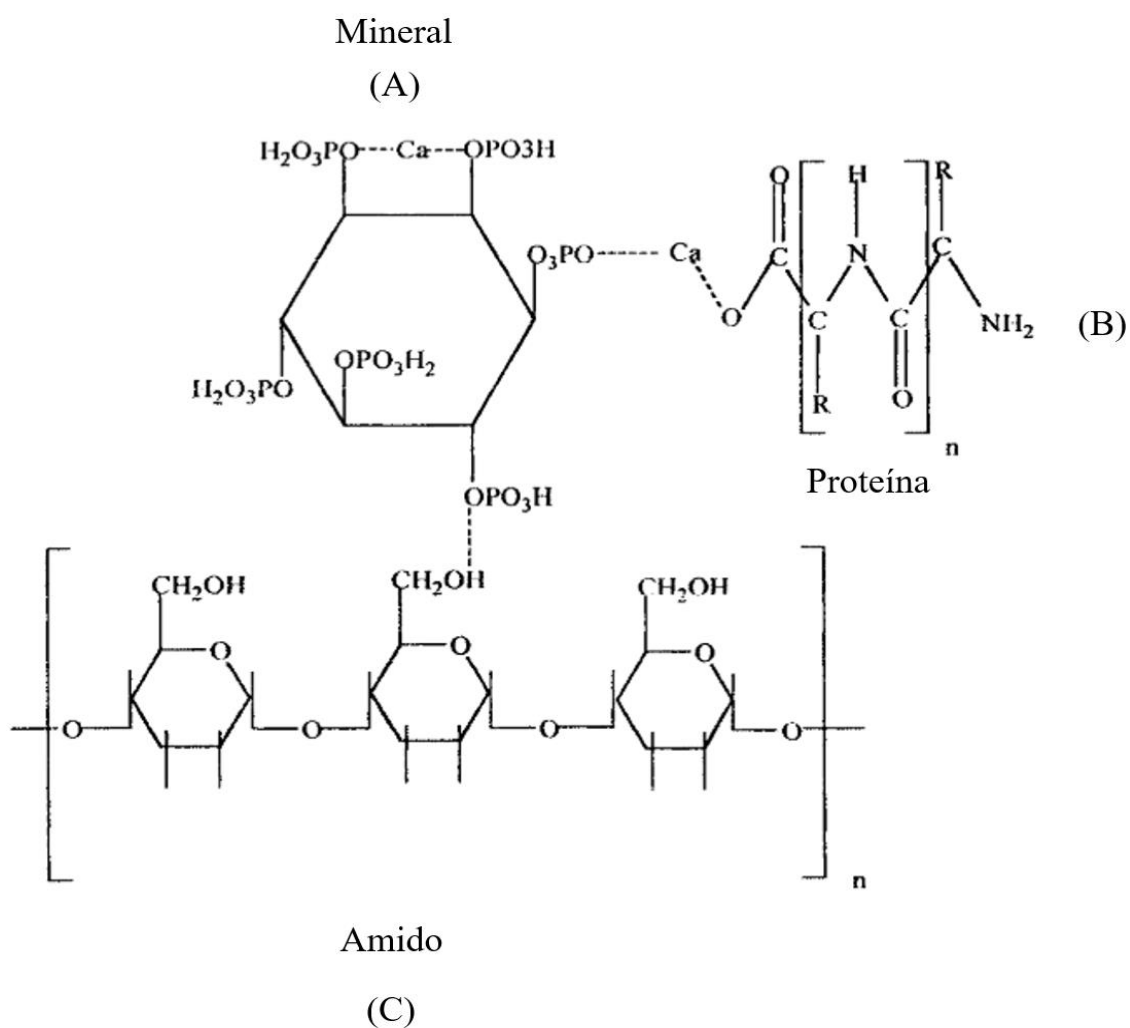


Figura 2. Interações do ácido fítico com minerais (A), proteínas (B) e amido (C). Adaptado e modificado de Rickard e Thompson (1997).

O fitato contido nos alimentos vegetais é de interesse na indústria de rações para peixes, já que processo de extrusão e peletização não inativam a molécula (Francis et al., 2001). O fitato presente na dieta eleva o custo de produção das rações balanceadas por causa da suplementação de fósforo inorgânico (fosfato bicálcico) a fim de atender à exigência de fósforo disponível para os peixes, incrementando assim, a excreção de fósforo na forma de fitato nos efluentes aquícolas, podendo contribuir para a eutrofização em águas abertas e afetando negativamente o ecossistema aquático (Kumar et al., 2012). Diferentes métodos de processamento para a remoção de fitato em alimentos vegetais foram estudados, como moagem e cozimento, germinação, fermentação, alteração genética (transgênese e mutação), umedecimento e autólise, entre outros (Kumar et al., 2012). Entre os diversos métodos, o uso de fitase exógena parece ser a solução mais promissória para maximizar o valor nutritivo das dietas à base de ingredientes de origem vegetal, além de disponibilizar o fósforo contido no fitato melhora a digestibilidade da energia e outros nutrientes nas dietas, reduzindo a carga poluente do nitrogênio e/ ou fósforo nos distintos sistemas de criação de peixes (Amirkolaie, 2011).

2.2 Enzima: Fitase

Fitase (mio-inositol hexaquisfosfato fosfohidrolase) é uma enzima fosfatase que catalisa a hidrólise do ácido fítico em mio-inositol e fósforo inorgânico (Figura 3) (Lemos and Tacon, 2017). A liberação do fósforo inorgânico na molécula de ácido fítico acontece por meio de uma série de reações de desfosforilação que acabam gerando séries menores de ésteres de fosfato de mio-inositol, sendo eles, pentaquis- (IP5), tetraquis- (IP4), tris- (IP3), bis- (IP2), monofosfato (IP1) e, por último, fósforo inorgânico (Vats and Banerjee, 2004). Dependendo do local da desfosforilação inicial no anel de mio-inositol do ácido fítico, a União Internacional de Química Pura e Aplicada e a União Internacional de Bioquímica (IUPAC-IUB) podem classificar a fitase em duas categorias: 3-fitase [EC 3.1.3.8], com desfosforilação inicial no fósforo da posição C3 do anel de mio-inositol hexaquisfosfato e normalmente oriundo de fungos, e 6-fitase [EC 3.1.3.26], com desfosforilação inicial no fósforo da posição C6 do ácido fítico e comumente encontrado em bactérias e sementes de angiospermas (Selle and Ravindran, 2007).

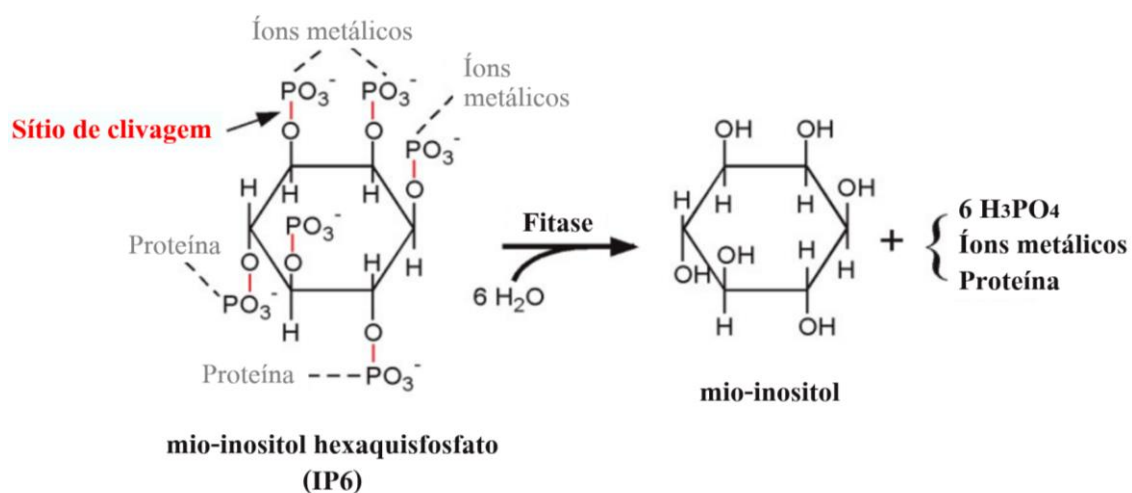


Figura 3. Representação química da hidrólise do fitato, em que a fitase cliva as ligações fosfodiéster (linhas vermelhas) liberando o grupo mio- inositol dos íons, proteínas e grupos fosfato antes ligados (Chen et al., 2015).

Características físico-químicas e propriedades catalíticas de fitases provenientes de várias fontes indicam que é uma enzima éster-hidrolisante com peso molecular estimado de 35 a 700 kDa e que geralmente são ativas em pH ligeiramente ácido (4,5 a 6,0) com temperaturas de 45 a 60°C (Türk et al., 1996). A atividade da fitase é expressa em unidades de fitase ativa (FTU), uma unidade de fitase ativa é definida como a quantidade de fitase necessária para liberar 1µmol de fósforo inorgânico por minuto de 0,0051 mol L⁻¹ de fitato de sódio em pH 5,5 a 37°C (Engelen et al., 2001). Esta definição fornece a medida útil da atividade da fitase e representa referência padrão sob condições de ensaio bem definidas, tais como pH, temperatura, duração, conteúdo mineral, agitação, etc (Kumar et al., 2012). Portanto, em dietas para peixes a atividade da fitase normalmente é mensurada na medida padrão de FTU kg⁻¹ da dieta (Hassaan et al., 2019).

Alimentos vegetais comumente utilizados em dietas comerciais para peixes possuem atividade de fitase endógena (Tabela 1). A fitase endógena dos vegetais é do tipo 6-fitase e sua função é a de hidrolisar o fitato para disponibilizar o fósforo durante a germinação da planta na presença de água (Kumar et al., 2012). Embora a fitase endógena esteja presente na camada de aleurona dos grãos de cereais e sementes leguminosas, a temperatura durante a extrusão e peletização de rações chega a reduzir ou até eliminar a atividade da fitase nativa dos vegetais, impedindo assim sua possível ação enzimática dentro do trato gastrointestinal dos animais monogástricos (Kumar et al., 2012). Por causa da sensibilidade a altas temperaturas e resistência a uma estreita faixa de pH (4 a 7,5), a atividade da fitase dos vegetais é menos efetiva do que as fitases microbianas (Cao et al., 2007).

Fitases microbianas são amplamente utilizadas na nutrição de animais monogástricos (Cao et al., 2007). Natuphos® foi a primeira fitase comercialmente disponível em 1991 e foi gerada a partir de uma cepa geneticamente modificada de *Aspergillus niger* (Selle and Ravindran, 2007). Atualmente, há ampla variedade de fitases comerciais disponíveis no mercado, normalmente derivadas de cepas geneticamente modificadas de fungos ou usando tecnologia de DNA recombinante (Cao et al., 2007). As três fitases comumente utilizadas na alimentação animal são derivadas do fungo *Aspergillus niger*, que é do tipo 3-fitase, e bactérias *Escherichia coli* e *Peniophora lycii*, que são do tipo 6- fitase (Cao et al., 2007). Fitases exógenas podem ser incluídas na alimentação de peixes como pó, granulado ou líquido, via pós-peletização (pulverização nos pellets) ou pré-tratamento (adicionado à mistura de ingredientes) para evitar problemas de estabilidade térmica em altas temperaturas de peletização (> 95 °C) (Rychen et al., 2017). De forma geral, o método de pós- peletização é fácil e mais prático de realizar. No entanto, o pré-tratamento é considerado mais eficiente em comparação à pós-peletização, pois é requerido menor quantidade de fitase exógena adicionada na dieta (Wang et al., 2009).

Empresas que comercializam a fitase exógena como aditivo para a alimentação animal buscam otimizar a eficácia da atividade da enzima (Kumar et al., 2012). Entre os principais fatores a serem considerados para a eficácia das fitases comerciais estão: a termoestabilidade, a resistência a oscilações de pH e a estabilidade à pepsina endógena do animal (Chen et al., 2015). Dessa forma, o nível de suplementação da fitase exógena em dietas para peixes finalmente dependerá de fatores relacionados ao peixe (espécie, idade e estado fisiológico) e a quantidade de fitato na dieta (Cao et al., 2007).

2.3 Fitase na digestibilidade de nutrientes em peixes

Os efeitos da fitase exógena em dietas para animais monogástricos é mais compreendida na nutrição de aves e suínos do que em peixes (Cowieson et al., 2016). Um dos empecilhos para sua total compreensão se deve à existência das diferentes espécies de peixes produzidas na piscicultura que acabam apresentando divergências na anatomia e fisiologia digestiva (Lemos and Tacon, 2017). Em razão disso, nas duas últimas décadas vem sendo realizadas pesquisas em relação a suplementação de fitase em dietas para peixes a fim de compreender suas especificidades quanto à digestibilidade de energia e nutrientes (Tabela 2). Tais trabalhos demonstraram a eficiência da suplementação da fitase

envolvendo a biodisponibilidade de minerais e digestibilidade da energia e proteínas em dietas para peixes carnívoros, como a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Vandenberg et al., 2011), herbívoros como a carpa capim, *Ctenopharyngodon idellus* (Liu et al., 2013) e onívoros, como as tilápias, *Oreochromis niloticus* (Gonçalves et al., 2005; Liebert and Portz, 2007, 2005; Silva et al., 2005).

O uso combinado da fitase com outras enzimas exógenas também vem sendo estudado, pois acredita-se que sua ação combinada possa potencializar o efeito da fitase (Lemos and Tacon, 2017). No estudo de Li et al. (2019) com tilápias (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) foi verificado que combinação de fitase e protease melhora a utilização do fósforo e proteína dietética, diminuindo a inclusão de fósforo inorgânico e farinha de peixe na dieta. Outra enzima frequentemente estudada junto com a fitase é a xilanase, pois em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) demonstra ter eficácia quanto à digestibilidade de energia e nutrientes da dieta, melhorando o desempenho dos peixes (Maas et al., 2020, 2019, 2018). Além disso, a suplementação de fitase e xilanase mostra ter efeito na redução da excreção do nitrogênio e fósforo pelos peixes, como observado em robalos, *Lateolabrax japonicus* (Ai et al., 2007). Portanto, a combinação enzimática da fitase com outras enzimas parece ser promissora, uma vez que há indícios de que tais combinações podem levar a benefícios sinérgicos, melhorando o desempenho dos peixes.

Tabela 2. Suplementação de fitase sobre a biodisponibilidade de minerais e digestibilidade de nutrientes em dietas para peixes. Adaptado de Lemos e Tacon (2017).

Espécie	Composição da dieta	Fonte de fitase/ método de aplicação	Nível de inclusão na dieta (FTU kg ⁻¹)	Melhoria na biodisponibilidade de minerais e digestibilidade de nutrientes	Referência
Carpa capim <i>Ctenopharyngodon idellus</i> (juvenis)	Farelo de soja (35%), farelo de colza (22%), farelo de algodão (18%) e farinha de trigo (17%)	<i>Pedobacter</i> sp./ pulverizado nos pellets	500 a 1500	Dose- resposta positiva, fósforo (>100%), cálcio (9%), proteína (10%), lipídeos (65%), aminoácidos: Lis (9%), Met (6%), Tre (10%), Val (8%), Ile (9%), Leu (9%), Fen (8%), His (9%), Asp (8%), Ser (9%), Glu (5%), Gli (12%), Ala (9%), Pro (10%), Cis (9%), Tir (8%)	Liu et al. (2013)
Panga <i>Pangasius pangasius</i> (alevinos)	Farelo de soja (45%), trigo (15%) e milho (15%)	<i>Aspergillus niger</i> / pulverizado nos pellets	150 a 2000	Dose- resposta positiva, Acima de 250 FTU kg ⁻¹ : zinco (6%), potássio (1%), cobre (10%) Acima de 500 FTU kg ⁻¹ : cálcio (>100%), fósforo (>30%) Acima de 1000 FTU kg ⁻¹ : magnésio (31%), manganês (75%), ferro (81%)	Debnath et al. (2005)
Salmão do Atlântico <i>Salmo salar</i> (juvenis)	Concentrado protéico de soja 60%	<i>Aspergillus niger</i> / adicionado à mistura de ingredientes	250 a 4000	Dose- resposta positiva, Acima de 4000 FTU kg ⁻¹ : fósforo (81%) Acima de 1000 FTU kg ⁻¹ : magnésio (30%), zinco (38%)	Carter and Sajjadi (2011)

Espécie	Composição da dieta	Fonte de fitase/ método de aplicação	Nível de inclusão na dieta (FTU kg ⁻¹)	Melhoria na biodisponibilidade de minerais e digestibilidade de nutrientes	Referência
	Farelo de soja (23%), milho (22%) e trigo (32%)	NE/ adicionado à mistura de ingredientes	500 a 4000	Proteína (3%) a 500 FTU kg ⁻¹ , fósforo (45%) e cálcio (>100%), dose-resposta positiva acima de 1000 FTU kg ⁻¹	Portz and Liebert (2004)
Tilápia do Nilo <i>Oreochromis niloticus</i> (juvenis)	Milho, sorgo, farelo de arroz, farelo de trigo, farelo de soja, glúten de milho, farelo de girassol e farelo de algodão (60% na dieta de referência)	<i>Aspergillus niger</i> / adicionado à mistura de ingredientes	1000 e 2000	<p>A 1000 FTU kg⁻¹:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Magnésio: milho (20%), sorgo (60%), soja (12 a 24%), semente de algodão (14%) - Zinco: sorgo (>100%), soja (21%) - Cobre: sorgo (100%), arroz (>100%), soja (>100%), semente de algodão (70%) - Manganês: milho (80%), soja (>100%) <p>A 2000 FTU kg⁻¹:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Magnésio: farelo de trigo (20%), girassol (27%) - Cobre: glúten de milho (63%) - Manganês: farelo de trigo (66%), sorgo (63%) <p>Dose-resposta positiva:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Magnésio: farelo de arroz (46%), glúten de milho (>100%) - Zinco: milho (49%), farelo de arroz (>100%), glúten de milho (>100%) - Cobre: milho (>100%), girassol (>100%) - Manganês: farelo de arroz (>100%), semente de algodão (>100%) 	Gonçalves et al. (2005)

NE, não especificado

Espécie	Composição da dieta	Fonte de fitase/ método de aplicação	Nível de inclusão na dieta (FTU kg ⁻¹)	Melhoria na biodisponibilidade de minerais e digestibilidade de nutrientes	Referência
	Farelo de soja (24%), milho (22%), trigo (32%) e glúten de trigo (11%)	<i>Hansenula polymorpha</i> GM ou <i>Aspergillus oryzae</i> GM expressados na <i>Peniophora lycci</i> / NE	500 a 1250	<i>H. polymorpha</i> a 500 FTU kg ⁻¹ : cálcio (42%) Dose- resposta positiva: proteína (4%, acima de 750 FTU kg ⁻¹), fósforo (62%, acima de 1000 FTU kg ⁻¹) <i>A. oryzae</i> Dose-resposta positiva: proteína (3%, acima de 750 FTU kg ⁻¹), cálcio (55%, acima de 750 FTU kg ⁻¹), fósforo (70%, acima de 1250 FTU kg ⁻¹)	Liebert and Portz (2007)
Tilápia do Nilo <i>Oreochromis niloticus</i> (juvenis)	Quirera de arroz (48%) e farelo de soja (42%)	<i>Aspergillus niger</i> / pulverizado nos pellets	250 a 1000	Dose- resposta positiva: proteína (2%) Acima de 500 FTU kg ⁻¹ : fósforo (6%)	Silva et al. (2005)
	Soja (26%), farelo de colza (17%) e farelo de trigo (25%)	6-Fitase expressado em <i>Aspergillus oryzae</i> / pulverizado a vácuo	500 a 2000	Fósforo (70%), dose- resposta positiva	Verlhac-Trichet et al. (2014)

NE, não especificado

GM, geneticamente modificado

Espécie	Composição da dieta	Fonte de fitase/ método de aplicação	Nível de inclusão na dieta (FTU kg ⁻¹)	Melhoria na biodisponibilidade de minerais e digestibilidade de nutrientes	Referência
	Farelo de soja (50%)	NE/ adicionado à mistura de ingredientes	500 a 4000	Fósforo (>100%), manganês (>100%), dose- resposta positiva	Sugiura et al. (2001)
Truta arco-íris <i>Oncorhynchus mykiss</i> (juvenis)	Farelo de soja (60%)	<i>Aspergillus niger</i> / pulverizado nos pellets	500 a 3000	Fósforo (57%), zinco (90%), dose- resposta positiva	Wang et al. (2009)
	Fontes vegetais 58% (farelo de glúten de milho)	<i>Aspergillus niger</i> / adicionado à mistura de ingredientes	3000	Fósforo (60%), cálcio (70%), cinzas (68%), manganês (60%), magnésio (45%), ferro (39%), zinco (12%), energia (3%) e proteína (2%)	Vandenberg et al. (2011)

NE, não especificado

3. Xilanase e β -glucanase na nutrição de peixes

3.1 Polissacarídeos não amiláceos e seu papel na nutrição de peixes

Polissacarídeos não amiláceos (PNAs) são um grupo de polissacarídeos complexos, predominantemente formados por monômeros de pentoses (arabinose e xilose) e hexoses (galactose, β -glucose e manose) ligados entre si (Sinha et al., 2011). Os polissacarídeos não amiláceos são responsáveis pela formação da parede celular das células vegetais e podem ser localizados estrategicamente nos componentes estruturais da parede celular, especificamente: celulose, hemicelulose, pectina, glicoproteínas e lignina (Figura 4) (Van Barneveld, 1999).

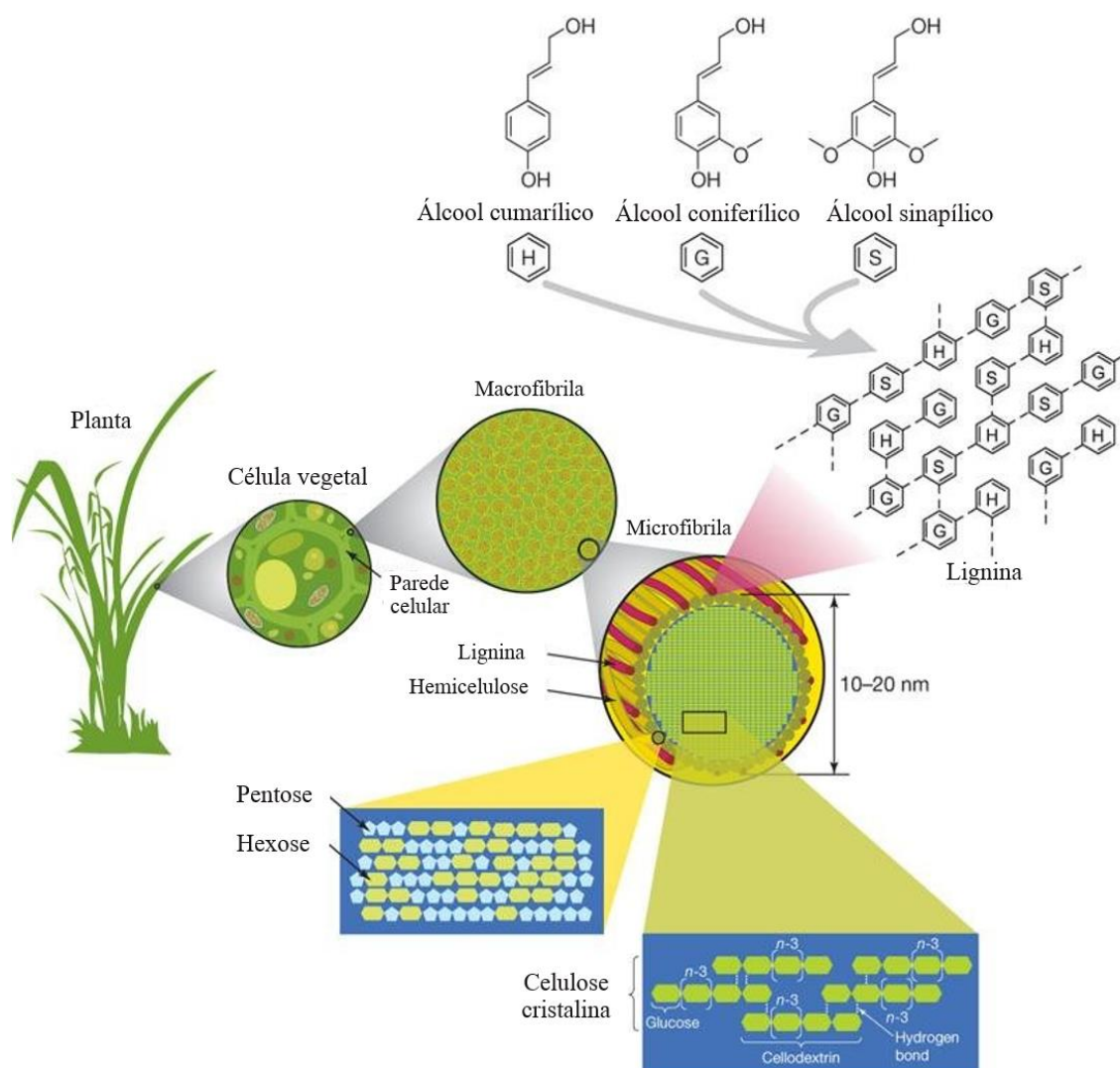


Figura 4. Estrutura da lignocelulose (Nunes and Kunamneni, 2018).

Os polissacarídeos não amiláceos podem ser classificados de acordo com diferentes critérios (Sinha et al., 2011). Na nutrição de ruminantes, os PNAs são classificados conforme a sua solubilidade, sendo eles: fibra bruta, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido (Sinha et al., 2011). Fibra bruta (FB) refere-se aos restos de material vegetal após extração com solução ácida e alcalina, e compreende porções variáveis de PNAs (Van Soest and Wine, 1967). A fibra em detergente neutro (FDN) compreende a porção insolúvel dos PNAs, principalmente, celulose, hemicelulose e lignina (Van Soest and Wine, 1967), enquanto a fibra em detergente ácido (FDA) é a porção insolúvel dos PNAs composta em grande parte, mas não unicamente, de celulose e lignina (Van Soest, 1963). Apesar dessa categorização ser frequentemente utilizada na nutrição ruminantes, carece de precisão quanto às estruturas químicas e funções biológicas dos PNAs, tornando duvidoso o valor nutricional de tais compostos na nutrição monogástrica (Sinha et al., 2011). Diante disso, Bailey (1973) propôs uma categorização mais clara com base na estrutura química dos PNAs, dividindo-os em três grupos principais: Celulose, polímeros não celulósicos e polissacarídeos pécticos (Tabela 3).

Na literatura relacionada a nutrição de animais monogástricos, os PNAs frequentemente são descritos como solúveis e insolúveis (Francis et al., 2001). Dentre os PNAs solúveis se destacam os arabinosilanos e β -glucanos de ligação mista que compõem a fração solúvel da hemicelulose, os quais aumentam a viscosidade intestinal dos animais e são atribuídos como os principais responsáveis pelas propriedades antinutricionais dos PNAs (Sinha et al., 2011). Por outro lado, dentre os PNAs insolúveis destaca-se a celulose, polissacarídeo caracterizado por impedir a permeabilidade da parede celular, resultando na diminuição da digestibilidade de energia, açúcares e proteínas (Sinha et al., 2011). Dessa forma, tanto os PNAs solúveis como insolúveis podem reduzir o valor nutritivo das dietas à base de ingredientes de origem vegetal, gerando grande impacto na piscicultura pelo declínio na otimização dos alimentos vegetais utilizados em dietas para peixes (Wyatt et al., 2008).

Tabela 3. Classificação dos polissacarídeos não amiláceos (Sinha et al., 2011).

Categoria	Resíduo monomérico	Ligação	Fontes
Celulose	Glicose	β - (1→ 4)	Maioria de cereais e legumes
Polímeros não celulósicos			
Arabinoxilanos	Arabinose e xilose	β - (1→ 4) – unidades de xilose ligadas	Trigo, centeio, cevada, aveia, arroz e sorgo
β - glucanos de ligação mista	Glicose	β - (1→ 3) e β - (1→ 4)	Aveia e cevada
Mananos	Manose	β - (1→ 4)	Semente de café
Galactomananos	Galactose e mananos	Cadeias de manano com ligação β - (1→ 4) com grupos laterais de galactosil com ligação α - (1→ 6)	Goma de alfarroba e goma guar
Glicomananos	Glicose e mananos	Cadeia de manano com ligação β - (1→ 4) com resíduos de glicose intercalados na cadeia principal	Polpa de beterraba, lírios e íris
Polissacarídeos pécticos			
Arabinanos	Arabinose	α - (1→ 5)	Coprodutos de cereais
Galactanos	Galactose	β - (1→ 4)	Farelo de feijão e polpa de beterraba
Arabinogalactanos (Tipo 1)	Arabinose e galactose	Esqueleto de galactano β - (1→ 4) substituído com ligação 5- e resíduos terminais de arabinose	Sementes de leguminosas
Arabinogalactanos (Tipo 2)	Arabinose e galactose	Polímeros de galactose com ligação β - (1→ 4) associados a resíduos de arabinose com ligações 3- ou 5-	Cotilédone de colza

Grãos de cereais e sementes de leguminosas são ricos em PNAs (Tabela 4). No trigo, por exemplo, o conteúdo de PNAs totais corresponde a cerca de 25% do grão total (Van Barneveld, 1999). Enquanto em derivados do trigo, como a farinha de trigo integral conformada pelo endosperma amiláceo, camada de aleurona, casca e gérmen (Figura 5) o conteúdo em arabinoxilanos é de $3,37 \text{ g kg}^{-1}$ (Fonseca, 2015) e β -D-glucanos de $4,48 \text{ g kg}^{-1}$ (Havrlentova and Kraic, 2006) e no farelo de trigo, correspondente exclusivamente a casca do trigo, a quantidade média em arabinoxilanos chega a corresponder $2,42 \text{ g kg}^{-1}$ do subproduto (Havrlentova and Kraic, 2006).

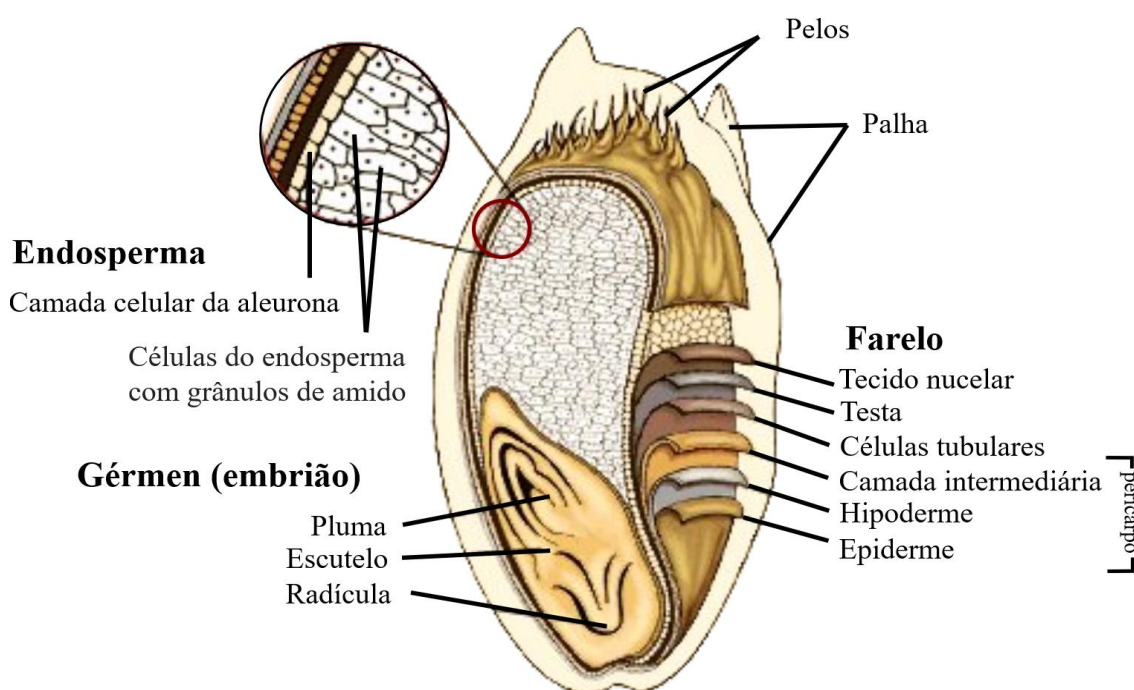


Figura 5. Estrutura do grão de trigo. Adaptado de Britannica (1996).

Fatores genéticos e ambientais à planta afetam o teor de PNAs em grãos de cereais e sementes de leguminosas (Sinha et al., 2011). Entretanto, o fator que mais parece influenciar o teor e fração do PNAs na dieta é a quantidade e tipo de ingredientes de origem vegetal incluídos na dieta, ou seja, se a maioria de ingredientes inclusos são provenientes de grãos/ sementes inteiros, grãos/ sementes sem casca ou farelos (Tabela 4) (Sinha et al., 2011).

Tabela 4. Conteúdo dos polissacarídeos não amiláceos (g kg^{-1} de matéria seca) nos principais ingredientes de origem vegetal utilizados em dietas para peixes (Sinha et al., 2011).

Ingredientes	Celulose	PNAs total	Lignina	PNAs solúveis	PNAs insolúveis
<i>Cereais</i>					
Milho	22	97	11	9	66
Trigo	20	119	19	25	74
Farelo de trigo	72	374	75	29	273
Centeio	16	152	21	42	94
Cevada: descascada	43	187	35	56	88
Cevada: sem casca	10	124	9	50	64
Glúten de milho	75	351	-	34	242
Aveia: descascada	82	232	66	40	110
Aveia: sem casca	14	116	32	54	49
Farelo da casca de aveia	196	505	148	13	295
<i>Legumes/ farelo de semente</i>					
Ervilhas	53	180	12	52	76
Farelo de soja	62	217	16	63	92
Farelo de colza	52	220	134	55	123
Tremoço	131	405	-	134	139
Torta de girassol	123	315	-	57	136
<i>Diversos</i>					
Polpa de beterraba sacarina	195	779	35	407	177
Torta de algodão	92	257	-	61	103
Farelo de algodão	90	283	-	66	127
Farelo de folhas de alfafa	139	329	-	77	113

PNAs possuem pouco ou nenhum valor nutricional para os peixes (Sinha et al., 2011). Isto se deve pela falta de carboidrases digestivas no animal capazes de hidrolisar a fração de PNAs presente na parede celular das células vegetais (NRC, 2011). A falta de enzimas endógenas resulta na integridade da fração insolúvel dos PNAs juntamente com outros nutrientes fortemente ligados à parede celular, impedindo o aproveitamento nutricional da energia, carboidratos e proteínas (Sinha et al., 2011). Além disso, a presença de PNAs solúveis induzem ao aumento da viscosidade intestinal ocasionando piora na conversão alimentar e desempenho dos peixes (Castillo and Gatlin, 2015).

Estudos em animais monogástricos têm demonstrado que o aumento da viscosidade na digesta é o principal fator responsável pela queda na digestibilidade da energia e nutrientes dos alimentos vegetais ricos em PNAs (Adeola and Cowieson, 2011). Isto se deve pela alta capacidade de retenção de água dos PNAs solúveis, ocasionando aumento na viscosidade da digesta (Castillo and Gatlin, 2015) e diminuição na taxa de passagem dos alimentos (Sinha et al., 2011). Embora os PNAs insolúveis aumentem a taxa de passagem do intestino em peixes, os PNAs solúveis fazem o processo inverso, reduzindo a taxa de passagem provocada pela viscosidade intestinal e, conseqüentemente, diminuindo a taxa de difusão das enzimas digestivas (amilases, proteases e lipases) com seus respectivos substratos alimentares (Sinha et al., 2011). Esta digesta retida acaba acumulando material particulado no intestino que contribui para uma adesão microbiana e menor fluxo de líquidos, acarretando na diminuição da renovação bacteriana na flora intestinal e aumentando a proliferação de bactérias nocivas no intestino (Vahjen et al., 1998). Essa modulação da microbiota intestinal a longo prazo pode levar a problemas relacionados à saúde e integridade intestinal do peixe que influenciarão na digestibilidade de energia e nutrientes da dieta (Sinha et al., 2011).

3.1.1 Arabinoxilano

Arabinoxilanos constituem parte importante da parede celular dos principais grãos de cereais utilizados na nutrição de peixes (Izydorczyk and Biliaderis, 1995). Na maioria de grãos chegam a corresponder de 60 a 70% da parede celular do endosperma e da camada celular da aleurona, com exceção da cevada (20%) e o arroz (40%) (Fincher and Stone., 1986). Em tecidos não endospermicos do trigo, particularmente o pericarpo e a testa (Figura 5), o conteúdo em arabinoxilanos chega a corresponder 64% do seu total (Selvendran and Du Pont, 1980).

As estruturas dos arabinoxilanos dos cereais são compostas predominantemente por duas pentoses, arabinose e xilose (Izydorczyk and Biliaderis, 1995). Sua estrutura molecular consiste em uma cadeia principal de resíduos de xilose unidos por ligações β -1,4, que substituintes de arabinose se encontram ligados aos átomos O-2 e O-3 dos resíduos de xilosil (Figura 6). Os resíduos de arabinose também podem se ligar a outros grupos, tais como: resíduos de ácido glucurônico, ligações cruzadas com o ácido ferúlico e grupos acetil (Izydorczyk and Biliaderis, 1995). Sua variante, o glucuronoarabinoxilano, além das substituições anteriormente mencionadas, possui ligações α -1,6 com o ácido glucurônico (Sørensen et al., 2007).

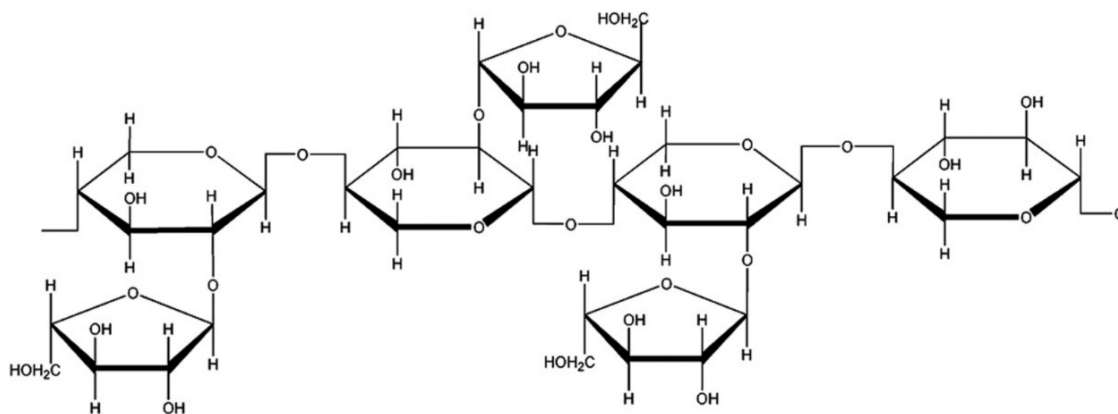


Figura 6. Estrutura química do arabinoxilano (Sinha et al., 2011).

Arabinoxilanos são capazes de formar soluções aquosas altamente viscosas (Sinha et al., 2011). De acordo Sternemalm et al. (2008) a perda das cadeias laterais de arabinose está relacionada com a baixa capacidade de retenção de água pelo arabinoxilano, pois quando a arabinose está ausente o arabinoxilano se liga com menos água e, conseqüentemente, torna-se menos solúvel. Outro tipo de interação que influencia a

viscosidade do arabinosilano são as várias ligações cruzadas tipo éster com a parede celular dos vegetais, o que resulta na insolubilidade da molécula (Mares and Stone, 1973). Arabinosilanos não unidos a parede celular são capazes de formar soluções altamente viscosas podendo absorver a cerca de 10 vezes seu peso em água (Mares and Stone, 1973). Na presença de agentes oxidativos, tais como peróxido de hidrogênio ou peróxidos podem desenvolver uma rede de gel rapidamente, devido ao reestabelecimento das suas ligações cruzadas (Geissmann and Neukom, 1973), podendo suportar até 100 g de água por grama de arabinosilano (Izydorczyk and Biliaderis, 1995).

À parte das ligações cruzadas covalentes, os arabinosilanos também podem formar “zonas de junção” por meio de ligações de hidrogênio intermoleculares entre as regiões que não foram substituídas na cadeia principal do xilano (Fincher and Stone., 1986). Tais interações na molécula podem ter grande importância na nutrição de peixes, pois as mudanças estruturais do arabinosilano afetam sua solubilidade e viscosidade, podendo levar a possíveis ações antinutricionais que irão influenciar na digestibilidade de nutrientes e desempenho dos peixes (Sinha et al., 2011).

3.1.2 Celulose

A celulose é o principal componente da parede celular das células vegetais, constituído por 3000 ou mais unidades de D-glicose unidos por ligações β -1,4 (Figura 7A) (Sinha et al., 2011). Por ser um polímero de cadeia linear sem enrolamentos ou ramificações acaba adotando conformação extensa e bastante rígida em forma de bastonete (Sinha et al., 2011). As várias hidroxilas nos resíduos de glicose em uma cadeia podem formar ligações de hidrogênio com as moléculas de oxigênio na mesma cadeia (ligações intramoleculares) ou na cadeia vizinha (ligações intermoleculares), mantendo as cadeias de celulose firmemente ligadas lado a lado (Figura 7B) (Sinha et al., 2011). O acúmulo de cadeias leva a formação de estruturas resistentes chamadas de microfibrilas (Figura 4), estas possuem regiões cristalinas, com mais organização entre as cadeias, e regiões amorfas, e são menos organizadas e mais flexíveis (Keshwani and Cheng, 2010). As microfibrilas de celulose também podem estar associadas com água e outros polissacarídeos, tais como os (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)- β -D-glucanos, heterosilanos (arabinosilanos) e glicomananos (Fincher and Stone., 1986).

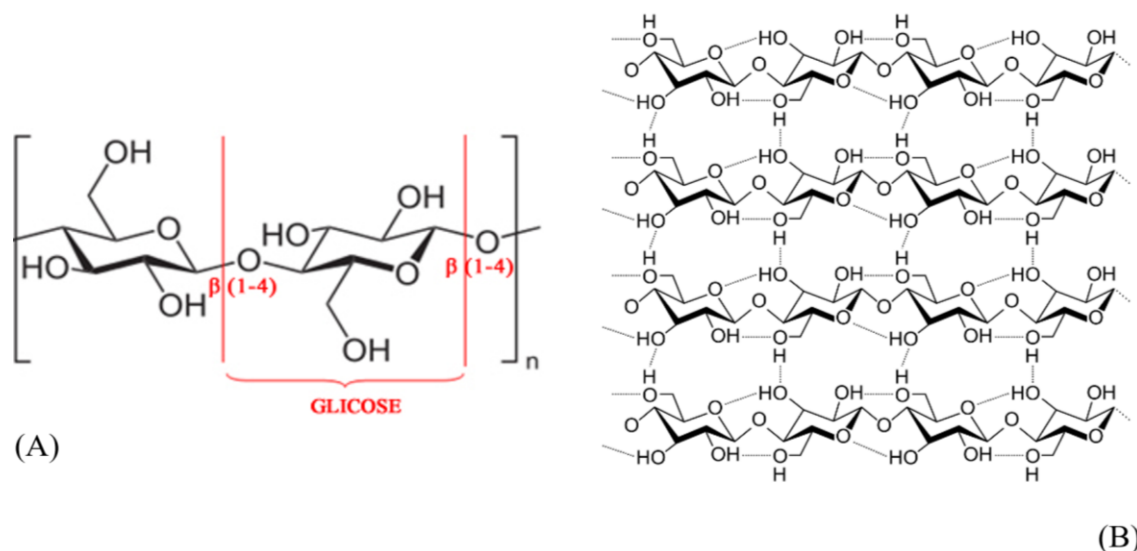


Figura 7. Estrutura química da celulose (A) e interação entre as cadeias de celulose com ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares (B). Adaptado de Sinha et al. (2011).

Diferentemente das ligações glicosídicas tipo α contidas no amido, as ligações tipo β da celulose acabam tornando a molécula indigestível para os animais monogástricos, pela falta da enzima celulase no seu trato gastrointestinal (Castillo and Gatlin, 2015). Em peixes, a celulose não possui valor nutritivo na formulação de dietas (Sinha et al., 2011). Entretanto, com o avanço na nutrição de peixes e a otimização dos ingredientes de origem vegetal, espera-se a aplicação de métodos capazes de promover a hidrólise da celulose para seu melhor aproveitamento em dietas vegetais (Sinha et al., 2011).

3.1.3 β -glucano de ligação mista

Os β -glucanos de ligação mista vem adquirindo importância na indústria alimentícia e farmacêutica, por suas propriedades funcionais (Cui and Wood, 2000). De acordo com Bhatta (1999), eles estão relacionados com a redução do colesterol no plasma sanguíneo e aos melhores níveis de glicose sérica pós-prandial em humanos e animais. Entretanto, altos níveis de β -glucanos nos alimentos vegetais elevam o grau de viscosidade junto com os arabinoxilanos, reduzindo a conversão alimentar e desempenho dos peixes (Sinha et al., 2011). Os β -glucanos de ligação mista são encontrados predominantemente em cereais de gramíneas, especificamente, na camada sub-aleurona e na parede celular do endosperma dos grãos de cereais (Figura 5), que se encontram associados com as microfibrilas de celulose durante o crescimento celular (Ebringerová, 2006).

As características estruturais dos β -glucanos determinam suas propriedades químicas e funcionalidade, assim como determinadas respostas fisiológicas nos peixes (Sinha et al., 2011). A estrutura química do β -glucano de ligação mista consiste em uma cadeia linear de unidades de D-glicose unidas por ligações do tipo β -1,3 e β -1,4 (Figura 8, Bengtsson et al., 1990). Diferente da celulose, em que a molécula possui estrutura rígida, cristalina e pouco solúvel, devido às unidades de D-glicose estarem unidas exclusivamente pelo tipo de ligação β -1,4, a estrutura do β -glucano acaba adotando uma conformação mais flexível e solúvel, pois as ligações β -1,3 do β -glucano são capazes de quebrar a estrutura normal da cadeia de celulose, fornecendo mais solubilidade a molécula (Anderson and Bridges, 1993). Portanto, características estruturais dos β -glucanos como a razão de ligações glicosídicas tipo β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 4) nas unidades de β -glicose, assim como a quantidade de fragmentos longos análogos a celulose e tamanho molecular do β -glucano, afetam sua permeabilidade e solubilidade podendo resultar em possíveis propriedades antinutricionais por parte da molécula (Izydorczyk and Biliaderis, 2000).

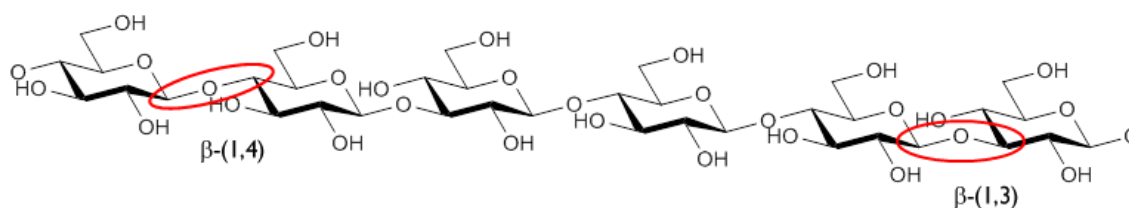


Figura 4. Estrutura química do β -glucano de ligação mista com ligações β -1,4 e β -1,3 (Megazyme, 2017a).

3.2 Enzimas: Xilanase e β -glucanase

Enzimas digestivas específicas capazes de hidrolisar os PNAs são escassas ou inexistentes em peixes (NRC, 2011). Logo, a suplementação de carboidratos exógenos se apresenta como a principal solução frente aos efeitos negativos dos PNAs em dietas para peixes (Sinha et al., 2011). Mais do que 80% de carboidratos comercializados no mercado mundial são representados pelas enzimas xilanase e glucanase, pois além de realizarem a hidrólise dos arabinosilanos, celulose e β -glucanos de ligação mista contidos nos alimentos vegetais promovem a biodisponibilidade de minerais e digestibilidade de outros nutrientes na dieta, melhorando o valor nutricional dos alimentos vegetais ricos em PNAs (Castillo and Gatlin, 2015).

A principal enzima envolvida na despolimerização da xilana é a endoxilanase ou endo-1,4- β -xilanase [EC 3.2.1.8], a qual é responsável pela hidrólise das ligações β -1,4 na cadeia principal do xilano, gerando xilo-oligosacarídeos de baixo grau de polimerização (Figura 9A) (Castillo and Gatlin, 2015) e somente com ação da enzima β -xilosidase [EC 3.2.1.37] que é decomposta totalmente em monômeros de xilose (Figura 9B). Sendo assim, endo-1,4- β -xilanases são enzimas-chaves na degradação dos arabinosilanos encontrados na parede celular dos grãos de cereais, gerando os arabinosilo-oligosacarídeos (AXOs) (Beg et al., 2001).

As xilanases exógenas mais utilizadas pela indústria de rações para animais são provenientes do *Aspergillus niger* (fungo), *Trichoderma reesei* ou *Bacillus subtilis* (bactérias) (Collins et al., 2005). A atividade da xilanase é mensurada em unidades de xilanase ativa (TXU), em que uma unidade de xilanase ativa é definida como a quantidade de endoxilanase necessária para a liberação de 5 μ mol de xilose por minuto proveniente de uma solução tampão contendo 10 g L⁻¹ de arabinosilanos em pH 3,5 a 40°C (Aquilina et al., 2016). Portanto, em dietas para peixes a atividade da xilanase normalmente é mensurada na medida padrão de TXU kg⁻¹ da dieta (Castillo and Gatlin, 2015).

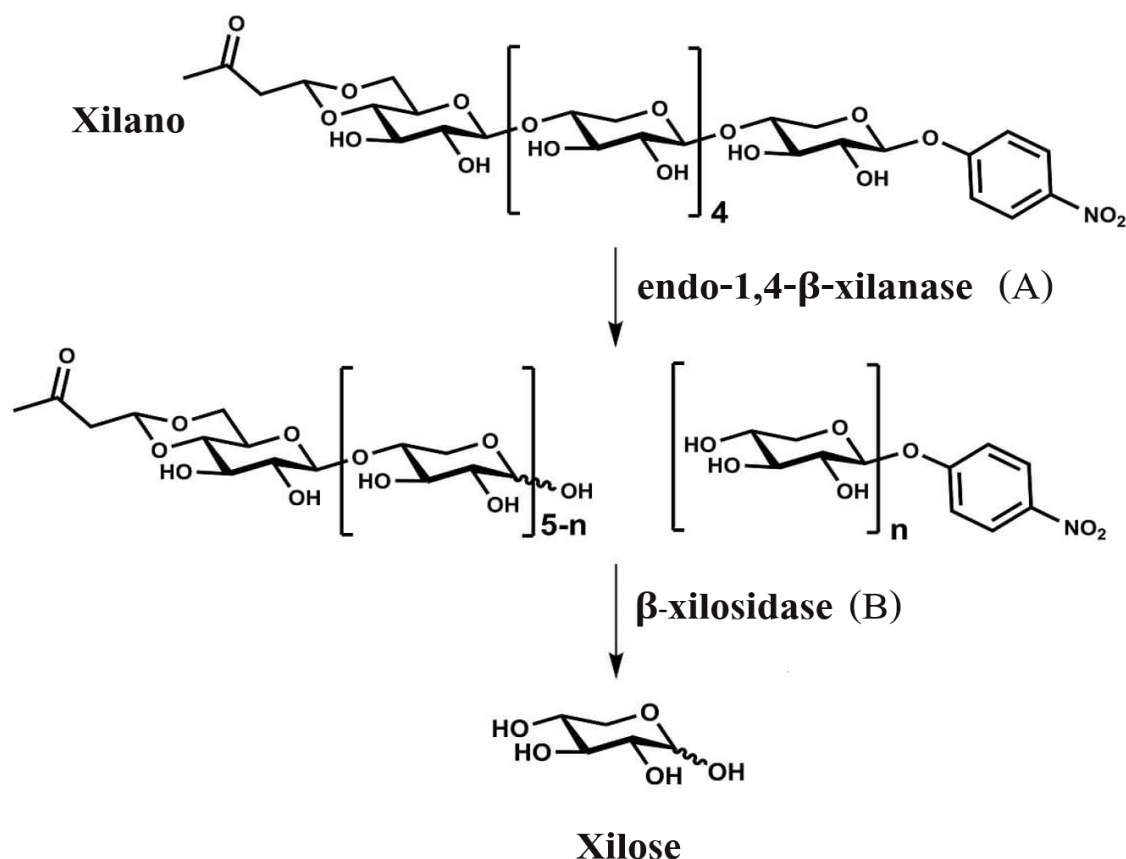


Figura 5. Ação da endo-1,4-β-xilanase sobre o xilano (A) e ação da β-xilosidase sobre os xilo-oligossacarídeos liberando os monômeros de xilose (B). Adaptado de Megazyme (2017b).

Celulose e β-glucanos de ligação mista são decompostos pela enzima endo-1,4-β-glucanase (Sinha et al., 2011). As endoglucanases ou endo-1,4-β-glucanases [EC 3.2.1.4] fazem parte do complexo enzimático da celulase e são responsáveis por atuar de forma aleatória nas regiões amorfas da celulose interna, hidrolisando as ligações glicosídicas β-1,4 para produzir novos terminais de cadeia livre mais acessíveis para que as exo-1,4-β-glucanases [EC 3.2.1.91] e 1,4-β-glucosidades [EC 3.2.1.21] possam atuar no polímero de celulose (Figura 10) (Godoy et al., 2018). Devido a estrutura amorfa/ cristalina da celulose, também se faz necessário a atuação dessas duas últimas enzimas (exo-1,4-β-glucanases e 1,4-β-glucosidades) para a completa degradação da celulose em monômeros de β-glicose (Figura 10) (Godoy et al., 2018). Similarmente, as endo-1,4-β-glucanases agem aleatoriamente no β-glucano de ligação mista hidrolisando as ligações β-1,4, reduzindo a massa molar dos β-glucanos e impedindo suas propriedades antinutricionais (Sinha et al., 2011).

As β -glucanases exógenas utilizadas como aditivos na nutrição de animais monogástricos são provenientes de fungos, como *Aspergillus niger*, ou bactérias, como *Bacillus amyloliquefaciens* (Godoy et al., 2018). A atividade da β -glucanase é mensurada em unidades de β -glucanase ativa (TGU), e uma unidade de β -glucanase ativa é definida como a quantidade de endoglucanase necessária para a liberação de 1 μ mol de glicose por minuto proveniente de uma solução tampão contendo 7,14 g L⁻¹ de β -glucanos em pH 3,5 a 40°C (Aquilina et al., 2016). Portanto, em dietas para peixes a atividade da β -glucanase normalmente é mensurada na medida padrão de TGU kg⁻¹ da dieta (Castillo and Gatlin, 2015).

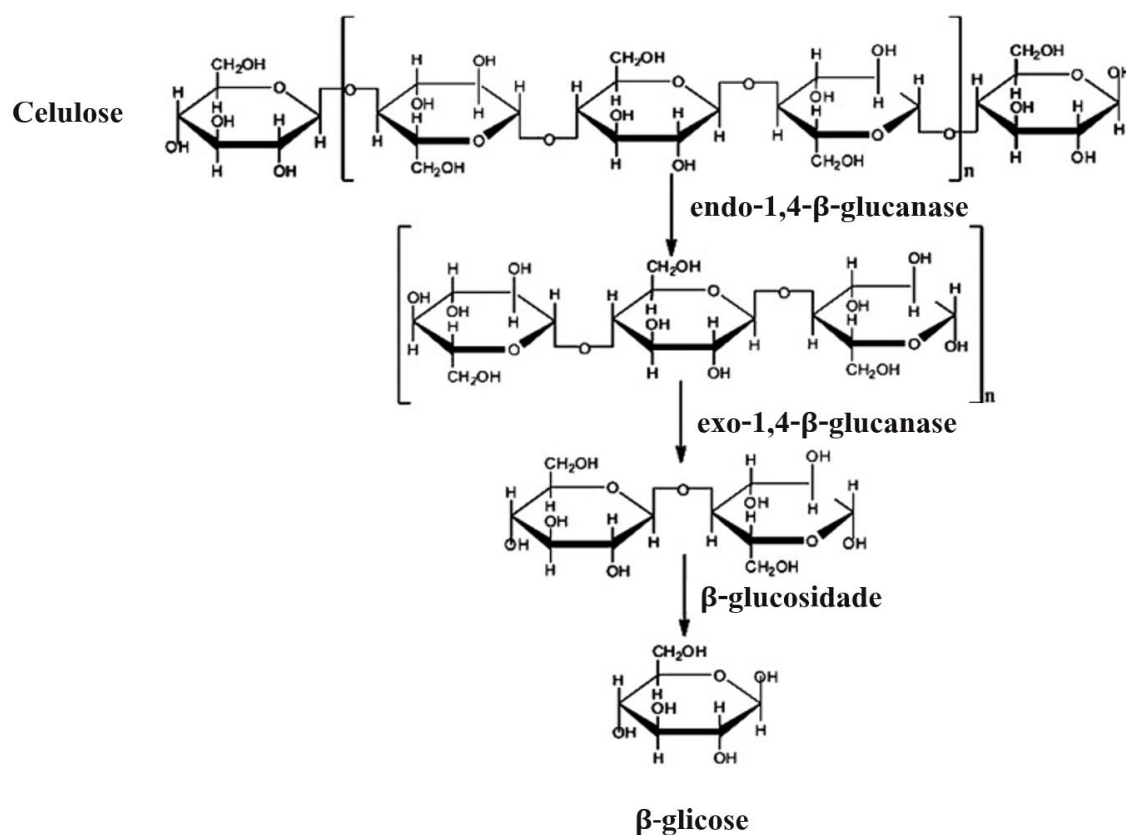


Figura 6. Esquema dos principais locais de ação da endo-1,4- β -glucanase, exo-1,4- β -glucanase e 1,4- β -glicosidade no polímero de celulose (Godoy et al., 2018).

Fabricantes de xilanases e β -glucanases comerciais buscam a otimização das enzimas por meio da produção de cepas geneticamente melhoradas e/ ou modificadas (transgênicas) a fim de melhorar a eficácia na produção, rendimento e atividade das enzimas (Beg et al., 2001). Atualmente, a maioria de xilanases e β -glucanases comercializadas são termoestáveis podendo ser encontradas na forma de pó ou líquida (Castillo and Gatlin, 2015). Estas enzimas exógenas normalmente são aplicadas via pós-peletização (pulverização nos pellets) para a preservação da atividade máxima da xilanase

e β -glucanase e evitar problemas relacionados à temperatura durante a fabricação de rações ($> 85^{\circ}\text{C}$) (Aquilina et al., 2016). Desse modo, o nível de suplementação da xilanase e β -glucanase em dietas para peixes finalmente dependerá de fatores relacionados ao peixe (espécie, idade e estado fisiológico) e a quantidade e fração do PNAs presente na dieta (Castillo and Gatlin, 2015).

3.3 Xilanase e β - glucanase na digestibilidade de nutrientes em peixes

Nas duas últimas décadas foram realizados diversos estudos relacionados a suplementação de carboidratos em dietas para peixes (Tabela 5). De forma geral, existem três principais modos de ação das carboidratos comumente relatados: a redução da viscosidade da digesta, o aumento da permeabilidade da parede celular e a geração de compostos prebióticos (Figura 11). Tais modos contribuem para o aumento na biodisponibilidade de minerais e digestibilidade da energia e nutrientes na dieta, resultando em melhor conversão alimentar e desempenho dos peixes (Castillo and Gatlin, 2015).

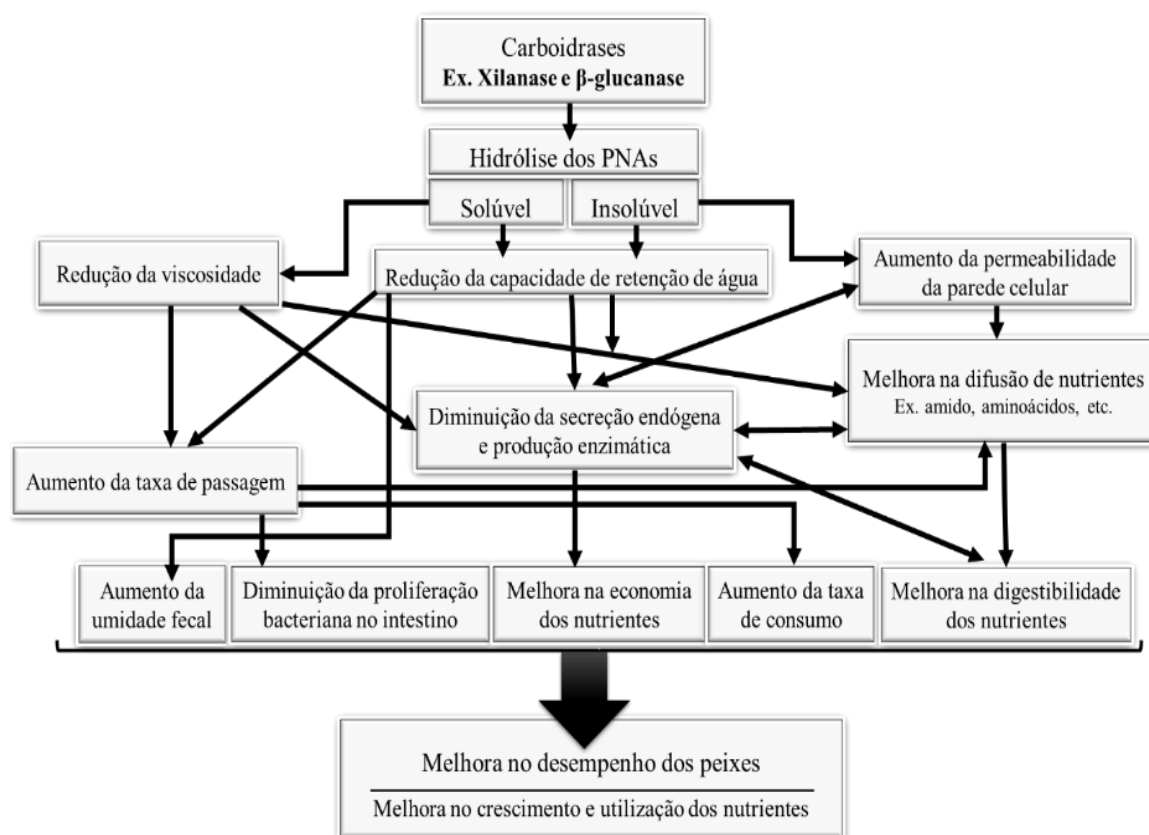


Figura 7. Modos de ação das carboidratos nos PNAs (Wyatt et al., 2008).

Tabela 5. Efeito da suplementação de carboidrases em dietas para peixes. Adaptado de Castillo e Gatlin (2015).

1

Espécie	Carboidrases exógenas	Dieta com fonte vegetal	Efeitos	Referência
Catfish africano, <i>Clarias gariepinus</i>	Complexo multienzimático Farmazyme® (xilanase, β -glucanase, β -amilase, celulase e pectinase)	Dieta da truta (48% de proteína), sem alimento específico à base de plantas	Taxa de crescimento aumentou significativamente. Taxa de conversão alimentar e eficiência protéica foram significativamente maiores.	Yildirim e Turan (2010)
Poleiro de prata, <i>Bidyamus bidyamus</i>	Natustarch® (α -amilase) e Natugrain-blend® (β -glucanase e β -xilanase)	Farelo de soja	Natustarch® aprimora a digestibilidade do amido. No Natugrain-blend® nenhum efeito sobre a digestibilidade dos nutrientes foi observado.	Stone et al. (2003)
Robalo japonês, <i>Lateolabrax japonicus</i>	Complexo multienzimático (fitase, glucanase, pentosanase, celulase e xilanase)	Farelo de soja, colza e amendoim	Taxa de crescimento e eficiência alimentar foram significativamente maiores. A retenção de nitrogênio e fósforo aumentaram significativamente.	Ai et al. (2007)
Tilápia, <i>Oreochromis niloticus</i> x <i>O. aureus</i>	Coquetel enzimático (protease, β -glucanase e xilanase)	Farelo de soja, colza e algodão	Taxa de crescimento, eficiência alimentar e digestibilidade da matéria seca aumentaram significativamente. Houve diminuição no consumo de ração e aumento significativo na produção de enzimas digestivas pelo peixe.	Lin et al. (2007)
Truta arco-íris, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Complexo multienzimático Superzyme CS (xilanase, amilase, celulase, protease e β -glucanase)	Farelo de soja	Leve aumento na digestibilidade de nutrientes e nenhum efeito no crescimento. Redução da coesão fecal e velocidade no afundamento de fezes.	Ogunkoya et al. (2006)
	Coquetel enzimático (protease, β -glucanase e xilanase)	Farelo de soja, colza e girassol	Aumento da digestibilidade aparente dos nutrientes, especialmente lipídios. Nenhum efeito sobre o desempenho dos peixes e retenção de nitrogênio foi observado.	Dalsgaard et al. (2012)

Xilanases e β -glucanases reduzem o grau de polimerização da dieta e viscosidade da digesta, promovendo maior taxa de difusão das enzimas digestivas (proteases, amilases e lipases) com seus respectivos substratos alimentares (Vahjen et al., 2007). Como observado por Li et al. (2009), que comprovou que a β -glucanase pode chegar a aumentar a atividade da amilase endógena na tilápia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) em 11,4% no hepatopâncreas e 49,5% no intestino.

A suplementação de carboidrases em dietas para peixes não só melhora a digestibilidade dos carboidratos, mas também incrementa a digestibilidade das proteínas e lipídeos de dietas elaboradas a partir de fontes vegetais (Castillo and Gatlin, 2015). Efeitos positivos da suplementação de xilanase e β -glucanase sobre a digestibilidade proteica em peixes foi relatada na tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Maas et al., 2019), robalo europeu, *Dicentrarchus labrax* (Magalhães et al., 2018) e “turbot”, *Scophthalmus maximus* (Diógenes et al., 2018). Similarmente, efeitos positivos na digestibilidade lipídica em peixes foram observadas para a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Maas et al., 2019), truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Dalsgaard et al., 2012), robalo europeu, *Dicentrarchus labrax* (Magalhães et al., 2018) e “turbot”, *Scophthalmus maximus* (Diógenes et al., 2018).

Dietas suplementadas com carboidrases também melhoram a biodisponibilidade de minerais em organismos alvo como resposta indireta (Castillo and Gatlin, 2015). Isto se deve pela complexação da fitina com os PNAs na parede vegetal das células vegetais, pois quando as xilanases e β -glucanases hidrolisam os PNAs, o fitato e outros minerais ficam melhor expostos ao lúmen do intestino, podendo ser aproveitados pelo animal (Adeola and Cowieson, 2011). Efeitos positivos na biodisponibilidade do fósforo em dietas suplementadas com xilanase e β -glucanase foram observadas na truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Dalsgaard et al., 2012), tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Maas et al., 2019) e robalo europeu, *Dicentrarchus labrax* (Magalhães et al., 2018).

Carboidrases exógenas podem modular a microbiota intestinal dos peixes, afetando a digestibilidade da energia e nutrientes das dietas (Castillo and Gatlin, 2015). A suplementação de carboidrases em dietas para peixes estimulam o crescimento de bactérias benéficas, proporcionando melhor saúde intestinal (Adeola and Cowieson, 2011). Fato explicado devido à redução na viscosidade intestinal e aumento na taxa de passagem no intestino, promovendo renovação constante da flora intestinal e reduzindo a proliferação de bactérias patógenas no intestino (Adeola and Cowieson, 2011). Somado

a isso, a ação prebiótica por parte dos arabinosílo-oligossacarídeos (AXOs) no intestino, promove um aumento na produção de ácidos graxos voláteis (propiónico, acético e butírico), melhorando a integridade das vilosidades intestinais e favorecendo o crescimento de populações microbianas benéficas (Van Doan et al., 2018). Dessa forma, tais bactérias podem secretar enzimas digestivas e substâncias nutritivas que podem favorecer ao peixe, melhorando a digestibilidade da energia e nutrientes das dietas (Adeoye et al., 2016; Hassaan et al., 2019).

LITERATURA CITADA

- 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. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3715>
- Adeoye, A.A., Yomla, R., Jaramillo-Torres, A., Rodiles, A., Merrifield, D.L., Davies, S.J., 2016. Combined effects of exogenous enzymes and probiotic on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, intestinal morphology and microbiome. *Aquaculture* 463, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.028>
- Ai, Q., Mai, K., Zhang, W., Xu, W., Tan, B., Zhang, C., Li, H., 2007. Effects of exogenous enzymes (phytase, non-starch polysaccharide enzyme) in diets on growth, feed utilization, nitrogen and phosphorus excretion of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 147, 502–508. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.01.026>
- Amirkolaie, A.K., 2011. Reduction in the environmental impact of waste discharged by fish farms through feed and feeding. *Rev. Aquac.* 3, 19–26. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2010.01040.x>
- Anderson, J.W., Bridges, S.R., 1993. Hypocholesterolemic effects of oat bran in humans, in: Wood, P.J. (Ed.), *Oat Bran*. St. Paul, MN, pp. 139–157.
- Aquilina, G., Bampidis, V., Bastos, M. de L., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P.S., Flachowsky, G., Gropp, J., Kolar, B., Kouba, M., Puente, S.L., López-Alonso, M., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Rychen, G., Saarela, M., Villa, R.E., Wallace, R.J., Wester, P., 2016. Safety and efficacy of Natugrain® TS (endo-1,4-β- xylanase and endo-1,4-β-glucanase) for chickens for fattening, *EFSA Journal*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4347>
- Bailey, R.W., 1973. Structural carbohydrates, in: Butler, G.W., Bailey, R.W. (Eds.), *Chemistry and Biochemistry of Hbage*. Academic Press, New York, pp. 157–211.
- Barrier-Guillot, B., Casado, P., Maupetit, P., Jondreville, C., Gatel, F., Larbier, M., 1995. Wheat phosphorus availability. 1. In vitro study; factors affecting endogenous phytasic activity and phytic phosphorus content. *J. Sci. Food Agric.* 70, 62–68. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0010\(199601\)70:1<62::aid-jsfa465>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0010(199601)70:1<62::aid-jsfa465>3.0.co;2-m)
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s002530100704>
- Bengtsson, S., Åman, P., Graham, H., Newman, C.W., Newman, R.K., 1990. Chemical studies on mixed-linked β-glucans in hull- less barley cultivars giving different

- hypocholesterolaemic responses in chickens. *J. Sci. Food Agric.* 52, 435–445. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740520402>
- Bhatty, R.S., 1999. The potential of hull-less barley. *Cereal Chem. J.* 76, 589–599. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1999.76.5.589>
- Britannica, 1996. The outer layers and internal structures of a kernel of wheat [WWW Document]. *Encycl. Br. Inc.* URL <https://www.britannica.com/technology/cereal-processing/Wheat-varieties-and-characteristics>
- Cao, L., Wang, W., Yang, C., Yang, Y., Diana, J., Yakupitiyage, A., Luo, Z., Li, D., 2007. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 497–507. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.007>
- Carter, C.G., Sajjadi, M., 2011. Low fishmeal diets for Atlantic salmon, *Salmo salar* L., using soy protein concentrate treated with graded levels of phytase. *Aquac. Int.* 19, 431–444. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9358-z>
- Castillo, S., Gatlin, D.M., 2015. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: A review. *Aquaculture* 435, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.011>
- Chen, C.C., Cheng, K.J., Ko, T.P., Guo, R.T., 2015. Current Progresses in Phytase Research: Three-Dimensional Structure and Protein Engineering. *ChemBioEng Rev.* 2, 76–86. <https://doi.org/10.1002/cben.201400026>
- Collins, T., Gerday, C., Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>
- Costello, A.J.R., Glonek, T., Myers, T.C., 1976. 31P Nuclear magnetic resonance- pH titrations of myo-inositol hexaphosphate. *Carbohydr. Res.* 46, 159–171. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)84287-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84287-1)
- Cowieson, A.J., Ruckebusch, J.P., Knap, I., Guggenbuhl, P., Fru-Nji, F., 2016. Phytate-free nutrition: A new paradigm in monogastric animal production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 222, 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.10.016>
- Cui, W., Wood, P.J., 2000. Relationships between structural features, molecular weight and rheological properties of cereal β -D-glucans, in: Nishinari K. (Ed.), *Hydrocolloids*. Elsevier, Amsterdam, pp. 159–168. <https://doi.org/10.1016/b978-044450178-3/50019-6>
- Dalsgaard, J., Verlhac, V., Hjermslev, N.H., Ekmann, K.S., Fischer, M., Klausen, M., Pedersen, P.B., 2012. Effects of exogenous enzymes on apparent nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with high inclusion of plant-based protein. *Anim. Feed Sci. Technol.* 171, 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.10.005>
- Debnath, D., Sahu, N.P., Pal, A.K., Jain, K.K., Yengkokpam, S., Mukherjee, S.C., 2005. Mineral status of *Pangasius pangasius* (Hamilton) fingerlings in relation to supplemental phytase: absorption, whole-body and bone mineral content. *Aquac. Res.* 36, 326–335. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01204.x>
- Diógenes, A.F., Castro, C., Carvalho, M., Magalhães, R., Estevão-Rodrigues, T.T., Serra, C.R., Oliva-Teles, A., Peres, H., 2018. Exogenous enzymes supplementation enhances diet digestibility and digestive function and affects intestinal microbiota of turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles fed distillers' dried grains with solubles (DDGS) based diets. *Aquaculture* 486, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.013>
- Ebringerová, A., 2006. Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses. *Macromol. Symp.* 232, 1–12. <https://doi.org/10.1002/masy.200551401>
- Eeckhout, W., De Paepe, M., 1994. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase

- activity in plant feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 47, 19–29. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90156-2](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90156-2)
- Engelen, A.J., Van Der Heeft, F.C., Randsdorp, P.H.G., Somers, W.A.C., Schaefer, J., Van Der Vat, B.J.C., 2001. Determination of Phytase Activity in Feed by a Colorimetric Enzymatic Method: Collaborative Interlaboratory Study. *J. AOAC Int.* 84, 629–633.
- FAO, 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fincher, G.B., Stone, B.A., 1986. Cell walls and their components in cereal grain technology, in: Pomeranz, Y. (Ed.), *Advances in Cereal Science and Technology*. American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, pp. 207–295.
- Fonseca, A. da S., 2015. Avaliação de compostos bioativos em farinhas de trigo melhoradas geneticamente: fibra e arabinoxilanos. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Francis, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197–227. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00526-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9)
- Geissmann, T., Neukom, H., 1973. On the composition of the water soluble wheat flour pentosans and their oxidative gelation. *Leb. und Technol.* 6, 59–62.
- Godoy, M.G., Amorim, G.M., Barreto, M.S., Freire, D.M.G., 2018. Agricultural Residues as Animal Feed, in: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp. 235–256. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63990-5.00012-8>
- Gonçalves, G.S., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Kleman, G.K., Rocha, D.F., 2005. Efeitos da Suplementação de Fitase sobre a Disponibilidade Aparente de Mg, Ca, Zn, Cu, Mn e Fe em Alimentos Vegetais para a Tilápia-do-Nilo. *Rev. Bras. Zootec.* 34, 2155–2163. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982005000700001>
- Graf, E., 1983. Applications of phytic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60, 1861–1867. <https://doi.org/10.1007/BF02901539>
- Hardy, R.W., 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: Effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquac. Res.* 41, 770–776. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02349.x>
- Hassaan, M.S., Mohammady, E.Y., Soady, M.R., Abdel Rahman, A.A.S., 2019. Exogenous xylanase improves growth, protein digestibility and digestive enzymes activities in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed different ratios of fish meal to sunflower meal. *Aquac. Nutr.* 25, 841–853. <https://doi.org/10.1111/anu.12903>
- Havrlentova, M., Kraic, J., 2006. Content of beta-d-glucan in cereal grains. *J. Food Nutr. Res. (Slovak Republic)*.
- IBGE, 2017. Censo Agropecuário 2017: Resultados Preliminares, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro, Brasil.
- Izydorczyk, M.S., Biliaderis, C.G., 2000. Structural and functional aspects of cereal arabinoxylans and b-glucans, in: Doxastakis, G., Kiosseoglou, V. (Eds.), *Novel Macromolecules in Food Systems*. Elsevier, Amsterdam, pp. 361–384.
- Izydorczyk, M.S., Biliaderis, C.G., 1995. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydr. Polym.* 28, 33–48. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00077-1](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00077-1)
- Keshwani, D.R., Cheng, J.J., 2010. Microwave-based alkali pretreatment of switchgrass and coastal bermudagrass for bioethanol production. *Biotechnol. Prog.* 26, 644–652. <https://doi.org/10.1002/btpr.371>
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2010. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chem.* 120, 945–959.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.052>
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., De Boeck, G., Becker, K., 2012. Phytate and phytase in fish nutrition. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 96, 335–364. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01169.x>
- Lemos, D., Tacon, A.G.J., 2017. Use of phytases in fish and shrimp feeds: a review. *Rev. Aquac.* 9, 266–282. <https://doi.org/10.1111/raq.12138>
- Li, J.S., Li, J.L., Wu, T.T., 2009. Effects of non-starch polysaccharides enzyme, phytase and citric acid on activities of endogenous digestive enzymes of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*). *Aquac. Nutr.* 15, 415–420. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00606.x>
- Li, X.Q., Zhang, X.Q., Kabir Chowdhury, M.A., Zhang, Y., Leng, X.J., 2019. Dietary phytase and protease improved growth and nutrient utilization in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) fed low phosphorus and fishmeal-free diets. *Aquac. Nutr.* 25, 46–55. <https://doi.org/10.1111/anu.12828>
- Liebert, F., Portz, L., 2007. Different sources of microbial phytase in plant based low phosphorus diets for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* may provide different effects on phytate degradation. *Aquaculture* 267, 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.023>
- Liebert, F., Portz, L., 2005. Nutrient utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed plant based low phosphorus diets supplemented with graded levels of different sources of microbial phytase. *Aquaculture* 248, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.009>
- Lin, S., Mai, K., Tan, B., 2007. Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquac. Res.* 38, 1645–1653. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01825.x>
- Liu, L.W., Su, J.M., Zhang, T., Liang, X.-F., Luo, Y.L., 2013. Apparent digestibility of nutrients in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) diet supplemented with graded levels of neutral phytase using pretreatment and spraying methods. *Aquac. Nutr.* 19, 91–99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00942.x>
- Lott, J.N.A., Ockenden, I., Raboy, V., Batten, G.D., 2000. Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: A global estimate. *Seed Sci. Res.* 10, 11–33. <https://doi.org/10.1201/9781420014419.ch2>
- Maas, R.M., Verdegem, M.C.J., Dersjant-Li, Y., Schrama, J.W., 2018. The effect of phytase, xylanase and their combination on growth performance and nutrient utilization in Nile tilapia. *Aquaculture* 487, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.040>
- Maas, R.M., Verdegem, M.C.J., Schrama, J.W., 2019. Effect of non-starch polysaccharide composition and enzyme supplementation on growth performance and nutrient digestibility in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Nutr.* 25, 622–632. <https://doi.org/10.1111/anu.12884>
- Maas, R.M., Verdegem, M.C.J., Stevens, T.L., Schrama, J.W., 2020. Effect of exogenous enzymes (phytase and xylanase) supplementation on nutrient digestibility and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed different quality diets. *Aquaculture* 529, 735723. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735723>
- Magalhães, R., Díaz-Rosales, P., Diógenes, A.F., Enes, P., Oliva-Teles, A., Peres, H., 2018. Improved digestibility of plant ingredient-based diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*) with exogenous enzyme supplementation. *Aquac. Nutr.* 24, 1287–1295. <https://doi.org/10.1111/anu.12666>
- Mares, D.J., Stone, B.A., 1973. Studies on wheat endosperm II. Properties of the wall components and studies on their organisation in the wall. *Aust. J. Biol. Sci.* 26, 813–

830.

- Megazyme, 2017a. β -Glucan Portal [WWW Document]. URL <https://www.megazyme.com/focus-areas/beta-glucan-portal> (accessed 3.25.21).
- Megazyme, 2017b. Xylanase Assay Kit (XylX6 Method) [WWW Document]. URL <https://www.megazyme.com/xylanase-assay-kit-xylx6-method> (accessed 3.26.21).
- NRC, 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academies Press, Washington, DC. <https://doi.org/https://doi.org/10.17226/13039>
- Nunes, C.S., Kunamneni, A., 2018. Laccases-properties and applications, in: Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives. Elsevier Inc., pp. 133–161. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00007-1>
- Oatway, L., Vasanthan, T., Helm, J.H., 2001. Phytic acid. Food Rev. Int. 17, 1–35. <https://doi.org/10.1081/FRI-100108531>
- Ogunkoya, A.E., Page, G.I., Adewolu, M.A., Bureau, D.P., 2006. Dietary incorporation of soybean meal and exogenous enzyme cocktail can affect physical characteristics of faecal material egested by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 254, 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.032>
- PeixeBR, 2020. Anuário PeixeBR da Piscicultura 2020. São Paulo, Brasil.
- Portz, L., Liebert, F., 2004. Growth, nutrient utilization and parameters of mineral metabolism in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) fed plant-based diets with graded levels of microbial phytase. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl). 88, 311–320. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2004.00486.x>
- Reddy, N.R., Sathe, S.K., Salunkhe, D.K., 1982. Phytates in legumes and cereals. Adv. Food Res. 28, 1–92. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60110-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60110-X)
- Rickard, S.E., Thompson, L.U., 1997. Interactions and Biological Effects of Phytic Acid. ACS Symp. Ser. 662, 294–312. <https://doi.org/10.1021/bk-1997-0662.ch017>
- Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. de L., Bories, G., Chesson, A., Flachowsky, G., Gropp, J., Kolar, B., Kouba, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Saarela, M., Villa, R.E., Wallace, R.J., Wester, P., Brantom, P., Dierick, N.A., Glandorf, B., Herman, L., Kärenlampi, S., Aguilera, J., Anguita, M., Cocconcelli, P.S., 2017. Safety and efficacy of Natuphos® E (6-phytase) as a feed additive for avian and porcine species. EFSA J. 15, 1–35. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5024>
- Selle, P.H., Cowieson, A.J., Cowieson, N.P., Ravindran, V., 2012. Protein-phytate interactions in pig and poultry nutrition: A reappraisal. Nutr. Res. Rev. 25, 1–17. <https://doi.org/10.1017/S0954422411000151>
- Selle, P.H., Ravindran, V., 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. Anim. Feed Sci. Technol. 135, 1–41. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.010>
- Selvendran, R.R., Du Pont, M.S., 1980. An alternative method for the isolation and analysis of cell wall material from cereals. Cereal Chem. 57, 278–283.
- Silva, T.S.C., Furuya, W.M., dos Santos, V.G., Botaro, D., Silva, L.C.R., Sales, P.J.P., Hayashi, C., dos Santos, L.D., Furuya, V.R.B., 2005. Coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes do farelo de soja integral sem e com fitase para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Acta Sci. Anim. Sci. 27, 371–376. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v27i3.1213>
- Sinha, A.K., Kumar, V., Makkar, H.P.S., De Boeck, G., Becker, K., 2011. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition - A review. Food Chem. 127, 1409–1426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.042>
- Sørensen, H.R., Pedersen, S., Meyer, A.S., 2007. Characterization of solubilized arabinoxylo-oligosaccharides by MALDI-TOF MS analysis to unravel and direct enzyme catalyzed hydrolysis of insoluble wheat arabinoxylan. Enzyme Microb.

- Technol. 41, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.12.009>
- Sternemalm, E., Höije, A., Gatenholm, P., 2008. Effect of arabinose substitution on the material properties of arabinoxylan films. *Carbohydr. Res.* 343, 753–757. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.11.027>
- Stone, D.A.J., Allan, G.L., Anderson, A.J., 2003. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). III. The protein-sparing effect of wheat starch-based carbohydrates. *Aquac. Res.* 34, 123–134. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00774.x>
- Sugiura, S.H., Gabaudan, J., Dong, F.M., Hardy, R.W., 2001. Dietary microbial phytase supplementation and the utilization of phosphorus, trace minerals and protein by rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)] fed soybean meal-based diets. *Aquac. Res.* 32, 583–592. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00581.x>
- Türk, M., Carlsson, N.G., Sandberg, A.S., 1996. Reduction in the levels of phytate during wholemeal bread making; effect of yeast and wheat phytases. *J. Cereal Sci.* 23, 257–264. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1996.0026>
- Usmani, N., Jafri, A.K., 2002. Influence of dietary phytic acid on the growth, conversion efficiency, and carcass composition of mrigal *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) fry. *J. World Aquac. Soc.* 33, 199–204. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2002.tb00495.x>
- Vahjen, W., Gläser, K., Schäfer, K., Simon, O., 1998. Influence of xylanase-supplemented feed on the development of selected bacterial groups in the intestinal tract of broiler chicks. *J. Agric. Sci.* 130, 489–500. <https://doi.org/10.1017/S0021859698005498>
- Vahjen, W., Osswald, T., Schäfer, K., Simon, O., 2007. Comparison of a xylanase and a complex of non starch polysaccharide- degrading enzymes with regard to performance and bacterial metabolism in weaned piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 61, 90–102. <https://doi.org/10.1080/17450390701203881>
- Van Barneveld, R.J., 1999. Understanding the nutritional chemistry of lupin (*Lupinus* spp.) seed to improve livestock production efficiency. *Nutr. Res. Rev.* 12, 203–230. <https://doi.org/10.1079/095442299108728938>
- Van Doan, H., Hoseinifar, S.H., Faggio, C., Chitmanat, C., Mai, N.T., Jaturasitha, S., Ringø, E., 2018. Effects of corncob derived xylooligosaccharide on innate immune response, disease resistance, and growth performance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Aquaculture* 495, 786–793. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.068>
- Van Soest, P.J., 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Assoc. Of. Agric. Chem.* 46, 829–835.
- Van Soest, P.J., Wine, R.H., 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 50, 50–55.
- Vandenberg, G.W., Scott, S.L., Sarker, P.K., Dallaire, V., de la Noüe, J., 2011. Encapsulation of microbial phytase: Effects on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Feed Sci. Technol.* 169, 230–243. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.07.001>
- Vats, P., Banerjee, U.C., 2004. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): An overview. *Enzyme Microb. Technol.* 35, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.010>
- Verlhac-Trichet, V., Vielma, J., Dias, J., Rema, P., Santigosa, E., Wahli, T., Vogel, K., 2014. The efficacy of a novel microbial 6-phytase expressed in *Aspergillus oryzae*

- on the performance and phosphorus utilization of cold- and warm-water fish: rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. World Aquac. Soc.* 45, 367–379. <https://doi.org/10.1111/jwas.12133>
- Wallace, J.L., Murray, F.J., Little, D.C., 2016. Effects of β -xylanase and 6-phytase on digestibility, trace mineral utilisation and growth in juvenile red tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) x *O. mossambicus* (Peters, 1852), fed declining fishmeal diets. *J. Appl. Ichthyol.* 32, 471–479. <https://doi.org/10.1111/jai.13055>
- Wang, F., Yang, Y.-H., Han, Z.-Z., Dong, H.-W., Yang, C.-H., Zou, Z.-Y., 2009. Effects of phytase pretreatment of soybean meal and phytase-sprayed in diets on growth, apparent digestibility coefficient and nutrient excretion of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquac. Int.* 17, 143–157. <https://doi.org/10.1007/s10499-008-9187-5>
- Wyatt, C.L., Parr, T., Bedford, M., 2008. Mechanisms of action for supplemental NSP and phytase enzymes in poultry diets, in: 35th Poultry Nutrition Conference. Carolina Feed Industry Association, North Carolina, pp. 12–22.
- Yildirim, Y.B., Turan, F., 2010. Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in African catfish, *Clarias gariepinus*. *J. Anim. Vet. Adv.* 9, 327–331.

II. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação isolada e combinada do complexo xilanase- β -glucanase e fitase em dietas exclusivamente vegetais sobre a digestibilidade da energia e nutrientes, incluindo a disponibilidade de minerais e aminoácidos, e excreção fecal do nitrogênio e fósforo em juvenis de tilápia do Nilo.

III. Fitase, xilanase e β -glucanase sobre a digestibilidade da energia e nutrientes e excreção do nitrogênio e fósforo em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Resumo

O objetivo neste estudo foi avaliar o efeito da suplementação isolada e combinada do complexo xilanase- β -glucanase e fitase em dietas exclusivamente vegetais sobre a digestibilidade aparente da energia e nutrientes, incluindo a disponibilidade de minerais e aminoácidos, e excreção fecal do nitrogênio e fósforo em juvenis de tilápia do Nilo. Foram testadas quatro dietas, dieta controle (CON) sem enzimas, dieta com fitase (FT, 1000 FTU kg⁻¹), dieta com xilanase e β -glucanase (XB, 1120 TXU e 500 TGU kg⁻¹) e dieta com a combinação da fitase, xilanase e β -glucanase (FT+XB). O total de 272 tilápias masculinizadas ($22,52 \pm 0,65$ g) foram distribuídas em delineamento de blocos ao acaso com quatro tratamentos e quatro repetições, em 16 aquários com fundo cônico de 150 L adaptados para a coleta de fezes (sistema Guelph modificado). Os peixes foram alimentados seis vezes ao dia até saciedade aparente com as dietas experimentais contendo 0,5% de óxido de cromo, durante 21 dias. Xilanase e β -glucanase aumentou a digestibilidade da matéria seca, amido e lipídeos ($P < 0,001$), e disponibilidade do cobre ($P < 0,001$). Paralelamente, fitase aumentou a digestibilidade da matéria seca, energia bruta, amido e cinzas ($P < 0,001$), e disponibilidade do magnésio, manganês e zinco ($P < 0,001$). Fitase também melhorou a disponibilidade da maioria de aminoácidos, entre eles, arginina ($P = 0,019$), fenilalanina ($P = 0,001$), histidina ($P = 0,019$), lisina ($P = 0,019$), metionina ($P = 0,001$) e valina ($P = 0,025$), e quando combinada com a xilanase e β -glucanase potencializou a disponibilidade da isoleucina ($P = 0,004$), leucina ($P = 0,004$), treonina ($P = 0,002$), ácido glutâmico ($P = 0,00$), cistina ($P < 0,001$) e serina ($P = 0,01$). A combinação enzimática (FT+XB) demonstrou ter efeito sinérgico na digestibilidade da proteína ($P < 0,001$) e disponibilidade do cálcio, ferro e fósforo ($P < 0,001$). Quando comparado a dieta controle, a suplementação com fitase, xilanase e β -glucanase demonstrou reduzir a excreção fecal do nitrogênio ($P = 0,007$) e fósforo ($P < 0,001$) em 30 e 49,5%, respectivamente. Em conclusão, a suplementação isolada e combinada do complexo xilanase- β -glucanase e fitase melhora a digestibilidade da energia e nutrientes de dietas à base de vegetais, e reduz a excreção do nitrogênio e fósforo pelos peixes, colaborando para a produção de tilápias com menor impacto ambiental.

Palavras-chave: Enzimas, dietas à base de vegetais, peixes.

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of isolated and combined supplementation of xylanase- β -glucanase complex and phytase in entirely plant-based diets on energy and nutrients digestibility, including minerals and amino acids availability, and fecal excretion of nitrogen and phosphorus in Nile tilapia juveniles. Four diets were tested, a control diet (CON) without enzymes, a phytase diet (PHY, 1000 FTU kg⁻¹), a xylanase- β -glucanase diet (XB, 1120 TXU e 500 TGU kg⁻¹), and a diet with phytase, xylanase, and β -glucanase (PHY+XB). Two hundred seventy-two masculinized fish (22.52 ± 0.65 g) were distributed in a randomized block design with four treatments and four replications, in sixteen cylindrical-conical fiberglass tanks (150 L), adapted for feces collection (modified Guelph system). Fish were fed six times a day to apparent satiation, with experimental diets containing 0.5% chromium oxide, for 21 days. Xylanase and β -glucanase supplementation increased dry matter, starch, and lipids digestibility ($P < 0.001$), and copper availability ($P < 0.001$). At the same time, phytase supplementation increased dry matter, crude energy, starch, and ash digestibility ($P < 0.001$), and magnesium, manganese, and zinc availability ($P < 0.001$). Phytase also improved the availability of most amino acids, including arginine ($P = 0.019$), phenylalanine ($P = 0.001$), histidine ($P = 0.019$), lysine ($P = 0.019$), methionine ($P = 0.001$) and valine ($P = 0.025$), and when combined with xylanase and β -glucanase enhanced the availability of isoleucine ($P = 0.004$), leucine ($P = 0.004$), threonine ($P = 0.002$), glutamic acid ($P = 0.00$), cystine ($P < 0.001$) and serine ($P = 0.01$). Enzymatic combination (PHY+XB) shows a synergy effect on protein digestibility ($P < 0.001$) and calcium, iron, and phosphorus availability ($P < 0.001$). When compared to control diet, xylanase- β -glucanase and phytase supplementation reduce fecal excretion of nitrogen ($P = 0.007$) and phosphorus ($P < 0.001$) by 30 and 49.5%, respectively. In conclusion, the isolated and combined supplementation of xylanase- β -glucanase complex and phytase improves energy and nutrients digestibility in plant-based diets and reduces the excretion of nitrogen and phosphorus by fish, contributing to tilapia production with less environmental impact.

Keywords: Enzymes, plant-based diets, fish.

1. Introdução

A rápida expansão do setor aquícola estimula a implementação de novas tecnologias capazes de otimizar a produção de peixes, principalmente no que tange à melhoria do valor nutritivo das dietas, redução dos custos com alimentação e diminuição dos impactos ambientais (FAO, 2018). Devido a isso, busca-se otimizar os alimentos de origem vegetal, pois cada vez mais e com frequência vem sendo utilizados na elaboração de dietas para peixes (Hardy, 2010). Entretanto, as altas taxas de inclusão desses alimentos, principalmente grãos de cereais e sementes de leguminosas, elevam simultaneamente o teor de fitato e polissacarídeos não amiláceos (PNAs) nas dietas (Francis et al., 2001; Kumar et al., 2012; Sinha et al., 2011). Tanto o fitato como os PNAs são indesejáveis na nutrição de peixes, pois possuem propriedades antinutricionais e não podem ser inativados no processo de extrusão das rações (Francis et al., 2001).

Grande parte do fósforo contido nas plantas se encontra na forma de fitato, tornando-se indisponível para os peixes (Kumar et al., 2012). O alto teor de fitato afeta a biodisponibilidade de minerais e digestibilidade de proteínas dietéticas, contribuindo para a queda no crescimento dos peixes (Costello et al., 1976; Kumar et al., 2010). Da mesma forma, o alto conteúdo de PNAs nas dietas, principalmente arabinosilanos e β -glucanos de ligação mista, afeta a digestibilidade de energia e nutrientes nos peixes, basicamente pelo aumento da viscosidade intestinal, resultando na redução da taxa de difusão das enzimas digestivas com seus respectivos substratos alimentares (Sinha et al., 2011; Vahjen et al., 2007). Portanto, a queda na digestibilidade de nutrientes induzida pelo fitato e PNAs na dieta, não só resulta na queda no desempenho dos peixes (Maas et al., 2020, 2019, 2018), mas também no impacto causado pelos nutrientes não aproveitados (Kumar et al., 2012; Sinha et al., 2011). Principalmente, pelo impacto conjunto do nitrogênio e fósforo em águas abertas que contribuem para a eutrofização no meio aquático, assim como o impacto gerado pelo nitrogênio em sistemas de recirculação de água (RAS) (Amirkolaie, 2011).

Suplementação das dietas com fitase e carboidrases (xilanase e β -glucanase) neutralizam os efeitos negativos do fitato e PNAs, melhorando a digestibilidade da energia e nutrientes (Castillo and Gatlin, 2015; Kumar et al., 2012). Fitase hidrolisa as ligações fosfodiéster entre os grupos fosfato e o anel mio-inositol do ácido fítico (Lemos and Tacon, 2017), disponibilizando o fósforo e outros minerais, como cálcio, cobre, ferro, magnésio, potássio, manganês e zinco, além de elevar a digestibilidade da proteína bruta

e disponibilidade aminoácidos, como demonstrado em tilápias, *Oreochromis niloticus* (Gonçalves et al., 2005; Liebert and Portz, 2007, 2005; Silva et al., 2005). Tendo em conta que o efeito das fitases é bem mais compreendido do que das carboidrases (Adeola and Cowieson, 2011; Kumar et al., 2012) e, próximo de 80% de carboidrases comercializadas, são representadas pela xilanase e β -glucanase (Castillo and Gatlin, 2015), faz-se necessário o estudo do efeito do complexo xilanase- β -glucanase em dietas para peixes (Dalsgaard et al., 2012; Lin et al., 2007; Ogunkoya et al., 2006; Stone et al., 2003; Yildirim and Turan, 2010), pois é conhecido que seu efeito sinérgico pode reduzir significativamente a viscosidade da digesta (Munyaka et al., 2016), e pode contribuir para a melhoria na digestibilidade da energia e nutrientes nas dietas (Castillo and Gatlin, 2015).

A suplementação de dietas para peixes com combinação de enzimas exógenas tem sido considerada ferramenta útil para liberar energia e nutrientes dos alimentos (Maas et al., 2018). Recentemente, a utilização de fitase com outras enzimas exógenas em dietas para tilápias, como proteases (Lin et al., 2007) e xilanases (Maas et al., 2020; Wallace et al., 2016), têm demonstrado efeito sinérgico na digestibilidade da energia e nutrientes em dietas (Lin et al., 2007; Maas et al., 2018; Wallace et al., 2016). Além disso, a suplementação de fitase e xilanase demonstra ter efeito na redução da excreção do nitrogênio e fósforo pelos peixes, como observado em robalos, *Lateolabrax japonicus* (Ai et al., 2007). No entanto, ainda há poucas informações sobre a utilização combinada de fitase e o complexo xilanase- β -glucanase sobre a melhoria do valor energético e digestibilidade dos nutrientes, além do impacto causado pelo nitrogênio e/ou fósforo nos distintos sistemas de criação de peixes (Maas et al., 2021).

Nesse contexto, o principal objetivo neste presente estudo é avaliar o efeito da suplementação isolada e combinada do complexo xilanase- β -glucanase e fitase em dietas exclusivamente vegetais sobre a digestibilidade de energia e nutrientes, incluindo a disponibilidade de minerais e aminoácidos, e excreção fecal do fósforo e nitrogênio em juvenis de tilápia do Nilo.

2. Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido de acordo com o Comitê de Conduta Ética para o Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo n°132808/2019).

2.1. Dietas

Uma dieta controle composta por ingredientes de origem vegetal (Tabela 1) foi formulada de forma a atender as exigências dietéticas de juvenis de tilápia do Nilo (NRC, 2011). Semelhante a dieta controle (CON) foram feitas outras três dietas, mas suplementadas com fitase (FT, 1000 FTU kg⁻¹, Natuphos[®] E, BASF, Ludwigshafen na Rhein, RLP, Alemanha), xilanase e β-glucanase (XB, 1120 TXU e 500 TGU kg⁻¹, Natugrain[®] TS, BASF, Ludwigshafen na Rhein, RLP, Alemanha) e fitase, xilanase e β-glucanase (FT+XB). Óxido de cromo (Cr₂O₃) foi incluído como marcador inerte no estudo da digestibilidade aparente.

Tabela 1

Composição dos ingredientes da dieta controle, com base na matéria natural.

Ingrediente	g kg ⁻¹
Farelo de soja 45%	340,0
Farelo de trigo	255,0
Farinha de trigo	191,4
Quirera de arroz	80,0
Concentrado proteico de soja	60,0
Óleo de soja	30,0
Calcário	12,0
Fosfato bicálcico	10,0
L- Lisina	5,7
Óxido de cromo (Cr ₂ O ₃)	5,0
Premix vitamínico mineral ^a	5,0
Sal	3,5
DL- Metionina	1,2
Antifúngico ^b	1,0
BHT	0,2

^a Premix vitamínico mineral (UI ou mg kg⁻¹ da dieta): Palmitato de retinol (vitamina A), 6000 UI; colecalciferol (vitamina D₃), 1000 UI; DL-α-tocoferol (vitamina E), 60 mg; menadiona (vitamina K₃), 12 mg; tiamina HCL (vitamina B₁), 24 mg; riboflavina (vitamina B₂), 24 mg; piridoxina HCL (vitamina B₆), 20 mg; cianocobalamina (vitamina B₁₂), 24 mg; ácido fólico, 6 mg; D-pantotenato de cálcio, 60 mg; ácido ascórbico, 240 mg; D- biotina, 0,24 mg; cloreto de colina, 325 mg; niacina, 120 mg; sulfato ferroso, 50 mg; sulfato de cobre, 3 mg; sulfato de manganês, 20 mg; sulfato de zinco, 30 mg; iodeto de potássio, 0,1 mg; sulfato de cobalto, 0,01 mg; selenito de sódio, 0,1 mg.

^b Antifúngico, Mold Zap Aquativa[®]. Composição: dipropionato de amônia, ácido acético, ácido sórbico e ácido benzoico (Alltech Agroindustrial Ltda, São Paulo, Brasil).

A dieta controle foi elaborada com base em valores de composição de alimentos previamente analisados e após extrusão e aplicação de óleo nos pellets, esses valores

foram confirmados por meio de análises de composição proximal, minerais e aminoácidos (Tabela 2).

Tabela 2

Composição química analisada da dieta controle, com base na matéria seca.

	Dieta
<i>Composição proximal (g kg⁻¹)</i>	
Matéria seca	916,50
Energia bruta (kcal kg ⁻¹)	4194,13
Proteína bruta	340,97
Lipídios totais	38,03
Fibra bruta	35,99
Cinzas	67,64
<i>Minerais</i>	
Cálcio (g kg ⁻¹)	9,73
Cobre (mg kg ⁻¹)	27,66
Ferro (mg kg ⁻¹)	406,89
Fósforo (g kg ⁻¹)	7,93
Magnésio (mg kg ⁻¹)	2,23
Manganês (mg kg ⁻¹)	118,32
Zinco (g kg ⁻¹)	216,00
<i>Aminoácidos essenciais (AAE, g kg⁻¹)</i>	
Arginina	21,76
Fenilalanina	15,43
Histidina	7,65
Isoleucina	13,29
Leucina	23,46
Lisina	19,07
Metionina	5,13
Treonina	11,53
Triptofano	3,76
Valina	15,47
ΣEAA	136,55
<i>Aminoácidos não essenciais (AANE, g kg⁻¹)</i>	
Ácido aspártico	31,77
Ácido glutâmico	60,26
Alanina	14,47
Cistina	4,64
Glicina	13,80
Prolina	0,00
Serina	15,62
Tirosina	9,79
ΣNEAA	150,35

A dieta controle foi moída, misturada e extrusada no Laboratório de Nutrição e Saúde de Peixes-AquaNutri (UNESP, Botucatu, SP, Brasil). A moagem foi realizada em moinho centrífugo com peneiras de 0,8 mm (Viera MC 680B, Tatuí, SP, Brasil) e a extrusão em extrusora de rosca simples com matriz de 3 mm e um furo, três “facas” com 40 rpm e temperatura de 105°C (Exteec EX30, Ribeirão Preto, SP, Brasil), obtendo pellets com diâmetros de 4 a 5 mm e secos em estufa de ventilação forçada de ar (Hexis HX00, Jundiaí, SP, Brasil) a 55°C por 24 horas.

Após secagem e resfriamento, o óleo de soja (ingrediente) e/ou as enzimas foram aplicadas *on top* dos pellets das dietas e os mesmos secos em estufa com circulação forçada de ar (Hexis HX00, Jundiaí, SP, Brasil) a 42°C por 2 horas, no Laboratório de Aquicultura-GPA (UEPG, Ponta Grossa, PR, Brasil). Para a adição das enzimas, Natuphos® e Natugrain® foram diluídos 1:100 com água deionizada. Em seguida, 10 mL do Natuphos® e 20 mL do Natugrain® diluído foram adicionados respectivamente em 290 e 280 mL de água deionizada, para serem aplicados em cada quilograma de ração, obtendo dietas suplementadas com fitase (1000 FTU kg⁻¹ da dieta), xilanase (1120 TXU kg⁻¹ da dieta) e β-glucanase (500 TGU kg⁻¹ da dieta). Posteriormente, todas as dietas foram revestidas com óleo de soja, secas e armazenadas na geladeira (4 °C).

2.2. Características da fitase, xilanase e β- glucanase

A fitase exógena utilizada no presente estudo foi obtida do produto Natuphos® E 10000 L (10000 FTU g⁻¹, BASF, Ludwigshafen na Rhein, RLP, Alemanha), um produto líquido que contém 6-fitase híbrida [EC 3.1.3.26] produzida a partir da combinação de três fontes bacterianas: *Hafnia* sp., *Yersinia mollaretii* e *Buttiauxella gaviniae*, formando uma geração híbrida que foi inserida em uma cepa geneticamente modificada de *Aspergillus niger* (DSM 25770). Conforme dados do fabricante, a hibridização foi realizada com o intuito de melhorar a atividade da fitase de forma a abranger uma extensa faixa de pH (2,0 a 5,5), além de ser resistente a pepsina e temperaturas de até 80°C (Rychen et al., 2017).

O complexo xilanase-β-glucanase utilizado no presente estudo foi obtido do produto Natugrain® TS L (5600 TXU e 2500 TGU g⁻¹, BASF, Ludwigshafen na Rhein, RLP, Alemanha), um produto líquido que contém endo-1,4-β xilanase [EC 3.2.1.8] e endo-1,4-β glucanase [EC 3.2.1.4] que foi produzido a partir de duas cepas geneticamente modificadas de *Aspergillus niger* (CBS 109.713 e DSM 18404, respectivamente).

Conforme dados do fabricante, tais enzimas possuem estabilidade térmica de até 85°C (Aquilina et al., 2016).

2.3. *Delineamento experimental*

O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso (dois), com quatro tratamentos (CON, FT, XB e FT+XB) e duas repetições por bloco. O ensaio de digestibilidade foi composto por dois períodos de experimentação diferentes (blocos) de 21 dias cada. O primeiro e segundo período de experimentação foram conduzidos em março e maio de 2019, respectivamente. Procurou-se manter as condições experimentais (peixes com a mesma genética e peso inicial, mesmo manejo e qualidade de água) nos dois períodos de experimentação diferentes de forma a obter quatro repetições por tratamento. A repetição considerada como unidade experimental foi composta por uma gaiola de digestibilidade com 17 peixes.

2.4. *Peixes e condições experimentais*

Alevinos de tilápia do Nilo masculinizados (*Oreochromis niloticus*) da linhagem Premium Aquabel foram adquiridos de uma piscicultura comercial (Ponta Grossa, PR, Brasil) e levados ao Laboratório de Aquicultura-GPA (UEPG, Ponta Grossa, PR, Brasil), lugar onde foram mantidos em aquários cilíndricos de 200 L e alimentados com dieta comercial micro extrusada (Algomix[®]) com 42% de proteína bruta e 4% de gordura.

Sete dias antes do ensaio de digestibilidade, os peixes foram distribuídos aleatoriamente em aquários cilíndricos de 200 L (17 peixes/aquário) dentro de gaiolas cilíndricas de PVC com abertura de malha de 3 cm (50 L) e foram alimentados com as dietas experimentais de forma a simular o ensaio de alimentação do experimento.

O ensaio de digestibilidade foi realizado por 21 dias. Os peixes ($22,52 \pm 0,65$ g) mantiveram-se nos aquários cilíndricos destinados a alimentação, e receberam seis refeições diárias (8, 9, 10, 11, 14 e às 15h) até a saciedade aparente. Após esse período, os peixes foram transferidos para os aquários cilíndricos com fundo cônico (150 L), adaptados para a coleta de fezes (sistema Guelph modificado), onde defecavam e as fezes eram captadas em recipiente coletor na manhã do dia subsequente. As fezes coletadas foram centrifugadas e secas em estufa de ventilação forçada de ar (Hexis HX00, Jundiaí, SP, Brasil) a 55°C por 48 horas. Após secas, as fezes foram moídas no almofariz e armazenadas no freezer a -20°C.

Os parâmetros de qualidade da água permaneceram dentro das faixas pré-estabelecidas. Durante o experimento, a temperatura média foi de $28,3 \pm 0,6$ °C, respeitando os limites de conforto térmico para tilápias de acordo com El-Sayed e Kawanna (2008), pH $7,0 \pm 0,2$, oxigênio dissolvido $5,85 \pm 0,41$ mg L⁻¹, nitrogênio amoniacal total $1,50 \pm 0,06$ mg L⁻¹, nitrito $1,00 \pm 0,06$ mg L⁻¹ e nitrato $10,15 \pm 0,32$ mg L⁻¹. O fotoperíodo foi de 10h de luz: 14h de escuro (luzes acesas às 8h e apagadas às 18h).

2.5. Análises químicas

As análises de matéria seca (método 934.01), proteína bruta (método 981.10), extrato etéreo (método 920.85), fibra bruta (método 991.43) e cinzas (método 942.05) da dieta controle e fezes foram realizadas conforme os métodos padronizados pela AOAC (1995). A energia bruta foi determinada em bomba calorimétrica adiabática (Modelo 6200, Parr Instruments Company, Moline, Illinois, EUA) seguindo a metodologia de Silva e Queiroz (2004). As análises de matéria seca, extrato etéreo e cinzas foram efetuadas no Laboratório de Aquicultura-GPA (UEPG, Ponta Grossa, PR, Brasil) e as análises de energia, proteína e fibra bruta no Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal-LANA (UEM, Maringá, PR, Brasil).

O teor de cálcio, fósforo, zinco, ferro, manganês, magnésio e cobre da dieta controle e fezes foram determinados pela técnica de espectrofotometria de absorção atômica (Welz and Sperling, 1998), enquanto o teor de cromo (Cr₂O₃) foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Bremer Neto et al. (2005). Para a análise de cromo, cálcio, fósforo, zinco, ferro, manganês, magnésio e cobre, amostras da dieta controle e fezes foram encaminhadas para o laboratório CBO (Valinhos, SP, Brasil).

O conteúdo de aminoácidos totais e livres na dieta controle e fezes foi determinado pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (*HPLC: high-performance liquid chromatography*), em que os aminoácidos foram separados por cromatografia de troca iônica e quantificados por fotolorimetria após coloração de ninidrina (Rayner, 1985). Para a quantificação dos aminoácidos essenciais e não essenciais, amostras da dieta controle e fezes foram encaminhadas para o Laboratório de Nutrição da Ajinomoto (São Paulo, SP, Brasil).

2.6. Digestibilidade

O coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca (MS), energia bruta (EB), proteína bruta (PB), amido, lipídeos totais (LT), fibra bruta (FB), cinzas, minerais e aminoácidos das dietas experimentais foram calculados de acordo com o método padrão (Maynard and Loosli., 1969):

$$CDA_{(n)} = 100 - \left[100 \left(\frac{\%Cr_2O_{3d}}{\%Cr_2O_{3f}} \right) \times \left(\frac{\%N_f}{\%N_d} \right) \right]$$

Sendo, $CDA_{(n)}$ = coeficiente de digestibilidade aparente da energia ou nutriente; Cr_2O_{3d} = % de óxido de cromo na dieta; Cr_2O_{3f} = % de óxido de cromo nas fezes; N_d = nutriente na dieta e N_f = nutriente nas fezes.

2.7. Excreção fecal de nitrogênio e fósforo

O ganho de peso corporal foi calculado pela diferença entre o peso médio inicial e final dos peixes. Para a pesagem inicial e final, os peixes foram anestesiados com MS-222 na concentração de 100 mg L⁻¹ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). O consumo alimentar médio dos peixes foi monitorado para determinação do nitrogênio e fósforo ingerido durante o experimento. A excreção fecal do nitrogênio (N_e) e fósforo (P_e), foram determinadas de acordo com as equações:

$$N_e = N_i - (N_i \times CDA_N)$$

$$P_e = P_i - (P_i \times CDA_P)$$

Sendo, N_e e P_e = nitrogênio e fósforo excretado, respectivamente (g kg⁻¹ de ganho de peso corporal); N_i e P_i = nitrogênio e fósforo ingerido, respectivamente (g kg⁻¹ de ganho de peso corporal) e CDA_N e CDA_P = coeficiente de digestibilidade aparente do nitrogênio e fósforo, respectivamente (%).

2.8. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa *Statistical Analysis System* (SAS) versão 9.0 (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Inicialmente, os dados obtidos foram submetidos a verificação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e a análise de homocedasticidade pelo teste de Brown Forsythe. Atendida essas duas

exigências, os dados foram submetidos à análise de variância simples (*one-way ANOVA*) e em caso de efeito significativo ($P < 0,05$), as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%. Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (EPM).

3. Resultados

Na Tabela 3, não foi observada diferença na digestibilidade da FB ($P = 0,009$) entre os diferentes tratamentos. Entretanto, observou-se maior digestibilidade da MS e amido ($P < 0,001$) em dietas com suplementação enzimática, independente do seu uso isolado ou combinado. A dieta controle apresentou pior aproveitamento da MS e amido.

A digestibilidade da EB foi maior em dietas suplementadas com fitase ($P < 0,001$), independente da combinação com outra enzima. A dieta suplementada somente com xilanase- β -glucanase se igualou à dieta suplementada apenas com fitase. A dieta controle apresentou o pior aproveitamento da EB.

A digestibilidade da PB foi maior na dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase ($P < 0,001$). A dieta suplementada somente com xilanase- β -glucanase se igualou à dieta suplementada apenas com fitase. Apesar disso, tanto a dieta com suplementação isolada de xilanase- β -glucanase como a dieta controle apresentaram pior aproveitamento da PB.

A digestibilidade dos LT foi maior em dietas suplementadas com xilanase e β -glucanase ($P < 0,001$), independente da combinação com fitase. A dieta suplementada somente com fitase se igualou à dieta suplementada apenas com xilanase- β -glucanase. Apesar disso, tanto a dieta com suplementação isolada de fitase como a dieta controle apresentaram pior aproveitamento de LT.

Por último, observou-se maior digestibilidade das cinzas ($P < 0,001$) nas dietas suplementadas com fitase, independente da combinação com outra enzima. A dieta com suplementação isolada de xilanase- β -glucanase e a dieta controle apresentaram o pior aproveitamento de cinzas.

Tabela 3

Coefficiente de digestibilidade aparente (g kg^{-1}) da matéria seca, energia bruta e nutrientes de dietas sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase para juvenis de tilápia do Nilo.

CDA (g kg^{-1})	Dieta ¹				EPM ²	Valor- <i>P</i> ³
	CON	FT	XB	FT+XB		
Matéria seca	55,45 ^b	64,79 ^a	64,87 ^a	66,56 ^a	0,305	<0,001
Energia bruta	75,09 ^c	78,77 ^{ab}	77,82 ^b	79,46 ^a	0,452	<0,001
Proteína bruta	89,23 ^c	90,43 ^b	89,97 ^{bc}	91,76 ^a	0,066	<0,001
Amido	96,42 ^b	97,32 ^a	97,55 ^a	97,32 ^a	0,112	<0,001
Lipídeos totais	91,60 ^c	92,45 ^{bc}	93,35 ^{ab}	94,62 ^a	0,330	<0,001
Fibra bruta	-17,10	-10,61	-11,20	-12,96	1,041	0,099
Cinzas	39,64 ^b	49,90 ^a	38,49 ^b	56,62 ^a	0,521	<0,001

¹ CON: dieta controle; FT: dieta suplementada com fitase; XB: dieta suplementada com xilanase e β -glucanase; FT+XB: dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase.

³ EPM, erro padrão da média.

⁴ Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Observou-se maiores valores de energia digestível em dietas suplementadas com fitase ($P < 0,001$), independente da combinação com outra enzima. A dieta suplementada somente com xilanase- β -glucanase se igualou à dieta suplementada apenas com fitase. A dieta controle apresentou o pior valor de energia digestível (Fig. 1).

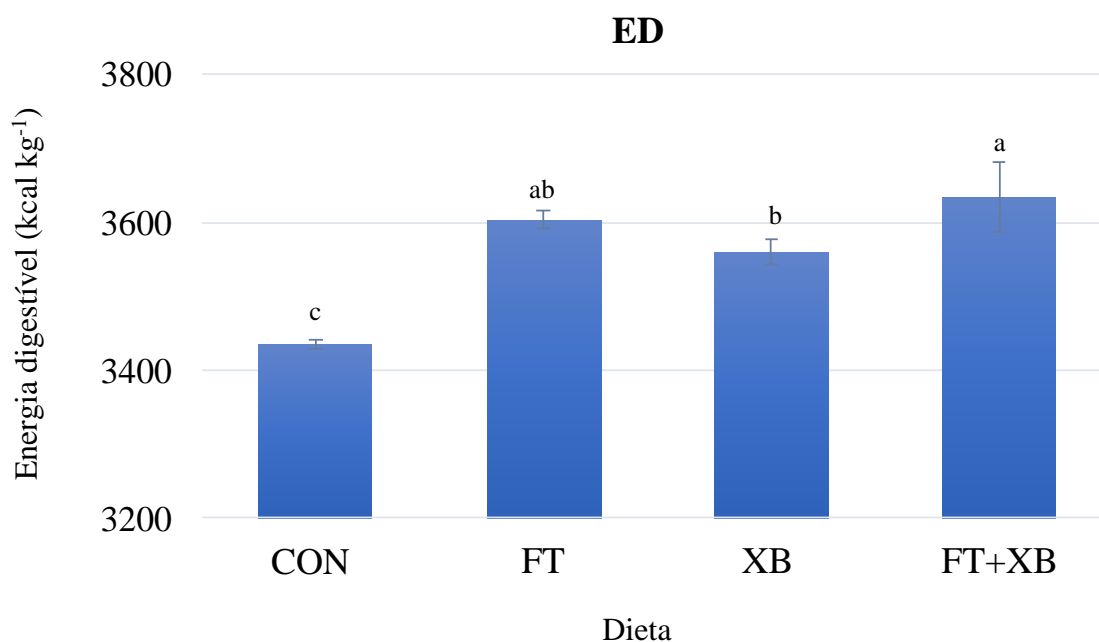


Fig. 1. Valores de energia digestível (ED) em dietas para tilápias do Nilo alimentadas com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase. CON: dieta controle; FT: dieta suplementada com fitase; XB: dieta suplementada com xilanase e β -glucanase; FT+XB: dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase. Barras representam a média \pm desvio padrão da média para cada tratamento com quatro repetições de 17 peixes cada. Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,001$).

Observou-se maiores valores de proteína digestível ($P < 0,001$) na dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase. A dieta suplementada somente com xilanase- β -glucanase se igualou à dieta suplementada apenas com fitase. A dieta com suplementação isolada de xilanase- β -glucanase e a dieta controle apresentaram os piores valores dietéticos de proteína digestível (Fig. 2).

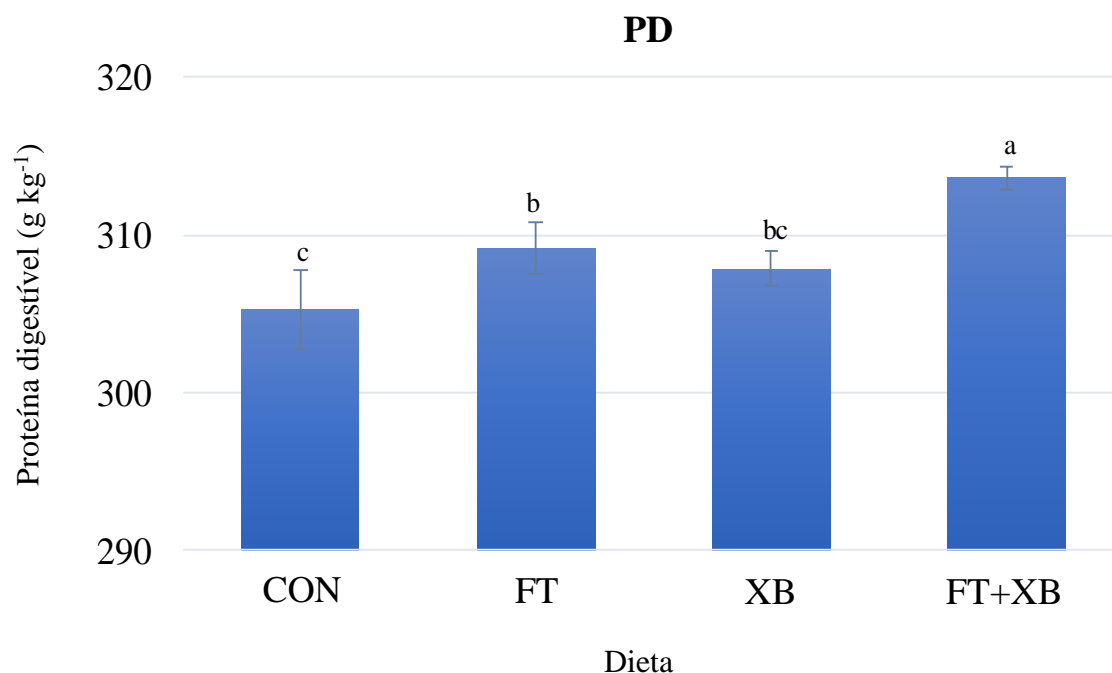


Fig. 2. Valores de proteína digestível (PD) em dietas para tilápias do Nilo alimentadas com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase. CON: dieta controle; FT: dieta suplementada com fitase; XB: dieta suplementada com xilanase e β -glucanase; FT+XB: dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase. Barras representam a média \pm desvio padrão da média para cada tratamento com quatro repetições de 17 peixes cada. Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,001$).

Na Tabela 4, observou-se maior digestibilidade do Ca e P na dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase ($P < 0,001$). Não obstante, a dieta suplementada somente com fitase apresentou maior digestibilidade do Ca e P em relação a dieta suplementada apenas com xilanase e β -glucanase. A dieta controle apresentou o pior aproveitamento de Ca e P.

A digestibilidade do Zn, Mg e Mn foi maior ($P < 0,001$) em dietas suplementadas com fitase, independente da combinação com outra enzima. Além disso, a dieta com suplementação isolada de xilanase- β -glucanase apresentou maior digestibilidade de Zn, Mg e Mn em relação a dieta controle. A dieta controle apresentou o pior aproveitamento de Zn, Mg e Mn.

A digestibilidade do Fe foi maior na dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase ($P < 0,001$). Não obstante, a dieta suplementada somente com xilanase e β -

glucanase apresentou maior digestibilidade do Fe em relação a dieta suplementada apenas com fitase. A dieta controle apresentou o pior aproveitamento do Fe.

Por último, observou-se maior digestibilidade do Cu ($P < 0,001$) na dieta suplementada apenas com xilanase e β -glucanase. Não obstante, a dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase apresentou maior digestibilidade do Cu em relação a dieta controle. A dieta com suplementação isolada de fitase apresentou o pior aproveitamento do Cu.

Tabela 4

Coefficiente de disponibilidade aparente (g kg^{-1}) dos macro e microminerais analisados de dietas sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase para juvenis de tilápia do Nilo.

CDA (g kg^{-1}) ¹	Dieta ²				EPM ³	Valor- P ⁴
	CON	FT	XB	FT+XB		
Ca	25,80 ^d	55,17 ^b	41,78 ^c	58,92 ^a	3,358	<0,001
P	26,47 ^d	60,42 ^b	44,34 ^c	67,08 ^a	4,088	<0,001
Zn	-6,17 ^c	18,25 ^a	13,52 ^b	20,32 ^a	2,717	<0,001
Fe	-48,38 ^d	-21,74 ^c	-6,58 ^b	-2,84 ^a	4,634	<0,001
Mn	-9,40 ^c	15,82 ^a	-0,02 ^b	17,08 ^a	2,405	<0,001
Mg	61,97 ^c	75,26 ^a	67,16 ^b	76,73 ^a	1,558	<0,001
Cu	51,66 ^c	49,92 ^d	61,07 ^a	54,85 ^b	1,104	<0,001

¹ Ca: cálcio; P: fósforo; Zn: zinco; Fe: ferro; Mn: manganês; Mg: magnésio; Cu: cobre.

² CON: dieta controle; FT: dieta suplementada com fitase; XB: dieta suplementada com xilanase e β -glucanase; FT+XB: dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase.

³ EPM, erro padrão da média.

⁴ Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Observou-se maiores valores dietéticos de fósforo disponível ($P < 0,001$) em dietas suplementadas com fitase, independente da combinação com outra enzima. A dieta suplementada somente com xilanase- β -glucanase ainda apresentou maior valor dietético de fósforo disponível do que a dieta controle. A dieta controle apresentou o pior valor dietético de fósforo disponível (Fig. 3).

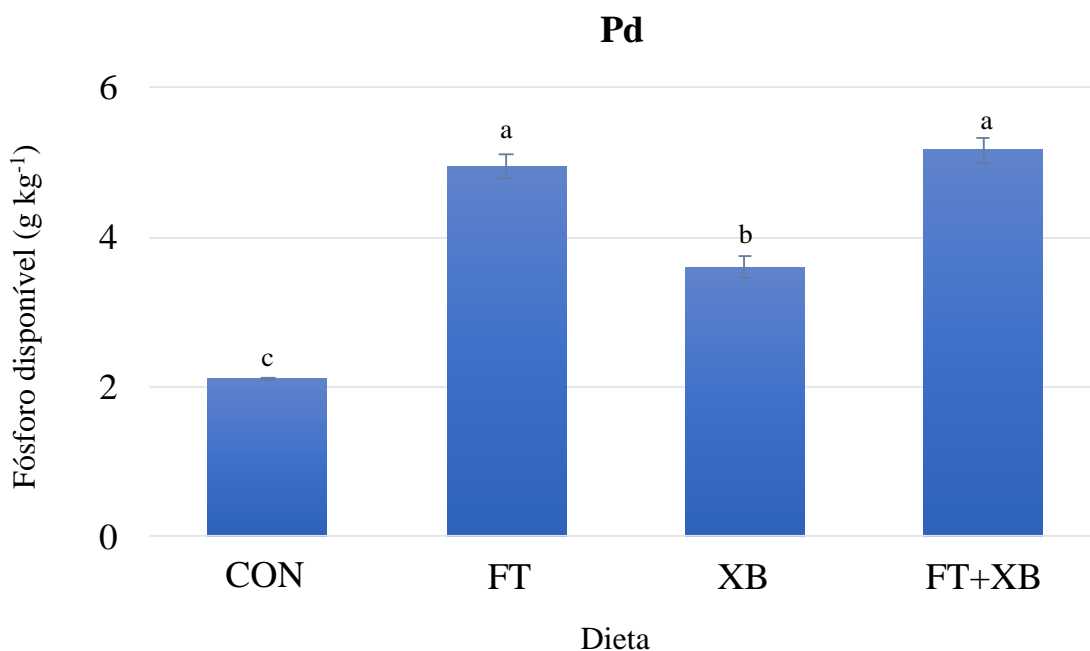


Fig. 3. Valores do fósforo disponível (Pd) em dietas para tilápias do Nilo alimentadas com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase. CON: dieta controle; FT: dieta suplementada com fitase; XB: dieta suplementada com xilanase e β -glucanase; FT+XB: dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase. Barras representam a média \pm desvio padrão da média para cada tratamento com quatro repetições de 17 peixes cada. Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,001$).

A Tabela 5 indica a digestibilidade aparente dos aminoácidos essenciais (AAE) e não essenciais (AANE) das dietas experimentais. Dentre os aminoácidos essenciais, a digestibilidade do triptofano ($P = 0,062$) não apresentou diferença significativa entre os diferentes tratamentos.

A digestibilidade da arginina ($P = 0,019$), histidina ($P = 0,019$) e lisina ($P = 0,019$) foi maior em dietas suplementadas com fitase, independente da combinação com outra enzima. A dieta suplementada somente com xilanase- β -glucanase se igualou à dieta suplementada apenas com fitase. Apesar disso, tanto a dieta com suplementação isolada de xilanase- β -glucanase como a dieta controle apresentaram pior aproveitamento da arginina, histidina e lisina.

A digestibilidade da isoleucina ($P = 0,004$), leucina ($P = 0,004$) e treonina ($P = 0,002$) foi maior na dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase. As dietas com suplementação isolada (FT e XB) e sem suplementação (CON) apresentaram o pior aproveitamento de isoleucina, leucina e treonina.

A digestibilidade da fenilalanina foi maior ($P = 0,001$) em dietas suplementadas com fitase, independente da combinação com outra enzima. A dieta suplementada somente com xilanase- β -glucanase se igualou à dieta suplementada apenas com fitase. A dieta controle apresentou o pior aproveitamento da fenilalanina.

A digestibilidade da metionina foi maior ($P = 0,001$) em dietas suplementadas com fitase, independente da combinação com outra enzima. A dieta suplementada somente com xilanase- β -glucanase se igualou à dieta suplementada apenas com fitase. Apesar disso, tanto a dieta com suplementação isolada de xilanase- β -glucanase como a dieta controle apresentaram pior aproveitamento da metionina.

A digestibilidade da valina foi maior ($P = 0,025$) em dietas com suplementação enzimática, independente do seu uso isolado ou combinado. Apesar disso, as dietas com suplementação isolada (FT e XB) e sem suplementação (CON) apresentaram o pior aproveitamento da valina.

Dentre os aminoácidos não essenciais, a digestibilidade do ácido aspártico ($P = 0,35$), alanina ($P = 0,15$), glicina ($P = 0,43$) e tirosina ($P = 0,48$) não apresentaram diferença significativa entre os diferentes tratamentos. Por outro lado, observou-se maior digestibilidade do ácido glutâmico ($P = 0,00$), cistina ($P < 0,001$) e serina ($P = 0,01$) da dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase. As dietas com suplementação isolada (FT e XB) e sem suplementação (CON) apresentaram o pior aproveitamento de ácido glutâmico, cistina e tirosina.

Tabela 5

Coefficiente de digestibilidade aparente (g kg^{-1}) dos aminoácidos de dietas sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase para juvenis de tilápia do Nilo.

CDA (g kg^{-1})	Dieta ¹				EPM ²	Valor- <i>P</i> ³
	CON	FT	XB	FT+XB		
<i>Aminoácidos essenciais (AAE, g kg⁻¹)</i>						
Arginina	95,19 ^b	95,56 ^{ab}	95,28 ^b	96,17 ^a	0,031	0,019
Fenilalanina	88,86 ^c	91,30 ^{ab}	90,89 ^b	92,90 ^a	0,107	0,001
Histidina	92,58 ^b	93,04 ^{ab}	92,72 ^b	93,88 ^a	0,044	0,019
Isoleucina	89,53 ^b	89,65 ^b	89,89 ^b	91,66 ^a	0,069	0,004
Leucina	89,21 ^b	89,72 ^b	89,72 ^b	90,80 ^a	0,046	0,004
Lisina	93,82 ^b	94,35 ^{ab}	93,73 ^b	94,72 ^a	0,035	0,019
Metionina	90,35 ^c	91,90 ^{ab}	91,58 ^{bc}	92,98 ^a	0,070	0,001
Treonina	85,66 ^b	85,21 ^b	85,32 ^b	87,88 ^a	0,084	0,002
Triptofano	85,64	89,35	89,80	90,32	0,178	0,062
Valina	84,31 ^b	85,19 ^{ab}	85,90 ^{ab}	87,40 ^a	0,100	0,025
<i>Aminoácidos não essenciais (AANE, g kg⁻¹)</i>						
Ácido aspártico	70,97	63,04	61,29	66,81	0,497	0,35
Ácido glutâmico	96,08 ^b	96,24 ^b	96,28 ^b	97,02 ^a	0,027	0,00
Alanina	84,47	84,26	84,70	86,10	0,079	0,15
Cistina	84,50 ^b	86,99 ^b	87,10 ^b	88,37 ^a	0,102	<0,001
Glicina	86,14	86,03	86,07	87,22	0,071	0,43
Serina	90,73 ^b	91,11 ^b	91,10 ^b	92,30 ^a	0,049	0,01
Tirosina	92,43	92,67	91,90	92,90	0,056	0,48

¹ CON: dieta controle; FT: dieta suplementada com fitase; XB: dieta suplementada com xilanase e β -glucanase; FT+XB: dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase.

² EPM, erro padrão da média.

³ Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Comparado a dieta controle, peixes alimentados com dietas contendo fitase, xilanase e β -glucanase mostraram reduzir a excreção fecal de nitrogênio ($P = 0,007$) em 30% (Fig. 4). Além disso, observou-se menor excreção fecal de nitrogênio nas dietas com suplementação enzimática, independente da suplementação isolada ou combinada. Apesar disso, as dietas com suplementação isolada (FT e XB) e sem suplementação (CON) apresentaram o pior aproveitamento de nitrogênio.

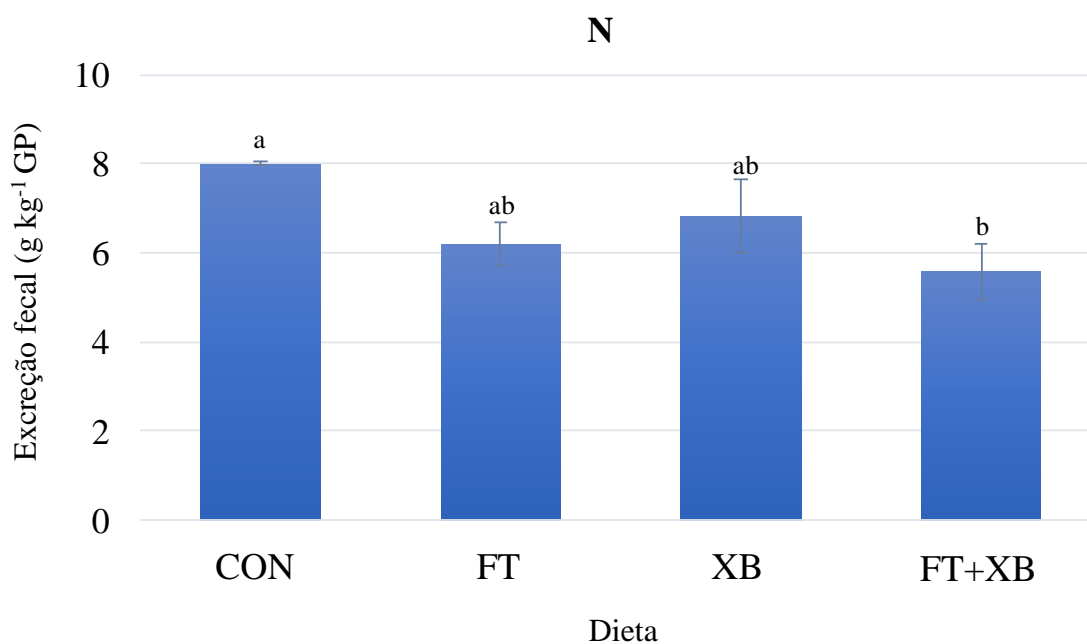


Fig. 4. Excreção fecal [g kg⁻¹ de ganho de peso (GP)] de nitrogênio (N) em juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase. CON: dieta controle; FT: dieta suplementada com fitase; XB: dieta suplementada com xilanase e β -glucanase; FT+XB: dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase. Barras representam a média \pm desvio padrão da média para cada tratamento com quatro repetições de 17 peixes cada. Letras distintas indicam diferença significativa de acordo com o teste Tukey ($P = 0,007$).

Comparado a dieta controle, peixes alimentados com dietas contendo fitase, xilanase e β -glucanase mostraram reduzir a excreção fecal de fósforo ($P < 0,001$) em 49,5% (Fig. 5). Além disso, observou-se menor excreção fecal de fósforo nas dietas com suplementação de fitase, independente da combinação com outra enzima. A dieta suplementada somente com xilanase e β -glucanase se igualou à dieta suplementada apenas com fitase. A dieta controle apresentou a maior excreção fecal de fósforo.

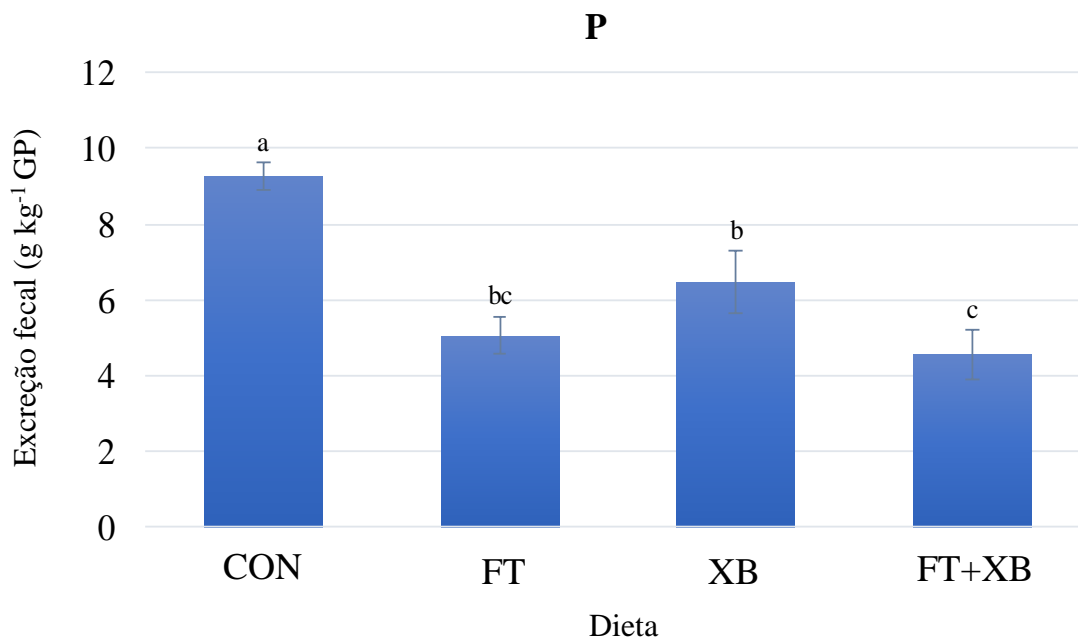


Fig. 5. Excreção fecal [g kg⁻¹ de ganho de peso (GP)] de fósforo (P) em juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase. CON: dieta controle; FT: dieta suplementada com fitase; XB: dieta suplementada com xilanase e β -glucanase; FT+XB: dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase. Barras representam a média \pm desvio padrão da média para cada tratamento com quatro repetições de 17 peixes cada. Letras distintas indicam diferença significativa de acordo com o teste Tukey ($P < 0,001$).

4. Discussão

No presente estudo, a suplementação de fitase aumentou o CDA da energia bruta de dietas ricas em ingredientes vegetais para tilápias do Nilo. Isto se deve, pela ação da fitase em inibir a formação de complexos entre o fitato e nutrientes na dieta (Kumar et al., 2012), como demonstrado no aumento do CDA da proteína e amido na presente pesquisa, pois a absorção crescente de ambos nutrientes na dieta implica no aproveitamento de energia digestível pelo animal (Kumar et al., 2010). Assim, a adição do complexo xilanase- β -glucanase junto à fitase aumentou ainda mais a digestibilidade da energia bruta pelos peixes, resultando em maior teor de energia digestível nas dietas, na presente pesquisa. Justificado pela ação conjunta da fitase com o complexo xilanase- β -glucanase, em que este último hidrolisa os PNAs que compõem a fibra bruta e constituem fonte energética de baixo custo em dietas para tilápias (Castillo and Gatlin, 2015). Esse resultado foi corroborado por Mass et al. (2021) e também por outros autores que observaram que a suplementação de fitase e xilanase aumentou os coeficientes de

digestibilidade aparente da proteína, carboidratos e lipídios para a tilápia do Nilo, resultando em maior valor de energia digestível (Maas et al., 2020; Wallace et al., 2016).

A suplementação de carboidrases incrementa a digestibilidade dos lipídeos de dietas elaboradas a partir de fontes vegetais (Castillo and Gatlin, 2015). Na tilápia, a suplementação dietética com xilanase e β -glucanase diminui o grau de polimerização da dieta e concomitantemente a viscosidade da digesta (Munyaka et al., 2016), promovendo melhor acesso das enzimas digestivas protease, amilase e lipase ao substrato (Hassaan et al., 2019). Além disso, a xilanase atua reduzindo a ação dos PNAs sobre a hidrólise dos sais biliares, aumentando a utilização de lipídeos pelo animal (Vahjen et al., 2007). Essas respostas fisiológicas na tilápia, justificam o maior CDA dos lipídeos observado em peixes que consumiram as dietas com xilanase e β -glucanase no presente trabalho. O aumento do CDA dos lipídios em dietas suplementadas com complexo xilanase- β -glucanase já foi descrito em tilápias, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* (Lin et al., 2007) e outras espécies como robalo europeu, *Dicentrarchus labrax* (Magalhães et al., 2018), truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Dalsgaard et al., 2012), e “turbot”, *Scophthalmus maximus* (Diógenes et al., 2018). Dessa forma, a suplementação da fitase junto ao complexo xilanase- β -glucanase aumentou ainda mais a digestibilidade de lipídeos pelas tilápias, na presente pesquisa. Isto é justificado pela ação sinérgica da fitase, xilanase e β -glucanase na redução do grau de polimerização da dieta, como observado em tilápias do Nilo (Maas et al., 2021).

No presente estudo, foi observado maior CDA da proteína bruta em peixes que consumiram dietas suplementadas com fitase, xilanase e β -glucanase, resultando em dietas com maiores teores de proteína digestível. Os efeitos benéficos da fitase sobre a biodisponibilidade da proteína ocorre pelo rompimento do complexo fitato-proteína permitindo que as proteases endógenas possam atuar diretamente sobre as proteínas dietéticas (Selle et al., 2012), aumentando seu CDA (Biswas et al., 2019) e dos aminoácidos (Riche et al., 2002). Semelhantemente ao observado no presente estudo, outros autores já demonstraram que a adição de xilanase e β -glucanase aumentaram o CDA da proteína em tilápias (Maas et al., 2021), e que este efeito pode ser atribuído à redução da viscosidade da digesta e aumento da atividade das proteases endógenas (Hassaan et al., 2019; Lin et al., 2007). Este resultado também foi observado em juvenis de carpa Jian, *Cyprinus carpio* (var. Jian) alimentados com dietas suplementadas só com xilanase (Jiang et al., 2014) e em tilápias do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com fitase e xilanase (Maas et al., 2018).

No presente estudo, a disponibilidade da maioria dos aminoácidos essenciais foi maior em dietas suplementadas com fitase. Este efeito positivo da fitase pode ser explicado pela prévia hidrólise do fitato, impedindo a formação de complexos binários e ternários, disponibilizando os aminoácidos para absorção (Selle et al., 2012), como observado no trabalho de Riche et al. (2002) com juvenis de tilápia do Nilo, em que comprovou que a crescente suplementação de fitase em dietas contendo alto teor de fitato aumenta a disponibilidade aparente de um ou mais aminoácidos essenciais. Igualmente, observou-se maior disponibilidade aparente na maioria dos aminoácidos não essenciais e parte dos aminoácidos essenciais na dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase. Este resultado pode ser explicado pela ação sinérgica entre a fitase e o complexo xilanase- β -glucanase, em que a fitase atua no aumento da atividade das proteases digestivas, pela redução na formação de complexos entre fitato e enzimas endógenas (Li et al., 1993), e pela ação das carboidrases na diminuição dos PNAs que dificultam o acesso das enzimas digestivas à proteína dietética (Li et al., 2009). Este resultado pode ser corroborado por Maas et al. (2021), em que foi comprovado efeito sinérgico da fitase, xilanase e β -glucanase no aproveitamento de proteína dietética para tilápias do Nilo.

No presente estudo, a disponibilidade do P foi influenciada pela adição de fitase e complexo xilanase- β -glucanase. O efeito da suplementação da fitase sobre os CDA dos minerais depende da fonte e dose de fitase, espécie e estágio de desenvolvimento do peixe (Kumar et al., 2012). Para tilápia do Nilo, a dose recomendada varia de 750 a 1000 FTU kg^{-1} (Liebert and Portz, 2005). Na presente pesquisa, a dieta controle foi formulada de forma a não atender à exigência de P disponível para o crescimento de juvenis de tilápia, estimado em 4 g kg^{-1} de fósforo de acordo com o NRC (2011). Considerando os CDA do P, somente as dietas que receberam 1000 FTU kg^{-1} apresentaram valores de P disponível que atendiam a exigência de fósforo para tilápias.

A digestibilidade aparente do P é considerada como principal critério sensível na avaliação do efeito da fitase como enzima exógena (Kumar et al., 2012). No presente estudo, o valor do CDA do P obtido em dietas elaboradas exclusivamente com alimentos de origem vegetal (60,42%) se aproximou ao valor descrito (60,9%) com híbridos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* (Li et al., 2009).

No presente estudo, considerando o efeito isolado da fitase foi obtido CDA do fósforo de 60,42%, sendo que a dieta que recebeu adição combinada com a xilanase e β -glucanase resultou em aumento do CDA do P para 67,08%, indicando efeito sinérgico

entre a fitase, xilanase e β -glucanase. Resultado corroborado por Maas et al. (2018) e foi comprovado efeito sinérgico da fitase e xilanase na digestibilidade do fósforo em tilápias do Nilo, sendo que a adição de fitase resultou em CDA do P de 66,10%, enquanto sua combinação com xilanase resultou em CDA do P de 68,9%.

A adição isolada e combinada da fitase e xilanase- β -glucanase também aumentou o CDA do Ca, Zn, Fe, Mn e Mg sendo observado efeito sinérgico sobre a disponibilidade de Ca e Fe. O aumento no CDA desses minerais em dietas suplementadas com fitase também foi descrita em truta arco-íris (Vandenberg et al., 2011) e no “turbot”, *Psetta máxima* (Von Danwitz et al., 2016).

No entanto, na presente pesquisa, a adição de fitase reduziu o CDA do Cu, enquanto a adição de xilanase- β -glucanase resultou em aumento na disponibilidade do Cu pelos peixes. Existe controvérsia sobre os efeitos da fitase sobre a disponibilidade do Cu, enquanto alguns autores reportaram que o CDA do Cu em dietas suplementadas com fitase não foi alterado (Vandenberg et al., 2011; Von Danwitz et al., 2016), outros descreveram aumento no CDA do Cu (Wang et al., 2009). A quantidade de Zn liberada do complexo fitato pela ação da fitase pode ser a razão das diferentes respostas sobre o mecanismo de antagonismo do Cu (Zacharias et al., 2003). A fitase induz a melhora da disponibilidade de Zn, como encontrado na truta arco-íris (Vielma et al., 2004; Wang et al., 2009) está de acordo com o presente estudo, em que foi encontrada maior CDA do Zn em dietas suplementadas com fitase. A redução no CDA do Cu em dietas com suplementação elevada de fitase também foi descrita na truta arco-íris (Vandenberg et al., 2011). O antagonismo entre Zn e Cu é mediado principalmente pelo processo de absorção, em que o Zn apresenta altas concentrações de metalotioneínas na mucosa intestinal e essa proteína se liga ao Cu mais fortemente do que com o Zn, impedindo a absorção do Cu, que é eliminado com as células da mucosa (Fischer et al., 1983).

Autores demonstraram que a fitase e xilanase são ferramentas nutricionais para reduzir o impacto ambiental com redução na excreção de nitrogênio pelos peixes (Ai et al., 2007; Maas et al., 2020). Na presente pesquisa, a suplementação combinada de fitase, xilanase e β -glucanase foi efetiva para redução da excreção fecal do nitrogênio e fósforo pelos peixes. Comparado a dieta controle, peixes alimentados com dietas contendo fitase, xilanase e β -glucanase mostraram reduzir a excreção fecal de nitrogênio e fósforo em 30 e 49,5%, respectivamente. As dietas para peixes são potencialmente impactantes, considerando o elevado conteúdo de proteína em relação às dietas para aves e suínos, e também pela baixa disponibilidade do fósforo dos alimentos de origem vegetal. Assim

como observado por outros autores, a suplementação de fitase, xilanase e β -glucanase em dietas para tilápias aumenta os CDA da proteína e do P, reduzindo o potencial poluente da criação de tilápias (Maas et al., 2021). A redução na excreção de N e, principalmente, P pelos peixes, tem sido demonstrada em peixes que consumiram dietas com fitase, como observado na tilápia do Nilo (Verlhac-Trichet et al., 2014), mas os benefícios da adição de xilanase e β -glucanase sobre as melhorias nos CDA da PB e P e conseqüentemente redução na excreção de N e P também foram demonstrados para truta arco-íris (Dalsgaard et al., 2012), robalo europeu (Magalhães et al., 2018) e tilápia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* (Lin et al., 2007).

A xilanase hidrolisa o polissacarídeo linear β - 1,4 xilano, o principal constituinte dos arabinoxilanos, liberando a xilose, decompondo assim a hemicelulose, componente da parede celular das plantas (Beg et al., 2001). Assim, a xilanase atua sobre a hidrólise dos PNAs e reduz a viscosidade da digesta em tilápias do Nilo (Adeoye et al., 2016), diminuindo o efeito negativo da viscosidade (Vahjen et al., 2007). Os efeitos positivos da β -glucanase, deveu-se provavelmente à atividade lateral das pectinas, inferência apoiada pelos maiores CDA dos açúcares constituintes da pectina, galactose, manose e ácidos urônicos, como demonstrado em truta arco-íris alimentadas com dietas suplementadas com β -glucanase (Dalsgaard et al., 2016) e tilápias do Nilo (Maas et al., 2021).

Em resumo, na presente pesquisa foi observado aumento no CDA da energia e nutrientes em dietas suplementadas com fitase e complexo xilanase- β -glucanase. Além disso, foi observado que a combinação de fitase e complexo xilanase- β -glucanase potencializou os efeitos isolados das enzimas, ocorrendo efeito sinérgico sobre os CDA da energia e nutrientes. A fitase, xilanase e β -glucanase melhoraram o valor nutritivo das dietas, evidenciado principalmente pelo aumento dos valores de energia digestível, proteína digestível e fósforo disponível nas dietas. Além disso, promoveu aumento na disponibilidade de aminoácidos e minerais como Ca, Zn, Fe, Mn e Mg, possibilitando considerar os efeitos da adição das enzimas sobre a matriz nutricional de dietas para tilápias para elaboração de dietas de mínimo custo. Considerando a importância da criação ambientalmente sustentável, a suplementação de fitase, xilanase e β -glucanase também constitui em importante ferramenta nutricional para a produção de tilápias com menor impacto ambiental, reduzindo as excreções de nitrogênio e fósforo pelos peixes, além de possibilitar a maior inclusão de alimentos de origem vegetal e reduzir a utilização de fontes inorgânicas de cálcio e fósforo.

5. Conclusões

A suplementação isolada e combinada do complexo xilanase- β -glucanase e fitase mostrou ser ferramenta efetiva na otimização de dietas exclusivamente vegetais. O complexo xilanase- β -glucanase melhorou a digestibilidade da MS, amido e lipídeos, e disponibilidade do Cu. Em contrapartida, a fitase melhorou a digestibilidade da MS, energia, amido e cinzas, assim como a disponibilidade da maioria de aminoácidos essenciais e dos minerais Mg, Mn e Zn.

Quando comparada a suplementação isolada, a suplementação conjunta de fitase, xilanase e β -glucanase demonstrou potencializar a digestibilidade dos nutrientes de dietas exclusivamente vegetais, destacando-se o efeito sinérgico no aproveitamento da proteína dietética e dos minerais P, Ca e Fe. A suplementação de fitase, xilanase e β -glucanase contribui para a redução na excreção do N e P pelos peixes, e pode fomentar a produção de tilápias com menor impacto ambiental.

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. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3715>
- Adeoye, A.A., Yomla, R., Jaramillo-Torres, A., Rodiles, A., Merrifield, D.L., Davies, S.J., 2016. Combined effects of exogenous enzymes and probiotic on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, intestinal morphology and microbiome. *Aquaculture* 463, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.028>
- Ai, Q., Mai, K., Zhang, W., Xu, W., Tan, B., Zhang, C., Li, H., 2007. Effects of exogenous enzymes (phytase, non-starch polysaccharide enzyme) in diets on growth, feed utilization, nitrogen and phosphorus excretion of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 147, 502–508. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.01.026>
- Amirkolaie, A.K., 2011. Reduction in the environmental impact of waste discharged by fish farms through feed and feeding. *Rev. Aquac.* 3, 19–26. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2010.01040.x>
- AOAC International, 1995. Official methods of analysis of AOAC International. Arlington, Va.
- Aquilina, G., Bampidis, V., Bastos, M. de L., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P.S., Flachowsky, G., Gropp, J., Kolar, B., Kouba, M., Puente, S.L., López-Alonso, M., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Rychen, G., Saarela, M., Villa, R.E., Wallace, R.J., Wester, P., 2016. Safety and efficacy of Natugrain® TS (endo-1,4- β - xylanase and endo-1,4- β -glucanase) for chickens for fattening, *EFSA Journal*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4347>
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s002530100704>
-

- Biswas, A., Araki, H., Sakata, T., Nakamori, T., Takii, K., 2019. Optimum fish meal replacement by soy protein concentrate from soymilk and phytase supplementation in diet of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 506, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.023>
- Bremer Neto, H., Graner, C.A.F., Pezzato, L.E., Padovani, C.R., 2005. Determinação de rotina do cromo em fezes, como marcador biológico, pelo método espectrofotométrico ajustado da 1,5-difenilcarbazida. *Ciência Rural* 35, 691–697.
- Castillo, S., Gatlin, D.M., 2015. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: A review. *Aquaculture* 435, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.011>
- Costello, A.J.R., Glonek, T., Myers, T.C., 1976. ³¹P Nuclear magnetic resonance- pH titrations of myo-inositol hexaphosphate. *Carbohydr. Res.* 46, 159–171. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)84287-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84287-1)
- Dalsgaard, J., Knudsen Bach, K.E., Verlhac, V., Ekmann, K.S., Pedersen, P.B., 2016. Supplementing enzymes to extruded, soybean-based diet improves breakdown of non-starch polysaccharides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Nutr.* 22, 419–426. <https://doi.org/10.1111/anu.12258>
- Dalsgaard, J., Verlhac, V., Hjermitsev, N.H., Ekmann, K.S., Fischer, M., Klausen, M., Pedersen, P.B., 2012. Effects of exogenous enzymes on apparent nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with high inclusion of plant-based protein. *Anim. Feed Sci. Technol.* 171, 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.10.005>
- Diógenes, A.F., Castro, C., Carvalho, M., Magalhães, R., Estevão-Rodrigues, T.T., Serra, C.R., Oliva-Teles, A., Peres, H., 2018. Exogenous enzymes supplementation enhances diet digestibility and digestive function and affects intestinal microbiota of turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles fed distillers' dried grains with solubles (DDGS) based diets. *Aquaculture* 486, 42–50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.013>
- El-Sayed, A.F.M., Kawanna, M., 2008. Optimum water temperature boosts the growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry reared in a recycling system. *Aquac. Res.* 39, 670–672. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01915.x>
- FAO, 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fischer, P.W.F., Giroux, A., L'Abbe, M.R., 1983. Effects of Zinc on Mucosal Copper Binding and on the Kinetics of Copper Absorption. *J. Nutr.* 113, 462–469. <https://doi.org/10.1093/jn/113.2.462>
- Francis, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197–227. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00526-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9)
- Gonçalves, G.S., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Kleman, G.K., Rocha, D.F., 2005. Efeitos da Suplementação de Fitase sobre a Disponibilidade Aparente de Mg, Ca, Zn, Cu, Mn e Fe em Alimentos Vegetais para a Tilápia-do-Nilo. *Rev. Bras. Zootec.* 34, 2155–2163. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982005000700001>
- Hardy, R.W., 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: Effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquac. Res.* 41, 770–776. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02349.x>
- Hassaan, M.S., Mohammady, E.Y., Soady, M.R., Abdel Rahman, A.A.S., 2019. Exogenous xylanase improves growth, protein digestibility and digestive enzymes activities in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed different ratios of fish meal to sunflower meal. *Aquac. Nutr.* 25, 841–853. <https://doi.org/10.1111/anu.12903>

- Jiang, T.T., Feng, L., Liu, Y., Jiang, W.D., Jiang, J., Li, S.H., Tang, L., Kuang, S.Y., Zhou, X.Q., 2014. Effects of exogenous xylanase supplementation in plant protein-enriched diets on growth performance, intestinal enzyme activities and microflora of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquac. Nutr.* 20, 632–645. <https://doi.org/10.1111/anu.12125>
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2010. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chem.* 120, 945–959. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.052>
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., De Boeck, G., Becker, K., 2012. Phytate and phytase in fish nutrition. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 96, 335–364. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01169.x>
- Lemos, D., Tacon, A.G.J., 2017. Use of phytases in fish and shrimp feeds: a review. *Rev. Aquac.* 9, 266–282. <https://doi.org/10.1111/raq.12138>
- Li, J.S., Li, J.L., Wu, T.T., 2009. Effects of non-starch polysaccharides enzyme, phytase and citric acid on activities of endogenous digestive enzymes of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*). *Aquac. Nutr.* 15, 415–420. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00606.x>
- Li, Z., Alli, I., Kermasha, S., 1993. In-vitro α -amylase inhibitor activity-phytate relationships in proteins from *Phaseolus* beans. *Food Res. Int.* 26, 195–201. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0963-9969\(93\)90053-L](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0963-9969(93)90053-L)
- Liebert, F., Portz, L., 2007. Different sources of microbial phytase in plant based low phosphorus diets for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* may provide different effects on phytate degradation. *Aquaculture* 267, 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.023>
- Liebert, F., Portz, L., 2005. Nutrient utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed plant based low phosphorus diets supplemented with graded levels of different sources of microbial phytase. *Aquaculture* 248, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.009>
- Lin, S., Mai, K., Tan, B., 2007. Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquac. Res.* 38, 1645–1653. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01825.x>
- Maas, R.M., Verdegem, M.C.J., Dersjant-Li, Y., Schrama, J.W., 2018. The effect of phytase, xylanase and their combination on growth performance and nutrient utilization in Nile tilapia. *Aquaculture* 487, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.040>
- Maas, R.M., Verdegem, M.C.J., Lee, C.N., Schrama, J.W., 2021. Effects and interactions between phytase, xylanase and β -glucanase on growth performance and nutrient digestibility in Nile tilapia. *Anim. Feed Sci. Technol.* 271, 114767. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114767>
- Maas, R.M., Verdegem, M.C.J., Schrama, J.W., 2019. Effect of non-starch polysaccharide composition and enzyme supplementation on growth performance and nutrient digestibility in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Nutr.* 25, 622–632. <https://doi.org/10.1111/anu.12884>
- Maas, R.M., Verdegem, M.C.J., Stevens, T.L., Schrama, J.W., 2020. Effect of exogenous enzymes (phytase and xylanase) supplementation on nutrient digestibility and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed different quality diets. *Aquaculture* 529, 735723. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735723>
- Magalhães, R., Díaz-Rosales, P., Diógenes, A.F., Enes, P., Oliva-Teles, A., Peres, H., 2018. Improved digestibility of plant ingredient-based diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*) with exogenous enzyme supplementation. *Aquac. Nutr.* 24,

- 1287–1295. <https://doi.org/10.1111/anu.12666>
- Maynard, L.A., Loosli, J.K., 1969. Animal nutrition, 6th ed. McGraw Hill Book Company, London.
- Munyaka, P.M., Nandha, N.K., Kiarie, E., Nyachoti, C.M., Khafipour, E., 2016. Impact of combined β -glucanase and xylanase enzymes on growth performance, nutrients utilization and gut microbiota in broiler chickens fed corn or wheat-based diets. *Poult. Sci.* 95, 528–540. <https://doi.org/10.3382/ps/pev333>
- NRC, 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academies Press, Washington, DC. <https://doi.org/10.17226/13039>
- Ogunkoya, A.E., Page, G.I., Adewolu, M.A., Bureau, D.P., 2006. Dietary incorporation of soybean meal and exogenous enzyme cocktail can affect physical characteristics of faecal material egested by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 254, 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.032>
- Rayner, C.J., 1985. Protein hydrolysis of animal feeds for amino acid content. *J. Agric. Food Chem.* 33, 249–273.
- Riche, M., Trottier, N.L., Ku, P.K., Garling, D.L., 2002. Apparent digestibility of crude protein and apparent availability of individual amino acids in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed phytase pretreated soybean meal diets. *Fish Physiol. Biochem.* 25, 181–194. <https://doi.org/10.1023/A:102222431004>
- Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. de L., Bories, G., Chesson, A., Flachowsky, G., Gropp, J., Kolar, B., Kouba, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Saarela, M., Villa, R.E., Wallace, R.J., Wester, P., Brantom, P., Dierick, N.A., Glandorf, B., Herman, L., Kärenlampi, S., Aguilera, J., Anguita, M., Cocconcelli, P.S., 2017. Safety and efficacy of Natuphos® E (6-phytase) as a feed additive for avian and porcine species. *EFSA J.* 15, 1–35. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5024>
- Selle, P.H., Cowieson, A.J., Cowieson, N.P., Ravindran, V., 2012. Protein-phytate interactions in pig and poultry nutrition: A reappraisal. *Nutr. Res. Rev.* 25, 1–17. <https://doi.org/10.1017/S0954422411000151>
- Silva, D.J., Queiroz, A.C., 2004. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos, 3rd ed. UFV, Viçosa.
- Silva, T.S.C., Furuya, W.M., dos Santos, V.G., Botaro, D., Silva, L.C.R., Sales, P.J.P., Hayashi, C., dos Santos, L.D., Furuya, V.R.B., 2005. Coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes do farelo de soja integral sem e com fitase para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Sci. Anim. Sci.* 27, 371–376. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v27i3.1213>
- Sinha, A.K., Kumar, V., Makkar, H.P.S., De Boeck, G., Becker, K., 2011. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition - A review. *Food Chem.* 127, 1409–1426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.042>
- Stone, D.A.J., Allan, G.L., Anderson, A.J., 2003. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). III. The protein-sparing effect of wheat starch-based carbohydrates. *Aquac. Res.* 34, 123–134. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00774.x>
- Vahjen, W., Osswald, T., Schäfer, K., Simon, O., 2007. Comparison of a xylanase and a complex of non starch polysaccharide- degrading enzymes with regard to performance and bacterial metabolism in weaned piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 61, 90–102. <https://doi.org/10.1080/17450390701203881>
- Vandenberg, G.W., Scott, S.L., Sarker, P.K., Dallaire, V., de la Noüe, J., 2011. Encapsulation of microbial phytase: Effects on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Feed Sci. Technol.* 169, 230–243.

- <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.07.001>
- Verlhac-Trichet, V., Vielma, J., Dias, J., Rema, P., Santigosa, E., Wahli, T., Vogel, K., 2014. The efficacy of a novel microbial 6-phytase expressed in *Aspergillus oryzae* on the performance and phosphorus utilization of cold- and warm-water fish: rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. J. World Aquac. Soc. 45, 367–379. <https://doi.org/10.1111/jwas.12133>
- Vielma, J., Ruohonen, K., Gabaudan, J., Vogel, K., 2004. Top-spraying soybean meal-based diets with phytase improves protein and mineral digestibilities but not lysine utilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquac. Res. 35, 955–964. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01106.x>
- Von Danwitz, A., van Bussel, C.G.J., Klatt, S.F., Schulz, C., 2016. Dietary phytase supplementation in rapeseed protein based diets influences growth performance, digestibility and nutrient utilisation in turbot (*Psetta maxima* L.). Aquaculture 450, 405–411.
- Wallace, J.L., Murray, F.J., Little, D.C., 2016. Effects of β -xylanase and 6-phytase on digestibility, trace mineral utilisation and growth in juvenile red tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) x *O. mossambicus* (Peters, 1852), fed declining fishmeal diets. J. Appl. Ichthyol. 32, 471–479. <https://doi.org/10.1111/jai.13055>
- Wang, F., Yang, Y.-H., Han, Z.-Z., Dong, H.-W., Yang, C.-H., Zou, Z.-Y., 2009. Effects of phytase pretreatment of soybean meal and phytase-sprayed in diets on growth, apparent digestibility coefficient and nutrient excretion of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquac. Int. 17, 143–157. <https://doi.org/10.1007/s10499-008-9187-5>
- Welz, B., Sperling, M., 1998. Atomic Absorption Spectrometry. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9783527611690>
- Yildirim, Y.B., Turan, F., 2010. Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in African catfish, *Clarias gariepinus*. J. Anim. Vet. Adv. 9, 327–331.
- Zacharias, B., Ott, H., Drochner, W., 2003. The influence of dietary microbial phytase and copper on copper status in growing pigs. Anim. Feed Sci. Technol. 106, 139–148. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00007-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00007-5)