
Revisión bibliográfica de la aplicación de fitasas microbianas para
facilitar la absorción de fósforo en animales monogástricos

Laura Mondéjar Travería

TRABAJO FINAL DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

Tutor académico: Dr. Ricardo Cordero. Departamento de Bioquímica y
Biotecnología (URV). Email: ricardo.cordero@urv.cat.

Facultad de Enología

8 de junio de 2020

Tarragona

Dedicado a mi madre por superar la COVID-19 con valentía, y a mi tía, allá donde esté, por ser mi inspiración y mi guía.

Índice

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Justificación del tema	2
1.2. Animales monogástricos.....	3
1.3. Fósforo	5
1.4. Absorción de fósforo en animales monogástricos	6
1.5. Ácido fítico	7
1.6. Fitassas.....	11
1.7. Diferentes matrices de alimentación cereal.....	18
1.8. Digestibilidad ileal y digestibilidad total de fósforo	19
2. Objetivos.....	21
2.1 Objetivo principal	21
2.2 Objetivo secundario	21
3. Metodología.....	22
3.1. Criterios de inclusión	22
3.2. Criterios de exclusión	22
4. Resultados.....	24
5. Discusión	30
5.1 Origen y tipo de fitasa.....	30
5.2 Concentración de fitasa añadida.....	30
5.3 Efecto sobre la absorción de fósforo.....	30
5.4 Especie.....	31
5.5 Matriz alimentaria	31
6. Conclusiones	32
7. Autoevaluación	33
8. Agradecimientos	34
9. Bibliografía.....	35

Resumen

El fósforo es un nutriente esencial en la dieta de los animales monogástricos. Normalmente no se encuentra biodisponible sino que está unido al ácido fítico. Este secuestro del fósforo, y de otros minerales, hace que el fitato actúe como antinutriente. Para resolver esta deficiencia se suplementa la dieta de los animales con fósforo inorgánico en forma de fosfato monocálcico o dicálcico. Además de no ser económicamente rentable, el fósforo excretado provoca contaminación ambiental. Las fitasas son enzimas que hidrolizan el fitato aumentando la biodisponibilidad de fósforo en la dieta de animales monogástricos. Reducen el efecto antinutritivo, el impacto ambiental y disminuyen el gasto en suplementos de fósforo. Existen fitasas endógenas producidas por el propio animal y exógenas provenientes de piensos o aisladas de microorganismos. En esta revisión se analiza el papel sobre la absorción de fósforo de las fitasas exógenas microbianas en función del cereal utilizado como matriz alimentaria. Los resultados muestran que tienen un papel muy importante en hidrolizar el fitato, en la digestibilidad y absorción de fósforo, y en la reducción de su excreción al medioambiente. Indistintamente de la matriz alimentaria utilizada se observan mejoras, a pesar de que cada cereal tiene una actividad fitásica diferente.

Palabras clave: fitato, animales monogástricos, matrices alimentarias, fitasas exógenas microbianas.

1. Introducción

1.1 Justificación del tema

La nueva regulación adoptada por la Unión Europea (UE) (Reglamento 2019/6 del Parlamento Europeo y del Consejo del 11 de diciembre de 2018 sobre medicamentos veterinarios y por el que se deroga la Directiva 2001/82/CE) entrará en vigor en todos los países de la UE a partir del 28 de enero de 2022. Entre otros aspectos lo que nos indica esta nueva legislación es que no se podrán usar antibióticos para fomentar el crecimiento de los animales. Esta nueva normativa potencia la investigación del uso de enzimas para mejorar la asimilación de nutrientes, el crecimiento del animal y reducir la contaminación ambiental ligada a este sector (1).

El fósforo en los piensos de animales monogástricos se presenta unido a sales de ácido fítico, el fitato. Este fitato proviene de la interacción del ácido fítico con minerales y proteínas, inhibiendo su absorción. Debido a la baja actividad de las fitasas en el tracto digestivo de los animales monogástricos, el fósforo no está disponible y se excreta contribuyendo a la contaminación ambiental. Además, las fuentes de fósforo mineral son limitadas y como suplementos para alimentos son el tercer nutriente más caro después de los suplementos de energía y proteínas (2).

El método más eficaz para desfosforilar el fitato y liberar el fósforo es la adición de fitasas comerciales exógenas. Las fitasas comerciales exógenas se dividen en dos tipos: fitasas vegetales y fitasas microbianas. Las microbianas son más eficientes que las vegetales (3). Por ejemplo, una fitasa que proviene de *Escherichia coli* tiene una actividad fitásica específica entre 811-1800 U¹/mg, cuando una fitasa que proviene de la soja tiene una actividad de 2,4 U/mg (4).

Las fitasas comerciales más conocidas son de *Aspergillus niger* llamada NatuphosTM (BASF, desde 1991), de *Peniophora lycii* (expresada en *Aspergillus oryzae*) conocida como Bio-feed (DSM), de *Aspergillus oryzae* conocida como Ronozyme, de *Aspergillus awamori* (producida en *Trichoderma reesei*) conocida como Finase, y *Penicillium simplicissimum* (producida en *Penicillium funiculosum*) conocida como ROVABIO (5).

Como novedades se puede aludir una fitasa recombinante de *Escherichia coli* llamada OptiPhos® que es la más rápida de todas las fitasas en el actual mercado. Por último,

¹ La actividad de la fitasa se expresa como FYT, FTU, PU o U. Una unidad de fitasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de fosfato inorgánico por minuto a partir de 0,0015 mol/L de fitato de sodio a pH 5,5, y 37 °C (5).

la fitasa de *Buttiauxella* spp que se ha visto que tiene más beneficios que la fitasa de *Escherichia coli* (6).

El mercado de fitasas tiene un abanico de posibilidades muy amplio. Gracias a la investigación se han conseguido obtener fitasas comerciales a precios muy económicos. Si a eso se suma el beneficio nutricional y medioambiental, se comprende porque es tan importante en la industria de producción animal.

Es por esto por lo que se ha creído conveniente llevar a cabo esta revisión bibliográfica. Para identificar qué papel juega la aplicación de fitasas microbianas en la absorción de fósforo. Este es un tema que concierne a la industria de producción animal y en consecuencia la alimentación de animales monogástricos. Por lo tanto, se va a hacer hincapié en revisar si existe una matriz alimentaria que propicia de manera sustancial la actividad fitásica, o si por el contrario este factor es indiferente.

1.2. Animales monogástricos

La palabra monogástrico hace referencia a la estructura del estómago con un solo compartimento. Animales de granja como cerdos y aves son monogástricos. Tienen sistemas similares pero existen diferencias como por ejemplo órganos que tienen las aves de corral y no los cerdos.

1.2.1. Cerdos

El alimento se transporta a través de todo el sistema digestivo pasando por distintas partes (Figura 1). Cuando el alimento entra en la boca empieza la digestión. El alimento empieza a absorberse en el intestino delgado y lo que queda de él pasa al ciego y después al colon. Por último, pasan a través del recto y se excretan por el ano.

Hay que hacer una mención importante a los órganos que liberan jugos digestivos y enzimas para ayudar en la digestión. Páncreas, vesícula biliar e hígado, son un ejemplo.

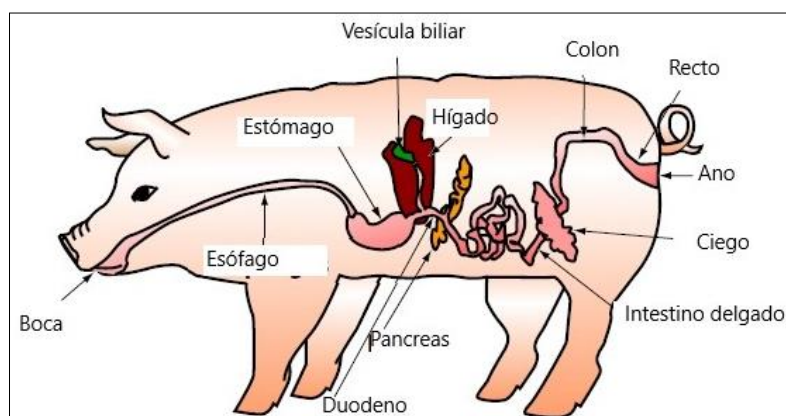


Figura 1. Sistema digestivo de los cerdos (7).

El pH en el estómago del cerdo oscila entre 2 y 2,5 cuando está vacío y aumenta conforme se alimenta. En los cerdos recién nacidos no hay secreción de ácido clorhídrico (HCl) significativa, por tanto, tienen un pH más alcalino.

El pH del intestino delgado se encuentra entre 3,5 y 5,5 en la primera parte de este. En el duodeno oscila entre un pH de 6 en el momento de alimentarse, y pH de 4 después de la alimentación (8).

1.2.2. Aves de corral

Aunque son animales monogástricos no son mamíferos como los cerdos y sus digestiones difieren.

La diferencia consiste en las partes por las que pasa el alimento hasta llegar al intestino delgado (Figura 2).

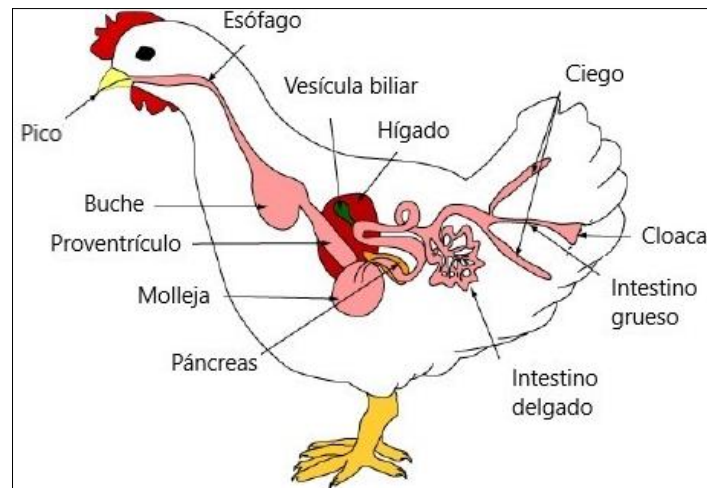


Figura 2. Sistema digestivo de las aves de corral (7).

Después de digerir el alimento en el intestino delgado, aquella parte que no se haya digerido pasa al intestino grueso y sale del animal a través de la cloaca.

El pH está entre 5,2 en el buche y disminuye hasta 2,8 en el proventrículo. A partir de este y siguiendo por el intestino delgado incrementa su valor entre 5 y 7 (8).

1.2.3. Función de las diferentes partes del sistema digestivo

Tanto en cerdos como en aves de corral se puede dividir el sistema digestivo en su totalidad en cuatro partes: antes de llegar al intestino delgado, el intestino delgado en sí, intestino grueso, y la salida de las heces.

Los compartimentos situados antes del intestino delgado sirven para reducir el tamaño del alimento. En el intestino delgado se descomponen y absorben los nutrientes.

Continúa en el duodeno con la absorción de los nutrientes a través del torrente sanguíneo. En el intestino grueso se absorbe el agua y se moldea la parte no ingerida de forma sólida. Por último, en el ciego, se encuentran los microorganismos. En animales monogástricos no tiene importancia, es más relevante en animales rumiantes.

1.2.4. Importancia de los jugos digestivos y enzimas

La finalidad de la digestión es obtener partículas solubles descomponiendo los alimentos para que puedan pasar a través de las paredes del intestino hasta el torrente sanguíneo.

En el sistema digestivo existen glándulas o tejidos que secretan estos jugos digestivos y enzimas que ayudan a digerir y absorber el alimento.

Tanto en aves de corral como en cerdos existen cinco tipos de jugo digestivo: salivar, gástrico, pancreático, biliar e intestinal. Con el enfoque dirigido hacia la absorción de fósforo en el intestino delgado es interesante tener en cuenta algunas enzimas. En el jugo gástrico se debe tener en cuenta la pepsina y el HCl, por ejemplo, y en el jugo intestinal la peptidasa. Pepsina y peptidasa digieren las proteínas (7).

1.3. Fósforo

1.3.1. Materia prima vegetal y disponibilidad del fósforo

Hay dos formas de encontrar el fósforo en la materia prima vegetal, inorgánica y orgánica. La forma inorgánica del fósforo se encuentra como ortofosfatos, y la forma orgánica formando parte de moléculas como el ATP, nucleótidos o fosfolípidos.

Los animales monogástricos absorben y utilizan el fósforo en forma de ortofosfatos. Directamente como fosfatos inorgánicos o hidrolizando el fosfato orgánico liberando ortofosfatos mediante enzimas fitasas.

La materia prima vegetal, que es la fuente de fósforo de interés, está formada mayoritariamente por fósforo orgánico en forma de ácido fítico, como fosfolípidos, y en forma de sus sales, el fitato (9).

1.3.2. Fósforo y el organismo

El fósforo es un mineral y un nutriente esencial para el crecimiento de los animales. Es por esto por lo que se necesitan suplementos de este componente en la alimentación.

Varios ejemplos de procesos en los que está involucrado son los siguientes:

- Formación y mineralización de la matriz de los huesos.
- Regulación de enzimas fundamentales del metabolismo de glúcidos y ácidos grasos.

- Equilibrio osmótico.
- Síntesis de proteínas y aminoácidos.

El fósforo también es vital para mantener la integridad de las membranas celulares formando parte de fosfolípidos. Interviene en el crecimiento y diferenciación celular formando parte de ácidos nucleicos. Además forma parte del ATP, siendo importante en estas alianzas abundantes en energía para el cuerpo (10)(2).

1.3.3. Fósforo y el medioambiente

Para entender el problema medioambiental, se debe tener en cuenta que los animales monogástricos tienen una actividad fitasa despreciable. A esto se añade que un porcentaje muy significativo del fósforo que ingieren está ligado al ácido fítico proveniente de los granos y subproductos de las materias primas. Por lo tanto, no está biodisponible para estos animales (11).

Para abastecer esta necesidad de absorber fósforo, es necesario suplementar la alimentación en forma de fosfato dicálcico y monocálcico (12). A parte de ser muy costoso económicamente, provoca una excreción excesiva al medioambiente que puede ser en forma de fitato, proveniente de piensos, o en forma de fosfato inorgánico ingerido mediante suplementos (3).

Cuando proviene del fosfato inorgánico sobrante y se usa de abono, las plantas no son capaces de extraer todo el fósforo. Este filtra a ríos y lagos, y puede dar lugar a fenómenos de eutrofización de las corrientes y de las reservas acuáticas. Hay un crecimiento acelerado de las algas y, por lo tanto, un agotamiento del oxígeno del agua que provoca la muerte de la fauna marina (2)(13).

Si es en forma de fitato, dado que no se ha hidrolizado por falta de enzimas, los microorganismos del suelo lo liberan en forma de fósforo por la acción de fitasas microbianas.

Las consecuencias de contaminación medioambiental son similares de una forma u otra, aunque el producto excretado discierna.

1.4. Absorción de fósforo en animales monogástricos

El fósforo entra en el organismo en forma inorgánica o soluble, y orgánica o insoluble. Los jugos gástricos disuelven la parte soluble y parte de los insolubles rompiendo los enlaces de los ácidos fosfóricos en estos compuestos. Como se ha visto anteriormente este proceso ocurre principalmente en el intestino delgado por acción de las fosfatasa

del jugo digestivo. Tanto aves como cerdos de granja presentan una pobre asimilación por ausencia de estas enzimas.

Dersjant-Li *et al.* (8) muestran la actividad fitasa procedente de la digestión de distintos segmentos del intestino de cerdos alimentados con una dieta basal o con un suplemento de fitasa microbiana procedente de *Aspergillus niger*. Se analizan muestras del estómago, duodeno, parte alta del yeyuno, parte baja del yeyuno, el íleo y el colon. Se demuestra que con una dieta basal normal la actividad fitásica es insignificante en estómago e intestino delgado. La mayor parte de actividad y de fósforo soluble se encuentra en el colon. En cambio con un suplemento de fitasas de 500 FTU y de 2000 FTU, la actividad fitásica está presente notablemente en el estómago y la parte alta del yeyuno, y no en el colon.

En aves de corral se suplementó la dieta con la misma fitasa y se determinó su actividad en el tracto digestivo. Estas aves se alimentaron con una dieta basal y con una dieta de 500 y 1000 FTU/kg. Con la dieta control no se encontró actividad fitásica. En cambio con la dieta suplementada, se encontró actividad fitásica en el buche y en el estómago, y no en el intestino delgado.

1.5. Ácido fítico

El ácido fítico (myo-inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate, IP6) está formado por una molécula de inositol con la posibilidad de tener unidos de 1 a 6 grupos ortofosfatos conectados mediante enlaces éster (Figura 3).

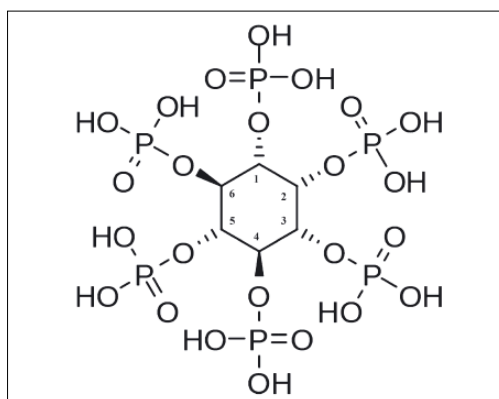


Figura 3. Estructura del ácido fítico (8).

1.5.1. Efecto antinutriente

1.5.1.1. Interacciones IP6-cationes

El ácido fítico normalmente se presenta en forma de complejo con cationes metálicos, fitato, debido a que es inestable en su forma libre. Los cationes con los que forma los

complejos insolubles son: Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} y Mn^{2+} . Esta unión provoca una reducción en la biodisponibilidad y absorción intestinal de estos, actuando así como antinutriente.

La sal del fitato con Ca^{2+} puede unirse a lípidos formando jabones metálicos en el lumen intestinal. Esto provoca una reducción de la utilización de energía de las fuentes de lípidos, ya que la mayoría de la grasa se excreta en forma de ácidos grasos de jabón (5).

La mayor o menor biodisponibilidad va a depender de una serie de factores tales como el pH. El ácido fítico tiene 12 protones reemplazables (Figura 1), de los cuales seis son fuertemente ácidos (pKa alrededor de 1,5), tres de ellos son ácidos más débiles (pKa entre 5,7 y 7,6) y, finalmente, los tres últimos son muy débilmente ácidos (pKa superior a 10). Esto se traduce en que a un pH = 2 (acidez del estómago), el ácido fítico se encuentra cargado negativamente (2).

1.5.1.2. Interacción IP6-proteína

El ácido fítico puede formar complejo con proteínas y aminoácidos e inhibir enzimas como la tripsina, pepsina, lipasas y la α -amilasa. Esto provoca una reducción de la digestibilidad de las proteínas (9).

A pH ácido, como el del estómago, el ácido fítico se une a los aminoácidos básicos como la arginina, histidina y la lisina. En cambio en el intestino delgado a un pH por encima del punto isoeléctrico de las proteínas, se une a estas a través de los cationes. Estos complejos son insolubles y resistentes a la hidrólisis de enzimas y por lo tanto, reducen la eficiencia del uso de las proteínas (14).

Puede darse también una reducción de la digestibilidad de los nutrientes, ya que el ácido fítico interactúa con enzimas endógenas haciendo que la proteína unida sea resistente a la digestión de la pepsina.

El fitato puede afectar perjudicialmente a la utilización de las vitaminas, dando lugar a la demacración del animal, retraso en el crecimiento y fallo en la reproducción (5).

Tanto la formación de complejos con cationes o con proteínas/aminoácidos darán lugar a una reducción del uso de nutrientes, un aumento de los costes energéticos de mantenimiento de proteínas y una reducción de la disponibilidad de energía (8)(15) (Figura 4).

Dejando de lado el efecto antinutriente, estos complejos llamados fitatos no pueden ser absorbidos. El tamaño reducido de la molécula de inositol hace que el ácido fítico tenga

una densidad de carga fuertemente negativa. Esto se traduce en una imposibilidad de los fitatos para atravesar la barrera lipídica de las membranas plasmáticas (8).

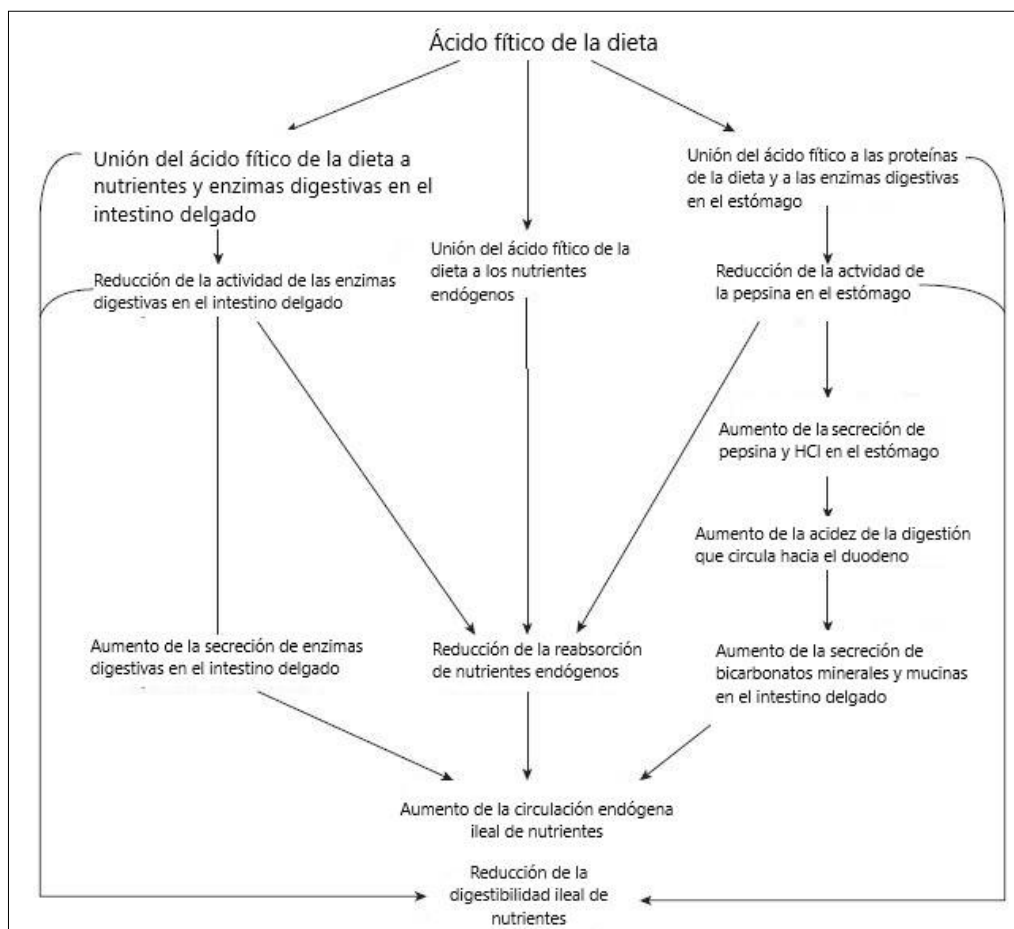


Figura 4. Mecanismo de acción del ácido fítico sobre la digestión ileal y la pérdida endógena de nutrientes (13).

En Woyengo *et al.* (16) (Tabla 1) se observa como el suplemento con ácido fítico reduce la actividad de la pepsina en el estómago. El contenido de Ca^{2+} y Mg^{+} solubles se reduce y aumenta el contenido de Na^{+} .

La actividad de la pepsina se reduce provocando una disminución de la digestibilidad de proteína. A más a más, la reducción de Ca^{2+} y Mg^{+} implica una menor biodisponibilidad de estos para su absorción.

Estos datos implican que para suprimir los efectos antinutricionales del IP6 es necesario que se hidrolice la fitasa en la parte superior del tracto digestivo.

Tabla 1. Efecto del ácido fítico en la digestión intestinal sobre el contenido de mineral soluble y la actividad de la pepsina. Adaptación de Woyengo *et al.* (16).

	Control	Control + ácido fítico
Actividad de la pepsina en el estómago (PU/ml)	265,5	142,5
pH del estómago	4,84	4,84
pH del yeyuno	7,13	6,61
Contenido mineral del yeyuno (ppm)		
Ca ²⁺	270,2	108,5
Mg ²⁺	468,5	69,1
K ⁺	653,4	691,2
Na ⁺	2670,2	4191,9

1.5.2. *Dephytinization*

Por todos los efectos desfavorables que produce el fitato se lleva a cabo una estrategia para eliminarlo. Eliminando el fitato (*dephytinization*) se incrementa la disponibilidad del fósforo, los cationes, y el valor nutricional.

Las estrategias originales fueron moler los cereales, la cocción o la fermentación. Aunque reducían el fitato, también generaban una pérdida de minerales y nutrientes.

Considerando estas limitaciones y usando una dieta basada en plantas, hay que centrar el interés en el fitato no digerible y en su hidrolización.

La enzima de degradación del fitato, la fitasa, es otra estrategia para eliminarlo o reducirlo a niveles muy bajos y aumentar la biodisponibilidad mineral (Figura 5) (5).

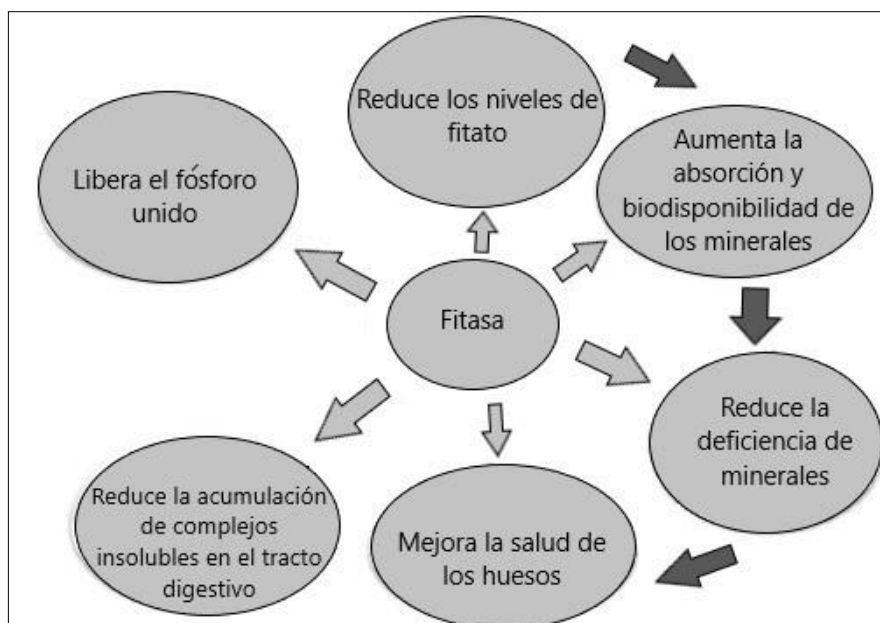


Figura 5. Beneficios de la utilización de fitasas en la dieta (5).

1.6. Fitasas

Las fitasas (mioinositol hexafosfato fosfohidrolasa) hidrolizan el fitato obteniendo ortofosfato inorgánico, pudiéndose así absorber (Figura 6). También se obtienen esteres fosfóricos desde pentafofato de inositol hasta inositol libre (17).

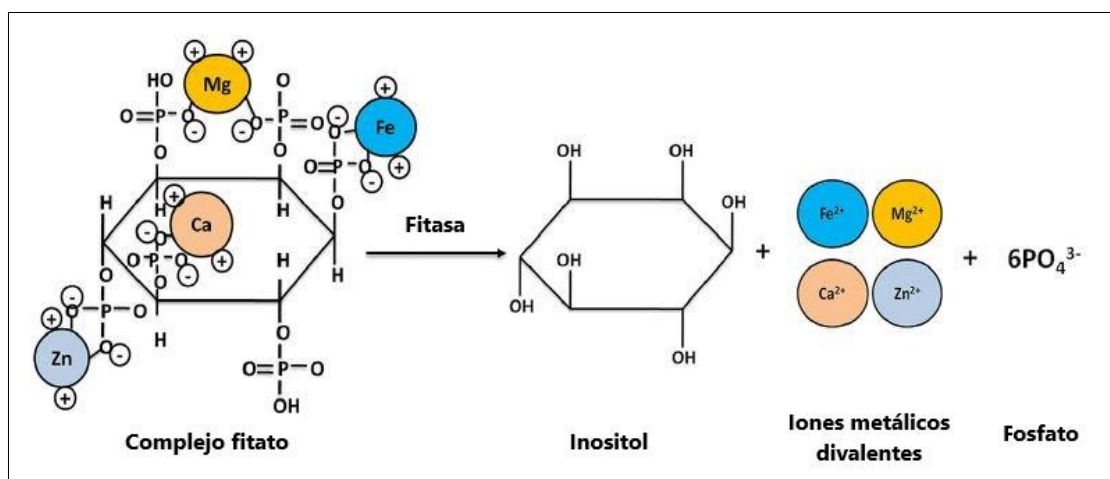


Figura 6. Hidrólisis del fitato (18).

Al hidrolizar el IP6 se obtiene el inositol 5 fosfato (IP5) y así sucesivamente hasta obtener inositol 1 fosfato (IP1) y, por último, inositol libre (Figura 7). Si se logra obtener este inositol libre, la fitasa generaría 282 gramos de fosfato inorgánico de cada kilogramo de fitato (17).

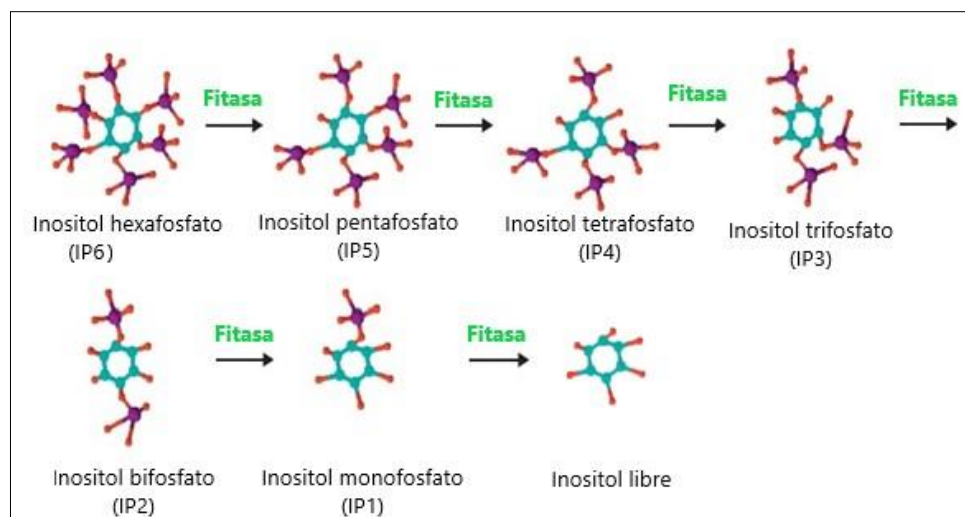


Figura 7. Ejemplo de la degradación enzimática del fitato (IP6) hasta el inositol libre por la enzima fitasa (19).

1.6.1. Clasificación de fitasas

Hay fitasas vegetales, animales y microbianas. A su vez se pueden clasificar según la posición del carbono de la molécula de fitato en la que se inicie la hidrólisis. Las dos fitasas más abundantes y clasificadas son las 3-fitasas (EC 3.1.3.8) y 6-fitasas (EC 3.1.3.26). Las 3-fitasas son principalmente de origen microbiano, y las 6-fitasas están principalmente aisladas de fuentes vegetales. No obstante, las fitasas de la soja son 3-fitasas y las fitasas de *Escherichia coli* son 6-fitasas (2).

A nivel de desfosforilación, la diferencia entre los pasos han hecho que las 3-fitasas sean más eficientes comercialmente que las 6-fitasas. Las 3-fitasas forman como producto final el IP1, degradando continuamente el fitato. En cambio las 6-fitasas se detienen al formar IP4 (20).

El pH es también un criterio para clasificar a las fitasas. Existen las fosfatasas ácidas de histidina (HAP), las fitasas ácido-púrpura y las fitasas tirosinas proteicas, actuando en un pH entre 3 y 5,5. Las HAP son actualmente las comerciales en alimentación. *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. y *Pseudomonas syringae* pertenecen a este grupo (21).

En un pH alcalino de entre 7 y 8 están las fitasas β -propulsoras (BPPhy)(8). *Bacillus* spp. es un ejemplo (21).

1.6.2. Fuentes de fitasas

Los animales monogástricos pueden tener actividad fitásica procedente de diferentes fuentes: enzimas endógenas generadas por la mucosa del intestino delgado y la microflora gastrointestinal, la actividad intrínseca derivada de los piensos vegetales que ingieren, y las fitasas exógenas aisladas de microorganismos (17).

1.6.2.1. Fitasas endógenas

La actividad fitásica endógena proveniente de la mucosa del intestino delgado no es suficiente para la absorción de fósforo, aunque demostrable experimentalmente (12). Cuando se habla de la microflora gastrointestinal se debe tener en cuenta que la absorción de fósforo se produce en las partes superiores del intestino delgado. Así mismo, la actividad de los microorganismos propios del animal en el colon no es relevante (2).

1.6.2.2. Fitasas exógenas

Las fitasas exógenas provienen de fuentes vegetales o aisladas de microorganismos (11).

Se observa que hay actividad exógena en las fitasas de origen vegetal pero es dependiente de la especie. El maíz muestra un incremento de la actividad fitásica después de la germinación y el trigo y la cebada tienen alta actividad en el grano. También se han aislado y caracterizado fitasas del arroz, la colza, soja, guisantes, cebada, judías, patatas, rábanos, espinacas, etc. (20).

La actividad fitásica depende del contenido de humedad, temperatura y pH. En referencia a los piensos la humedad puede afectar si la planta originaria es húmeda o seca. La mayor preocupación proviene de su inactivación térmica irreversible producida por los procesos de *pelleting* de los piensos, donde se alcanzan temperaturas de hasta 95° (20). Finalmente, hay que tener en cuenta su pH de trabajo óptimo (11) (2).

Las fitasas comerciales de origen microbiano tienen el objetivo de aumentar la liberación de fósforo. Las que están disponibles hoy en día se producen de forma recombinante en microorganismos. Bacterias como *Escherichia coli*, hongos como *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, levaduras como *Saccharomyces pombe* y *Komagatella pastoris*, se utilizan ampliamente en dietas para animales monogástricos (22). Estas fitasas comerciales difieren en su pH, resistencia a proteasas endógenas, afinidad por el sustrato y temperatura óptima, por ejemplo (Tabla 2).

Tabla 2. Ejemplos de fitasas microbianas comerciales y sus características. Adaptación de Balwani *et al.* (20).

Proteína de origen	Cepa productora	pH óptimo	Temperatura óptima (C°)
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Escherichia coli</i>	5,1	43-50
<i>Agrocybe pediades</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	5-6	50
<i>Peniophora lycii</i>	<i>Pichia pastoris</i>	4,5	50
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2–2,5, 5–5,5	55-60

1.6.3. Factores que afectan a la eficacia de las fitasas

La actividad fitásica *in vivo* puede verse afectada por diversos factores: el tipo de **fitasa**, el pH, resistencia a proteasas, etc. También puede depender de factores intrínsecos del **animal** en el cual se analice esta actividad. La especie, edad y tiempo de retención son un ejemplo. Por último, es importante la **dieta**. El contenido de fitatos, los niveles de calcio y la composición del pienso son muy relevantes.

1.6.3.1. Factores derivados de la dieta

1.6.3.1.1. En relación a la composición

La composición de algunas semillas o cereales, la concentración y accesibilidad, y la cantidad de fitasas intrínsecas que contienen pueden afectar a la hidrólisis del fitato.

En El-Hack *et al.* (23) se ve como la adición de fitasas incrementa el fósforo biodisponible pero varía entre diferentes fuentes de alimentación. En maíz aumenta de 30% a 59%, en harina de soja de 34,9 a 72,4%, en trigo de 30,7 a 46,8%, en cebada de 32,2 a 71,3% y en colza de 36,7 a 55,8%.

La accesibilidad del fitato por la fitasa difiere entre los diferentes ingredientes. Por ejemplo, 600 FTU de fitasa liberaron 0,42 de harina de soja (SBM) y 0,46 g/kg IP6-P de colza; sin embargo, como la colza contenía una cantidad mayor de IP6 que SBM en la dieta (2,41 frente a 1,12 g/kg), esto da lugar a un mayor porcentaje de degradación de IP6 en la harina de soja (37,5%) en comparación con la colza (19%) (8).

1.6.3.1.2. En relación al contenido mineral

Como se ha comentado anteriormente, el fitato puede unirse a cationes como el Ca^{2+} y el Fe^{3+} en el intestino delgado, reduciendo así la solubilidad del fitato y reduciendo su accesibilidad por la fitasa (8).

La unión Ca-Fitato no es fácil de hidrolizar por la fitasa, lo que hace aún más difícil la disponibilidad del Ca como nutriente. Kahindi *et al.* (24) demuestran como una dieta alta en concentración de Ca y sin fitasas reduce la disponibilidad del fósforo.

Plumstead *et al.* (25) afirman que un aumento de Ca de 6,9 g/kg en una dieta sin fitasas disminuyó la digestibilidad ileal del fósforo en un 71%. Mientras que en una dieta con fitasas (500 FTU) hubo una reducción del 11%.

La relación entre Ca y P es muy importante en la dieta. Un aumento del ratio Ca:P tiene un mal impacto en la actividad fitásica y una reducción de este aumenta la eficacia de las fitasas. Un cambio de ratio de 2:1 a 1.2:1 aumentó la eficacia de las fitasas en un 16%.

Lo mismo pasa con el Fe^{3+} . Un incremento de este en la dieta inhibe la eficacia de las fitasas y en consecuencia, no puede ser usado como nutriente por los animales (23).

1.6.3.2. Factores derivado de características de las fitasas

1.6.3.2.1. La fuente de fitasas

La eficacia de la fitasa exógena viene determinada por su resistencia a la degradación gastrointestinal, termoestabilidad, y el pH óptimo de actividad.

En Ribeiro *et al.* (26) se compara una fitasa derivada de *Escherichia coli* y una derivada de *Citrobacter braakii* (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de equivalencia de fósforo (g/kg) en función de la concentración de fitasa añadida (U/kg). Adaptación de V. Ribeiro Jr. *et al.* (26).

	500 U/kg	1000 U/kg	2000 U/kg
<i>Citrobacter braakii</i>	0,63	1,09	2,02
<i>Escherichia coli</i>	0,76	1,31	2,40

Añadiendo la fitasa derivada de *Escherichia coli* se obtienen unos valores de fósforo liberado más altos y, por lo tanto, no haría falta tanta suplementación con fosfato dicálcico en comparación con la fitasa derivada de *Citrobacter braakii*.

1.6.3.2.2. El sustrato

Dersjant-Li *et al.* (8) determinan la actividad relativa en la hidrolización del fitato- Na^+ , fitato-proteína de soja y fitato-lisozima. Las fitasas comerciales analizadas fueron: *Escherichia coli* expresada en *Schizosaccharomyces pombe*, *Escherichia coli* (*Pichia pastoris*), *Aspergillus niger* y *Peniophora lycii*. El pH 3 usado y el sustrato fueron determinantes a la hora de obtener los resultados.

La fitasa de *Escherichia coli* tiene más actividad cuando hidroliza el complejo fitato-proteína de soja y fitato-lisozima. En cambio la fitasa de *Aspergillus niger* tenía más actividad cuando hidrolizaba el complejo fitato- Na^+ .

La afinidad de las fitasas con distintos sustratos influye en su eficacia.

1.6.3.2.3. El pH

Las condiciones óptimas para obtener la máxima actividad fitásica y reducir el efecto antinutricional del fitato, es que este sea hidrolizado lo antes posible en la parte alta del tracto digestivo. Se debe tener en cuenta que el pH del estómago es menor a 5,5. Este pH es el usado en la estandarización de las mediciones de fitasas. Por lo tanto, la actividad fitásica *in vitro* varía considerablemente de la *in vivo*.

Por lo general, las fitasas microbianas tienen un pH óptimo de actuación a 2,5 y otro entre 4,5-5,7 (8).

Naves *et al.* (27) muestran la máxima actividad que presentan fitasas microbianas en función del pH. *Aspergillus oryzae* muestra máxima actividad en un pH de 4, *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* cerca de un pH 5.

Dersjant-Li *et al.* (8) determinan que no solo difiere entre géneros, sino también entre variantes dentro de un mismo género y especie. Por ejemplo la variante 1 de *Escherichia coli* (*Schizosaccharomyces pombe*) y la variante 2 *Escherichia coli* (*Pichia pastoris*) son activas a pH bajos. Si se comparan entre sí, la variante 1 muestra más actividad fitásica que la 2.

1.6.3.2.4. La temperatura

La mayoría de las fitasas tienen máxima actividad a una temperatura óptima de 44 a 60°. La fitasa microbiana por lo general tiene una temperatura óptima de 60° C.

Hay que tener en cuenta que temperaturas extremas desnaturalizan proteínas. Sobre todo con los procesos de pelleting de los piensos, donde se llega a temperaturas entre 65 y 95° (20).

Naves *et al.* (27) documentan que una fitasa de *Aspergillus oryzae* presenta un aumento de la actividad hasta 40° y luego se inactiva a 50°. La fitasa de *Aspergillus niger* presenta actividad hasta casi 45° y a 60° se inactiva. Por último, la fitasa de *Saccharomyces cerevisiae* muestra actividad entre 50-60° y se inactiva a 70°.

1.6.3.2.5. La resistencia a proteasas endógenas

Característica muy importante de las fitasas ya que estas pueden ser hidrolizadas por las proteasas del tracto digestivo.

Morales *et al.* (28) incubaron una fitasa de *Escherichia coli* y una fitasa de *Peniophora lycii* con pepsina y después analizaron la fitasa residual. Después de 1 hora de incubación, la actividad fitasa de *Peniophora lycii* disminuyó significativamente mientras que la fitasa de *Escherichia coli* se mantuvo durante toda la incubación. Por lo tanto, la fitasa de *Escherichia coli* sería más estable y activa al paso por el tracto digestivo que la fitasa de *Peniophora lycii*.

1.6.3.3. Factores derivados de los animales monogástricos

Cada especie diferente tiene un pH diferente en el tracto gastrointestinal.

Como se puede leer en el apartado 1.2 del trabajo, en los cerdos la actividad fitásica tiene lugar en el estómago con un pH de 2-2,5, y en la primera parte del intestino delgado a un pH de 3,5-5,5. En cambio en aves de corral se observa en el buche a un pH de 5,5 y en el proventrículo a pH 2,5.

Existen diferencias en cuanto al estado fisiológico y edad del animal. En animales adultos el tiempo de retención de la digesta y los valores de pH del tracto digestivo son más favorables para las fitasas que en animales jóvenes. No obstante, la eficacia de absorción disminuye con la edad del animal. En cerdos, la eficacia de las fitasas microbianas va disminuyendo desde cerdos lactantes, cerdos en crecimiento (40-100 kg), cerdas en final de gestación (100 días), lechones (30-38 kg), hasta cerdas a mitad de gestación (60 días). En aves también existen diferencias. Las fitasas exógenas tienen mayor eficacia en aves ponedoras (35% superior) que en pollos de engorde. Esto indica que la capacidad de hidrolizar el fitato aumenta con la edad de las aves (9).

Se han encontrado evidencias de que el género del animal afecta a la degradación de IP6. Wu *et al.* (29) suplementaron aves de corral con una fitasa de *Aspergillus niger*. Con un suplemento desde 500 a 2000 FTU/kg la degradación se encontraba entre un 59-79% en machos, y entre un 52-72% en hembras.

1.7. Diferentes matrices de alimentación cereal

La alimentación representa un 70% de los costes de una explotación ganadera. Los avances nutricionales son una herramienta indispensable para mejorar su rentabilidad.

El 56% del cereal producido en países desarrollados se destina al ganado. En los países en desarrollo se destina el 23%.

El más destacado como fuente de energía es el maíz, donde el 80% de su producción es usada como ingrediente de pienso. También existen otras alternativas importantes como trigo, sorgo, cebada, avena, centeno y soja (30).

Aunque el trigo y el centeno son los cereales con más actividad fitásica (Tabla 4) hay una diferencia considerable entre los dos. El centeno y el salvado de centeno con una actividad entre 6000 y 9000 U, y el trigo y salvado de trigo entre 2000 y 9000 U.

Tabla 4. Contenido en fósforo fítico (%) y actividad fitásica (U/kg). Adaptación de Godoy *et al.* (31) y Woyengo (32).

Materias primas vegetales	P fítico (%)	Actividad fitásica (U/kg)
Maíz	0,73	< 50
Trigo	1,03	2886
Salvado de trigo	2,80	9945
Sorgo	0,85	< 50
Cebada	0,92	2323
Soja	1,60	< 50
Avena	0,22	63
Centeno	0,85	6016
Salvado de centeno	1,74	9241

Los motivos por los cuales se usa mayoritariamente trigo y no centeno, a pesar de lo anunciado anteriormente, son varios. Según la Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA) el centeno contiene altos valores antinutricionales en comparación con el trigo como por ejemplo pentosanos (30). Estos provocan trastornos

digestivos debido a un aumento de la viscosidad del contenido intestinal. También contienen resorcinol, que provoca rechazo al pienso.

El centeno se ve afectado en numerosas ocasiones por el hongo *Claviceps purpurea*, que da lugar a la enfermedad del cornezuelo de centeno. Este hongo produce compuestos muy tóxicos para los animales provocando pérdida de hambre, convulsiones, dificultades respiratorias, esterilidad y, por último, la muerte del animal.

1.8. Digestibilidad ileal y digestibilidad total de fósforo

Las fitasas añadidas son activas en el estómago y en la parte superior del intestino delgado, por lo tanto, los datos de la degradación ileal *in vitro* del fosfato serán los útiles para el análisis de fitasas.

Los niveles de fósforo, la especie del animal o el género, los niveles de calcio, el tipo de fitasa, y la composición de ingredientes de las matrices alimentarias afectan a la digestión ileal del IP6.

La digestibilidad total de fósforo es un parámetro usado también para analizar *in vitro* la eficacia de las fitasas. Se ve afectada por factores como el nivel de fósforo inorgánico usado o los niveles de fitasa microbiana endógena.

Es importante tener en cuenta la posibilidad de análisis *in vitro* a nivel ileal o total. El análisis total ayudará sobre todo a determinar la retención de fósforo. En la total se obtendrá una cantidad de fósforo que no corresponde a la actividad fitásica real, ya que en ese valor no se tiene en cuenta las pérdidas endógenas por fermentaciones en el intestino grueso.

Wu *et al.* (29) nos muestran el contenido de fósforo excretado y la aparente retención de fósforo en hembras de pollos de engorde. Añadiendo 2000 PU/kg de fitasa a una dieta basada en trigo y soja se obtiene solo un 0,97% de fósforo excretado y una retención del 49,3%.

Por eso, en un análisis *in vitro* debe medirse a nivel ileal, porque en el intestino grueso el fitato es degradado por la microflora pero el fósforo liberado no es absorbido. La medición *in vitro* a nivel ileal será una buena indicación de la eficacia de la fitasa de interés.

En un análisis *in vivo*, como se verá en los resultados, se analiza la digestibilidad ileal aparente (AID) y la digestibilidad total aparente del tracto digestivo (ATTD). En los análisis *in vivo* existe una limitación añadida y es el análisis del fitato en la digesta ileal, por eso los resultados no suelen reportarse así sino que suelen darse en forma de ATTD (8).

2. Objetivos

2.1 Objetivo principal

Revisar las mejoras en la absorción de fósforo que producen las fitasas exógenas microbianas en la alimentación de animales de granja monogástricos.

2.2 Objetivo secundario

Revisar si hay una matriz alimentaria que propicia un aumento de la actividad fitasa superior respecto a las demás y, en consecuencia, mejora sustancialmente la absorción de fósforo.

3. Metodología

En este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica, para dar respuesta a los objetivos planteados, que ha tenido lugar desde abril hasta junio de 2020.

Se han utilizado bases de datos como *PubMed*, *ResearchGate* y *Science Direct*. También el buscador *Google Scholar* y la revista *Journal of ANIMAL SCIENCE*. Las palabras clave usadas en estas bases de datos han sido *comercial phytase*, *phytic acid*, *phytate*, *exogenous phytase*, *microbial phytase*, *monogastric animals*, *animal feed*, *fungus phytase*, *bacterial phytase*, *yeast phytase*. Se han utilizado los operadores booleanos "AND", "OR" y "NOT" para poder combinar las palabras clave y obtener unos resultados en la búsqueda más precisos. Por ejemplo, el conector "AND" se ha usado para dar importancia a que las fitasas tenían que ser de origen microbiano. La búsqueda ha sido: *exogenous phytase* "AND" *microbial*. El conector "OR" se ha usado para palabras similares, como *phytic acid* y *phytate*. Y el conector "NOT" se ha usado sobre todo para eliminar los resultados que nombraban fitasas de origen vegetal: *microbial phytase* "NOT" *plant phytase*.

3.1. Criterios de inclusión

Se han incluido artículos científicos que cumplen los siguientes requisitos:

- Que hablen de fitasas microbianas exógenas.
- El principal objetivo sea mejorar la absorción de fósforo.
- Aplicación para animales de granja monogástricos.
- Publicados posteriormente al año 2015.
- Idioma inglés.
- *Free full text*.

3.2. Criterios de exclusión

Se han excluido por las siguientes razones:

- Que el origen de la fitasa exógena fuera desconocido o no nombrado en el artículo.

De la búsqueda se obtuvieron 17 artículos. Aplicando los criterios de inclusión y exclusión, finalmente quedaron en 8. De los artículos seleccionados 1 fue de *Pubmed*, 3 artículos de *Journal of ANIMAL SCIENCE*, 3 artículos de *ScienceDirect* y 1 artículo de *ResearchGate*.

Tabla 5. Características de los artículos incluidos en la revisión bibliográfica.

Autor/es	Origen y tipo de fitasa	Nombre comercial	Dieta	FTU/kg						Especie
Gourley et al. (2018) (33)	<i>Aspergillus niger</i> (6-fitasa)	Natuphos® E 5000 G	Maíz-SBM	150	250	500	750	1000		Cerdos
Kiarie et al. (2016) (34)	<i>Buttiauxella</i> spp. (6-fitasa)	Axtra®PHY	Maíz-SBM	0			500			Cerdos en crecimiento
De Cuyper et al. (2020) (35)	<i>Escherichia coli</i> (6-fitasa)	OptiPhos®PLUS	Cebada-Maíz-SMB	0	125	250	500	1000		Lechones
Hamdi et al. (2018) (36)	<i>Serratia odorífera</i> (3-fitasa)	FLF® 1000 FTU	Maíz-Trigo-SBM	0	250	500	1000			Pollos de engorde
Dersjant-Li et al. (2019) (37)	<i>Buttiauxella</i> spp. (6-fitasa) <i>Escherichia coli</i> (6-fitasa)	-	Maíz-SBM	250	500	750	1000			Pollos de engorde
Attia et al. (2020) (38)	<i>Aspergillus niger</i> (3-fitasa)	-	Maíz-SBM	0			500			Pollos de engorde
Bello et al. (2019) (39)	<i>Buttiauxella</i> spp. (6-fitasa)	Axtra®PHY	Maíz-SBM	0			300			Gallinas ponedoras
Srikanthithasan et al. (2020) (40)	<i>Aspergillus niger</i> (6-fitasa)	Natuphos®E	Maíz-SBM	500			1000			Pollos de engorde

4. Resultados

El salvado de arroz fue la primera matriz alimentaria donde se encontró actividad fitásica, seguido de la sangre de terneros. Su presencia también se documentó en bacterias, levaduras, hongos y plantas.

*Natuphos*TM fue la primera fitasa introducida en el mercado en 1991 y se obtuvo de *Aspergillus niger* (3-fitasa). Posteriormente, comenzó a ganar popularidad en todo el mundo como un suplemento de alimentación animal. En 1999 se demostró que algunas fitasas de origen bacteriano como *Escherichia coli* (6-fitasa) eran más activas que las producidas por los hongos.

Las fitasas y su efecto sobre el fósforo han sido investigados a lo largo de los años y sus propiedades han sido descritas por varios autores (5).

- Gourley *et al.* (33) evalúan los efectos del aumento del P disponible a partir del fitasa *Natuphos E 5000 G* (6-fitasa de *Aspergillus niger*). Utilizaron un total de 288 cerdos de cría, de 11,1 kg y 40 días de edad, en un estudio de crecimiento de 21 días. Las concentraciones de fitasa añadida fueron 150, 250, 500, 750 y 1000 FTU/kg.

Añadiendo 1000 FTU/kg se pasa de un peso inicial en el día 0 de 11,1 kg a 23,3 kg en el día 21 (Tabla 6). Estos datos son significativos porque en una dieta sin fitasas y sin un suplemento extra de fósforo inorgánico se pasa de un peso en el día 0 de 11,1 kg a un peso en el día 21 de 20,3 kg.

Con un suplemento de fósforo inorgánico en forma de fosfato monocálcico se ve que partiendo del mismo peso original en el día 0 los cerdos llegan a un peso de 23,4 kg en el día 21.

Los suplementos en forma de fosfato monocálcico son muy costosos económicamente. Al obtener el mismo resultado en peso añadiendo fitasa supone un ahorro económico para la industria ganadera.

Si se analiza con *bone ash* como criterio, se pasa de un 38,1% en una dieta sin fitasas ni suplemento de fósforo inorgánico a un 45,6% en una dieta con 1000 FTU/kg. Estos resultados complementan a los obtenidos mediante el peso del animal.

La adición de fitasas permite que el fósforo liberado este más disponible para el animal y, en consecuencia, se pueda utilizar como componente estructural de los huesos (*bone ash*).

Tabla 6. Efectos del aumento de fósforo disponible al añadir 1000 FTU/kg de la fitasa Natuphos E 5.000 G en el rendimiento del crecimiento de los cerdos (kg) y los valores de *bone ash* (%).

	- fitasa / - P inorgánico	- fitasa / + P inorgánico	+ fitasa / - P inorgánico
Peso (kg)			
Día 0	11,1	11,2	11,2
Día 21	20,3	23,4	23,3
% Bone ash	38,1	42,1	45,6

- Kiarie *et al.* (34) analizan los efectos de añadir fitasa en la digestibilidad ileal aparente (AID) y en la digestibilidad total aparente del tracto digestivo (ATTD) del fósforo. Utilizaron 9 cerdos de 33,3 kg en un estudio de 9 días. Se añadió una 6-fitasa de *Buttiauxella* spp. (Aextra®PHY) en una concentración de 0 y 500 FTU/kg.

En este artículo, a diferencia del anterior, se analiza el papel que tiene la fitasa exógena de *Buttiauxella* spp. mediante el análisis de la digestibilidad aparente ileal y total (Tabla 7). Se concluye que la adición de la fitasa mejora la digestibilidad de fósforo. No obstante, si se tuvieran más datos como el % de excreción de fósforo o el % de bone ash, se tendrían unas conclusiones más completas.

Tabla 7. Efecto de la adición de 500 FTU/kg de fitasa en la digestibilidad ileal aparente (%) y en la digestibilidad total aparente del tracto digestivo (%) de fósforo.

	- fitasa	+ fitasa
Digestibilidad ileal aparente de P (%)	37,9	48,2
Digestibilidad total aparente del tracto digestivo de P (%)	40,6	52,9

- De Cuyper *et al.* (35) determinan el efecto de incrementar los niveles de OptiPhos®Plus (6-fitasa de *Escherichia Coli*). Utilizaron 150 cerdos, de 4 semanas de edad con un peso medio de 8,2 kg, en un estudio de 6 semanas de duración. Los niveles de fitasa fueron 0, 125, 250, 500 y 1000 FTU/kg.

Existe una correlación entre el aumento de los niveles de fitasa, la mejora de la digestibilidad del fósforo y el peso del animal. Conforme se incrementan los niveles de fitasa, el fósforo ve incrementada su biodisponibilidad como nutriente y, en consecuencia, aumenta el crecimiento de los animales.

Con 500 FTU/kg de fitasa el peso medio fue de 27,2 kg y con 1000 FTU/kg fue de 26,9 kg (Tabla 8). Debe tenerse en cuenta que la actividad fitásica viene determinada por muchos factores intrínsecos y extrínsecos, como la dieta del animal, género, proteasas del tracto digestivo, etc. No obstante, la diferencia de interés es la existente entre una dieta con 0 FTU/kg de fitasa exógena microbiana y una dieta con 1000 FTU/kg, donde se observa un aumento de la digestibilidad de fósforo.

Tabla 8. Efecto del incremento de fitasa sobre la digestibilidad total aparente del tracto digestivo (%) del fósforo (%) y sobre el peso final (kg).

(FTU/kg)	0	125	250	500	1000
Digestibilidad total aparente del tracto digestivo de P (%)	33,1	42,0	47,6	53,6	61,6
Peso (kg)	23,3	25,4	24,9	27,2	26,9

- Hamdi *et al.* (36) evalúan el efecto de incrementar la concentración de una fitasa de *Serratia odorífera* (3-fitasa) llamada comercialmente FLF®1000 FUT. Utilizan 160 pollos de engorde, de 1 día de edad, en un estudio de 35 días de duración. Las concentraciones de fitasa fueron 0, 250, 500 y 1000 FTU/kg.

Este estudio ayuda a correlacionar la retención de fósforo con la mejora en la digestibilidad de este. Cuanto mejor es la digestibilidad del fósforo gracias a la adición de fitasas, mayor retención existe y, por lo tanto, menor excreción. Así se reduce el problema medioambiental que causa el fósforo (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto de diferentes concentraciones de fitasa sobre la retención de fósforo (%) y en la digestibilidad ileal aparente (%).

FTU/kg	0	250	500	1000
Retención de P (%)	53,0	58,4	58,9	57,7
Digestibilidad ileal de P (%)	49,9	54,2	53,4	55,7

- Dersjant-Li *et al.* (37) comparan el efecto de diferentes concentraciones de una 6-fitasa de *Escherichia coli* y una 6-fitasa de *Buttiauxella* sp. con un incremento del fósforo inorgánico en forma de fosfato monocálcico. Utilizaron 1152 pollos de engorde, de 5 días de edad, en un estudio que duró 16 días. Las concentraciones añadidas de fitasa fueron 250, 500, 750, 1000 FTU/kg para las dos fitasas.

La adición de fitasas exógenas microbianas sigue teniendo un papel muy importante en la retención de fósforo y la utilización de este como nutriente. Utilizando fitasas microbianas en vez de un suplemento de fosfato monocálcico se obtiene un incremento de peso mayor, incremento en la digestibilidad del fósforo y mayor retención de este (Tabla 10).

Se consiguen mejores resultados con la fitasa de *Buttiauxella* sp. debido a que es más activa a pH bajos (pH=3) en comparación con la fitasa de *Escherichia coli*. Tiene más capacidad de liberar el fósforo del fitato en las primeras regiones del tracto superior digestivo antes de que este forme complejos con minerales y nutrientes.

Tabla 10. Efecto de suplementar la dieta con dos fitasas diferentes o con fosfato monocálcico como fuente de fósforo inorgánico en el peso (g), digestibilidad aparente ileal del fósforo (%) y en la retención de fósforo (%).

	- fitasa / - P inorgánico	- fitasa / + P inorgánico	<i>Buttiauxella</i> sp.				<i>Escherichia coli</i>			
			250	500	750	1000	250	500	750	1000
Peso (g)	692	878	766	832	848	876	787	816	848	844
Digestibilidad aparente ileal de P (%)	59,1	55,8	65,5	67,8	71,5	73,9	65,2	68,8	67,6	68,6
Retención de P (%)	57,6	53,0	64,0	68,3	69,4	72,2	62,0	65,8	65,7	69,0

- Attia *et al.* (38) estudian el efecto de una fitasa fúngica de *Aspergillus niger* (3-fitasa) sobre el rendimiento de crecimiento en pollos. Se utilizaron 420 pollos, de un día de edad, en un estudio de 64 días de duración. Las concentraciones de fitasa añadidas fueron 0 y 500 FTU/kg.

El fósforo a nivel metabólico se ve incrementado y en consecuencia aumenta el peso de los pollos al poder utilizar este fósforo como nutriente (Tabla 11).

Tabla 11. Efecto de añadir fitasa a la dieta sobre el peso (g) y niveles de fósforo (mg/dL) de pollos.

	- fitasa	+ fitasa
Fósforo (mg/dL)	6,10	6,64
Peso (g)	1478	1646

- Bello *et al.* (39) evalúan los efectos de suplementar la dieta con una fitasa de *Buttiauxella* sp. (Aextra®PHY) en la digestibilidad ileal aparente. Utilizaron 456 gallinas ponedoras entre 30 y 70 semanas de edad. La concentración de fitasa añadida fue de 0 y 300 FTU/kg.

Vemos que a las 48 semanas de edad la digestibilidad del fósforo ha aumentado considerablemente respecto a 32 semanas y respecto a no añadir fitasas (Tabla 12). No obstante, a las 70 semanas el factor “edad” influye en la digestibilidad y por lo tanto, el fósforo liberado no acaba siendo absorbido y usado como nutriente.

Tabla 12. Efecto de la adición de 300 FTU/kg de fitasa en la digestibilidad aparente ileal (%) dependiendo de la edad de gallinas ponedoras.

	Digestibilidad ileal aparente (%)		
Semanas	32	48	70
- fitasa	39,9	53,0	54,2
+ fitasa	52,7	60,7	39,2

La edad de las gallinas ponedoras es una variable importante que disminuye los efectos de las fitasas en la absorción de fósforo (41). En animales adultos el tiempo de retención de la digesta es mayor y el pH es más favorable a la hidrólisis del fitato pero la eficacia de absorción disminuye.

- Srikanthithasan *et al.* (40) analizan el efecto de añadir una fitasa de *Aspergillus niger* (6-fitasa) comercialmente conocida como Natuphos®E sobre la excreción de fósforo en pollos de engorde. Utilizaron 810 pollos, de un día de edad, en un estudio de 35 días de duración. La concentración de fitasa añadida fue de 500 FTU/kg y 1000 FTU/kg.

El suplemento de fósforo dicálcico promueve una mayor absorción pero también mayor excreción, ya que el fitato ingerido continúa excretándose al no haber enzimas que lo destruyan (Tabla 13). Con la fitasa existe mayor absorción y además una menor excreción de fósforo al poder hidrolizar el fitato.

Tabla 13. Efecto de la concentración de fitasa añadida sobre el fósforo excretado (%).

	0 FTU/kg / + fosfato dicálcico	500 FTU/kg / - fosfato dicálcico	1000 FTU/kg / - fosfato dicálcico
Fósforo excretado (%)	72	39	15

5. Discusión

5.1 Origen y tipo de fitasa

En la tabla 5 se ve como la mayoría de los estudios realizados con fitasas exógenas microbianas usan 6-fitasas. Un porcentaje elevado corresponde a fitasas bacterianas (*Buttiauxella* spp., *Escherichia coli*), aunque actualmente ya existen 6-fitasas fúngicas como Natuphos®E (*Aspergillus niger*). Se observa que el uso de fitasas provenientes de levaduras es muy bajo aunque existente (42).

A nivel de desfosforilación, las 3-fitasas forman como producto final el IP1 y las 6-fitasas se detienen al formar IP4. Esto hace que comercialmente sean más atractivas las 3-fitasas.

Las fitasas fúngicas (generalmente 3-fitasas) están glicosiladas. Existen casos en que la glicosilación aumenta la termoestabilidad de la enzima y su producción. No obstante, en general tiene efectos negativos sobre las fitasas: propiedades catalíticas, estabilidad, punto isoeléctrico y expresión.

Actualmente no se dispone de unas conclusiones claras respecto a la glicosilación pero al escoger una 6-fitasa bacteriana para estudiar el papel que tiene sobre la absorción de fósforo se evita una variable importante.

5.2 Concentración de fitasa añadida

Las ecuaciones que sigue la digestibilidad de fósforo en función de la concentración de fitasas son exponenciales o logarítmicas. Aun así se puede deducir un incremento lineal por unidad de fitasa (3). Muchos son los artículos que determinan que a partir de 1000 FTU/kg no hay una mayor digestibilidad de fósforo. Se puede ver que la cantidad máxima de fitasa añadida en los artículos de la **Tabla 5** es de 1000 FTU/kg y que existe un incremento a mayor cantidad de fitasa añadida.

Actualmente se están llevando a cabo estudios donde se añaden super dosis de fitasas a la dieta (>1500 FTU/kg). Estudios recientes han demostrado que puede mejorar el crecimiento de los animales monogástricos. No obstante, aunque este *super-dosing* está generando mucho interés no se han desarrollado conclusiones firmes (43).

5.3 Efecto sobre la absorción de fósforo

Porcentaje de retención de fósforo, digestibilidad ileal, digestibilidad total, *bone ash*, excreción y rendimiento de crecimiento de los animales (peso final) han sido los valores analizados para determinar el papel de estas fitasas microbianas. Mediante el análisis de los artículos escogidos para esta revisión puede concluirse que en cada uno de ellos

existe una mejora relacionada con el fósforo. De esta manera se da respuesta al objetivo principal de esta revisión concluyendo que las fitasas exógenas microbianas desempeñan un papel muy importante en la absorción de fósforo. Como consecuencia directa de esto se ven también mejoras en otros aspectos.

5.4 Especie

Entre los diferentes artículos se puede ver que hay variedad en cuanto al animal monogástrico escogido. Aunque todos son animales de granja monogástricos, la edad, especie y objetivo (gallinas ponedoras o pollos de engorde, por ejemplo) influyen en la absorción de fósforo.

5.5 Matriz alimentaria

Las matrices alimentarias más utilizadas son el trigo, maíz y soja. En la tabla 4 se ve que el trigo tiene una actividad fitásica elevada pero en cambio maíz y soja tienen unos valores muy bajos.

Si la alimentación es de consistencia líquida y además es húmeda se ve favorecida la eficacia de las fitasas vegetales contenidas en las matrices alimentarias. Es algo que no se puede discutir ni analizar ya que en los artículos estudiados no existe tal referencia sobre la dieta.

En respuesta al objetivo secundario de este trabajo se puede concluir que la elección del tipo de cereal de la dieta viene motivada por su contenido en carbohidratos, proteínas y lípidos, por ejemplo. Todo esto influye en el valor energético del grano. Más allá de buscar un efecto aditivo entre matriz alimentaria y fitasa para la actividad fitásica, lo que se requiere es un cumplimiento adecuado de los valores nutricionales. En la mayoría de los artículos se evalúa la absorción de fósforo provocada por la fitasa y no se tiene en cuenta el cereal.

No obstante, existen estudios donde se observa un efecto aditivo entre las fitasas vegetales de la matriz alimentaria (salvado de trigo) y las fitasas microbianas (*Aspergillus niger*) (3).

6. Conclusiones

Las fitasas microbianas han sido usadas amplia y exitosamente durante los últimos años dentro de la alimentación de animales monogástricos. La primera generación de fitasas procede de fuentes fúngicas, sobre todo de *Aspergillus* spp. Esta generación mayoritariamente era termolábil y activa a un pH neutro (el del estómago es más ácido). Se potenció el uso de fitasas bacterianas y surgió una segunda generación, generalmente de *Escherichia coli*. Aumentó la actividad específica de la enzima y la afinidad por el sustrato, pero no la termoestabilidad. Actualmente existe una tercera generación de fitasas termoestables con modificaciones en aminoácidos y en patrones de glicosilación.

Desde un punto de vista biotecnológico se está ante un mundo que tiene mucho potencial en el futuro pero que actualmente aún no ha encontrado la fitasa ideal. Esta fitasa debería actuar a un rango muy amplio de pH y mantenerse activa en el estómago y hasta la parte alta del intestino delgado. Así se usaría de manera más eficiente para la absorción de fósforo en animales monogástricos de granja.

Existen incoherencias como el método de medición de la actividad fitásica. Esta se realiza a pH 5,5 el cual no refleja el pH real del tracto digestivo de los cerdos, por ejemplo. También es muy complejo comparar diferentes estudios de fitasas ya que hay una gran cantidad de variables que se tienen en cuenta: cantidad de ingredientes en la dieta, la especie y edad del animal, condiciones del tracto digestivo, pH y temperatura. Además, en la alimentación animal el *pelleting* del pienso es el factor más limitante. Las temperaturas son muy elevadas y aunque se usen fitasas modificadas para ser más termorresistentes no dejan de ser enzimas que se desnaturalizan con el calor.

Sin embargo, puede concluirse que el uso de fitasas microbianas exógenas facilitan considerablemente la absorción de fósforo. Se reducen los costes a causa de evitar los suplementos de fósforo inorgánico, se mejora la eficiencia del uso del fosfato y se reduce la excreción de fósforo, lo que resulta en una disminución de la contaminación ambiental.

7. Autoevaluación

Este trabajo ha sido muy enriquecedor a la par que dificultoso.

A raíz de la situación de pandemia que estamos viviendo, tuve que cambiar de un Trabajo de Final de Grado (en adelante, TFG) experimental a bibliográfico. Nunca había hecho una revisión de tal calibre así que realmente era un reto para mí, ya que no se asemeja para nada a un trabajo corriente de cualquier asignatura.

Empezar con este trabajo más tarde de lo habitual y a contrarreloj propició una situación de estrés que tuvo momentos negativos pero también me ayudó a focalizarme en el trabajo y mantenerme concentrada olvidándome un poco del contexto social.

Las limitaciones que he ido encontrando han sido a la hora de buscar información, sobre todo porque una inmensa mayoría de artículos no son *open access*. Lo positivo fue que al encontrarnos en esta situación de confinamiento, muchas plataformas empezaron a ofrecer gratuitamente artículos, revistas y libros para uso académico.

Estoy muy satisfecha con el trabajo realizado, me ha dado mucha confianza en mí misma ya que no me creía capaz de llevarlo a cabo. También he aprendido a valorar el trabajo de otros investigadores. A medida que iba referenciando iba creciendo en mi un respeto (aún más si cabe) hacía esos científicos que comparten sus conocimientos con la comunidad científica y que muchas veces se ven vulnerados por plagios.

Poniendo el foco en las fitasas creo que queda mucho estudio por delante. No obstante, la biotecnología va por buen camino ya que sumándole el uso de sistemas biológicos, en este caso microorganismos, los beneficios nutricionales, ambientales y económicos que obtenemos son un objeto de estudio muy atractivo.

8. Agradecimientos

Al equipo de APSA R&D por darme la oportunidad de realizar el TFG con ellos aunque al final no pudo ser. La estancia fue corta pero siempre mostraron amabilidad y me hicieron sentir muy cómoda. Espero algún día tener la ocasión de volver y aprovechar la estancia durante más tiempo.

A mi familia por transmitirme una positividad desbordante y enseñarme siempre a ver el lado bueno frente a las adversidades.

Por último y no menos importante, agradecer al tutor académico del trabajo, Ricardo Cordero, por ofrecerme siempre ayuda de manera inmediata y contribuir a la mejora de la revisión con sus comentarios constructivos.

9. Bibliografía

1. BOE.es - Documento DOUE-L-2019-80010 [Internet]. [citado el 8 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2019-80010>
2. Humer, E. et al. (2015) «Phytate in pig and poultry nutrition», *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(4), pp. 605-625. doi: 10.1111/jpn.12258
3. Quiles, A. (2002) «Papel de las Fitasas en la Alimentación Porcina».
4. Greiner, R. et al. (2006). «Phytase for food application». *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 125–140.
5. Kumar, V. et al. (2018). «General aspects of phytases». *Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives*. doi: 10.1016/B978-0-12-805419-2.00003-4
6. Ushasree, M. V. et al. (2017). «Microbial phytase: Impact of advances in genetic engineering in revolutionizing its properties and applications». *Bioresource Technology*, 245, 1790–1799. doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.060
7. «Monogastric Digestive System - Introduction to Animal Nutrition» (2010). Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/243b/78c5edc3079d85e6dd28020aa255d837c508.pdf>
8. Dersjant-Li, Y. et al. (2015). «Phytase in non-ruminant animal nutrition: A critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors». *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(5), 878–896. doi: 10.1002/jsfa.6998
9. Rebollar, P. G., & Mateos, G. G. (2005). «Materias Primas Y Mejora De La Disponibilidad». Disponible en: http://portal.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Fósforo_en_Alimentación_Animal.pdf
10. Oster, M. et al. (2016). «Toward improved phosphorus efficiency in monogastrics—interplay of serum, minerals, bone, and immune system after divergent dietary phosphorus supply in swine». *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 310(10), R917–R925. doi: 10.1152/ajpregu.00215.2015

11. Romano, N., & Kumar, V. (2018). «Phytase in animal feed». *Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives*. doi: 10.1016/B978-0-12-805419-2.00004-6
12. Spier, M. R. et al. (2018). «Perspectives of phytases in nutrition, biocatalysis, and soil stabilization». *Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives*, 89–104. doi: 10.1016/B978-0-12-805419-2.00005-8
13. Haefner, S. et al. (2005). «Biotechnological production and applications of phytases». *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(5), 588–597. doi: 10.1007/s00253-005-0005-y
14. Stein, H. H. et al. (2016). «Phytate destruction: Consequences for precision animal nutrition». *Wageningen Academic Publishers*.
15. Olukosi, O. A. (2012). «Biochemistry of phytate and phytases: Applications in monogastric nutrition». *International Journal of the Nigerian Society for Experimental Biology*, 24(September), 58–63.
16. Woyengo, T. A. et al. (2010). «Gastro-intestinal digesta pH, pepsin activity and soluble mineral concentration responses to supplemental phytic acid and phytase in piglets». *Livestock Science*, 134(1–3), 91–93. doi: 10.1016/j.livsci.2010.06.107.
17. Selle, P. H., & Ravindran, V. (2008). «Phytate-degrading enzymes in pig nutrition». *Livestock Science*, 113(2–3), 99–122. doi: 10.1016/j.livsci.2007.05.014
18. Vashishth, A., Ram, S., & Beniwal, V. (2017). «Cereal phytases and their importance in improvement of micronutrients bioavailability». *3 Biotech*, 7(1), 1–7. doi: 10.1007/s13205-017-0698-5
19. Kebreab, E. et al. (2012). «Animal production for efficient phosphate utilization: From optimized feed to high efficiency livestock». *Current Opinion in Biotechnology*, 23(6), 872–877. doi: 10.1016/j.copbio.2012.06.001
20. Balwani, I. et al. (2017). «Role of phytase producing microorganisms towards agricultural sustainability». *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12(August), 23–29. doi: 10.1016/j.bcab.2017.08.010
21. Jain, J., Sapna, & Singh, B. (2016). «Characteristics and biotechnological applications of bacterial phytases». *Process Biochemistry*, 51(2), 159–169. doi: 10.1016/j.procbio.2015.12.004

22. Gifre, L. *et al.* (2017). «Trends in recombinant protein use in animal production». *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1–17. doi: 10.1186/s12934-017-0654-4
23. El-Hack, M. E. A. *et al.* (2018). «The uses of microbial phytase as a feed additive in poultry nutrition - A review». *Annals of Animal Science*, 18(3), 639–658. doi: 10.2478/aoas-2018-0009
24. Kahindi, R. K. *et al.* (2016). «Performance and Phosphorus Utilization of Broiler Chickens Fed Low Phytate Barley and Pea Based Diets with Graded Levels of Inorganic Phosphorus». *Annals of Animal Science*, 17(1), 205–215. doi: 10.1515/aoas-2016-0023
25. Plumstead, P. W. *et al.* (2008). «Interaction of calcium and phytate in broiler diets. 1. Effects on apparent prececal digestibility and retention of phosphorus». *Poultry Science*, 87(3), 449–458. doi: 10.3382/ps.2007-00231
26. Ribeiro, V. *et al.* (2016). «Efficacy and phosphorus equivalency values of two bacterial phytases (*Escherichia coli* and *Citrobacter braakii*) allow the partial reduction of dicalcium phosphate added to the diets of broiler chickens from 1 to 21 days of age». *Animal Feed Science and Technology*, 221, 226–233. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2016.09.008
27. Naves, L. de P. *et al.* (2012). «Effect of pH and temperature on the activity of phytase products used in broiler nutrition». *Revista Brasileira de Ciencia Avicola*, 14(3), 181–185. doi: 10.1590/S1516-635X2012000300004
28. Morales, G. A. *et al.* (2011). «In vitro assessment of the effects of phytate and phytase on nitrogen and phosphorus bioaccessibility within fish digestive tract». *Animal Feed Science and Technology*, 170(3–4), 209–221. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2011.08.011
29. Wu, Y. B. *et al.* (2004). «Evaluation of a microbial phytase, produced by solid state fermentation, in broiler diets II. Influence on phytate hydrolysis, apparent metabolizable energy, and nutrient utilization». *Journal of Applied Poultry Research*, 13(4), 561–569. doi: 10.1093/japr/13.4.561
30. FEDNA | Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal [Internet]. [citado el 4 de mayo de 2020]. Disponible en: http://www.fundacionfedna.org/concentrados_proteina_vegetal
31. Godoy, S. *et al.* (2005). «Phytic phosphorus and phytase activity of animal feed ingredients». *Interciencia*, 30(1), 24–28.

32. Woyengo, T. A. (2010). «Gut secretions and nutrient absorption responses to dietary phytic acid and phytase in piglets».
33. Gourley, K. M. et al. (2018). «Determining the available phosphorus release of natuphos E 5,000 g phytase for nursery pigs». *Journal of Animal Science*, 96(3), 1101–1107. doi: 10.1093/jas/sky006
34. Kiarie, E. et al. (2016). «Phytase improved digestible protein, phosphorous, and energy contents in camelina expellers fed to growing pigs». *Journal of Animal Science*, 94(7), 215–218. doi: 10.2527/jas2015-9735
35. De Cuyper, C. et al. (2020). «Effect of supplementing phytase on piglet performance, nutrient digestibility and bone mineralisation». *Journal of Applied Animal Nutrition*, 1–8. doi: 10.3920/jaan2019.0003
36. Hamdi, M. et al. (2018). «The effects of microbial phytases and dietary calcium and phosphorus levels on the productive performance and bone mineralization of broilers». *Animal Feed Science and Technology*, 243, 41–51. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2018.07.005
37. Dersjant-Li, Y., & Kwakernaak, C. (2019). «Comparative effects of two phytases versus increasing the inorganic phosphorus content of the diet, on nutrient and amino acid digestibility in boilers». *Animal Feed Science and Technology*, 253(May), 166–180. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2019.05.018
38. Attia, Y. A. et al. (2020). «Microbial and fungal phytases can affect growth performance, nutrient digestibility and blood profile of broilers fed different levels of non-phytic phosphorous». *Animals*, 10(4), 1–13. doi: 10.3390/ani10040580
39. Bello, A., & Korver, D. R. (2019). «Long-term effects of *Buttiauxella* sp. phytase on performance, eggshell quality, apparent ileal Ca and P digestibility, and bone properties of white egg layers». *Poultry Science*, 98(10), 4848–4859. doi: 10.3382/ps/pez220
40. Srikanthithasan, K. et al. (2020). «Effects of adding phytase from *Aspergillus niger* to a low phosphorus diet on growth performance, tibia characteristics, phosphorus excretion, and meat quality of broilers 35 days after hatching». *Journal of Poultry Science*, 57(1), 28–36. doi: 10.2141/jpsa.0180143
41. Bougouin, A. et al. (2014). «Effects of phytase supplementation on phosphorus retention in broilers and layers: A meta-analysis». *Poultry Science*, 93(8), 1981–1992. doi: 10.3382/ps.2013-03820

42. Kłosowski, G. *et al.* (2018). «Extracellular phytase production by the wine yeast *Saccharomyces Cerevisiae* (Finarome Strain) during submerged fermentation». *Molecules*, 23(4). doi: 10.3390/molecules23040848
43. Laird, S. (2016). «The effects of super-dosing phytase in the growing pig».