

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA

**EFFECTES DE L'ÚS DE FONTS EXÒGENES DE FITASA SOBRE  
ELS RENDIMENTS PRODUCTIUS I VALOR NUTRICIONAL DE  
LES DIETES RIQUES EN POLISACÀRIDS NO MIDÓ (NSP) EN  
POLLASTRES BROILERS.  
REPERCUSSIONS MEDIAMBIENTALS.**

Memòria presentada per  
JORDI JUANPERE DOMÍNGUEZ  
per optar al títol de Doctor per la  
Universitat Rovira i Virgili.

Tarragona, juliol de 2004

Dra. ANNA MARIA PÉREZ VENDRELL, Investigadora del Departament de Nutrició Animal de l'IRTA

CERTIFICA: Que la present memòria, amb el títol “Efectes de l’ús de fonts exògenes de fitasa sobre els rendiments productius i valor nutricional de les dietes riques en polisacàrids no midó (NSP) en pollastres broilers. Repercussions mediambientals” presentada pel llicenciat en Ciències Químiques Jordi Juanpere Dominguez, ha estat realitzada sota la seva direcció i compleix les condicions necessàries per a optar al grau de Doctor per la Universitat Rovira i Virgili.

I per a que així consti, firma la present a Reus, el 5 de juliol de 2004.

Firmat, Dra. Anna M. Pérez Vendrell

Quan es viatja en direcció a un objectiu  
és molt important prestar atenció al camí.

El camí és el que ens ensenya la millor manera d'arribar.

*Paulo Coelho – El peregrí de Compostel·la (Diari d'un mag)*

Als meus pares i germans.

## AGRAÏMENTS

- ❖ A l'Institut Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) per haver-me permès realitzar els estudis de Doctorat per la inclusió en el projecte SC 99-058, i a l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaria (IRTA) per haver-me facilitat la possibilitat de disposar del seu material i les seves instal·lacions del Centre de Mas Bové durant tot aquest temps.
- ❖ Al Dr. Joaquim Brufau de Barberà, director del centre i cap de departament de Nutrició Animal, per haver confiat en mi durant l'estança en el centre i les facilitats donades, així com l'interès mostrat.
- ❖ A la Dra. Anna M. Pérez Vendrell, la meva directora de Tesi. Moltes gràcies per tot el temps que has perdut amb mi, i per la paciència mostrada en tot moment.
- ❖ Als investigadors del Departament: Drs. Enric Esteve, Maria Francesch, David Torrallardona i Rosil Lizardo. Gràcies per ajudar-me quan ho he necessitat, amb els vostres consells i amb les vostres explicacions.
- ❖ A tot el personal del Laboratori de Nutrició Animal: Candy Segarra, Manoli Morales, LuisMi Algaba, Lola López i Núria Paris. Sense les vostres explicacions i consells en la part analítica segur que no m'hauria sortit tant bé en la part analítica del treball.
- ❖ Al personal de granja: Lluís Llaudó, Ramon Salvadó, Alfonso i Dioni Mejías, Joan Martí, Mercè, Christian, Josep Mateu. Gràcies per l'ajut en fer que els pollastres sobrevisquessin fins al final de les proves, i es quedessin els mínims possibles pel camí.
- ❖ Als companys becaris: Serena, Sergi, Nieves, Rosa, Laura, René, Virgínia, Pere i David. Durant tots aquests anys hem pogut compartir alegries i mals de caps, feina de laboratori i de granja, i al final, encara que no ho sembli, tots anirem arribant a l'objectiu.
- ❖ A la Noemí i a la Núria Canut, ex-ceteperas. Gràcies per les bones estones passades en el laboratori. A Rosa Guasch i Joan Albert Arnavat, dos estadants en el nostre Centre, que em van ajudar en diferents tasques en el seu moment.
- ❖ A la resta de personal de l'IRTA, ja siguin de Nutrició (Anna Pinto, Lluís Pedrell i Andreu), d'Administració (Marissa, Quica, Cristina, Maria) o d'Arboricultura (Tània, Joan Clavé, Jaume, Joan Plana). Gràcies per la bona estança que m'heu fet passar tots aquests anys. No se us oblidarà.

❖ Als de casa. A Josep Maria i Josefina. Pels més de trenta anys que porteu sofrint-me, però sobretot per l'ajuda i el suport facilitat en tot moment. Només puc dir-ho d'una manera: gràcies per tot. Perquè tot ha estat possible per “culpa” vostra.

A la Núria i al Josep Maria. Ja se sap que el recolzament entre germans és diferent a tot altre tipus de recolzament. Gràcies per l'ajuda física o espiritual, ja sigui en viu o via informàtica.

A la resta de la família, que encara que som pocs estem ben avinguts, i ens tenim pel que fa falta, així com pels que ja no hi són, que encara que només hi fossin al principi van donar el seus ànims, i encara els donen des d'on són.

❖ Als bons amics, Josep M., Joan i Tere, i d'altres que ara no recordo, que durant aquest temps s'han preocupat per mi, preguntant com anaven les coses. Als membres (junta, entrenadors i esportistes) dels dos clubs de bàsquet, que en la durada de la realització de la Tesi m'han acollit com a entrenador. Gràcies per la via d'escapament aportada.

❖ Finalment, voldria donar les gràcies a una persona que, tot i fer anys que ens coneixem, porta poc temps prop meu. Gràcies pels ànims, consells i amor que m'estàs donant en aquest tram de la Tesi, el més difícil, sens dubte.

Repeteixo, finalment, gràcies a tots per aquest període de la meva vida, en què he après moltes coses a part de nutrició animal.

JORDI

## **RESUM / SUMMARY**



El principal objectiu d'aquest treball és estudiar els efectes que l'addició de fitasa microbiana en diferents tipus de dietes per a aus produeix tant en el seu valor nutritiu, com en els rendiments productius de les aus, i en el seu impacte mediambiental.

En l'assaig 1, es van avaluar i comparar els efectes de l'addició de fitasa microbiana sobre les millores del creixement, energia de la dieta i retenció mineral en dietes de morenc i blat. Un objectiu addicional va ser definir el nivell òptim de l'enzim per usar en dietes de blat. Es van assajar dietes amb dos cereals diferents (morenc o blat), amb dos nivells de fòsfor (4.5 i 2.7 g FNF/kg de pinso) i amb diferents nivells d'enzim fitasa aplicat en la dieta deficient de fòsfor. En dietes deficientes de fòsfor de morenc la inclusió de fitasa incrementà el pes final, consum mig diari i la concentració de cendres dels dits, i també augmentà la retenció de fòsfor total i retenció de calci. En dietes de blat, l'addició de fitasa microbiana a dietes deficientes de fòsfor va augmentar la concentració de cendres dels dits, i el coeficient de retenció aparent de fòsfor total des de 0.53 en dietes normal de fòsfor fins a 0.69-0.73 en dietes deficientes; en canvi, la retenció de calci no va variar. L'addició de fitasa no va fer variar l'excreció mineral en cap de les dietes estudiades. Basat en els valors més grans de  $R^2$ , els valors de pes final i de cendres dels dits van ser els indicadors més sensibles per avaluar la disponibilitat de P. Es van utilitzar equacions lineals per calcular els valors d'equivalència de P per FNF. Utilitzant la funció mitjana de P alliberat per fitasa microbiana a un nivell de FNF de 2.7 g/kg, va trobar-se que 605 U de fitasa podrien ser equivalents a 1 g de P.

En l'assaig 2, es van avaluar els efectes d'una fitasa microbiana en la millora del creixement, energia de la dieta i la retenció de minerals en dietes d'ordi sense o amb fitasa endògena. Els tractaments es diferenciaven per tenir dues concentracions diferents de FNF (4.5 i 2.7 g/kg de dieta), per l'ús d'ordi tractat o no, i per l'addició o no de 500 U/kg de pinso de fitasa microbiana en les dietes deficientes de P. La reducció de FNF en dietes de pollastres d'engreix va produir una disminució de la ingestió diària de pinso i del consum d'aigua i una reducció del creixement animal que va ser millorat per la inclusió de l'enzim fitasa en aquests pinsos. Els animals que menjaren pinsos contenint 4.5g FNF/kg o dietes de només 2.7g FNF/kg més 500 U enzim fitasa/kg van tenir

un creixement similar. La concentració de cendres del dit del peu, bon indicador de la retenció de fòsfor, va variar depenent el contingut de fòsfor de la dieta i la presència o no de l'enzim fitasa microbiana. La concentració de fòsfor i calci en el plasma també fou influïda per la concentració de fòsfor de la dieta i la presència o no de fitasa endògena. La inclusió de fitasa a dietes amb una concentració baixa de FNF incrementà els coeficients de retenció de fòsfor i reduí la presència d'aquest element en l'excreta del pollastre en més d'un 45%, indicant un efecte mediambiental favorable. En general, no s'observaren efectes per la presència o no de fitasa endògena de l'ordi.

En l'assaig 3, es van avaluar els efectes en la biodisponibilitat de fòsfor i altres minerals per l'addició de fitasa exògena a dietes de morenc i soja amb segó de blat, depenent de la presència o no d'activitat fitàsica endògena del segó de blat. Els tractaments van variar en funció del segó de blat utilitzat (tractat o no per l'autoclau), el nivell de inclusió del segó en la dieta (0, 5 o 10%) i la quantitat de fitasa exògena (500 U per kg de pinso). L'addició de fitasa microbiana va permetre millorar els paràmetres productius, sense que hi hagués variacions en la viscositat del contingut intestinal. Els valors energètics de les dietes augmentaren per l'addició de fitasa, no havent variacions importants en la digestibilitat de nutrients. La fitasa microbiana va fer augmentar la concentració en plasma de fòsfor no fític i la mineralització dels ossos, tal com ho demostra l'augment en la quantitat de fòsfor total en les cendres dels dits, encara que no es modifiquessin ni la retenció aparent ni l'excreció d'aquest mineral. L'eliminació de la fitasa endògena del segó de blat present en dietes de morenc-soja deficientes de fòsfor va suposar un menor consum de pinso i creixement dels animals i, també, una disminució en el fòsfor no fític en plasma. Les digestibilitats de nutrients i retencions minerals no variaren per l'eliminació de la fitasa endògena.

L'assaig 4 tenia com a principals objectius l'avaluació del creixement dels animals i de la biodisponibilitat de fòsfor i altres minerals depenent de la presència o no d'activitat fitàsica endògena en blat. També es va estudiar els efectes de diferents nivells de fitasa exògena, alguns més alts dels habituals. Els tractaments variaven en el blat emprat (tractat o no per l'autoclau), el nivell de FNF (4.5 i 2.7 g per kg de pinso) i el nivell de fitasa exògena (0, 500 i 5000 U per kg de pinso).

L'addició de fitasa exògena en dietes de blat deficitàries en fòsfor, i una elevada activitat fitàsica endògena, produeix unes millores en el creixement dels animals sense tenir una incidència sobre la retenció de minerals. Per altra banda, la eliminació de fitasa endògena produeix unes lleugeres reduccions en el creixement sense influir en la retenció ni excreció de minerals. La presència de la fitasa endògena del blat va produir un creixement major dels pollastres i un major consum de pinso i minerals, sense repercutir en l'energia de la dieta ni en la retenció aparent ni en l'excreció de fòsfor. L'addició d'una dosi superior a la d'ús habitual de fitasa no va influenciar el creixement dels pollastres. En canvi, sí que va tenir efectes en l'energia de les dietes i en una major concentració en plasma de fòsfor no fític.

En l'assaig 5, es van estudiar els efectes de la fitasa microbiana i d'enzims carbohidrasa, i les seves interaccions, en els valors energètics i la digestibilitat de nutrients en dietes riques en polisacàrids no amilacis (PNA) amb tres assaigs factorials 2×2 utilitzant broilers que menjaren dietes de moresc, blat o ordi. Les dietes contenien o no fitasa, amb o sense enzims carbohidrasa ( $\alpha$ -galactosidasa, xilanasa o  $\beta$ -glucanasa per les dietes de moresc, blat i ordi, respectivament). Les carbohidrases disminuïren la viscositat intestinal, mentre que la fitasa incrementava aquest paràmetre en les dietes de moresc. La fitasa augmentà l'EMA en les dietes de moresc, mentre que la  $\beta$ -glucanasa en dietes d'ordi millorava l'EMA i l'EMAn i la digestibilitat de matèria seca, midó,  $\beta$ -glucans i lípids. La xilanasa en dietes de blat millorà la digestibilitat de matèria seca i midó. La fitasa augmentà la retenció de fòsfor total en totes les dietes, i es van detectar interaccions significatives entre els enzims carbohidrasa i la fitasa en dietes de blat i ordi. La fitasa disminuï l'excreció de fòsfor en dietes de moresc i ordi, mentre que l' $\alpha$ -galactosidasa incrementava l'excreció de fòsfor en dietes de moresc. La retenció de calci va augmentar per l'addició de fitasa a les dietes de moresc i per la  $\beta$ -glucanasa en les d'ordi i, com a conseqüència, l'excreció de calci va disminuir per l'acció de la fitasa en les dietes de moresc i per la  $\beta$ -glucanasa en les d'ordi; la inclusió de xilanasa va disminuir la retenció de calci en les dietes de blat. Es va trobar una interacció entre la fitasa i la  $\beta$ -glucanasa en dietes d'ordi, reduint-se l'excreció de calci. En general, no es trobaren interaccions negatives

entre la fitasa i els enzims carbohidrasa, indicant que ambdós tipus d'enzims poden ser usats junts en pinsos de morenc, blat o ordi.

La sisena part d'aquesta memòria té com a objectiu confirmar la determinació de fosfats d'inositol mitjançant la tècnica de la ressonància magnètica nuclear (RMN) de fòsfor ( $P^{31}$ ). Les mostres analitzades corresponien als pinsos i als continguts intestinals dels cinc assaigs anteriors, mentre que en el segon assaig també s'analitzaren els continguts del pap, pedrer i cloaca, ja que un dels objectius va ser analitzar l'evolució dels fosfats d'inositol en quatre trams diferents del tub digestiu. Els resultats obtinguts mostraren que el RMN de  $P^{31}$  és una bona tècnica per a la determinació de fosfats d'inositol amb un nombre elevat de grups fosfats. Els fosfats d'inositol amb un nombre menor de grups fosfats no es pogueren determinar per la poca presència en les mostres. Pel que fa a la hidròlisi del fosfat d'inositol dins el tracte digestiu, s'ha pogut observar com va disminuint la concentració de l'hexafosfat d'inositol a compostos menors, encara que no s'observen fosfats d'inositol amb menys de quatre grups fosfats, i com, en general, hi ha un aprofitament molt elevat del fòsfor no fític obtingut a partir de la hidròlisi.

En general, la presència de fitasa microbiana en dietes deficientes de fòsfor ha mostrat un increment en la retenció de fòsfor i calci i, en conseqüència una disminució de la seva excreció, així com un augment en el creixement de l'animal, especialment en dietes que contenien morenc i en les d'ordi.

L'increment de la retenció de fòsfor per la fitasa microbiana, deguda al trencament de l'àcid fític, queda corroborada en els espectres de RMN. En aquest estudi, i mitjançant el RMN, hem pogut observar com la retenció de fòsfor no fític roman constant, essent la major retenció del fòsfor fític la que fa augmentar la del fòsfor total.

L'eliminació de la fitasa endògena no ha repercutit en el creixement dels animals o en la digestibilitat i retenció de nutrients pels pollastres d'engreix que menjaren dietes deficientes de fòsfor. Sembla que en el tub digestiu de l'animal és més eficaç la fitasa microbiana que no pas la fitasa vegetal, segons la poca activitat observada d'aquesta darrera.

En dietes riques en polisacàrids no amilacis i deficientes de fòsfor no s'han observat interaccions negatives entre l'acció de la fitasa i els enzims carbohidrasa. S'han observat interaccions positives relacionades amb la retenció i excreció de minerals en alguns casos, només observant-se una interacció negativa per l'índex de transformació de les dietes de moresc. Per tant, aquests dos tipus d'enzims poden combinar-se sense efectes en productivitat o la salut de l'animal.

The main objective of the present study is to evaluate the effects on nutritive value and bird performance of microbial phytase supplementation in different types of poultry diets, and its impact in the environment.

The aim of trial 1 was to evaluate and compare the effects of addition of microbial phytase on the improvement of performance, energy of diet and mineral retention in wheat- and corn-based diets. An additional objective was to define the optimum level of enzyme to be used in wheat-based diets. Treatments were based on two different cereals (corn or wheat), two concentrations of NPP (4.5 and 2.7 g NPP/kg of diet), and different levels of phytase on phosphorus deficient diets. In phosphorus deficient corn-based diets, inclusion of phytase increased final body weight, average daily feed consumption, and toe ash concentration, and also increased total phosphorus and calcium retention. In wheat diets, phytase supplementation to P-deficient diets increased toe ash concentration, and coefficient of apparent total phosphorus retention increased from 0.53 in P normal diets to 0.69-0.73 in P deficient diets, but not calcium retention. Phytase supplementation did not vary mineral excretion in any studied diet. Based on the higher  $R^2$  values, final body weight and toe ash value were the most sensitive indicators to assess P availability. Linear equations were used to calculate P equivalency values of phytase for non-phytate P. Using the average function of released P by microbial phytase derived at NPP level of 2.7 g/kg, 605 U of phytase could be equivalent to 1 g of P.

In trial 2, broilers were used to evaluate the effects of a microbial phytase on the improvement of performance, dietary energy and mineral retention, in barley diets with or without endogenous phytase. Treatments were based on two different concentrations of non-phytate P (4.5 g/kg and 2.7 g/kg), use of untreated or autoclaved barley, and addition or not of 500 U/kg feed of microbial phytase to the P-deficient diets. The reduction of NPP in broiler diets produced a decrease of daily feed intake and water consumption and a reduction of animal growth that was overcome by the inclusion of phytase enzyme in these feeds. Similar broiler performance was obtained feeding the animals with diets containing 4.5 g NPP/kg or with diets containing only 2.7 g NPP/kg plus 500 U

phytase enzyme/kg. The concentration of toe ash, a good indicator of phosphorus deposition, varied according to the dietary content of phosphorus and the presence or not of microbial phytase enzyme. Plasma concentrations of phosphorus and calcium were also influenced by dietary P concentrations and the presence or not of exogenous phytase. The inclusion of phytase enzyme to diets with a low concentration of NPP increased the coefficient of phosphorus retention and reduced the presence of this element in broiler excreta by up to 45%, thus indicating a favourable environmental effect. In general, no effects were observed due to the presence or not of endogenous barley phytase.

In trial 3, we studied the effects on phosphorus and other minerals bioavailability by addition of exogenous phytase in diets based on corn-soy bean plus wheat bran, according to the presence or not of endogenous phytase activity in wheat bran. Treatments varied in accordance with the wheat bran used (non treated or autoclaved), the concentration of wheat bran included in diet (0, 5 or 10%), and the amount of exogenous phytase (500 U per kilo of feed). Microbial phytase supplementation improved the productive parameters, although intestinal viscosity was not changed. Energetic values of diets increased with the addition of phytase, but no important variations in nutrient digestibility were found. Microbial phytase increased plasmatic concentration of phosphorus and bone mineralization, which is reflected in an augment in the concentration of total phosphorus in toe ash, even though apparent retention and excretion of this mineral were not modified. Elimination of endogenous phytase from the wheat bran present in phosphorus deficient corn-based diets implied a lesser food intake and bird performance, and, also, a decrease in the NPP in plasma. Nutrient digestibilities and mineral retentions were not changed by elimination of endogenous phytase.

The aim of trial 4 was to evaluate the animal performance and bioavailability of phosphorus and other minerals according to the presence or not of endogenous phytase activity from wheat. The effects of some levels of exogenous phytase higher than usual were also studied. Treatments differed in wheat used (non treated or autoclaved), concentration of non-phytate phosphorus (4.5

and 2.7 g of NPP/kg of feed) and the concentration of exogenous phytase (0, 500 and 5000 U/kg of feed). Exogenous phytase supplementation in phosphorus deficient wheat-based diets and high endogenous phytase activity produced improvements in broiler performance with no effect on mineral retention and excretion. On the other hand, elimination of endogenous phytase produced some slight reductions in growth without influence in mineral retention. Presence of wheat phytase produced a better broiler performance and a higher feed and mineral intake, with effect neither in diet energy nor in phosphorus apparent retention and excretion. Addition of a higher dose of phytase did not influence broiler performance, but the effects were present in diet energy and in a bigger plasmatic concentration of NPP.

The effects of microbial phytase and glycosidase enzymes, and their interactions, on energy values and nutrient digestibility in diets rich in non-starch polysaccharides (NSP) were studied in trial 5, designed as a three 2×2 factorial assays. Phytase was added or not to diets, with or without glycosidase enzymes (α-galactosidase, xylanase, or β-glucanase for corn-, wheat- and barley-based diets, respectively). Glycosidases decreased intestinal viscosity, whereas phytase increased this parameter in corn diets. Phytase increased AME in corn diets, whereas β-glucanase in barley diets improved AME and AMEn, and digestibility of dry matter, starch, β-glucans, and lipid. Xylanase in wheat diets improved dry matter and starch digestibilities. Phytase increased total phosphorus retention in all diets, and significant interactions between glycosidase enzymes and phytase were detected in wheat and barley diets. Phytase decreased phosphorus excretion in corn and barley diets, whereas α-galactosidase increased phosphorus excretion in corn diets. Calcium retention increased by phytase in corn diets and by β-glucanase in barley diets, and, consequently, calcium excretion decreased by phytase in corn-based diets and by β-glucanase in barley-based diets; xylanase inclusion decreased calcium retention in wheat diets. An interaction was detected between phytase and β-glucanase in barley diets, in which calcium excretion was reduced. In general, no negative interactions between phytase and glycosidase enzymes were found, indicating that both types of enzymes may be used together in feeds based on corn, wheat or barley.

The aim of the part six of the work was to confirm the determination of inositol phosphates by nuclear magnetic resonance (NMR) of phosphorus ( $P^{31}$ ). The analysed samples correspond to the feed and intestinal contents of the five previous trials, while in trial 2 contents of crop, gizzard, and cloaca were also studied, since one of the aim was to assess the evolution of inositol phosphates in four sections of the digestive system. The obtained results showed that NMR of  $P^{31}$  was a good method to determine inositol phosphates with a high number of phosphates groups. The inositol phosphates with a lesser phosphate groups were not determined due to their very low concentration in samples. With the study of the hydrolysis of inositol phosphate through digestive system, a decrease in the concentration of inositol hexaphosphate to lower components could be observed, although the compounds with less than four phosphates groups were no observed. In general, there is a bigger profit of non-phytate phosphorus as a result of the hydrolysis.

In general, microbial phytase added to phosphorus deficient diets showed an increment in retention of phosphorus and calcium, and, in consequence, a decrease in their excretion. An increment of animal performance has also observed, especially in diets with corn or barley.

The increment in phosphorus retention by microbial phytase, due to the release of phytic acid, is corroborated in the spectra of NMR. In this work, and by NMR, we could observe as non-phytate phosphorus keep on constant, being a higher phytate phosphorus retention that permits the increase of total phosphorus retention.

Elimination of endogenous phytase has not influenced animal performance or digestibility and retention of nutrients for broilers chickens that consumed phosphorus deficient diets. Microbial phytase seemed to be more efficient than vegetal phytase in digestive tract, according to the low activity observed in vegetal phytase.

No negative interactions between phytase and carbohydrase enzymes in phosphorus deficient and non-starch polysaccharides rich-diets have been observed. Positive interactions related to mineral retention and excretion were found in some cases, and only a negative interaction for feed to gain

ratio in corn diets was observed. So, this two class of enzymes could be combined with no effects on performance or health of birds.

**ÍNDEX DE CONTINGUTS**

<b>1. ESTAT DE LA QÜESTIÓ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1. Fòsfor .....	5
2.2. Calci .....	8
2.3. Fòsfor fític .....	9
2.3.1. Determinació de fòsfor fític .....	12
2.3.1.1. Cromatografia .....	12
2.3.1.2. Isotacoforèsi per capil laritat .....	14
2.3.1.3. Mètodes espectrefotomètrics .....	14
2.3.1.4. Espectroscòpia d'infraroig proper (NIRS) .....	15
2.3.1.5. Ressonància magnètica nuclear (RMN) .....	15
2.4 Fitasa .....	17
2.4.1. Fonts de fitasa .....	18
2.4.1.1. Fitases intestinals endògenes dels animals .....	18
2.4.1.2. Fitases endògenes contingudes en els ingredients de la dieta .....	18
2.4.1.3. Fitases d'origen microbià produïda per la flora digestiva .....	19
2.4.1.4. Fitases d'origen microbià de producció industrial .....	19
2.4.2. Classificació de les fitases .....	21
2.4.2.1. Histidina fitases o fosfatasa àcida histidina (HAP) .....	23
2.4.2.2. Fitases metalo-depenents .....	24
2.4.3. Producció i purificació de fitases .....	24
2.4.3.1. Fitases vegetals .....	24
2.4.3.2. Fitases de microorganismes .....	24
2.4.4. Mecanisme de reacció .....	25
2.4.5. Estabilitat tèrmica .....	28
2.4.6. Estudis de l'aplicació de fitasa en nutrició .....	29
2.4.6.1. Nutrició humana .....	29
2.4.6.2. Nutrició animal .....	31
2.4.6.2.1. Remugants .....	31
2.4.6.2.2. Pors .....	31
2.5 Cereals .....	44
2.5.1. Moresc .....	45
2.5.2. Blat .....	46
2.5.3. Ordi .....	46
2.6 Polisacàrids no amilacis (PNA) i enzims degradadors .....	50
2.6.1. $\beta$ -Glucans .....	52
2.6.2. Arabinxilans .....	53
2.6.3. $\alpha$ -Galactòsids .....	54
2.7 Utilització de la fitasa en la nutrició avícola .....	54
2.7.1. Efectes de la fitasa en els paràmetres productius .....	54
2.7.2. Efectes de la fitasa sobre la disponibilitat de proteïna i aminoàcids .....	55
2.7.3. Efectes de la fitasa sobre la disponibilitat de fòsfor .....	56
2.7.4. Efectes de la fitasa sobre la disponibilitat de minerals .....	57
2.8 Referències bibliogràfiques .....	70
<b>3. OBJECTIUS .....</b>	<b>91</b>

<b>4. EFECTES DE L'ADDICIÓ DE FITASA MICROBIANA EN EL CREIXEMENT DE BROILERS I BIODISPONIBILITAT I EXCRECIÓ MINERAL SEGONS EL TIPUS DE DIETA .....</b>	<b>97</b>
4.1. Introducció .....	99
4.2. Materials i mètodes .....	100
4.2.1. Maneig dels animals .....	100
4.2.2. Tractaments i disseny experimental .....	100
4.2.3. Fabricació del pinso i composició de les dietes .....	100
4.2.4. Anàlisis químiques .....	101
4.2.5. Paràmetres productius .....	101
4.2.6. Assaig de balanç .....	101
4.2.7. Estudis sobre la retenció de minerals .....	102
4.2.8. Càlculs .....	102
4.2.9. Anàlisi estadística .....	102
4.3. Resultats .....	103
4.3.1. Matèries primeres i pinsos .....	103
4.3.2. Paràmetres productius .....	103
4.3.3. Valors energètics i retenció mineral .....	104
4.4. Discussió .....	106
4.5. Referències bibliogràfiques .....	116
<b>5. EFECTE DE LA FITASA MICROBIANA EN BROILERS QUE MENJAREN DIETES D'ORDI EN PRESENCIA O NO DE FITASA ENDÒGENA .....</b>	<b>121</b>
5.1. Introducció .....	123
5.2. Materials i mètodes .....	124
5.2.1. Maneig dels animals .....	124
5.2.2. Tractaments i disseny experimental .....	124
5.2.3. Fabricació del pinso i composició nutricional de les dietes .....	124
5.2.4. Anàlisis químiques .....	125
5.2.5. Paràmetres productius .....	125
5.2.6. Prova de balanç .....	126
5.2.7. Estudis de retenció mineral .....	128
5.2.8. Cura dels animals .....	127
5.2.9. Càlculs .....	127
5.2.10. Anàlisi estadística .....	127
5.3. Resultats i discussió .....	128
5.3.1. Matèries primeres i pinsos .....	128
5.3.2. Paràmetres productius .....	128
5.3.3. Estudis de retenció mineral .....	130
5.4. Referències bibliogràfiques .....	140
<b>6. EFECTE DE L'ADDICIÓ DE FITASA MICROBIANA A DIETES BASEDES EN SUBPRODUCTES EN PRESENCIA O NO DE FITASA ENDÒGENA .....</b>	<b>145</b>
6.1. Introducció .....	147
6.2. Materials i mètodes .....	148
6.2.1. Maneig dels animals .....	148
6.2.2. Tractaments i disseny experimental .....	149
6.2.3. Fabricació del pinso i composició nutritiva de les dietes .....	149
6.2.4. Anàlisi química .....	149
6.2.5. Paràmetres productius i assaig de balanç .....	150

6.2.6. Estudis sobre la retenció de minerals .....	150
6.2.7. Cura dels animals .....	151
6.2.8. Càlculs .....	151
6.2.9. Anàlisi estadística .....	151
6.3. Resultats .....	152
6.3.1. Tractament del segó de blat .....	152
6.3.2. Paràmetres productius .....	152
6.3.3. Viscositat intestinal .....	153
6.3.4. Valors energètics i digestibilitat de nutrients .....	153
6.3.5. Efectes sobre la disponibilitat de minerals .....	154
6.4. Discussió .....	156
6.5. Referències bibliogràfiques .....	167
<b>7. EFECTE DE L'ADDICIÓ DE DIFERENTS NIVELLS DE FITASA MICROBIANA EN DIETES DE BLAT EN PRESENCIA O NO DE FITASA ENDÒGENA .....</b>	<b>173</b>
7.1. Introducció .....	175
7.2. Materials i mètodes .....	176
7.2.1. Maneig dels animals .....	176
7.2.2. Tractaments i disseny experimental .....	176
7.2.3. Fabricació del pinso i composició nutritiva de les dietes .....	177
7.2.4. Anàlisi química .....	177
7.2.5. Paràmetres productius i assaig de balanç .....	177
7.2.6. Estudis sobre la retenció de minerals .....	178
7.2.7. Cura dels animals .....	178
7.2.8. Càlculs .....	178
7.2.9. Anàlisi estadística .....	179
7.3. Resultats. ....	180
7.3.1. Paràmetres productius .....	180
7.3.2. Valors energètics .....	182
7.3.3. Efectes sobre la retenció de minerals .....	182
7.4. Discussió .....	185
7.5. Referències bibliogràfiques .....	197
<b>8. AVALUACIÓ DE LES POTENCIALS INTERACCIONS ENTRE L'ADDICIÓ DE FITASA I ENZIMS CARBOHIDRASA SOBRE LA DIGESTIBILITAT DE NUTRIENTS EN BROILERS .....</b>	<b>201</b>
8.1. Introducció .....	203
8.2. Materials i mètodes .....	204
8.2.1. Maneig dels animals .....	204
8.2.2. Tractaments i disseny experimental .....	204
8.2.3. Fabricació del pinso i composició nutricional de les dietes .....	204
8.2.4. Anàlisis químiques .....	205
8.2.5. Assaig de balanç .....	205
8.2.6. Càlculs .....	206
8.2.7. Anàlisi estadística .....	207
8.3. Resultats. ....	207
8.3.1. Paràmetres productius .....	207
8.3.2. Viscositat intestinal .....	208
8.3.3. Valors energètics .....	208
8.3.4. Digestibilitat de nutrients .....	208

8.3.5. Retenció de minerals .....	209
8.3.6. Avaluació de les interaccions entre enzims .....	210
8.4. Discussió .....	210
8.5. Referències bibliogràfiques .....	227
<b>9. DETERMINACIÓ DELS FOSFATS D'INOSITOL MITJANÇANT ESPECTROSCÒPIA DE RESONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR DE P<sup>31</sup>. RETENCIÓ DE FITAT EN EL TRACTE GASTROINTESTINAL DE BROILERS .....</b>	<b>233</b>
9.1. Introducció .....	235
9.2. Materials i mètodes .....	236
9.2.1. Materials .....	236
9.2.2. Preparació de les mostres .....	236
9.2.3. Anàlisi de les mostres .....	236
9.2.4. Origen de les mostres de pinsos i continguts intestinals .....	237
9.2.5. Càlculs .....	237
9.3. Resultats i discussió .....	238
9.4. Referències bibliogràfiques .....	255
<b>10. DISCUSSIÓ GENERAL .....</b>	<b>257</b>
<b>11. CONCLUSIONS .....</b>	<b>281</b>
<b>12. ANNEXES .....</b>	<b>287</b>
12.1 Determinació de fòsfor total .....	289
12.1.1. Introducció .....	289
12.1.2. Reactius i solucions .....	289
12.1.3. Procediment analític .....	289
12.1.4. Càlculs .....	290
12.1.5. Exactitud i precisió .....	290
12.1.6. Aspectes de seguretat i higiene .....	290
12.2 Determinació de l'activitat fitasa .....	291
12.2.1. Introducció .....	291
12.2.2. Reactius i solucions .....	291
12.2.3. Procediment analític .....	292
12.2.4. Càlculs .....	293
12.2.5. Exactitud i precisió .....	294
12.2.6. Aspectes de seguretat i higiene .....	294
12.2.7. Bibliografia .....	294

**LLISTA DE FIGURES****2. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA.**

<b>Figura 2.1.</b> Diagrama esquemàtic del metabolisme del fòsfor .....	<b>5</b>
<b>Figura 2.2.</b> Naturalesa del fòsfor contingut en les matèries primeres .....	<b>6</b>
<b>Figura 2.3.</b> Representació esquemàtica de l'àcid fític (A) i d'una sal amb diferents metalls quelats (B) .....	<b>10</b>
<b>Figura 2.4.</b> Representació de la hidròlisi de l'àcid fític per una 3-fitasa (fitasa microbiana) .....	<b>17</b>
<b>Figura 2.5.</b> Classificació de les fosfatases, presentant els dos grans grups de fitases: les histidina fitases i les fitases metalodependents .....	<b>22</b>
<b>Figura 2.6.</b> Representació esquemàtica de l'estructura amb els dos dominis de la fitasa <i>Aspergillus niger</i> .....	<b>23</b>
<b>Figura 2.7.</b> Esquema de la ruta de hidròlisi de fitasa .....	<b>26</b>
<b>Figura 2.8.</b> Ruta de degradació del fitat per fitasa de llegums .....	<b>27</b>
<b>Figura 2.9.</b> Ruta de desfosforilació de l'hexafosfat d'inositol per acció de la fitasa del segó de blat de <i>Triticum aestivum</i> L. cv Nourin #61 .....	<b>27</b>
<b>Figura 2.10.</b> Representació esquemàtica dels grans dels cereals emprats en la prova: 10.1) morenc (a, tall longitudinal; b, tall transversal), 10.2 blat (a, tall longitudinal; b, tall transversal) i 10.3 ordí .....	<b>48</b>
<b>Figura 2.11.</b> Classificació dels carbohidrats .....	<b>51</b>

**9. DETERMINACIÓ DELS FOSFATS D'INOSITOL MITJANÇANT ESPECTROSCÒPIA DE RESONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR DE P<sup>31</sup>. RETENCIÓ DE FITAT EN EL TRACTE GASTROINTESTINAL DE BROILERS.**

<b>Figura 9.1.</b> Espectres obtinguts en l'anàlisi per RMN de P <sup>31</sup> desacoblat de H <sup>1</sup> . a) pinso, b) contingut del tub digestiu .....	<b>239</b>
<b>Figura 9.2.</b> Representació de la concentració dels compostos fosfats en cada tram del tracte gastrointestinal avaluat dels animals emprats en l'assaig 2. a) P no fític, b) IP <sub>6</sub> , c) IP <sub>5</sub> , d) IP <sub>n</sub> (n<5), e) P total .....	<b>248</b>

**10. DISCUSSIÓ GENERAL.**

<b>Figura 10.1.</b> Gràfiques comparatives del pes mig final, energia metabolitzable aparent, percentatge de cendres dels dits i retenció aparent de fòsfor total entre els resultats obtinguts en l'assaig 2 i l'assaig 4 .....	<b>266</b>
--	------------

**LLISTA DE TAULES****2. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA.**

<b>Taula 2.1.</b> Percentatge de fòsfor total i de fòsfor fític, relació entre el fòsfor fític i el fòsfor total present, i activitat fitàsica en diferents matèries primeres vegetals .....	<b>7</b>
<b>Taula 2.2.</b> Concentració de fòsfor en diferents fosfats inorgànics d'origen mineral .....	<b>8</b>
<b>Taula 2.3.</b> Activitat fitàsica d'ingredients de la dieta .....	<b>20</b>
<b>Taula 2.4.</b> Llista de microorganismes productors de fitasa .....	<b>21</b>
<b>Taula 2.5a.</b> Efectes de l'addició de fitasa en dietes de porcs sobre els paràmetres productius .....	<b>32</b>
<b>Taula 2.5b.</b> Efectes de l'addició de fitases en dietes de porcs sobre la digestibilitat de nutrients ..	<b>35</b>
<b>Taula 2.5c.</b> Efectes de l'addició de fitasa en dietes de porcs sobre els paràmetres productius i els de digestibilitat de nutrients .....	<b>39</b>
<b>Taula 2.6.</b> Requeriments en la dieta de fòsfor no fític i relació Ca:P per varies classes de porcs ..	<b>44</b>
<b>Taula 2.7.</b> Nomenclatura i acció dels enzims degradadors de $\beta$ -glucans .....	<b>52</b>
<b>Taula 2.8a.</b> Efectes de l'addició de fitasa en dietes de pollastres .....	<b>60</b>
<b>Taula 2.8b.</b> Efectes de l'addició de fitasa en dietes de gallines .....	<b>66</b>
<b>Taula 2.8c.</b> Efectes de l'addició de fitasa en dietes de gall dindi i d'altres animals .....	<b>69</b>

**4. EFECTES DE L'ADDICIÓ DE FITASA MICROBIANA EN EL CREIXEMENT DE BROILERS I BIODISPONIBILITAT I EXCRECIÓ MINERAL SEGONS EL TIPUS DE DIETA.**

<b>Taula 4.1.</b> Tractaments experimentals avaluats .....	<b>111</b>
<b>Taula 4.2.</b> Composició de les dietes base experimentals .....	<b>112</b>
<b>Taula 4.3.</b> Activitat fitàsica trobada en les dietes experimentals .....	<b>112</b>
<b>Taula 4.4.</b> Paràmetres productius de broilers que menjaren les dietes experimentals .....	<b>113</b>
<b>Taula 4.5.</b> Energia metabolitzable aparent de les dietes experimentals .....	<b>114</b>
<b>Taula 4.6.</b> Concentracions de cendres dels dits i de minerals en l'excreta; retenció aparent de fòsfor total i calci de les dietes .....	<b>114</b>
<b>Taula 4.7.</b> Ingesta i excreció diària de minerals dels animals que menjaren les dietes experimentals .....	<b>115</b>
<b>Taula 4.8.</b> Equacions de resposta per pes final i cendres de dits de broilers que menjaren dietes de blat amb nivells creixents de fòsfor no fític i de fitasa afegida .....	<b>116</b>
<b>Taula 4.9.</b> Valors calculats d'equivalència de fòsfor per a dietes de blat .....	<b>116</b>

**5. EFECTE DE LA FITASA MICROBIANA EN BROILERS QUE MENJAREN DIETES D'ORDI EN PRESENCIA O NO DE FITASA ENDÒGENA.**

<b>Taula 5.1.</b> Tractaments experimentals .....	<b>132</b>
<b>Taula 5.2.</b> Composició de les dietes base .....	<b>133</b>
<b>Taula 5.3.</b> Efecte del procés d'autoclau (105°C) en les característiques de l'ordi .....	<b>134</b>
<b>Taula 5.4.</b> Activitat fitàsica determinada per anàlisi en les dietes experimentals.....	<b>134</b>
<b>Taula 5.5.</b> Paràmetres productius (7-21 dies) .....	<b>135</b>
<b>Taula 5.6.</b> Consum de pinso i aigua (14-17 dies), viscositat intestinal estudiada al final del període i percentatge de culs bruts (11 dies) .....	<b>136</b>
<b>Taula 5.7.</b> Energia metabolitzable aparent de les dietes experimentals .....	<b>137</b>
<b>Taula 5.8.</b> Composició mineral del plasma de broiler, concentració de matèria seca i de cendres dels dits, i pes de pàncreas expressat com a % de pes corporal .....	<b>138</b>
<b>Taula 5.9.</b> Retenció aparent i excreció de fòsfor total i de calci de les dietes experimentals .....	<b>139</b>

## **6. EFECTE DE L'ADDICIÓ DE FITASA MICROBIANA A DIETES BASADES EN SUBPRODUCTES EN PRESENCIA O NO DE FITASA ENDÒGENA.**

<b>Taula 6.1.</b> Tractaments experimental emprats .....	<b>162</b>
<b>Taula 6.2.</b> Activitat fitàsica trobada en les dietes experimentals .....	<b>162</b>
<b>Taula 6.3.</b> Composició de les dietes experimentals .....	<b>163</b>
<b>Taula 6.4.</b> Paràmetres productius 1-21 dies .....	<b>164</b>
<b>Taula 6.5.</b> Consum d'aigua i pinso entre els dies 15 i 19, i viscositat intestinal al final de la prova .....	<b>164</b>
<b>Taula 6.6.</b> Energia metabolitzable aparent de les dietes experimentals .....	<b>165</b>
<b>Taula 6.7.</b> Composició mineral del plasma, i composició dels dits dels animals .....	<b>166</b>
<b>Taula 6.8.</b> Retenció aparent, ingesta i excreció de fòsfor total de les dietes experimentals .....	<b>167</b>

## **7. EFECTE DE L'ADDICIÓ DE DIFERENTS NIVELLS DE FITASA MICROBIANA EN DIETES DE BLAT EN PRESENCIA O NO DE FITASA ENDÒGENA.**

<b>Taula 7.1.</b> Tractaments experimental emprats .....	<b>191</b>
<b>Taula 7.2.</b> Composició de les dietes experimentals .....	<b>192</b>
<b>Taula 7.3.</b> Activitat fitàsica trobada en les dietes experimentals .....	<b>193</b>
<b>Taula 7.4.</b> Paràmetres productius al final de la prova .....	<b>193</b>
<b>Taula 7.5.</b> Consum d'aigua i pinso entre els dies 15 i 19, i viscositat intestinal al final de la prova .....	<b>194</b>
<b>Taula 7.6.</b> Valors energètics de les dietes experimentals, i digestibilitat ileal de proteïnes .....	<b>194</b>
<b>Taula 7.7.</b> Composició mineral del plasma i composició dels dits dels animals .....	<b>195</b>
<b>Taula 7.8.</b> Excreció mineral i retenció aparent de fòsfor total i calci de les dietes experimentals .....	<b>196</b>
<b>Taula 7.9.</b> Ingesta mineral diària .....	<b>197</b>

## **8. AVALUACIÓ DE LES POSSIBLES INTERACCIONS ENTRE L'ADDICIÓ DE FITASA I ENZIMS CARBOHIDRASA SOBRE LA DIGESTIBILITAT DE NUTRIENTS EN BROILERS.**

<b>Taula 8.1.</b> Tractaments experimentals .....	<b>216</b>
<b>Taula 8.2.</b> Composició de les dietes base .....	<b>217</b>
<b>Taula 8.3.</b> Paràmetres productius dels broilers que menjaren dietes de moresc .....	<b>218</b>
<b>Taula 8.4.</b> Paràmetres productius dels broilers que menjaren dietes de blat .....	<b>219</b>
<b>Taula 8.5.</b> Paràmetres productius dels broilers que menjaren dietes d'ordi .....	<b>220</b>
<b>Taula 8.6.</b> EMA, EMAn, coeficients de digestibilitat de matèria seca, lípids i midó en broilers que menjaren dietes de moresc .....	<b>221</b>
<b>Taula 8.7.</b> EMA, EMAn, coeficients de digestibilitat de matèria seca, lípids i midó en broilers que menjaren dietes de blat .....	<b>222</b>
<b>Taula 8.8.</b> EMA, EMAn, coeficients de digestibilitat de matèria seca, lípids i midó en broilers que menjaren dietes d'ordi .....	<b>223</b>
<b>Taula 8.9.</b> Coeficients de retenció i excrecions de fòsfor total i calci en broilers que menjaren dietes de moresc .....	<b>224</b>
<b>Taula 8.10.</b> Coeficients de retenció i excrecions de fòsfor total i calci en broilers que menjaren dietes de blat .....	<b>225</b>
<b>Taula 8.11.</b> Coeficients de retenció i excrecions de fòsfor total i calci en broilers que menjaren dietes d'ordi .....	<b>226</b>

## **9. DETERMINACIÓ DELS FOSFATS D'INOSITOL MITJANÇANT ESPECTROSCÒPIA DE RESONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR DE P<sup>31</sup>. RETENCIÓ DE FITAT EN EL TRACTE GASTROINTESTINAL DE BROILERS.**

<b>Taula 9.1.</b> Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de P <sup>31</sup> en pinsos i continguts intestinals de l'Assaig 1 i recuperació de fòsfor total en els pinsos .....	<b>249</b>
---	------------

<b>Taula 9.2a.</b> Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de $P^{31}$ i recuperació de fòsfor total en els pinsos de l'Assaig 2 .....	<b>250</b>
<b>Taula 9.2b.</b> Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de $P^{31}$ en continguts de pap i pedrer de l'Assaig 2 .....	<b>250</b>
<b>Taula 9.2c.</b> Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de $P^{31}$ en continguts ileal i cloaca de l'Assaig 2 .....	<b>250</b>
<b>Taula 9.3.</b> Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de $P^{31}$ en pinsos i continguts intestinals de l'Assaig 3 i recuperació de fòsfor total en els pinsos .....	<b>251</b>
<b>Taula 9.4.</b> Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de $P^{31}$ en pinsos i continguts intestinals de l'Assaig 4 i recuperació de fòsfor total en els pinsos .....	<b>252</b>
<b>Taula 9.5.</b> Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de $P^{31}$ en pinsos i continguts intestinals de l'Assaig 5 i recuperació de fòsfor total en els pinsos .....	<b>253</b>
<b>Taula 9.6.</b> Retenció aparent ileal de fòsfor total, fòsfor no fític i $IP_6$ dels animals emprats en l'assaig 2 .....	<b>254</b>
<b>Taula 9.7.</b> Retenció aparent ileal de fòsfor total, fòsfor no fític i $IP_6$ dels animals emprats en l'assaig 3 .....	<b>254</b>
<b>Taula 9.8.</b> Retenció aparent ileal de fòsfor total, fòsfor no fític i $IP_6$ dels animals emprats en l'assaig 4 .....	<b>254</b>

**CLAU D'ABREVIATURES**

**AME:** apparent metabolizable energy

**AMEn:** nitrogen-corrected apparent metabolizable energy

**d:** dies

**EMA:** energia metabolitzable aparent

**EMAn:** energia metabolitzable aparent corregida per una retenció de nitrogen zero

**FNF:** fòsfor no fític

**IPn:** fosfats d'inositol ( $n \leq 6$ )

**mPa.s:** miliPascal per segon

**NMR:** nuclear magnetic resonance

**NPP:** non-phytate phosphorus

**NS:** no significatiu estadísticament

**NSP:** non-starch polysaccharides

**PNA:** polisacàrids no amilacis

**RMN:** ressonància magnètica nuclear

**SE:** suplementació enzimàtica

**U:** unitats

**vs:** versus

## **1. ESTAT DE LA QÜESTIÓ.**

En els darrers anys ha crescut en tot el món la preocupació per la contaminació del sòl en zones on es crien porcs i aviram de manera intensiva. Els estudis se centren en disminuir l'impacte que produeixen en el medi ambient l'excés de nitrogen i fòsfor en les dejeccions dels animals.

El fòsfor és un mineral essencial en els animals, ja que influeix en el cicle energètic, en la formació d'ossos i com a regulador de la ingesta. El fòsfor present en els vegetals (base alimentària de les aus) es troba en forma d'àcid fític o fitat, molt poc disponible pels animals monogàstrics, degut a la manca o baixa activitat fitàsica en el tracte digestiu. Per tal de satisfer les necessitats dels animals, i donada la poca disponibilitat del fòsfor dels vegetals, s'addiciona fòsfor no fític a les dietes, sovint en excés. Per altra banda, degut a la prohibició de farines de carn i d'os en la Unió Europea, l'aportació de fòsfor ha de realitzar-se només en base a minerals i al fòsfor present en els vegetals. L'excés de fòsfor és excretat en part al medi ambient, apareixent problemes mediambientals, com l'eutroficació.

Per tal de minimitzar els problemes deguts a l'addició del fòsfor no fític, en els darrers anys s'ha anat incorporant fitasa microbiana en el pinso, enzim que a més de disminuir la quantitat de fòsfor no fític a afegir, permet mantenir la productivitat en els animals i disminuir l'excreció de fòsfor. La fitasa pot ser utilitzada en l'àmbit europeu ja que ha obtingut l'autorització pertinent per part de la Unió Europea, després de l'avaluació positiva com additiu feta per l'SCAN (Scientific Committee of Animal Nutrition), un cop passada una demostració de la seva eficàcia, podent-se trobar tota la informació sobre la fitasa en la plana web del comitè ([http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/outcome\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/outcome_en.html)).

Des de començaments de la dècada dels noranta, s'han escrit una quantitat important d'articles que impliquen l'acció de l'enzim fitasa. Els estudis s'han realitzat bàsicament en porcs i en dietes de moresc-soja, les quals tenen una activitat fitàsica endògena baixa o nul·la, descrivint-se clarament que la fitasa incrementa la digestibilitat i la biodisponibilitat de fòsfor des del fitat, redueix la quantitat de fòsfor no fític necessari per mantenir al màxim el creixement i la mineralització dels

ossos, i redueix en gran manera l'excreció fecal de fòsfor. També s'han descrit increments en la digestibilitat de minerals bivalents com el calci i el zinc, que es troben lligats al fitat.

El treball realitzat en aquesta tesi s'ha centrat en pollastres d'engreix o broilers, ja que a l'inici d'aquests estudis, la major part de treballs s'havia realitzat en porcs. El nostre estudi s'ha realitzat amb dietes amb cereals europeus, com el blat, l'ordi o el sègol, que presenten una activitat fitàsica endògena més elevada, així com alguns altres factors antinutritius, com per exemple, els polisacàrids no amilacis, ja que la majoria d'investigacions se centraven en dietes de moresc-soja. És pràctica habitual l'aplicació d'enzims degradadors dels polisacàrids no amilacis en les dietes que en presenten. Per això, també s'ha realitzat un estudi de la importància de les possible interaccions entre els enzims degradadors dels polisacàrids i la fitasa tant en la productivitat com en la biodisponibilitat dels minerals.

## **2. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA**



## 2.1. Fòsfor

El fòsfor és un element imprescindible pel creixement dels animals, essent el mineral present en l'organisme animal del qual es coneixen més funcions. Aproximadament el 80% del fòsfor es troba en els ossos i les dents dels animals. La resta es distribueix en els teixits tous i fluids orgànics.

El fòsfor actua en el metabolisme energètic com a component de substàncies riques en energia com l'ADP, ATP i la fosfocreatina. Les reaccions metabòliques dels carbohidrats, proteïnes i lípids es realitzen a través de compostos intermedis fosforilats. Forma part dels fosfolípids, que són importants en el transport dels lípids i el seu metabolisme, i com a component de les membranes cel·lulars. El fosfat forma part del RNA i DNA, components cel·lulars vitals, essencials per a síntesi proteica, i també forma part de sistemes enzimàtics com la cocarboxilasa i el NAD. En la llet i el rovell de l'ou existeixen proteïnes que contenen fòsfor, com la caseïna i la vitelina (Bondi, 1988). El metabolisme general del fòsfor, així com d'altres minerals com el calci i el magnesi, es troba en la figura 2.1.

La sang completa conté entre 35 i 45 mg de fòsfor per ml en forma d'ortofosfat ( $\text{HPO}_4^{2-}$  i  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), la major part en les cèl·lules. Gran part del fòsfor del plasma està ionitzat, però una petita quantitat es troba formant complexos amb proteïnes, lípids i carbohidrats.

Figura 2.1. Diagrama esquemàtic del metabolisme del fòsfor. (Bondi, 1988)

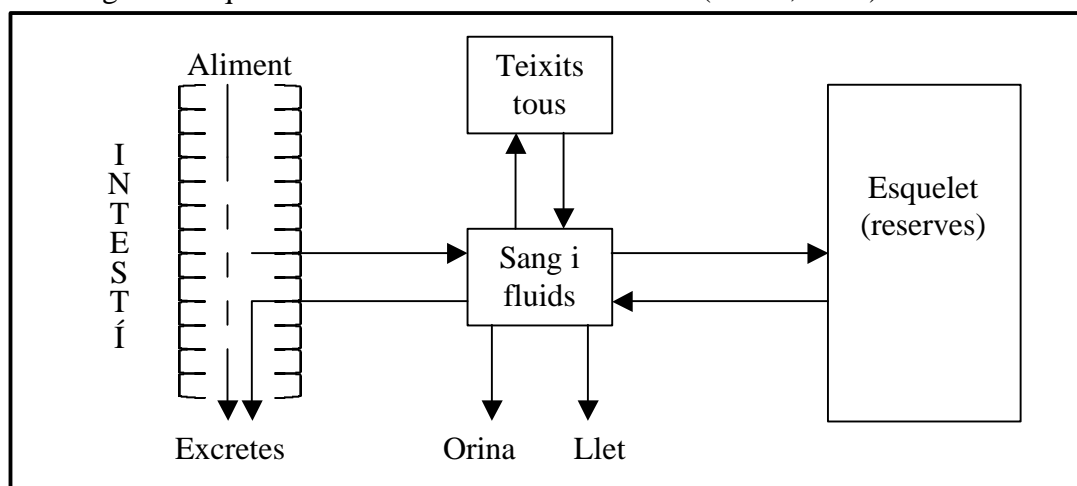
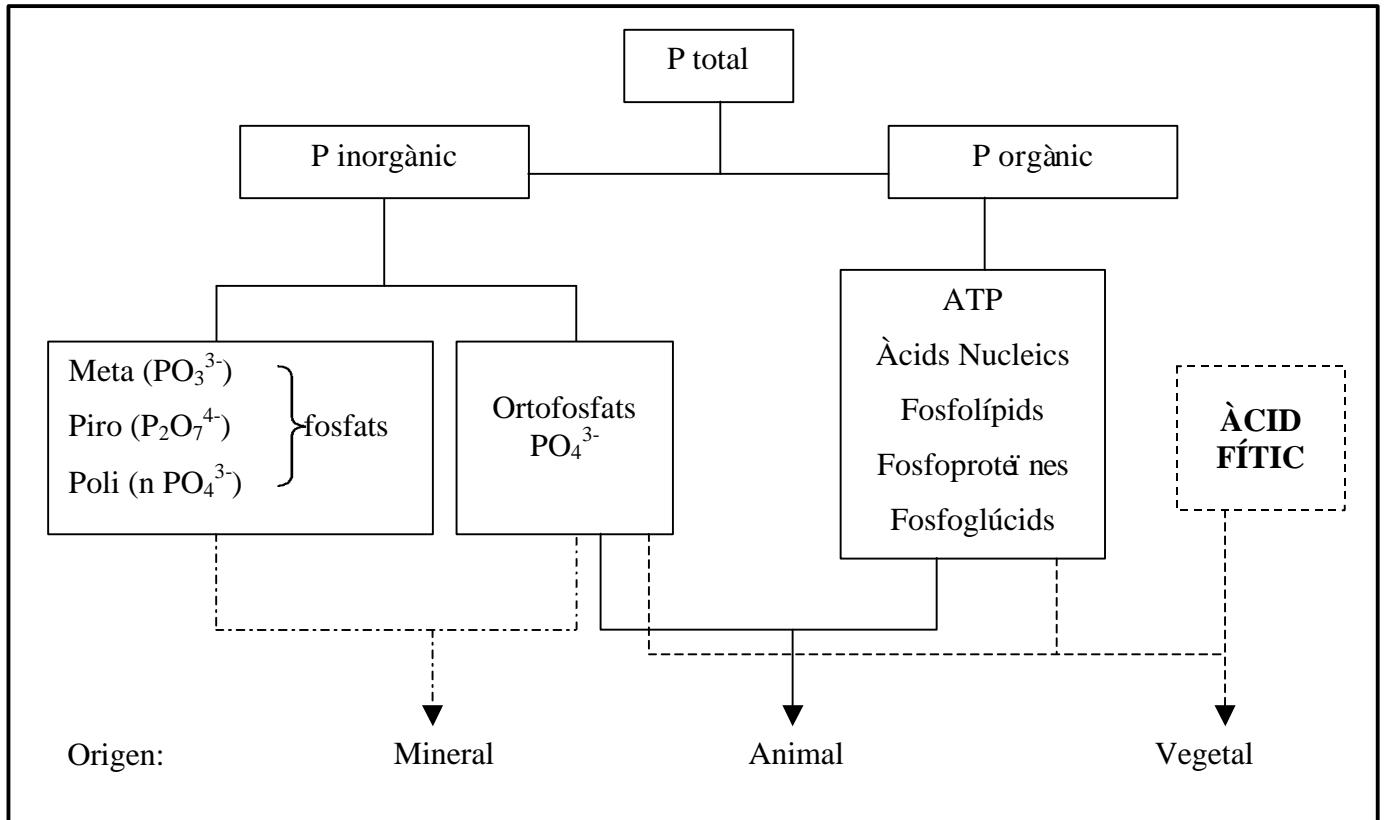


Figura 2.2. Naturalesa del fòsfor contingut en les matèries primeres. (Rebollar i Mateos, 2000)



Els símptomes més habituals de la deficiència de fòsfor inclou la disminució del consum de pinso, un creixement pobre, debilitat, morbilitat i deficiència en els ossos (Saxena, 1996).

Avui en dia, el fòsfor del pinsos d'aviram prové principalment dels fosfats inorgànics, però també de les fonts vegetals i de les farines de peix. En la figura 2.2 es presenta un esquema de la natura del fòsfor en les diferents matèries primeres. El contingut en fòsfor de les matèries primeres usades en alimentació animal presenta un ampli interval de variació. En general, les llavors (grans de cereals, lleguminoses i oleaginoses) tenen un contingut més elevat que els farratges. Els subproductes del processament de grans (segó de blat, gluten de morenc o farines d'oleaginoses) són especialment rics en fòsfor, mentre que tubercles, arrels i bulbs són els més pobres. Els productes làctics i les matèries primeres d'origen animal que inclouen part de l'esquelet són els aliments amb majors nivells de P.

En matèries primeres d'origen vegetal el contingut en fòsfor depèn del tipus de sòl, varietat cultivada, estat de maduració, condicions de cultiu, climatologia, etc. (Ravindran i col., 1995). En

els productes d'origen animal el nivell de fòsfor varia en funció del contingut dels ossos. El nivell en els suplementes minerals depèn de múltiples factors com són el material d'origen, procés de fabricació i el grau de hidratació.

Taula 2.1. Percentatge de fòsfor total i de fòsfor fític i relació entre el fòsfor fític i el fòsfor total present en diferents matèries primeres vegetals.

	% P total <sup>a</sup>		% P fític <sup>a</sup>		$\frac{\text{P fític}}{\text{P total}} \times 100$ <sup>a</sup>	
	Eeckhout i De Paepe (1994)	Kirby i Nelson (1988)	Eeckhout i De Paepe (1994)	Kirby i Nelson (1988)	Eeckhout i De Paepe (1994)	Kirby i Nelson (1988)
<b>Sègol</b>	0.36	-	0.22	-	61	-
<b>Triticale</b>	0.37 ± 0.02	-	0.25 ± 0.02	-	67 ± 3.7	-
<b>Blat</b>	0.33 ± 0.02	0.41 ± 0.001	0.22 ± 0.02	0.29 ± 0.004	67 ± 4.8	70.7
<b>Ordi</b>	0.37 ± 0.02	-	0.22 ± 0.01	-	60 ± 2.4	-
<b>Pèsols</b>	0.38 ± 0.02	-	0.17 ± 0.03	-	45 ± 6.2	-
<b>Segó de blat</b>	1.16 ± 0.14	1.24 ± 0.004	0.97 ± 0.20	0.88 ± 0.008	84 ± 7.3	71.5
<b>Segó i terceres de blat</b>	0.80 ± 0.25	-	0.53 ± 0.14	-	66 ± 6.9	-
<b>Segó d'arròs</b>	1.71	1.79 ± 0.004	1.10	1.54 ± 0.001	64	85.7
<b>Morenc</b>	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.005	0.19 ± 0.03	0.21 ± 0.010	68 ± 5.9	71.7
<b>Soja 48</b>	0.61 ± 0.01	-	0.32 ± 0.02	-	52 ± 3.7	-
<b>Soja</b>	0.57 ± 0.02	0.69 ± 0.013	0.26 ± 0.02	0.39 ± 0.019	46 ± 5.1	56.5
<b>Tramús</b>	0.25	0.53	0.05	0.29 ± 0.006	20	54.3

<sup>a</sup> valors de la mitjana més desviació estàndard.

En la Taula 2.1 es mostren valors de la concentració de fòsfor en diferents matèries primeres vegetals (Kirby i Nelson, 1988; Eeckhout i De Paepe, 1994), mentre que en la Taula 2.2 es mostren les concentracions i la disponibilitat de fòsfor present en diferents fonts inorgàniques d'origen mineral. Aquesta última depèn de la forma química dels diferents fosfats (per exemple, fosfat monocàlcic o bicàlcic) però també de les diferents tecnologies emprades en producció (CEFIC,

2002). La disponibilitat del fòsfor no fític d'origen vegetal (entre 25 i 50%, Sauveur, 1989) és més baixa que la que prové de fonts minerals (Taula 2.2), i per això, aquest últim tipus de fosfat és incorporat als pinsos, normalment en excés, doncs no perjudica la salut de l'animal. Precisament aquest excés de fòsfor no fític és excretat, provocant que augmenti la concentració en manera excessiva en el medi ambient.

Taula 2.2. Concentració de fòsfor en diferents fosfats inorgànics d'origen mineral (extreta de Cepero, 1992).

Fosfat	Fòsfor total (%)	Disponibilitat mitja
bicàlcic hidratat	17.5 - 19	100
bicàlcic anhidre	21	87
monocàlcic	21 - 24	110
monobicàlcic	20	112
tricàlcic	19.5	86
monosòdic	19.8 - 25	106
bisòdic	8.5 - 21	107
monopotàssic	22.6	112
bipotàssic	17.7	108
monoamònic	26.7	95
diamònic	23.2	117
defluorinat	18	93
tripolifosfat Na	24.7	101
Fosf. Ca-Mg-Na	17.3	106
Àcid fosfòric	24-28	112
<b>Fosfats de roca</b>		
defluorinat	18	70
roca tova	18	56
Illa Curaçao	14.3	87

## 2.2. Calci.

Un mineral molt íntimament lligat al fòsfor és el calci. Normalment, els dos minerals s'estudien conjuntament ja que van units tant en els aliments com en el metabolisme de l'organisme. El calci

és l'element mineral més abundant dins l'organisme animal. El 99% de la quantitat total es troba en els ossos i les dents. La resta es troba en els fluids i els teixits tous de l'organisme.

El calci apareix com un ió lliure, unit a les proteïnes del sèrum i formant complexos amb àcids orgànics i inorgànics. El calci ionitzat resulta essencial per a funcions com la conducció de corrents nervioses i el manteniment de la contracció i relaxació muscular, inclòs el múscle cardíac. Pot actuar com activador o estabilitzador d'alguns enzims i és precís per a la coagulació normal de la sang.

La principal font de calci és el carbonat càlcic ( $\text{CaCO}_3$ ). Altres fonts importants són les farines animals i els fosfats animals.

La forma hormonal de la vitamina D (1,25-dihidroxicolecalciferol) és la forma que regula el metabolisme del calci i del fòsfor. Quan la dieta és pobre en calci, se n'augmenta la producció, augmentant l'absorció i mobilització del fòsfor des dels ossos. La situació és a la inversa quan l'animal disposa de calci en excés en la dieta.

Els porcs i aus semblen ser tolerants a dietes amb quocients elevats de Ca:P. El quocient òptim per aquests animals varia entre 1:1 i 2:1, essent ben tolerats quocients inferiors a aquests i mal tolerats quocients superiors a 3:1 (Dieckmann i col., 2002).

La deficiència de calci en pollastres d'engreix té com a símptomes més habituals la disminució del consum de pinso, un creixement pobre, morbositat, deformitats dels ossos, augment de la velocitat metabòlica basal i una susceptibilitat augmentada a tenir hemorràgies internes (Saxena, 1996).

### **2.3. Fòsfor fític.**

Cereals i llegums contenen quantitats significatives de fòsfor en forma d'àcid fític (mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis dihidrogen fosfat). Aquest àcid té diverses funcions fisiològiques i també influeix significativament en les propietats funcionals i nutricionals de cereals i llegums, i dels seus pinsos derivats, per complexació de proteïnes i minerals essencials (Reddy i col., 1989). Els termes

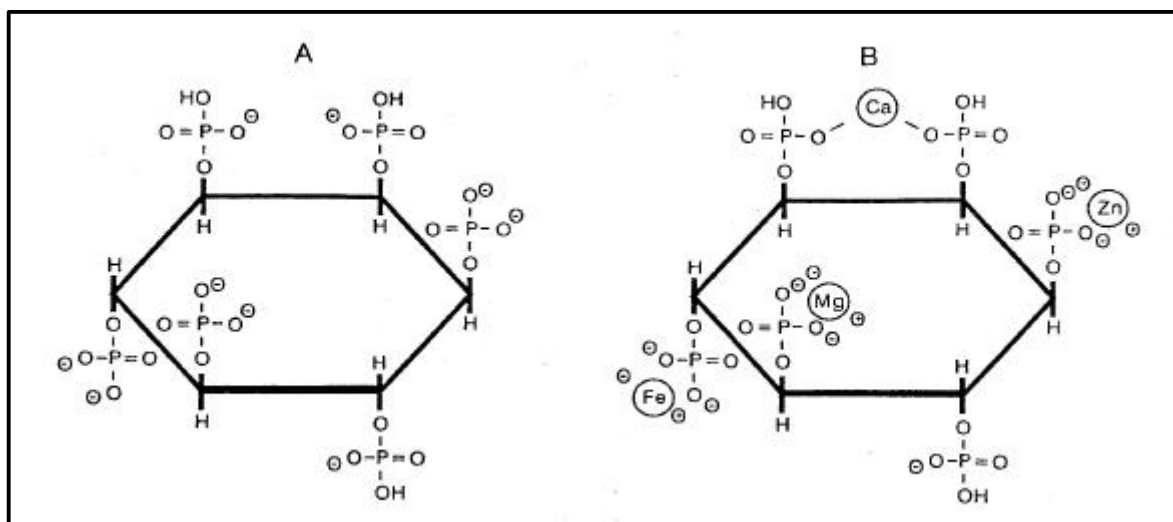
àcid fític, fitat i fitina es refereixen a l'àcid lliure, la sal i la sal de calci i magnesi, respectivament. Tot sovint, s'usa el nom d'àcid fític per a referir-se al fitat i a la inversa. També s'usa el nom d'àcid fític tant per la molècula de IP<sub>6</sub>, com pels compostos intermedis de la seva hidròlisi (des de IP<sub>5</sub> fins a IP<sub>1</sub>). En la figura 2.3, es pot observar una representació de la molècula d'àcid fític (A) i d'una sal (B).

La concentració de l'àcid fític en els pinsos depèn en gran manera de la part de la planta de la que deriven les matèries primeres; però també pot variar depenent de molts factors, com el grau de maduració, el grau de processament, la varietat, els factors climàtics, la disponibilitat d'aigua, factors del sòl, localització i l'any de collita (Ravindran i col., 1995).

En cereals, el fitat no està uniformement distribuït dins el gra, i està associat amb components morfològics de la llavor. En l'endosperma del gra de blat i d'arròs no hi ha una gran presència de fitat, però es troba concentrat en les capes del germen i l'aleurona de les cèl·lules de la llavor. L'endosperma del moresc té petites quantitats de fitat. En llegums, el fitat està distribuït per tot el cotiledó i localitzat dins les inclusions subcel·lulars dels cossos proteics.

En la Taula 2.1 es mostren valors del contingut de fòsfor fític de diferents matèries primeres emprades en la pràctica habitual de la fabricació de pinsos. El percentatge de fòsfor fític sobre el fòsfor total presenta un ampli rang de variació, amb valors entre el 60 i el 80% pels cereals i els seus subproductes, i d'entre el 30 i el 70% per la resta d'ingredients habituals.

Figura 2.3. Representació esquemàtica de l'àcid fític (A) i d'una sal amb diferents metalls quelats (B). (Schinkell, 1999)



L'àcid fític és un component essencial de totes les llavors, on constitueix una reserva de fòsfor i altres minerals durant la germinació (Wodzinski i Ullah, 1996). L'àcid fític té moltes aplicacions. Graf (1986) presenta en una revisió al voltant de 59 aplicacions diferents, com la prevenció de càries dental o un ús com a agent hipocolesteròmic. La principal característica d'aquestes aplicacions va lligat amb la capacitat de quelar metalls, interaccionar electrostàticament amb proteïnes o la seva gran afinitat per la hidroxiapatita, especialment per la de calci  $[Ca_5(PO_4)_3(OH)]$ , (component que dóna rigidesa a l'os i dents, ja que suposa més d'un 70% de la massa òssia i de la dent).

Degut a la gran capacitat per quelar, l'àcid fític forma sals insolubles a pH neutre amb nombrosos cations di- i trivalents (Ca, Mg, Zn, Cu, Co, Fe, Mn) (Sauveur, 1989), dificultant la seva absorció a nivell intestinal. És degut a això que se'l considera un antinutrient en alimentació, com descriuen alguns autors, per exemple Graf i col. (1987).

L'àcid fític també pot formar complexos insolubles amb proteïnes i midó (Ravindran i col., 1999b).

La interacció de l'àcid i les proteïnes és de tipus iònic i depenent del pH:

- a pH baix, s'uneix amb els residus bàsics (grup amino) de la lisina, arginina i histidina.
- a pH neutres, se solubilitzen els complexos anteriors i s'uneix amb el grup carboxil, amb cations multivalents com a intermediaris.

Els complexos formats canvien l'estructura de les proteïnes reduint la seva digestibilitat, la seva solubilitat i la seva funcionalitat.

Els fitats continguts en les diverses matèries primeres presenten característiques diferencials que influeixen en la seva hidròlisi i en la següent alliberació de fòsfor. En els grans, l'àcid fític està present en forma de fitina, i sobre tot, de fitats mixtes de K, Mg i Ca. Altres cations, com Fe, Zn, Cu, també estan presents però en menor quantitat. La solubilitat de les sals formades amb els cations bivalents segueix el següent ordre decreixent:  $Cu^{2+} > Zn^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{2+} > Ca^{2+}$  (Sauveur, 1989). Els oligoelements estan fixats més fortament a l'àcid fític que els alcalino-terris i aquests, a la seva vegada, són més insolubles que els fitats de cations monovalents ( $K^+$  i  $Na^+$ ).

El fòsfor contingut en els fitats és molt poc disponible per a les aus i els porcs degut a la manca en l'organisme de l'enzim necessari, com a mínim en una quantitat suficient, per a hidrolitzar i separar el fòsfor de la molècula de inositol. En situacions normals, la major part del fòsfor fític apareix en les excretes incrementant el problema de contaminació ambiental. La hidròlisi del fitat es pot dur a terme mitjançant l'acció de les fitases, ja sigui endògenes o exògenes, millorant l'absorció i retenció, en proporcions variables, del fòsfor, calci, magnesi, zinc, coure, ferro i aminoàcids, especialment en dietes eficients (Rebollar i Mateos, 2000).

### ***2.3.1. Determinació de fòsfor fític.***

Com a conseqüència de la hidròlisi de l'àcid fític per via enzimàtica, s'obtenen els compostos intermedis, des de l'IP<sub>5</sub> fins a l'IP<sub>1</sub>. La majoria dels mètodes de determinació segueixen unes pautes similars: extracció, purificació, i mesura de les relacions estaquiomètriques amb ió fèrric o del fosfat que forma part del fític.

Existeixen varis mètodes analítics que permeten analitzar el contingut de cada un d'aquests compostos intermedis, ja sigui de manera qualitativa o quantitativa. Entre els qualitius podem trobar cromatografia de paper (Bandursky i Axelrod, 1951), electroforèsi, cromatografia de capa fina (Hatzack i Rasmussen, 1999) o cromatografia de bescanvi iònic.

Els mètodes quantitius més emprats són mitjançant cromatografia, espectrofotometria o ressonància magnètica nuclear.

#### ***2.3.1.1. Cromatografia.***

Encara que es pot utilitzar de manera qualitativa, aquesta tècnica és usada àmpliament per a determinar la quantitat dels diferents fosfats d'inositol, especialment dels més elevats.

D'entre els diferents tipus de cromatografia, la HPLC (cromatografia líquida a pressions elevades), és la més utilitzada per a determinar els fosfats d'inositol, donada la seva rapidesa i reproduïbilitat.

Uns dels primers autors en descriure aquesta metodologia van ser Sandberg i Ahderinne (1986). El mètode inclou una extracció amb HCl, separació dels fosfats d'inositol de l'extracte de la mostra per cromatografia de bescanvi iònic, i l'anàlisi per HPLC de fase reversa amb àcid fòrmic/metanol i

hidròxid de tetrabutilamoni com a fase mòbil. En aquesta metodologia, els autors van ser capaços de descriure els inositol amb 3-6 fosfats.

Altres autors han utilitzat aquesta tècnica, encara que realitzant alguna modificació (Sooncharernying i Edwards, 1993; Lehrfeld, 1994; Brearley i Hanke, 1996), per tal de quantificar els fosfats de inositol en mostres de matèries primeres, pinsos, continguts intestinals o excretes. Rounds i Nielsen (1993) van descriure també un mètode de cromatografia de bescanvi iònic i detecció VIS-UV post-columna per separar els fosfats d'inositol. Aquest mètode es basa en la reacció de l'àcid fític amb una solució de clorur de ferro (III) en excés, i lectura del ferro no reaccionat amb àcid sulfosalicilic, llegint-se a 500 nm la disminució de l'absorbència. En aquesta tècnica, la quantitat dels fosfats d'inositol amb un menor nombre de fòsfors són difícils de determinar (di-, monofosfats), ja que són espècies amb poca presència i a més no es retenen en la columna, i per tant, donen poca resolució en el cromatograma (Rounds i Nielsen, 1993). Altres autors, com Phillippy i Johnston, (1985), Phillippy i col. (1987), Simons i col. (1990) i Bos i col. (1991) van emprar també la cromatografia de bescanvi iònic. Bos i col. (1991) determinaren mitjançant cromatografia de bescanvi iònic l'àcid fític, detectant-se colorimètricament a 300 nm després de la reacció amb una sal fèrrica en un derivatització post-columna. Phillippy i col. (1987) i Simons i col. (1990) varen utilitzar la cromatografia de bescanvi iònic acoblada a un espectròmetre de masses per a determinar els diferents fosfats d'inositol, i alguns dels seus isòmers. Tanmateix, amb aquest mètode no obtingueren una bona separació dels fosfats d'inositol amb baix nombre de fòsfors (IP<sub>2</sub>, IP, FNF).

La separació i quantificació d'aquests tipus de fosfats ha estat descrita per Skoglund i col. (1997, 1998) i Carlsson i col. (2001), utilitzant la cromatografia iònica (HPIC). Skoglund i col (1997) descriuen la total separació de tots els fosfats d'inositol combinant dos sistemes de HPIC. Gràcies aquest mètode, es pogueren determinar pel primer sistema les fraccions des de IP<sub>2</sub> fins a la IP<sub>6</sub> i els isòmers de IP<sub>4</sub> i IP<sub>5</sub> de mostres de pinsos, continguts ileals i excretes en estudis de balanços en humans. En el segon sistema es va usar per determinar isòmers de IP<sub>1</sub> – IP<sub>3</sub>. La determinació dels

isòmers dels diferents fosfats, productes del trencament de la molècula de l'hexafosfat també va ser realitzada per Brearley i Hanke (1996).

### *2.3.1.2. Isotacoforèsi per capil laritat.*

Mètode utilitzat per autors com Blatny i col. (1995) i Duskova i col. (2000). El mètode consisteix en una electroforesi a velocitat uniforme. Això vol dir que el temps de recorregut en el capil lar sota condicions isotacoforètiques és independent de la velocitat. Podem dir, per tant, que es tracta d'una tècnica de separació per desplaçament. El capil lar s'ha d'omplir amb un electròlit guia en un extrem. Aquest ha de tenir una gran mobilitat, i ha de ser major que la dels components a separar. Llavors s'introdueix la mostra seguit de l'electròlit de cua, amb una mobilitat la qual ha de ser menor de qualsevol dels components de la mostra. A la sortida del capil lar, la mostra s'analitza per conductivitat. En el mètode descrit per Duskova i col. (2000) l'electròlit guia consisteix en una solució formada per HCl, 1,3-bis[tris(hidroxilmetil)metilamin]propà (BTP) i hidroxipropilmetil cel lulosa (HPMC), mentre que el de cua està format per àcid 2-(N-morfolin)etanosulfònic monohidratat (MES), usant-se un temps de separació entre 25 i 35 minuts.

### *2.3.1.3. Mètodes espectrofotomètrics.*

El més emprat és el descrit per Haug i Lantzsch (1983). S'ha vist que és una determinació que dona molt bon resultat per a matèries primeres o pels pinsos. El procediment descrit comença per una extracció amb HCl, addició d'una solució fèrrica a l'extracte obtingut, i escalfament dins d'un tub en un bany amb aigua bullint. Després de refredar, la solució es centrifuga, s'afegeix una solució de 2,2'-bipiridina, i finalment es mesura l'absorbància a 519 nm enfront d'aigua destil lada. L'àcid fític es precipita amb una solució àcida de ferro (III) amb un contingut conegut de ferro. El ferro no precipitat reacciona amb la bipiridina, donant una coloració vermella. La disminució de ferro en el sobrenadant és proporcional al contingut de l'àcid fític.

També van utilitzar aquesta tècnica Brooks i col. (2001), on descriuen una manera de quantificar de manera acurada i ràpida el contingut de fòsfor total i lliure d'una preparació d'àcid fític disponible comercialment, i que pot ser usat com a estàndard per determinacions de l'àcid fític en pinsos.

#### 2.3.1.4. Espectroscòpia d'infraroig proper (NIRS).

Mitjançant aquesta tècnica es mesura l'excitació vibracional dels àtoms al voltant dels enllaços que els connecten. La molècula absorbeix llum i experimenta una excitació vibracional en la regió de l'infraroig de l'espectre electromagnètic (Vollhardt, 1987). Parrish i col. (1990) descriuen la metodologia per determinar l'àcid fític en llavors de cotó. El principal avantatge d'aquesta tècnica és que s'obvia la necessitat de realitzar la fase d'extracció que comporta varies hores i que es requereix en tots els altres mètodes. A més, s'escurça el temps d'anàlisi (Smith i col., 2001). La mostra es posa directament en el posamostres, i es registren les dades espectrals a longituds d'ona que van des de 1100 fins a 2500 nm. Klepacka (1990) trobà que, en llavors de colza, una de les bandes importants per determinar el fitat és la corresponent a l'enllaç P = O a  $1090\text{ cm}^{-1}$ . De Boever i col. (1994) van analitzar cent trenta-vuit mostres, corresponents a dinou matèries primeres vegetals, i van trobar que els valors estan molt correlacionats per la determinació de fòsfor total i fític amb errors de predicció de 0.08% i 0.04%, respectivament. Smith i col. (2001) descriuen que el NIRS pot ser usat per determinar el contingut de l'excreta, entre ells el contingut de fòsfor total i fòsfor fític.

Però no cal obviar que per tal de calibrar l'espectròmetre NIR, primerament s'han de realitzar les anàlisi dels valors dels diferents paràmetres en via humida, utilitzant algunes de les altres tècniques descrites en aquest capítol.

#### 2.3.1.5. Ressonància magnètica nuclear (RMN).

Aquesta tècnica, molt emprada en química orgànica, serveix per determinar el nombre, la naturalesa i l'entorn que envolta els àtoms d'una molècula. A partir d'aquesta informació es pot deduir sovint l'estructura de l'esquelet molecular. La ressonància es pot aplicar a bastants àtoms, com l'hidrogen ( $^1\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ), carboni ( $^{13}\text{C}$ ), nitrogen ( $^{15}\text{N}$ ), fluor ( $^{19}\text{F}$ ) i fòsfor ( $^{31}\text{P}$ ). Tots aquests àtoms tenen un nombre atòmic senar, i per tant tenen spin, això és, moment angular.

En absència de qualsevol camp magnètic, aquest moment pot estar apuntant a qualsevol direcció; però quan la mostra es sotmesa a un camp magnètic, els moments poden alinear-se tant en el mateix

sentit del camp (estat energètic més baix) o en contra del camp (estat energètic més alt). Els estats energètics més alts estan menys poblats que els més baixos, i els nuclis poden ser promoguts des del menor al major estat per l'aplicació de l'energia de la radiofreqüència. És l'absorció d'aquesta energia la que es mesura i es reflecteix en els espectres de RMN (Cooper, 1980).

Gràcies a aquesta tècnica es pot tenir una bona informació de tots els fosfats d'inositol i de l'ortofosfat presents en mostres de matèries primeres, pinsos, continguts ileals i excretes de porcs i aviram.

La mostra, igual que altres tècniques comentades anteriorment, es prepara mitjançant una extracció àcida, centrifugació, escalfament a 100°C, i una segona centrifugació. Al sobrenadant se li afegeix EDTA, ajustant després el pH a 6.0 amb NaOH. La solució es liofilitza, es redissol amb aigua, s'ajusta de nou amb NaOH a 12.6 de pH i es torna a liofilitar, tenint la mostra preparada per a realitzar el RMN de  $^{31}\text{P}$  (Kempe i col., 1999a).

Bona part de les publicacions de l'ús de fosfats d'inositol empen metodologies similars a la descrita per preparar la mostra. Les diferències entre elles radiquen en el patró usat per tal de quantificar l'espectre obtingut, i els desplaçaments químics obtinguts en cada cas. Per exemple, Kempe i col. (1999a) utilitzaren l'àcid 2-aminoetilfosfònic.

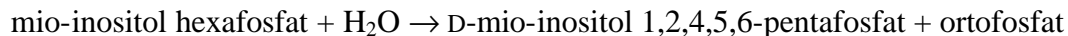
Els fosfats d'inositol es poden calcular a partir d'analitzar diferents àtoms. Així alguns autors, com Cerdan i col. (1986), Barrientos i col. (1994), Johnson i col. (1995), Hull i col. (1999), Nakano i col. (2000), Hatzack i col. (2001), realitzaren espectres de RMN de protó ( $^1\text{H}$ ). O'Neill i col. (1980), Cerdan i col. (1986), Barrientos i col. (1994), Jayarajah i col. (1997), Kempe i col. (1999a) utilitzaren espectres de RMN de  $^{31}\text{P}$ . Finalment, alguns autors utilitzaren espectres de dos dimensions amb una espectroscòpia múltiple de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  o  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  (Barrientos i col., 1994; Johnston i col., 1995; Nakano i col. 2000).

## 2.4. Fitasa

L'enzim fitasa presenta una activitat esterasa que li permet hidrolitzar el mio-inositol hexafosfat a ortofosfat inorgànic i a una sèrie d'èsters fosfònics del mio-inositol més baixos i, en alguns casos, al mio-inositol lliure (Reddy i col., 1989). Hi ha dos tipus de fitases tal com està classificat pel Nomenclature Committee de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) en consulta amb la IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, tal com descriuen Vohra i Satyanarayana (2003):

- EC 3.1.3.8.** Nom recomanat: 3-fitasa. Nom sistemàtic: mio-inositol-hexafosfat 3-fosfohidrolasa. Altres noms: fitasa; 3-fitat fosfatasa.
- EC 3.1.3.26.** Nom recomanat: 6-fitasa. Nom sistemàtic: mio-inositol-hexafosfat 6-fosfohidrolasa. Altres noms: fitasa; 6-fitat fosfatasa.

La 3-fitasa catalitza la reacció d'hidròlisis atacant primer el fitat en la posició 3, essent típica de microorganismes:



mentre que la 6-fitasa primer actua en la posició 6, i és típica de cereals:

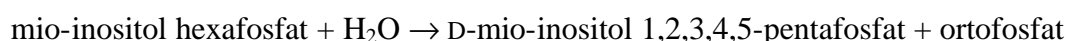
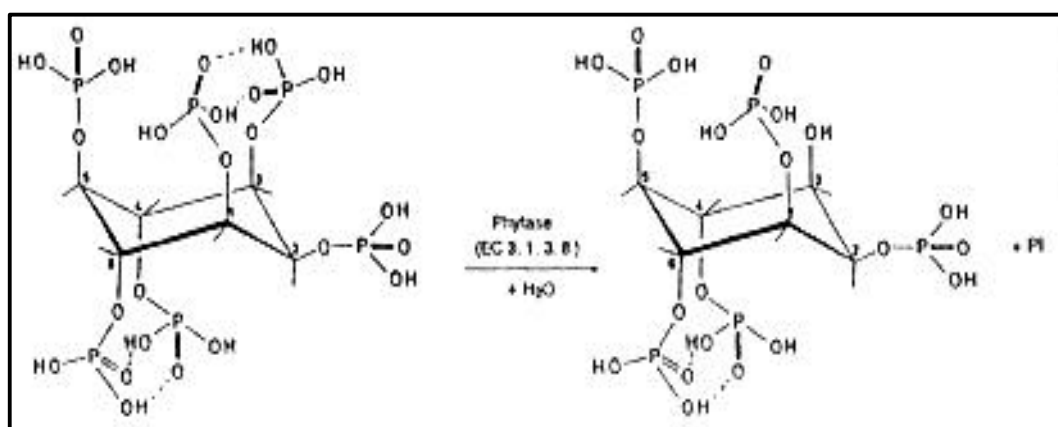


Figura 2.4. Representació de la hidròlisi de l'àcid fític per una 3-fitasa (fitasa microbiana) (Riond, 2003)



En la figura 2.4 es pot trobar una representació de la hidròlisi de l'àcid fític per una 3-fitasa (fitasa microbiana). Les fitases estan present de manera natural en nombrosos cultius de bacteris i fongs, així com en certs grans. També estan presents en el tracte intestinal de tots els animals degut tant per la ingestió de plantes que el contenen, com per la pròpia microflora intestinal o per la producció enzimàtica endògena per la mucosa o òrgans secretors del digestiu (Sebastian i col, 1998).

#### **2.4.1. Fonts de fitasa**

En la natura es coneixen les següents fonts de fitasa, segons classificació de Rebollar i Mateos (2000):

##### *2.4.1.1. Fitases intestinals endògenes dels animals.*

L'activitat fitàsica de la mucosa intestinal és molt reduïda encara que demostrable experimentalment. Almenys en el porc, les fosfatases intestinals endògenes només són capaces d'hidrolitzar les molècules d'intermediaris de fosfat d'inositol amb escàs nombre d'ions ortofosfats ( $IP_3$  a  $IP_1$ ) donant lloc a inositol lliure (Kemme, 1998). El contingut digestiu de l'estómac i intestí del porc (Yi i Kornegay, 1996) i del pap, estómac i intestí de les aus tenen escassa activitat fitàsica pròpia.

##### *2.4.1.2. Fitases endògenes contingudes en els ingredients de la dieta.*

Existeix un cert nombre de llavors amb activitat fitàsica pròpia, particularment dins el grup dels cereals, però no és possible establir una correlació significativa entre el contingut en P fític del gra i la seva activitat fitàsica (Eeckhout i De Paepe, 1994). Si es calculés la quantitat necessària d'enzim per hidrolitzar tot el contingut de fòsfor fític en una dieta comercial i se'l comparés amb la quantitat present de manera natural en plantes, s'observaria que l'enzim a afegir hauria de ser el 40% de la dieta per tal d'hidrolitzar tot el fòsfor fític (Wodzinski i Ullah, 1996). En el cas del blat, sègol i triticale la seva activitat fitàsica és important, essent baixa en la resta de grans utilitzats en la pràctica habitual. L'activitat fitàsica és molt reduïda en farines proteiques (soja, colza, cotó) i lleguminoses en gra (Sauveur, 1989; Ravindran i col., 1995). En qualsevol cas, el contingut varia en funció de la varietat i dels factors ambientals. La concentració de fitasa en les plantes augmenta

durant el procés de germinació (Wodzinski i Ullah, 1996). Els subproductes de la indústria farinera, en especial els procedents del blat, són rics en activitat fitàsica.

El pH òptim d'aquest tipus de fitasa va des de 4.0 fins a 7.5; la majoria dels enzims tenen un pH òptim entre 5.0 i 5.6, tenint una temperatura òptima de 45 i 60° C, degradant-se a temperatures superiors (Reddy i col., 1989).

#### 2.4.1.3. *Fitases d'origen microbià produïda per la flora digestiva.*

Nombrosos fongs i microorganismes presents en el tracte intestinal produeixen 3-fitasa. Els remugants i parcialment els animals copròfags, poden beneficiar-se d'aquesta activitat fitàsica. No obstant, en la majoria de les espècies monogàstriques, com aus i porcs, l'activitat de la flora intestinal té lloc en l'intestí gros. D'aquí que l'animal no se'n pugui beneficiar, encara que les fitases microbianes hidrolitzen els fitats i alliberin el fòsfor no fític, ja que aquest fòsfor s'excretarà totalment en les excretes (Kemme, 1998).

#### 2.4.1.4. *Fitases d'origen microbià de producció industrial.*

Fongs i bacteris són capaços de produir fitases en condicions naturals o de laboratori. Les fitases bacterianes (a excepció de *Bacillus subtilis*) són de tipus intracel·lular i, en general, no tenen un bon comportament quant a productivitat en condicions de laboratori. Les fitases bacterianes tenen un pH òptim entre neutre i alcalí, cosa que l'exclou per a ús com a additiu en pinsos.

Les fitases d'origen fúngic són produïdes per nombroses espècies. La majoria produeixen enzims extracel·lulars, essent el gènere *Aspergillus* el més emprat en l'actualitat, havent-se identificat a l'*Aspergillus niger* com el productor de la fitasa més activa procedent de fongs. El pH òptim d'aquest tipus de fitases es troba entre 2.5 i 7.5, mentre que el rang de temperatura òptima és entre 35 i 63°C (Wodzinski i Ullah, 1996). L'*Aspergillus niger* (NRRL 3135) produeix dos tipus de fitasa, una amb el pH òptim a 5.5 i 2.5 i l'altra amb el pH òptim a 2.0; aquests enzims s'han anomenat fitasa A i fitasa B, respectivament.

En la Taula 2.3 es mostren valors d'activitat fitàsica d'ingredient per a pinsos (Eeckhout i De Paepe, 1994). L'activitat fitàsica de les matèries primeres es pot determinar mitjançant varis procediments,

essent un dels més emprats el mètode colorimètric, descrit per Engelen i col. (1994, 2001). El mètode es basa en la determinació del fosfat no fític alliberat en la hidròlisi del fitat sòdic a pH 5.5 i 37° C.

En la Taula 2.4 es presenta una llista amb microorganismes productors de fitases (Vohra i Satyanarayana, 2003).

Taula 2.3. Activitat fitàsica d'ingredients de la dieta.

	<b>Fitasa<sup>a</sup></b> (Unitats kg <sup>-1</sup> )	<b>Fitasa<sup>b</sup></b> (Unitats kg <sup>-1</sup> )
<b>Llavors</b>		
Sègol	5130	5147 ± 649
Triticale	1688 ± 227	-
Blat	1193 ± 223	1637 ± 275
Ordi	582 ± 178	1016 ± 330
Pèsols	116 ± 54	86 ± 1
<b>Subproductes</b>		
Segó blat fi	4601 ± 860	-
Segó i tercers de blat	4381 ± 956	-
Segó blat	2957 ± 1556	4624 ± 4
Segó arròs	122	-
<b>Cereals</b>		
Moresc	15 ± 18	70 ± 5
Civada	42 ± 50	84 ± 39
Sorgo	24 ± 32	-
<b>Farines d'olis</b>		
Cacauet	3	-
Coco	24 ± 37	-
Llinassa	41	295 ± 4.6
Llavor de colza	16 ± 16	41 ± 2.5
Gira-sol	62 ± 53	73 ± 2
Soja 44	40 ± 45	-
Soja 48	8 ± 8	-
<b>Llegums</b>		
Soja	55 ± 89	32 ± 2.5
Tramús	0	219 ± 22
<b>Arrels i tubèrculs</b>		
Polpa de remolatxa	3 ± 4	20 ± 1
Patata	0	-
Midó de patata	0	-

<sup>a</sup> dades procedents d'Eeckhout i De Paepe (1994).

<sup>b</sup> dades procedents de Viveros i col. (2000).

Taula 2.4. Llista de microorganismes productors de fitasa (adaptada de Vohra i Satyanarayana, 2003).

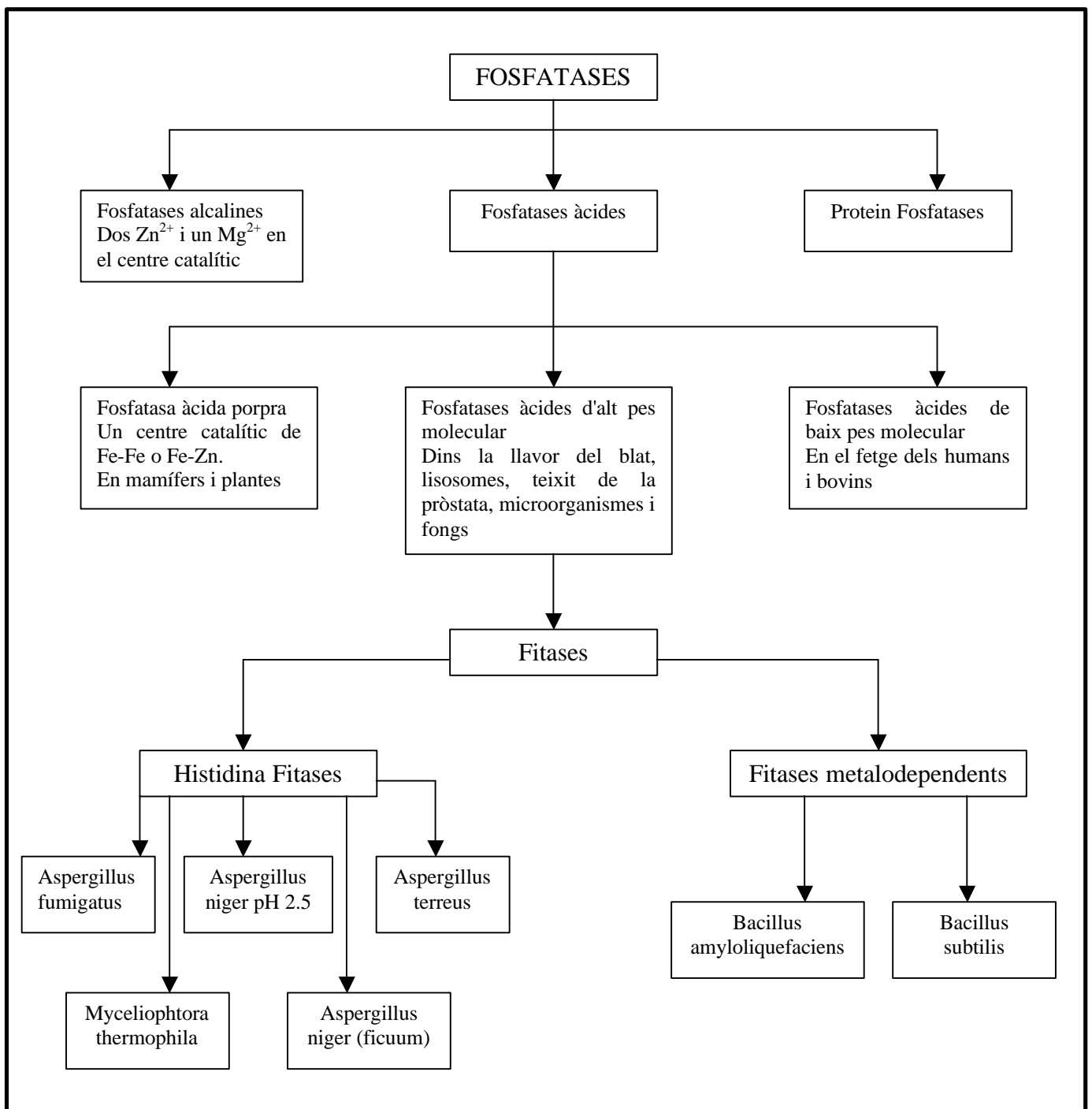
Localització enzim		Localització enzim	
<b>Bacteris</b>		<b>Fongs</b>	
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Paret cel lular	<i>Aspergillus amstelodami</i>	Extracel lular
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Extracel lular	<i>A. chevalieri</i>	Extracel lular
<i>Bacillus sp., DS11</i>	Extracel lular	<i>A. candidus</i>	Extracel lular
<i>Bacillus subtilis</i>	Extracel lular	<i>A. niger syn A. ficuum</i>	Extracel lular
<i>Enterobacter sp. 4</i>	Extracel lular	<i>A. flavus</i>	Extracel lular
<i>Escherichia coli</i>	Paret cel lular	<i>A. niger</i>	Extracel lular
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Paret cel lular	<i>A. repens</i>	Extracel lular
<i>Klebsiella oxytoca MO-3</i>	Paret cel lular	<i>A. sydowi</i>	Extracel lular
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Extracel lular	<i>A. terreus</i>	Extracel lular
<i>Mitsuokella multiacidus</i>	Paret cel lular	<i>A. versicolor</i>	Extracel lular
<i>Pseudomonas sp.</i>	Paret cel lular	<i>A. wentii</i>	Extracel lular
<i>Selenomonas ruminantium</i>	Paret cel lular	<i>A. fumigatus</i>	Extracel lular
<b>Llevats</b>		<i>A. carbonarius</i>	Extracel lular
<i>Arxula adeninivorans</i>	Extracel lular	<i>A. carneus</i>	Extracel lular
<i>Candida spp.</i>	Extracel lular	<i>Aspergillus terreus 9A1</i>	Extracel lular
<i>Clavispora lusitaniae</i>	Extracel lular	<i>Botrytis cinerea</i>	Extracel lular
<i>Debaryomyces yamadae</i>	Extracel lular	<i>Emericella nidulans</i>	Extracel lular
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	Extracel lular	<i>Geotrichum candidum</i>	Extracel lular
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Extracel lular	<i>Mucor piriformis</i>	Extracel lular
<i>Metchnikowia pulcherrima</i>	Extracel lular	<i>M. racemosus</i>	Extracel lular
<i>Pichia anomala</i>	Extracel lular	<i>Myceliophthora thermophila</i>	Extracel lular
	Paret cel lular	<i>Penicillium sp.</i>	Extracel lular
<i>Pichia spp.</i>	Extracel lular	<i>Rhizopus oryzae</i>	Extracel lular
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Paret cel lular	<i>R. oligosporus</i>	Extracel lular
	Extracel lular	<i>R. stolonifer</i>	Extracel lular
<i>S. kluyveri</i>	Extracel lular	<i>Sporotrichium thermophile</i>	Extracel lular
<i>Scwanniomyces occidentalis</i>	Extracel lular	<i>Talaromyces thermophilus</i>	Extracel lular
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Extracel lular	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Extracel lular
<i>T. globosa</i>	Extracel lular	<i>A. clavatus J239</i>	Paret cel lular
<i>T. pretoriensis</i>	Extracel lular	<i>A. flavipes Fla. A-14</i>	Paret cel lular
		<i>A. flavus</i>	Paret cel lular
		<i>A. nidulans QM-329</i>	Paret cel lular
		<i>A. niger NRRL 67</i>	Paret cel lular
		<i>A. niger P330</i>	Paret cel lular
		<i>A. oryzae QM 238</i>	Paret cel lular
		<i>A. phoenicus QM 329</i>	Paret cel lular
		<i>A. repens QM-44C</i>	Paret cel lular
		<i>A. terreus Fla C-93</i>	Paret cel lular
		<i>A. tamarii J1008</i>	Paret cel lular
		<i>Mucor spp.</i>	Paret cel lular
		<i>Penicillium spp. P-320</i>	Paret cel lular
		<i>Rhizopus spp.</i>	Paret cel lular

#### 2.4.2. Classificació de les fitases

Mendoza Parra (2002) proposa una classificació partint de la base que les fitases són fosfatases àcides d'alt pes molecular (Figura 2.5). Aquest autor les diferencia en funció de la seva seqüència, preferentment en el lloc actiu, distingint entre les histidina fitases i les fitases metalo-depenents. En el primer grup la catàlisi de la reacció es realitza en dues etapes: una primera caracteritzada per

l'atac nucleòfil sobre el fòsfor per un residu histidina, present dins un motiu en el lloc actiu i que es conserva en tots els enzims d'aquesta classe, seguida per la hidròlisi de l'intermediari. Per altra banda, el segon grup es caracteritza per una certa dependència amb ions metàl·lics durant l'activitat catalítica.

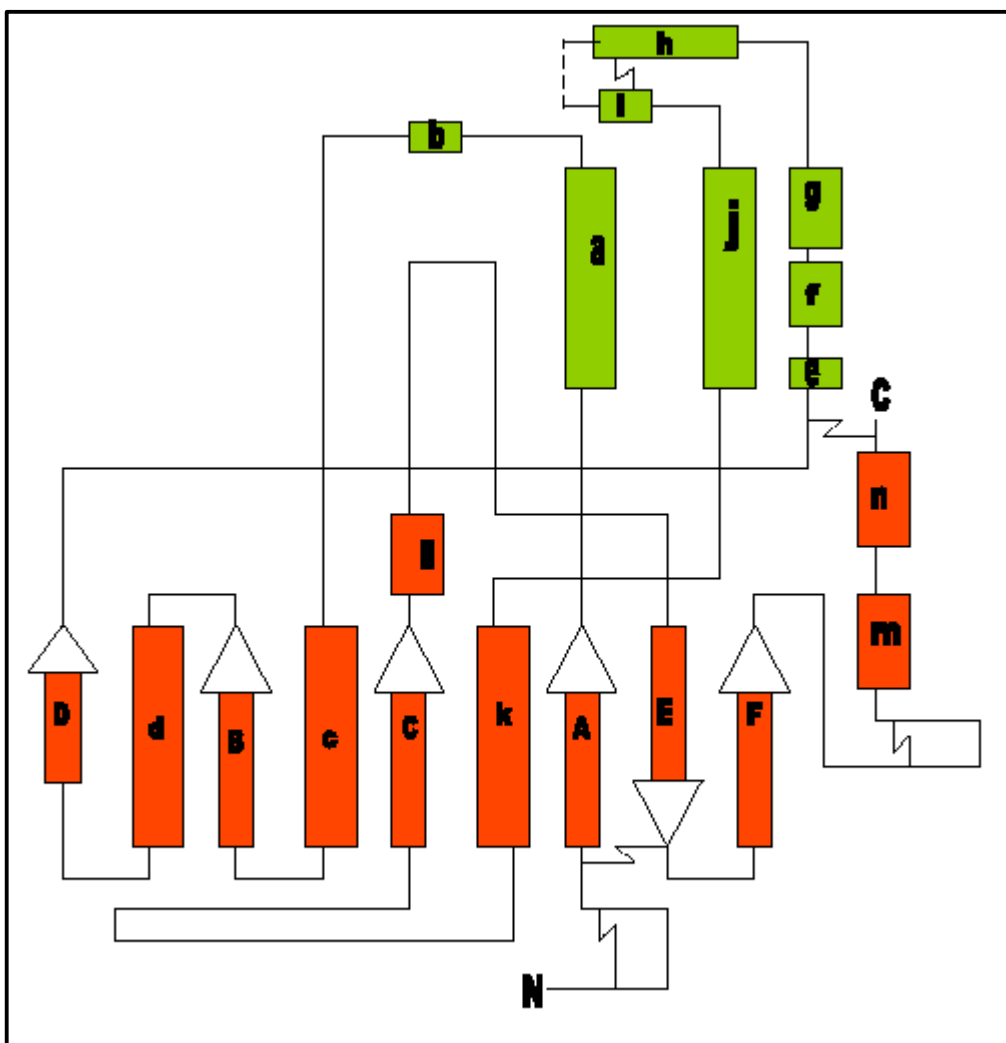
Figura 2.5. Classificació de les fosfatases, presentant els dos grans grups de fitases: les histidina fitases i les fitases metalodependents. (Mendoza Parra, 2002)



### 2.4.2.1. Histidina fitases o fosfatasa àcida histidina (HAP).

L'estructura de l'enzim pot estar dividit en dos dominis, un de gran anomenat domini  $\alpha/\beta$ , i un segon anomenat domini  $\alpha$ . El domini  $\alpha/\beta$  està constituït per sis làmines  $\beta$ , de les quals n'hi ha unes (A, B, C, D) paral·leles, mentre que les altres (E, F) són antiparal·leles (Figura 2.6). El domini  $\alpha$  en canvi està constituït d'una hèlix  $\alpha$  central, així com de set hèlixs  $\alpha$  disposats al voltant i anomenades: a, b, e, f, g, i, j. En el mig dels dominis, hi ha una bossa profunda, limitada per l'extrem N-terminal de la proteïna (que faria de tapa), contenint els aminoàcids implicats en el mecanisme de reacció. Dins la seqüència, s'han identificat deu cistèines, constituint cinc ponts disulfur responsables de mantenir l'estructura tridimensional de la proteïna.

Figura 2.6. Representació esquemàtica de l'estructura amb els dos dominis de la fitasa *Aspergillus niger*. (Mendoza Parra, 2002)



#### 2.4.2.2. *Fitases metalo-depenents.*

Aquest segon tipus està caracteritzat per la manca de similitud en les seqüències, estant format majoritàriament pels enzims d'origen bacterià. Una característica d'aquesta família de fitasa és la seva dependència pels ions calci, tant pel que fa a la seva estabilitat com a l'activitat catalítica.

#### 2.4.3. *Producció i purificació de fitases*

##### 2.4.3.1. *Fitases vegetals.*

Greiner i col. (1998) van descriure la purificació de fitasa de sègol no germinat, amb una recuperació del 6%. Amb els estudis efectuats, aquests autors observaren que l'enzim tenia una afinitat àmplia per a varis compostos fosforilats i que la hidròlisi de fitat es realitzava en varis passos, identificant-se compostos intermedis com el 1,2,3,4,5-IP<sub>5</sub> i el 2,3,4,5-IP<sub>4</sub>. El mateix autor (Greiner, 2002a) purificà i caracteritzà tres fitases de tramussos amb recuperacions entre el 8 i el 13%, referit a l'activitat fitàsica de l'extracte brut, i també de civada (Greiner i Alminger, 1999) que, com en els casos anteriors, observaren que el primer producte de la hidròlisi és l'inositol 1,2,3,4,5-pentafosfat.

##### 2.4.3.2. *Fitases de microorganismes.*

Per a la producció de fitases mitjançant microorganismes s'han emprat algunes tècniques com la fermentació submergida o la fermentació en estat sòlid. Els factors crítics que afecten al rendiment de la producció i que s'han de tenir en compte en el moment de seleccionar la tècnica emprada són el tipus de soca del microorganisme, condicions de cultiu, natura del substrat i disponibilitat dels nutrients (Pandey i col., 2001).

Nair i col. (1991) descriuen la purificació d'una fitasa d'*Aspergillus ficuum* en un procés de fermentació submergida, observant que la hidròlisi d'àcid fític en una dieta incloent farina de colza 00 catalitzada per l'enzim obtingut és completa. La fitasa aconseguida tenia un pH òptim de la seva activitat enzimàtica a 5.0 i essent 60°C la temperatura òptima. Mun Choi i col. (2001) purificaren una fitasa de *Bacillus* sp. KHU-10, que es mostrà ser específica pel fitat sòdic però no mostrà cap activitat en altres èster fosfats. Kerovuo i col. (1998) purificaren i caracteritzaren una fitasa de soca

de *Bacillus subtilis*, enzim que requereix calci per la seva activitat i estabilitat i inhibit per l'EDTA; a més, es va provar que l'enzim era específic per a fitat, ADP i ATP, amb activitats relatives del 100, 75 i 50%, respectivament.

#### 2.4.4. Mecanisme de reacció.

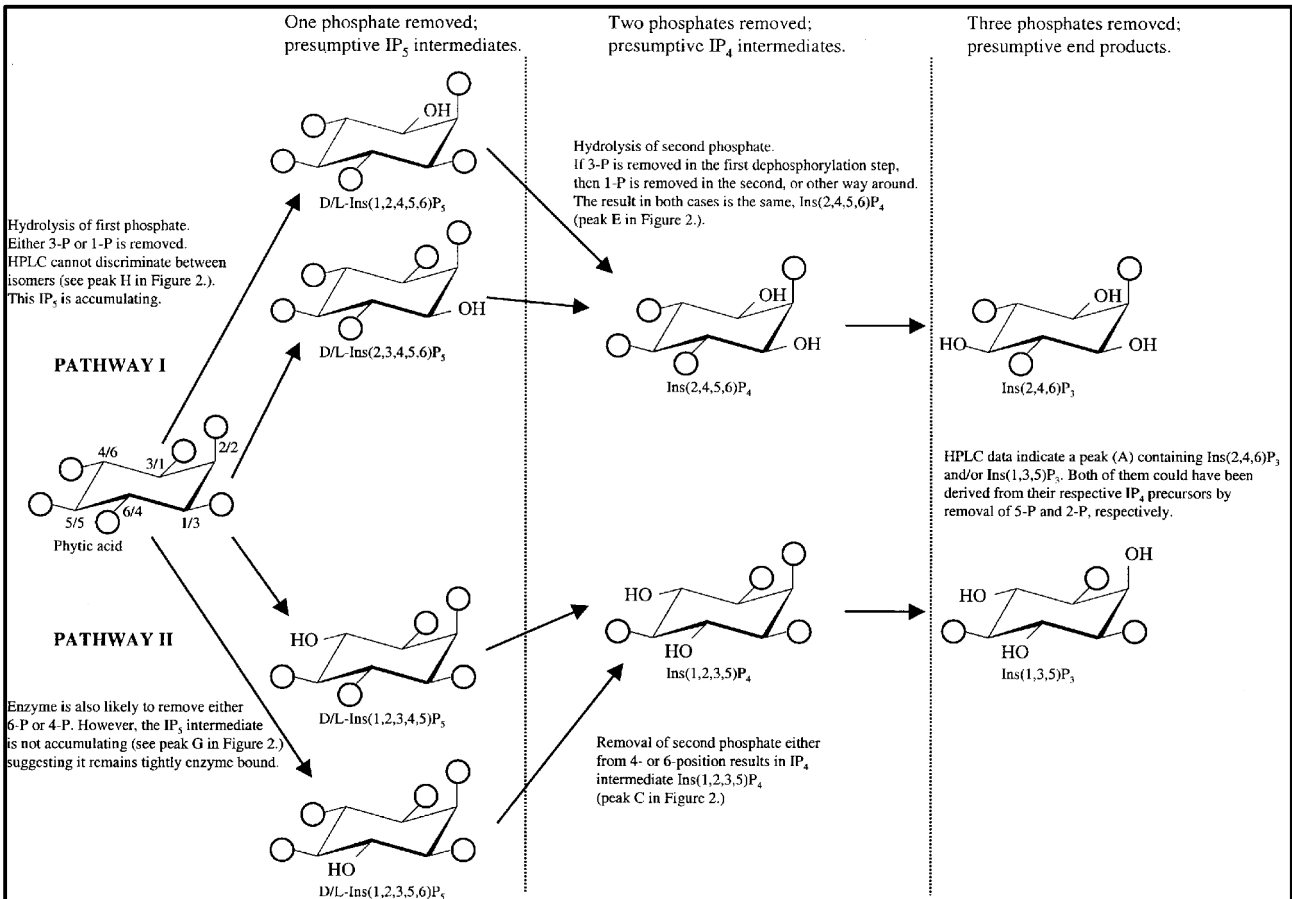
No està massa clar el mecanisme pel qual la fitasa realitza la hidròlisi del fosfat en les molècules de l'àcid fític. S'han realitzat varis estudis per determinar-ne el mecanisme tant amb fitases d'origen bacterià (Kerovuo i col., 2000), com fúngic (Dvoráková i col., 2000; Greiner i col., 2001), en cereals (Nakano i col., 2000) i en llegums (Greiner i col., 2002b).

Kerovuo i els seus col laboradors (2000) en el seu treball descriuen i proposen un mecanisme de reacció per la hidròlisi de fitat per fitasa de *Bacillus*, que es pot veure en la figura 2.7. El mecanisme contempla la hidròlisi mitjançant dues vies:

La primera de les qual indicaria que s'hidrolitzaria un fosfat de la posició 1 o 3, en posició  $\alpha$  al fosfat del carboni 2 (fosfat axial), per donar pentafofosfats d'inositol (1,2,4,5,6-IP<sub>5</sub> i 2,3,4,5,6-IP<sub>5</sub>). El compost intermedi obtingut seria alliberat de l'enzim, però es tornaria a unir, amb la consegüent hidròlisi del fosfat en posició 1 o 3 que no ha estat abans hidrolitzat, per obtenir un tetrafosfat d'inositol (2,4,5,6-IP<sub>4</sub>). El darrer pas proposat és l'obtenció del 2,4,6-IP<sub>3</sub>, per hidròlisi del fosfat en posició 5.

La segona via proposta seria que la hidròlisi comença pel fosfat del carboni 4 o 6, en posició  $\beta$  al carboni 2, per obtenir els compostos 1,2,3,5,6-IP<sub>5</sub> o 1,2,3,4,5-IP<sub>5</sub>. Els autors van trobar que els compostos pentafofosfats eren detectats en poca quantitat, per la qual cosa suposaren que estaven fortament lligats a l'enzim, el que permetria el pas ràpid a tetrafofosfats, per la hidròlisi del fosfat en la posició que no s'havia hidrolitzat anteriorment (4/6 o 6/4), obtenint-se el 1,2,3,5-IP<sub>4</sub>. Aquest compost intermedi seria alliberat de l'enzim però podria tornar-se a unir a l'enzim, hidrolitzant-se ràpidament cap als trifosfats. El darrer pas és la hidròlisi del fosfat en posició 2, donant el trifosfats d'inositol 1,3,5-IP<sub>3</sub>, isòmer de l'obtingut per l'altra via.

Figura 2.7. Esquema de la ruta de hidròlisi de fitasa (Kerovuo i col., 2000)



Dvoráková i col. (2000) descriu la formació de fosfats d'inositol per la 3-fitasa d'*Aspergillus niger*. Tot i que no descriuen el mecanisme ni els compostos intermedis de la reacció, si que descriuen la cinètica de la reacció, aconseguint que als 30 minuts de reacció, els fosfats de l'àcid fític estiguin un 16% separat, observant-se la presència de  $IP_5$  i  $IP_4$ . Passades 2-3 hores de reacció, hi havia hidrolitzat al voltant del 40% del fosfat, i prevalien les presències dels  $IP_3$  i  $IP_2$ , mentre que els compostos  $IP_5$  i  $IP_4$  eren compostos minoritaris.

En la Figura 2.8 es mostra una ruta de degradació del fitat per fitases de llegums, tres de tramús (LP1, LP11 i LP12) i una de fava, descrita en el treball de Greiner i col. (2002b). Es pot observar els passos fins a obtenir el monofosfat d'inositol (2-IP), descrivint que el pas de  $IP_6$  a  $IP_5$  és diferent segons sigui l'enzim que actua. Si actuen els enzims LP11 i LP12 de tramús, que tenen una activitat 3-fitasa, el primer compost obtingut serà el (1,2,4,5,6)- $IP_5$ ; mentre que si els enzims que actuen són el de fava i LP1 de tramús, el primer compost serà el (1,2,3,5,6)- $IP_5$ , ja que els autors descriuen que tenen activitat 6-fitasa.

Figura 2.8. Ruta de degradació del fitat per fitasa de llegums. (adaptat de Greiner i col., 2002)

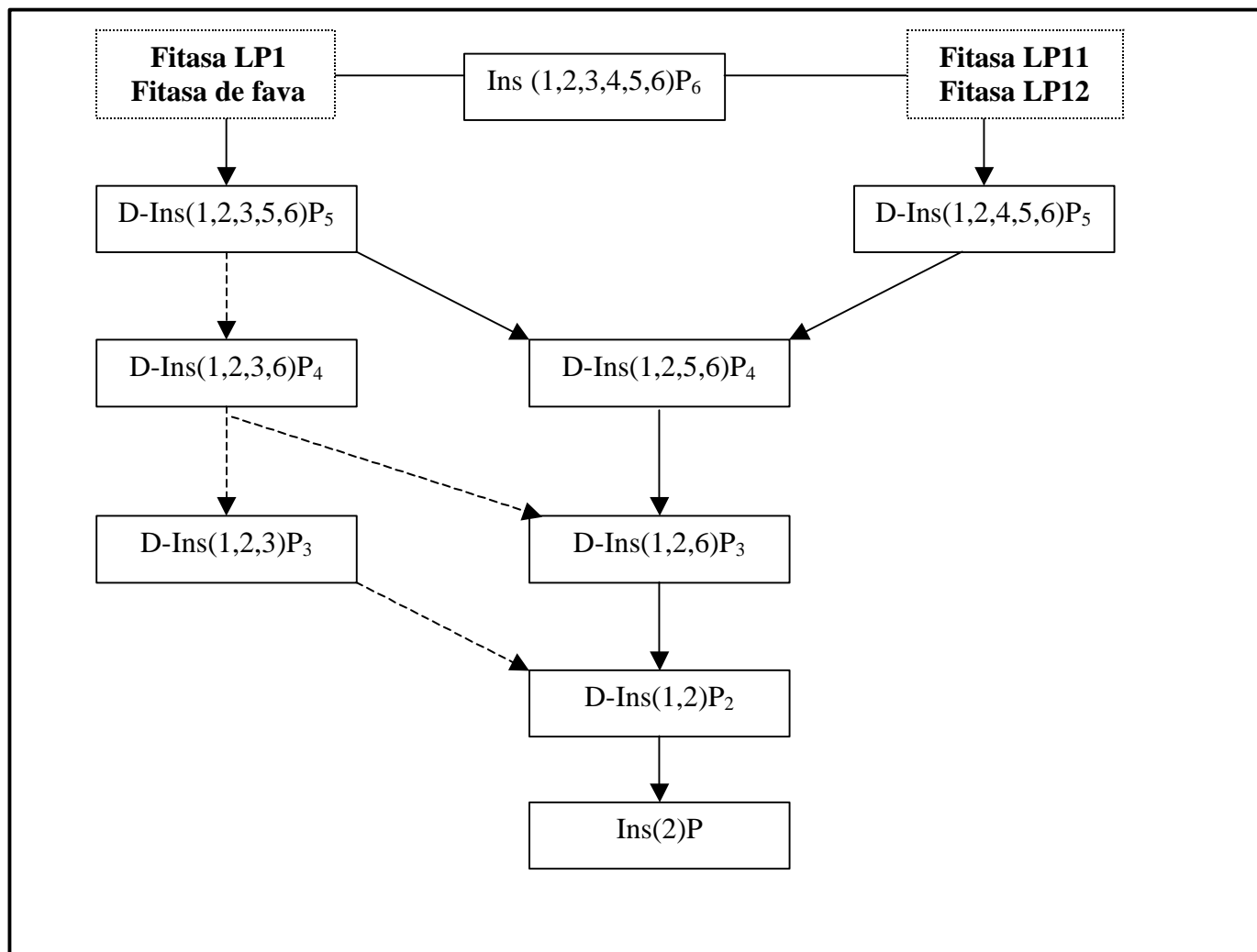
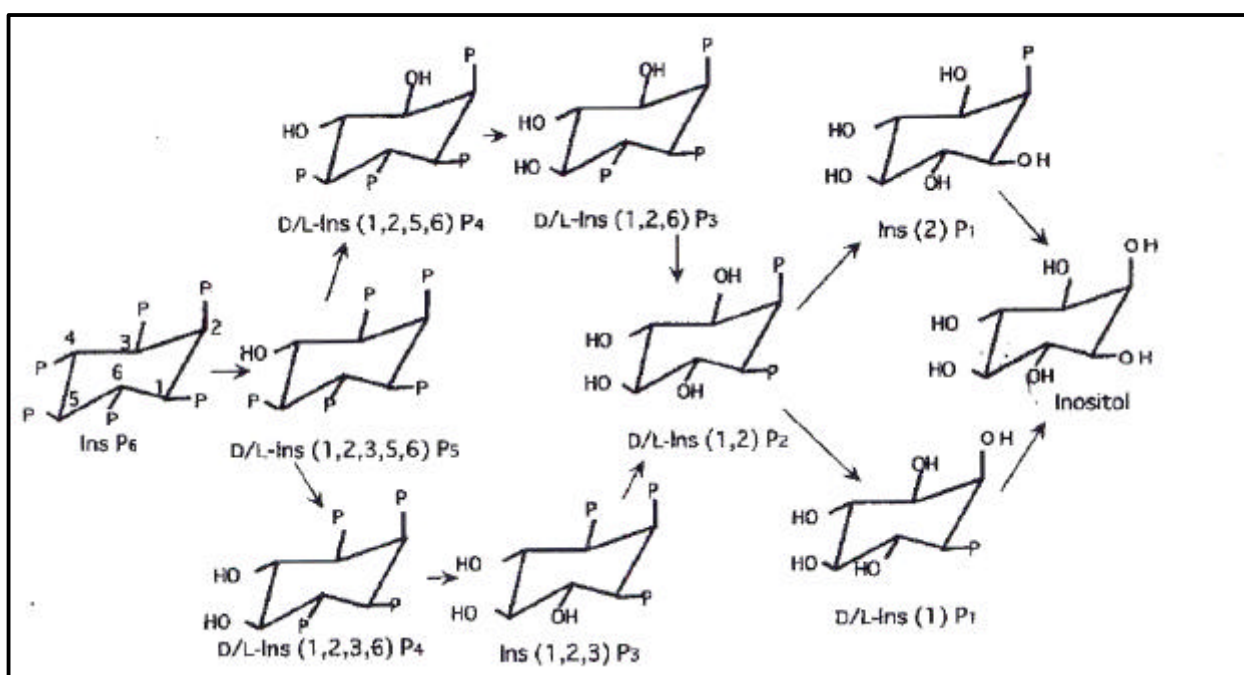


Figura 2.9. Ruta de desfosforilació de l'hexafosfat d'inositol per acció de la fitasa del segó de blat de *Triticum aestivum* L. cv Nourin #61. (Nakano i col., 2000).



Nakano i col. (2000) van proposar la ruta de desfosforilació de l'àcid fític per fitases de segó de blat (de *Triticum aestivum* L. cv Nourin #61). Mitjançant la tècnica del RMN, els autors van poder establir amb seguretat les estructures del fosfats intermedis i també la de la molècula de mio-inositol. En tractar-se d'una fitasa procedent d'un vegetal el primer compost intermedi obtingut és el (1,2,3,5,6)-IP<sub>5</sub>, producte de l'activitat 6-fitasa de l'enzim. Seguint tots els passos, Nakano i els seus col laboradors són els únics autors revisats que arriben a observar el mio-inositol com a producte final de la hidròlisi (Figura 2.9).

#### **2.4.5. Estabilitat tèrmica.**

Amb el fet de considerar la fitasa com a additiu alimentari per a pinsos d'animals monogàstrics de granja, han aparegut una sèrie de implicacions, com el fet que l'enzim ha d'ésser capaç de resistir les altes temperatures aplicades en la fabricació del pinso, entre 60 i 90°C. Bona part de les fitases conegudes presenten temperatures de desnaturalització entre 56 i 63°C, límit superior del rang de temperatura òptima, tal com s'ha descrit anteriorment.

Wyss i col. (1998) realitzaren un estudi de comparació de la termoestabilitat de diversos enzims (una fitasa d'*Aspergillus fumigatus* i una fitasa i una fosfatasa àcida de pH 2.5 d'*Aspergillus niger*). Aquests autors observaren que les dues fitases es desnaturalitzaven entre 50 i 70°C. Després de la desnaturalització per calor a temperatures superiors a 90°C, la fitasa d'*A. fumigatus* es torna a plegar completament fins a una conformació totalment activa i similar a l'original, mentre que en el cas de la fitasa d'*A. niger* exposada a temperatures de 55 i 90°C es va associar a un canvi conformacional irreversible amb pèrdues en activitat enzimàtica d'entre el 70 i el 80%. En canvi, la fosfatasa àcida d'*A. niger* mostrà una termoestabilitat considerablement més alta, observant-se la desnaturalització, canvis conformacionals i inactivació irreversible a temperatures iguals o superiors a 80°C. Finalment, també observaren que a 85°C la recuperació de l'activitat enzimàtica fou considerablement superior per la fitasa d'*A. fumigatus* (51%) que per la fitasa d'*A. niger* (31%).

Tecnològicament és possible millorar l'estabilitat de l'enzim fitasa, doncs es tracta d'una proteïna. Ward (2002) descriu que un dels factors que afecten més a l'estabilitat d'aquest enzim és la humitat,

conjuntament amb la calor, especialment en el processat del pinso. A la temperatura a què l'enzim es desplega, l'autor va trobar que era altament dependent del contingut d'humitat de l'ambient. Per tant, una manera de millora l'estabilitat tèrmica de la fitasa és minimitzar l'exposició de l'enzim a la humitat. L'ús de fitases seques ofereixen un major nombre d'avantatges que l'ús de les líquides. A nivell d'estructura de la molècula de la fitasa, es poden aplicar tres possibles accions tecnològiques per tal d'augmentar la temperatura de desnaturalització (Mendoza Parra, 2002):

- a) Mutagènesi aleatòria seguida de selecció.
- b) Comparació de la seqüència dels aminoàcids amb una altra proteïna presentant una major estabilitat, i posterior mutagènesi dirigida cap els aminoàcids seleccionats.
- c) Introducció dels possibles aminoàcids estabilitzadors, basat en l'estructura tridimensional de la proteïna.

Una altra manera de millorar l'estabilitat tèrmica i, per tant, evitar la desnaturalització, consisteix en recobrir l'enzim amb una coberta dissenyada per protegir-lo contra l'agressivitat del processament del pinso, afectant paràmetres com la calor i la humitat (López Álvarez, 2002). Gràcies a això és possible una granulació amb temperatures de condicionador de fins 90°. El grànul que recobreix l'enzim pot estar format per fibres de cel·lulosa modificades que absorbeixen l'aigua degut a un procés de ruptura. En el tracte intestinal de l'animal, la coberta es dissol en el procés de la digestió i en el cas de les aus el procés s'accelera per la trituració que es realitza en el pedrer.

#### ***2.4.6. Estudis de l'aplicació de fitasa en nutrició***

En els darrers anys s'han realitzat estudis sobre l'aplicació de fitasa en nutrició ja sigui humana com animal (avicultura, porcina, de remugants, etc).

##### ***2.4.6.1. Nutrició humana***

El contingut mineral dels llegums normalment és alt, però amb una biodisponibilitat pobra degut a la presència de fitat, que és el principal inhibidor de l'absorció de minerals essencials de la dieta. El complex fitat és insoluble al pH fisiològic de l'intestí, causant reduccions en el balanç de ferro, zinc

i calci, dins l'intestí humà (Sandberg, 2002). Una possible conseqüència d'aquest poc accés als minerals és l'anèmia, malaltia caracteritzada per la manca de disponibilitat del ferro.

Els estudis d'aquesta qüestió en humans són complicats pel tipus de fitat emprat, la dificultat de separar els efectes de la fibra dietària, i per la possibilitat que el fitat pot ser parcialment degradat per l'intestí humà, amb la conseqüent alliberament dels minerals units per absorció (Anònim, 1989).

S'ha trobat tres tipus de fitases en el tracte gastrointestinal humà: la fitasa procedent de la dieta, la fitasa de la flora bacteriana en l'intestí i les fitases de la mucosa intestinal. Bitar i Reinhold (1972) examinà l'activitat fitàsica de la mucosa de l'intestí prim d'humans (entre altres espècies). En un procediment *in vitro* trobà que el pH òptim de la fitasa era de 7.4, per la qual cosa l'enzim fitasa difereix bastant de la resta de fosfatases alcalines.

Sandberg i col.(1987) examinaren l'habilitat dels humans per degradar el fitat de la dieta. Quan els subjectes estudiats menjaren una barreja de segó, el 58% del fitat s'hidrolitzava a IP<sub>5</sub>, IP<sub>4</sub> i IP<sub>3</sub> després de passar per l'estómac i intestí prim. En canvi, després de consumir segó extrusionat només es va hidrolitzar el 25% de IP<sub>6</sub> a IP<sub>5</sub> i IP<sub>4</sub>. Els autors van fer la hipòtesi que la manca de digestió de fitat, quan es consumí segó extrusionat, podria ser causat per la degradació de les fitases endògenes del segó durant el processament del menjar o per la formació de complexos de fitats insolubles. En un altre estudi del mateix grup d'autors (Sandberg i Andersson, 1988) van concloure que molt poca quantitat de fitat va ser degradat per la fitasa intestinal en els subjectes que menjaren diferents formes de fitat. Per tant, sembla tenir més importància la fitasa de la dieta que la endògena corresponent a la mucosa intestinal.

Sandberg i col. (1996) estudiaren els efectes de dos tipus de fitases (la del cereal i la microbiana) en dieta de blat. Els resultats mostraren que es produí una degradació completa i efectiva del fitat ocorreguda en l'estómac després de afegir fitasa d'*Aspergillus niger* en la dieta. Com a conseqüència es va augmentar la retenció de ferro en un 86% (de 14% a 26%).

#### 2.4.6.2. *Nutrició animal*

Els efectes de l'addició de fitasa en la nutrició animal estan més estudiats en animals monogàstrics que en la resta, com per exemple, els remugants. Bàsicament és degut a que el temps de digestió en el segon tipus d'animals és major que en el primer, i per tant, els enzims endògens de l'animal i els de la flora bacteriana present en el rumen tenen més temps per actuar.

##### 2.4.6.2.1. Remugants.

Bona part dels estudis publicats referents als remugants es basen en la reducció del requeriment de la concentració de fòsfor, sense produir conseqüències negatives ni en la constitució dels animals ni en la seva alimentació, ja sigui per la llet materna o per la dieta emprada (Karn, 2001; Paterson, 2003).

Tal com descriuen Yanke i col. (1998) els remugants presenten, a diferència dels monogàstrics, una activitat fitàsica digestiva i que potencialment és capaç d'utilitzar el fitat, sent innecessari subministrar fosfat en les dietes. Aquests mateixos autors comenten que les bactèries ruminals podrien ser una bona font comercial de fitasa, pels alts valors de la seva activitat.

##### 2.4.6.2.2. Porcs.

En la Taula 2.5 es presenten dades procedents de la revisió bibliogràfica referent als efectes beneficis de l'addició de fitasa en dietes de porcs sobre els paràmetres productius (Taula 2.5a i 2.5c) i sobre la digestibilitat de nutrients (Taula 2.5b i 2.5c). Revisant les dades presentades, es pot observar que, com diuen Simons i col. (1992), l'addició de fitases a dietes deficientes de fòsfor en porcs fa que el creixement de l'animal sigui igual o millor que les dietes control que cobreixen els requeriments per al creixement (Beers i Jongbloed, 1992; Harper i col., 1997; Li i col., 1998; Matsui i col., 2000; Gentile i col., 2003), succeint en la majoria dels casos consultats. La fitasa microbiana afegida en les dietes millora, no només la retenció aparent de fòsfor, si no que també millora la d'altres nutrients com la matèria seca, proteïnes, o minerals com el calci (Lei i col., 1993; Mroz i col. 1994; Helander i col., 1996; Spencer i col., 2000; Zimmermann i col., 2003).

Taula 2.5a. Efectes de l'addició de fitasa en dietes de porcs sobre els paràmetres productius.

Referència	Dades estudi	Tipus dieta i SE <sup>1</sup>	Tractament	Resultats productius					
				GMD <sup>3</sup>	CMD <sup>4</sup>	IC <sup>5</sup>			
Cromwell i col., 1993	Porcs 18.6 kg PV <sup>2</sup>	31% farina soja 33% dextrosa 33% farina moresc Fitasa: tres nivells P: fòsfor afegit com monofosfat sòdic	Dieta base + 0.05% P + 0.10% P + 0.15% P + 250 U Fit <sup>6</sup> + 500 U Fit + 1000 U Fit CV Pr <sup>7</sup> (fòsfor) Pr (fitasa)	458 579 635 747 474 529 564 11.3 0.01 0.01	1370 1490 1650 1840 1490 1590 1720 13.9 0.01 0.01	3.01 2.58 2.60 2.47 3.15 3.01 3.06 12.6 0.05 NS <sup>8</sup>			
	Porcs 20.7 kg PV	77% moresc 20% farina soja Fitasa: dos nivells P: fòsfor afegit com monofosfat sòdic	Dieta base + 0.075% P + 0.15% P + 500 U Fit + 1000 U Fit CV Pr (fòsfor) Pr (fitasa)	536 662 726 600 648 6.6 0.01 0.01	1490 1550 1650 1590 1690 8.4 NS 0.05	2.78 2.34 2.28 2.65 2.62 5.4 0.01 NS			
Kemme i Jongbloed, 1993	64 truges i mascles castrats, 30-70 kg	20% segó i tercers de blat 31% moresc 20% tapioca Fitasa (500 U/kg)	Dieta base + Fit EEM <sup>9</sup> Pr	691 696 8.8 NS	1650 1650 0.01 NS	2.39 2.37 0.03 NS			
Lei i col., 1994	64 pocs, 8 kg PV	77% moresc 20% soja 44 VitD: vitamina D amb dos nivells Ca: dos nivells Fitasa: dos nivells	750 U Fit	497	1058	2.13			
			660 UVitD + 0.4%Ca	307	882	2.87			
			660 UVitD + 0.8%Ca	440	1120	2.55			
			6660 UVitD + 0.4%Ca	314	890	2.83			
			660 UVitD + 0.8%Ca	573	1192	2.08			
			660 UVitD + 0.8%Ca	303	840	2.77			
			6660 UVitD + 0.4%Ca	488	1093	2.24			
			6660 UVitD + 0.8%Ca	408	1062	2.60			
			Pr (fitasa)	NS	NS	NS			
			P (VitD)	NS	NS	NS			
P (calci)	0.007	0.04	0.0005						
Cromwell i col., 1995	35 porcs 13 kg PV	74% moresc 20% farina soja Fitasa: quatre nivells d'addició Addició de diferents nivells de fosfat monosòdic	Dieta base	424	1170	2.74			
			+ 0.075% P	571	1430	2.50			
			+ 0.150% P	641	1470	2.29			
			+0.007%P +250Fit	501	1390	2.78			
			+0.007%P +500Fit	509	1340	2.64			
			+0.007%P +1000Fit	538	1400	2.62			
			+0.007%P +2000Fit	545	1320	2.42			
			CV	13.5	13.6	7.3			
			Pr (fòsfor)	0.01	0.05	0.01			
			Pr (fitasa)	NS	NS	0.01			
Biehl i Baker, 1996	54 porcs, 7.6 kg PV	Dieta deficient P. 2% farina moresc 61% moresc 31% farina soja Fitasa. 1200 U/kg P: Monofosfat potàssic D3: µg/kg1 α-OH D <sub>3</sub>	Dieta base	295c	2.11c				
			+0.10% P	470b	1.68b				
			+ Fit	463b	1.64a				
			+ 20 D3	327c	2.07c				
			+ Fit + 20 D3	466b	1.62a				
			+0.30%P+0.25%Ca	546a	1.55a				
			EEM	17	0.019				
Pr	0.05	0.05							
Murry i col., 1997	18 truges joves 10.9 kg PV	PD: Dieta P deficient 57% perles de mill 25% farina soja PA: Dieta P adequat: 55% perles de mill 26% farina soja Fitasa: dos nivells	PD	433	871	2.34	P sèrum	Ca sèrum	
			PD + 700 U Fit	532	871	1.79	7.92	10.68	
			PD + 1000 U Fit	558	871	1.68	9.66	10.82	
			PA	564	871	1.65	9.34	10.23	
			PA + 700 U Fit	542	871	1.76	9.64	11.03	
			PA + 1000 U Fit	528	871	1.83	9.52	10.53	
			EEM	20	-	0.018	9.79	11.23	
			Pr (fòsfor)	0.003	NS	0.003	0.218	0.951	
			Pr (fitasa)	0.01	NS	0.007	0.002	NS	
			Pr (fòsfor x fitasa)	0.001	NS	0.001	0.004	NS	

Taula 2.5a. Efectes de l'addició de fitasa en dietes de porcs sobre els paràmetres productius. (continuació)

Referència	Dades estudi	Tipus dieta i SE	Tractament	Resultats productius				
				GMD	CMD	IC	P sèrum	Ca sèrum
Han i col., 1998	40 truges joves 9.9 kg PV	58-69% moresc 25-28% soja STB: segó i terceres de blat Diferents nivells de fòsfor no fític Fitasa: 1200 U/kg	CN <sup>11</sup>	482b	1112b	2.31b		
			+ 0.1 FNF	710a	1473a	2.07ab		
			+ 0.2 FNF	756a	1583a	2.09ab		
			+ 15 STB	637a	1386ab	2.18ab		
			+ Fit	725a	1475a	2.03a		
Li i col., 1998	30 porcs en creixement de 23.4 kg PV	74% moresc 23% soja Nivell baix P Fitasa Vit D: Vitamina D	EEM	40	66	0.012		
			Pr	0.0001	0.002	0.01		
			Dieta base	462b	1340b	2.90a	6.55b	10.44
			+ Vit D	475b	1354b	2.85a	7.26a	10.28
			+ Fit	512a	1374a	2.68b	8.49a	10.33
Radcliffe i col., 1998	96 porcs destetats, 7.4 kg PV	64/67% moresc 30/28% soja Fitasa: 250, 500, 750 U/kg ÀC: àcid cítric: 1.5 i 3.0 %.	CP <sup>12</sup>	540a	1377a	2.55b	8.76a	10.26
			+ Vit D+Fit	523a	1366a	2.61b	9.24a	10.18
			EEM	2.3	4.6	0.05	0.22	0.24
			Pr	0.05	0.02	0.03	0.03	NS
			0	321	2.01			
Matsui i col., 2000	66 mascles castrats 10.4 kg PV	DPA: dieta nivell adequat de fòsfor DPB: dieta nivell baix de fòsfor 74% moresc 21% soja Fitasa: dos tipus, de llevat (L) i microbiana (M)	+ 250 U Fit	329	2.11			
			+ 500 U Fit	340	2.09			
			+ 750 U Fit	327	2.21			
			Pr (Fitasa)	0.05	NS			
			0	313	2.21			
Stahl i col., 2000	140 porcs en total: 48 en experiment 1 50 en experiment 2 42 en experiment 3  Estudi comparatiu de dos tipus de fitasa: microbiana (FitM) i de llevat (FitLl)	62% moresc 30% soja 44 3% concentrat de proteïna de sèrum Fitasa: 1200 U/kg Addició de fosfat bicàlcic	+ 1.5% AC	336	2.09			
			+ 3.0 AC	340	2.00			
			Pr (AC)	NS	0.001			
			DPA	610a	1260	2.05	9.6a	11.5
			DPB	432b	1010	2.33	5.9d	11.9
Peter i col., 2001	408 porcs d'acabat, pes inici 84 kg PV	81.6% moresc 16% soja 10% oli soja Fitasa: dos nivells	DPB + 1000U FitLl	525ab	1130	2.17	7.8c	11.8
			DPB + 2000U FitLl	553a	1170	2.14	8.8ab	11.3
			DPB + 4000U FitLl	558a	1260	2.19	8.1bc	11.6
			DPB + 1000U FitM	569a	1120	2.03	8.2bc	11.7
			EEM	31	110	0.020	3.3	3.0
Paboeuf i col., 2002	120 porcs: 60 mascles castrats 60 femelles C: Creix. (25-60 kg) F: Final (60-107 kg)	42/44% blat 30/35% moresc 18/14% soja 48 Fitasa	Pr	0.05	NS	NS	0.001	NS
			Dieta base	488b	902	1.85c		
			+ FitLl	564a	948	1.68a		
			+ FitM	567a	968	1.70ab		
			+ 0.22% FNF	572a	1024	1.79bc		
EEM	19	128	0.012					
	Pr	0.05	NS	0.05				
	+ 300 U Fit Ll	519	1033	1.98				
	+ 600 U Fit Ll	557	1054	1.89				
	+ 900 U Fit Ll	553	1102	1.99				
GMD	586	1124	1.92					
	567	1124	1.98					
	31	64	0.014					
	NS	NS	NS					
	+FitLl	483	947	1.96				
CMD	+FitM	506	999	1.97				
	+ 0.17% FNF	508	1004	1.98				
	EEM	27	46	0.009				
	Pr	NS	NS	NS				
	CP	784	2794	3.56				
IC	CN	770	2771	3.60				
	+ 300 U Fit	774	2757	3.56				
	+ 500 U Fit	778	2727	3.51				
	EEM	11	34	0.002				
	Pr	NS	NS	NS				
MinCF	T	785	2.71					
	FitC	798	2.67					
	FitCF	810	2.64					
	EEM	5	3					
	Pr (dieta)	NS	NS					
Pr (sexe)	NS	NS						
	NS	NS						

Taula 2.5a. Efectes de l'addició de fitasa en dietes de porcs sobre els paràmetres productius. (continuació)

Referència	Dades estudi	Tipus dieta i SE	Tractament	Resultats productius					
				GMD	IC				
Augspurger i col., 2003	10 porcs 8.4 kg PV	1.5% midó de moresc 61% moresc 34% soja Fitasa: inclusió de tres productes comercials diferent (Fit A, Fit B, Fit C)	CN	369	1.88				
			+ 0.05% FNF	435	1.74				
			+ 0.10% FNF	476	1.62				
			+ 0.15% FNF	509	1.52				
			+ Fit A	460	1.65				
			+ Fit B	445	1.77				
			+ Fit C	443	1.72				
			EEM	17	0.022				
			Pr (fòsfor inorg.)	0.01	0.01				
			Pr (fitasa)	NS	NS				
Gentile i col., 2003	72 truges destetades	67% moresc 28% soja 48 Fitasa: cinc nivells de inclusió	Dieta base	GMD 308	CMD 642	IC 2.07			
			+ 250 U Fit	389	717	1.83			
			+ 500 U Fit	437	769	1.75			
			+ 750 U Fit	465	792	1.69			
			+1000 U Fit	443	792	1.78			
			+ 1250 U Fit	440	747	1.70			
			EEM	25	49	0.018			
			Pr	<0.001	NS	<0.001			
			Selle i col., 2003	Porcs mascles i femelles destetats	Blat Pèsols Farina de soja Farina de colza 00 Fosfat mineral Fitasa: 625 U/kg	0.12% FF <sup>10</sup>	GMD 392	CMD 505	IC 1.29
						0.12% FF + Fit	387	495	1.29
0.22% FF	351	491				1.43			
0.22% FF + Fit	406	546				1.36			
0.32% FF	330	486				1.57			
Porcs mascles i femelles destetats	60% blat 10% Farina soja 8% llavor tramús Fitasa Xil: Xilanasa	0.32% FF + Fit EEM Pr (FF) Pr (Fitasa) Pr (FF x Fitasa)		0.32% FF + Fit	GMD 370	CMD 511	IC 1.40		
				EEM	18.1	21.1	0.064		
				Pr (FF)	NS	NS	0.010		
				Pr (Fitasa)	0.044	NS	NS		
				Pr (FF x Fitasa)	NS	NS	NS		
Shelton i col., 2003	48 porcs castrats 26.4 kg PV	2 nivells energia 56/63% moresc 31/24% soja 48 Fitasa: 500U/kg	Dieta base	GMD 408	CMD 508	IC 1.25ab			
			+ Fit	452	525	1.16c			
			+ Xil	424	558	1.33a			
			+ Fit + Xil	465	542	1.17bc			
			EEM	25.1	30.2	0.029			
	64 porcs: 32 truges joves i 32 porcs castrats	61% moresc 26% soja 48 Fitasa: 475 U/kg	Dieta base + Fit EEM Pr	EEM	GMD 20	CMD 10	IC 0.01		
				Pr	0.01	0.01	NS		
				Dieta base	GMD 850	CMD 1920	IC 2.26		
				+ Fit	840	1850	2.21		
				EEM	20	40	0.008		
Pr	NS	NS	NS						

<sup>1</sup>SE: suplementació enzimàtica; <sup>2</sup>PV: pes viu; <sup>3</sup>GMD: guany mig (g); <sup>4</sup>CMD: consum mig diari (g); <sup>5</sup>IC: índex de conversió (g/g); <sup>6</sup>Fit: Fitasa; <sup>7</sup>Pr: probabilitat; <sup>8</sup>NS: no significatiu; <sup>9</sup>EEM: error estàndard de la mitja; <sup>10</sup>FF: fòsfor fític; <sup>11</sup>CN: control negatiu; <sup>12</sup>CP: control positiu.

Taula 2.5b. Efectes de l'addició de fitases en dietes de porcs sobre la digestibilitat de nutrients.

Referència	Dades estudi	Tipus dieta i SE <sup>1</sup>	Tractament	Digestibilitat					
				MS <sup>6</sup>	Ptotal	IP <sup>7</sup>			
Jongbloed i col., 1990	6 porc castrats 37 kg PV <sup>2</sup>	<b>DMS:</b> moresc-soja 86% moresc 12% soja <b>DP:</b> dieta provada 42% tapioca 34% gluten moresc 8% farina gira-sol Fitasa: 1000 U/kg	DMS DMS +Fit <sup>3</sup> EEM <sup>4</sup> Pr <sup>5</sup> DP DP + Fit EEM Pr	83.9 84.1 1.2 NS 78.2 79.8 0.5 NS <sup>8</sup>	12.9 42.6 4.0 0.01 27.8 54.8 2.0 0.01	9.6 59.7 6.2 0.01 -1.4 74.0 6.4 0.001			
Näsi, 1990	6 porcs creixement castrats	88% moresc 12% farina soja Addició de P, com fosfat bicàlcic Fitasa: 100 U/kg	Dieta base + 0.5% P + 0.5% P + Fit EEM Pr	N 44.0a 40.4b 41.9b 0.84 0.05	P 12.8 19.3 26.1 3.12 NS				
Simons i col., 1990	6 porcs en creixement 35-70 kg PV	<b>DM:</b> dieta moresc 86% moresc 12% farina soja <b>DP:</b> dieta provada 12% moresc 42% tapioca 34% menjar humà Fitasa: 1000 U/kg	DM DM + Fit EEM Pr	MS 85.2 85.0 1.6 NS	P 20 46 4.0 0.01	Ca 44 50 5.2 NS			
			DP DP + Fit EEM Pr	81.0 81.3 0.1 NS	34 56 1.6 0.001	50 58 1.0 0.01			
Lei, i col., 1993	12 porcs	77% moresc 20% soja 44 Zn: 30 mg/kg Fitasa: 1350 U/kg	Dieta base + Zn + Fit EEM Pr	P 24.9b 22.5b 69.6a 4.69 0.0001	Zn -46.0 -14.3 -41.7 29.91 NS	Ca 13.0b 19.2b 54.8a 4.67 0.0001			
Mroz i col., 1994	5 porcs castrats 45 kg PV	30% moresc 20% tapioca 15% farina soja 10% ordi 10% pesols Fitasa: 800 U/kg	Dieta base + Fit EEM Pr	P total 31.8b 55.1a 1.7 0.01	Ca 29.4b 46.4a 1.7 0.01	N 40.1 42.8 1.7 NS			
Pallauf i col., 1994	24 mascles castrats 9-12 kg PV	45% blat 30% ordi 22% moresc Fitasa: dos nivells de inclusió	Dieta base + 350 U Fit + 700 U Fit EEM Pr	P 54.1b 66.0a 71.2a 1.85 0.05	Ca 55.4b 68.3a 72.9a 1.94 0.05	Mg 32.2 34.1 33.6 1.73 NS			
Adeola, 1995	72 porcs: 36 truges joves i 36 porcs castrats	70% moresc 25% farina soja Cu: addició de Cu Fitasa: 1500 U/kg	Dieta base	P 60.8	Ca 62.1	Cu 7.2	Zn 19.1	Mg 31.9	Mn 17.4
			+ 60Cu	61.4	58.4	19.9	23.2	34.6	26.5
			+ 120 Cu	58.0	59.9	10.2	15.9	29.4	20.1
			+ Fit	62.3	63.7	15.4	21.3	36.3	15.9
			+ Fit + 60 Cu	61.2	64.5	16.9	19.0	32.1	22.4
			+ Fit + 120 Cu	64.3	64.7	21.3	23.7	38.2	32.1
EEM	3.7	4.86	7.28	5.48	6.63	6.83			
Pr (Fitasa)	0.05	0.05	NS	NS	NS	NS			
Bruce i Sundstøl, 1995	4 porcs en creixement de 40 kg PV	80% civada 15% farina de soja Diferents nivells P MCP:monocalci fosfat Fitasa	MCP	P 49.4b	Ca 60.5ab	Mg 36.5ab	MS 75.5a	PB <sup>9</sup> 82.2ab	FB <sup>10</sup> 47.1
			Dieta base	42.0b	52.1c	28.6b	69.1b	81.4ab	44.8
			Fit	68.8a	69.2a	44.4a	76.4a	84.5a	47.2
			MCP + Fit	66.4a	54.6c	41.5a	72.4ab	79.8b	39.5
			EEM	4.6	2.8	3.8	2.0	1.3	4.9
			Pr	0.01	0.05	0.01	0.01	0.01	NS
Lantzach i Drochner, 1995	30 porcs castrats 16.0 ± 1.3 kg PV	71% ordi 20% farina soja Diferents nivells de ppm de fòsfor Diferents nivells de ppm de calci Fitasa: 1000 U/kg	0.4%P + 0.5% Ca	P *	Ca *				
			0.4%P + 0.5%Ca + Fit	44.3c ± 0.8	42.3c ± 2.5				
			0.4%P + 0.6%Ca + Fit	62.3b ± 2.4	70.0a ± 5.6				
			0.4%P + 0.7%Ca + Fit	65.8ab ± 2.3	65.8a ± 4.0				
			0.4%P + 0.8%Ca + Fit	67.3a ± 4.2	60.2b ± 4.3				
			Pr	64.3ab ± 2.6	58.5b ± 2.7				

\* mitjana ± desviació estàndard per sis animals en cada grup

Taula 2.5b. Efectes de l'addició de fitases en dietes de porcs sobre la digestibilitat de nutrients. (continuació)

Referència	Dades estudi	Tipus dieta i SE	Tractament	Digestibilitat					
				MS	Cendres	MO <sup>11</sup>	PB	P	Ca
Näsi i col., 1995	8 porcs castrats en creixement de 27.8 kg PV	80% ordi 10% farina colza S: 6% sèrum de llet assecat i tractat en remull Fitasa SP: Increment de P per addició de fosfat bicàlcic	SP	79.0	49.3	80.8	77.7	28.2	38.4
			SP + S	80.4	52.4	82.2	77.5	29.4	38.2
			SP + Fit	79.7	51.6	81.5	78.8	28.6	38.1
			SP + W + Fit	80.7	55.4	82.3	78.2	31.0	41.3
			-	80.1	52.1	81.8	78.7	31.8	35.1
			+ S	80.9	54.3	82.5	77.9	34.5	35.0
			+ Fit	80.0	54.4	81.6	79.1	40.2	42.1
			+ W + Fit	81.3	58.1	82.7	79.0	42.8	42.4
			EEM	0.39	0.96	0.37	0.68	1.6	1.7
			Pr (addició fòsfor)	0.05	0.001	NS	NS	0.001	NS
			Pr (remull)	0.001	0.001	0.001	NS	NS	NS
			Pr (Fitasa)	NS	0.001	NS	<0.001	0.001	0.01
Helander i col., 1996	8 porcs castrats	50/75% ordi Pes: 50/25% pesols Fitasa: 1000 U/kg P: addició de fòsfor amb fosfat bicàlcic	250	84.6	86.0	80.7	46.0	38.3	33.0
			250 + Fit	85.5	86.7	82.1	45.0	52.8	43.2
			250 + P	84.4	85.9	80.7	48.2	41.9	48.4
			250 + P + Fit	85.7	87.1	81.4	46.7	41.1	48.4
			500	87.3	88.6	82.9	50.8	41.4	36.4
			500 + Fit	88.1	89.1	84.6	52.5	57.8	44.0
			500 + P	86.8	88.1	82.2	56.2	48.8	52.2
			500 + P + Fit	87.2	88.5	83.5	55.0	48.7	52.6
			EEM	0.40	0.37	0.72	0.98	1.54	1.88
			Pr (pesols)	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.05
			Pr (fosfor)	NS	NS	NS	0.001	0.05	0.001
			Pr (fitasa)	0.01	0.05	0.05	NS	0.001	0.01
Kemme i col., 1997a	112 porquets 32 growing-Finishing porcs 12 mares	20% segó i tercers de blat (amb la fitasa inactivada) 31% moresc 20% tapioca Fitasa: 500 U/kg	Porquets	P	Ca				
			Dieta base	23.0	39.3				
			+ Fit	36.6	43.9				
			EEM	1.21	0.93				
			Pr	<0.001	<0.001				
			Porcs						
			Dieta base	26.0	39.2				
			+ Fit	43.2	43.2				
			EEM	1.51	0.90				
			Pr	0.001	0.022				
			Mares						
			Dieta base	19.4	30.6				
+ Fit	40.9	31.3							
EEM	1.14	2.53							
Pr	<0.001	NS							
Li i col, 1998	12 porcs castrat	58% moresc 32% soja Nivell baix P Fitasa CA: Àcid cítric Vit D <sub>3</sub> : Vitamina D <sub>3</sub>	Dieta base	MS	N	P	P ret	Ca	Ca ret
			+ Fit	86.6b	83.8b	37.9b	0.6c	55.2c	1.8b
			+ Fit+CA	87.9a	84.9ab	53.2a	0.9b	62.8b	2.2a
			+ Fit+Vit D <sub>3</sub>	90.8a	86.1a	55.0a	0.9b	63.3ab	2.2a
			+ Fit+CA+Vit D <sub>3</sub>	88.8a	86.4a	55.4a	1.0b	64.5a	2.4a
			+	89.1a	86.8a	56.9a	0.9b	65.9a	2.3a
			EEM	87.8a	83.0b	56.3a	1.4a	60.9a	2.5a
			Pr	0.09	2.21	0.82	0.02	0.11	0.04
				0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.02
			Valaja i col., 1998	6 mascles castrats 89.2-120.4 kg PV	59% subproducte destil·lació d'ordi 28% midó d'ordi 6% cel lulosa Fitasa: dos nivells de inclusió	Dieta base	P	Ca	MS
+ 250 U Fit	59.3	58.8				83.6	46.4		
+ 500 U Fit	59.7	50.3				82.9	48.7		
EEM	62.1	55.3				83.9	47.0		
Pr	3.87	2.65				0.33	1.71		
	NS	NS				NS	NS		
Kemme i col., 1999b	6 porcs mascles castrats 37 kg PV	86% moresc 11% soja Fitasa: 900 U/kg FS: fitat sòdic AL: 3% àcid làctic	NO AL	Cendres	Ca	Mg			
			+ AL	53.5	45.3	22.7			
			EEM	58.1	54.1	27.7			
			Pr	1.03	1.48	1.71			
			No Fit	0.0001	0.0001	0.01			
			+ Fit	52.2	44.8	22.0			
			EEM	59.5	54.5	28.3			
			Pr	1.03	1.48	1.71			
				0.0001	0.0001	0.002			
			No FS	56.9	49.8	22.3			
			+ FS	54.7	49.5	28.1			
			Pr	1.03	1.48	1.71			
	0.046	NS	0.004						

Taula 2.5b. Efectes de l'addició de fitases en dietes de porcs sobre la digestibilitat de nutrients. (continuació)

Referència	Dades estudi	Tipus dieta i SE	Tractament	Digestibilitat					
				MS	PB	P			
Näsi i col., 1999	8 porcs en creixement 37.2 kg PV	<b>DO:</b> dieta ordi <b>DM:</b> dieta moresc 80% cereal 20% soja Fitasa: 1100 U/kg FA:Fosfatasa àcida en diferents nivells	<b>DO</b>	MS	PB	P			
			Fit + 500 U FA	85.1	84.1	58.6b			
Liu i col., 2000	8 mascles castrats 123 kg PV  Estudi de diferents valors de la relació Ca:P	78/85% moresc 17/11% soja 49 Fitasa: 500 U/kg	1.5:1	21.3	60.4	53.2	57.7	56.4	66.5
			1.3:1	42.5	58.2	53.6	64.2	66.2	70.2
Spencer i col., 2000	20 mascles castrats 20 kg PV	<b>MBF:</b> 78% moresc baix en fitat <b>MN:</b> 78% moresc Normal 19% soja 48 <b>FBC:</b> fosfat bicàlcic	MBF + 0.2% FBC	54.8	51.6	71.3			
			MBF	48.4	49.7	68.5			
Traylor i col., 2001	Porcs castrats de 25 kg PV a l'inici	<b>SBM:</b> farina soja 45% farina moresc 31% soja nu <b>SPC:</b> proteïna soja 46% farina moresc 27% proteïna soja <b>Cas:</b> Caseïna 66% farina moresc 5% cel lulosa 5% caseïna Fitasa: tres nivells	SBM	PB	Ca	P			
			SBM + 500 U Fit	82.5	63.5	49.8			
Zimmermann i col., 2002	76 mascles castrats 16.6 kg PV  Estudi de l'eficàcia de fitasa endògena (FitE) vs microbiana (FitM) en dos tipus de dietes per canvi del cereal de la dieta inactivat per cereal normal	19% cereal avaluat 16% farina tapioca 10% farina soja Fitasa: quatre nivells	<b>DB</b>	P					
			Dieta base	29.0c					
			+ 50 U FitM	40.0bc					
			+ 100 U FitM	50.2ab					
			+ 150 U FitM	50.0ab					
			+ 200 U FitM	54.9a					
			EEM	2.45					
			Pr	0.05					
			Dieta base	29.0					
			+ 50 U FitE	35.6					
			+ 100 U FitE	35.6					
			+ 150 U FitE	37.6					
			+ 200 U FitE	37.0					
			EEM	1.40					
			Pr	NS					
			<b>DS</b>	P					
			Dieta base	28.0d					
			+ 50 U FitM	36.4c					
			+ 100 U FitM	41.2bc					
			+ 150 U FitM	48.5ab					
			+ 200 U FitM	50.9a					
			EEM	2.01					
			Pr	0.05					
			Dieta base	28.0b					
			+ 50 U FitE	30.7b					
			+ 100 U FitE	36.6ab					
			+ 150 U FitE	32.6a					
			+ 200 U FitE	37.2ab					
			EEM	0.97					
			Pr	0.05					

Taula 2.5b. Efectes de l'addició de fitases en dietes de porcs sobre la digestibilitat de nutrients. (continuació)

Referència	Dades estudi	Tipus dieta i SE	Tractament	Digestibilitat		
				Cendres	Ca, mg	P, mg
Zacharias i col., 2003	72 porcs castrats 23.3 kg PV	73% ordi 22% farina soja 3 nivells addició ppm sulfat de coure Fitasa: dos nivells	20 Cu	39.7	336	235
			20 Cu + 250 U Fit	43.5	444	272
			20 Cu + 500 U Fit	43.9	428	277
			80 Cu	41.2	358	239
			80 Cu + 250 U Fit	42.6	412	277
			80 Cu + 500 U Fit	43.4	370	269
			175 Cu	40.9	360	241
			175 Cu + 250 U Fit	41.4	405	262
			175 Cu + 500 U Fit	43.4	376	256
			EEM	0.52	14.9	5.3
			Pr (Cu)	NS	NS	NS
			Pr (fitasa)	<0.001	NS	<0.001
			Pr (Cu x fitasa)	NS	NS	NS
			Zimmermann i col., 2003	30 mascles castrats 16.5 kg PV  Estudi de la suma de l'aport de fitasa de cereal i de microbiana	<b>DB:</b> dieta blat <b>DS:</b> dieta sègol <b>DBS:</b> dieta sègol + blat	<b>DB</b> Dieta base
+ Fit	29.0b					
EEM	46.9a					
44% moresc 19% cereal provat 16% tapioca 10% soja Fitasa: 150 U/kg provinent en parts iguals del cereal i de microbiana	<b>DS</b> Dieta base	3.3				
	+ Fit	0.05				
	EEM	28.0b				
Fitasa: 150 U/kg provinent en parts iguals del cereal i de microbiana	<b>DBS</b> Dieta base	43.0a				
	+ Fit	2.7				
	EEM	0.05				
Fitasa: 150 U/kg provinent en parts iguals del cereal i de microbiana	<b>DBS</b> Dieta base	32.4b				
	+ Fit	38.2a				
	EEM	1.4				
			Pr	0.05		

<sup>1</sup>SE: suplementació enzimàtica; <sup>2</sup>PV: pes viu; <sup>3</sup>Fit: Fitasa; <sup>4</sup>EEM: error estàndard de la mitja; <sup>5</sup>Pr: probabilitat; <sup>6</sup>MS: matèria seca; <sup>7</sup>IP<sub>6</sub>: àcid fític (hexafofat d'inositol); <sup>8</sup>NS: no significatiu; <sup>9</sup>PB: proteïna bruta; <sup>10</sup>FB: fibra bruta; <sup>11</sup>MO: matèria orgànica; <sup>12</sup>CP: control positiu.

La majoria d'estudis revisats utilitzen dietes de moresc com a cereal i soja com a font proteica. La diversitat de resultats observats es deu a la presència en la dieta d'altres components com, per exemple, àcids (Valencia i Chavez, 2002; Omogbenigun i col., 2003); però també, i com a factor molt important en els estudis, la diferent quantitat de fòsfor en la dieta, tant fòsfor total com no fític, (Cromwell i col., 1995; Harper i col., 1997; Han i col., 1998). S'han anat introduint en la dieta altres cereals, que tenen una major activitat endògena, amb una disminució de la quantitat de fosfat a afegir en el pinso; utilitzant-se cereals com el blat (Paboeuf i col., 2002; Selle i col., 2003), o subproductes com el segó (Zimmermann i col., 2002, 2003).

Un altre aspecte important dels estudis de fòsfor és establir l'estimació de les necessitats d'aquest mineral basant-se en la quantitat de fòsfor digerible (Jongbloed i Kemme, 1998). El requeriment de fòsfor no fític en el porc depèn del pes que l'animal té, però també té en compte que la relació Ca:FNF estigui dins els nivells recomanats. Les dades de requeriment es presenten en la Taula 2.6 (NRC 1998). Alguns estudis revisats han determinat la quantitat de fitasa exògena necessària per a

Taula 2.5c. Efectes de l'addició de fitasa en dietes de porcs sobre els paràmetres productius i la digestibilitat de nutrients.

				Resultats productius		Digestibilitat	
				GMD <sup>5</sup> *	IC <sup>7</sup> *	P *	Ca *
Pointillart i col., 1987	12 porcs 3 mesos 27,8 kg PV <sup>2</sup> Estudi activitat fitàsica endògena	DT: dieta tritocale 80% tritocale 7,5% proteïna soja DM: dieta moresc 89% moresc 9,2% proteïna soja	DT DM Pr <sup>4</sup>	710 ± 20 640 ± 20 0,05	2,44 ± 0,06 2,70 ± 0,06 0,05	60 ± 2 47 ± 3 0,05	45 ± 2 41 ± 3 NS <sup>9</sup>
Pointillart, 1991	12 porcs de 11,8 kg de PV	: dieta control  : dieta segó rica	DC DS EEM <sup>3</sup> Pr	GMD 550 590 0,02 NS	IC 2,33 2,17 0,02 NS	P 36b 55a 4 0,01	Ca 50 53 2 NS
Beers i Jongbloed, 1992	384 porquets 11-25 kg PV	41% moresc 28% ordi 5% farina soja 6% llavor soja Fitasa: 1450 U/kg	14	GMD 424c 469b 456b 529a 15,6 0,05	CMD 695c 739b 735b 802a 16,3 0,05	P 39,1d 44,6c 49,5b 60,1a 1,31 0,05	Ca 63,2a 58,6b 55,6b 61,6a 1,16 0,05
Adeola i col., 1995	48 porcs: 24 truges joves i 24 porcs castrats. Pes inici: 9,4 kg	68% moresc 28% soja 48 Zn: addició de sulfat de zinc Fitasa: 1500 U/kg		GM <sup>5</sup> 257 412 333 405 26 NS 0,05	CMD 802 905 913 1009 54 NS NS	P ret <sup>11</sup> 3,0 3,3 3,0 3,1 0,12 NS 0,05	Ca ret 4,0 4,3 3,9 4,9 0,11 NS 0,05
Komegay i Qian, 1996	96 porcs joves 7,8 kg PV	72% moresc groc 25% soja 48 Fitasa: varis nivells Addició de fosfat defluorinat per a tenir diferents nivells de FNF	0,7% FNF 0,7% FNF+ 350U Fit 0,7% FNF+ 700U Fit 0,7% FNF+ 1050U Fit 1,6% FNF 1,6% FNF+ 350U Fit 1,6% FNF+ 700U Fit 1,6% FNF+ 1050U Fit 1,6% FNF+ 1400U Fit 3,2% FNF+ 1400U Fit EEM Pr (fosfor) Pr (fitasa) Pr (fosfor x fitasa)	GMD 244 282 300 338 337 256 328 387 357 386 327 368 24,1 0,01 0,01 NS	IC 2,16 2,01 2,04 1,89 1,93 2,13 1,91 1,82 1,72 1,60 1,82 1,78 0,150 NS NS NS	MS 87,9 86,8 87,1 87,2 87,4 87,6 86,7 86,5 86,8 86,2 86,1 87,1 0,43 NS NS NS	Ca 72,1 77,3 77,5 79,6 83,9 72,9 74,8 78,1 76,9 77,8 74,6 76,8 1,68 NS NS NS

Taula 2.5c. Efectes de l'addició de fitasa en dietes de porcs sobre els paràmetres productius i la digestibilitat de nutrients. (continuació)

Qian i col., 1996	1	Resultats productius				Digestibilitat		
		GMD	CMD	IC	MS	P	Ca	N
96 porcs entre mascles i femelles Estudi de l'efecte de varies relacions Ca:P en la dieta amb dos nivells de FNF en la dieta	73% morenc	488	913	1.88	86.1	53.4	76.0	
	25% soja 48	428	880	2.05	86.4	49.2	74.5	
	Fitasa: dos nivells	396	829	2.09	86.5	44.4	70.4	
	Ca:P: tres nivells	486	871	1.79	84.5	57.2	77.4	
	Fosfat defluorinat	458	865	1.89	85.9	57.9	76.0	
	1:2:1 Ca:P (0.07%FNF)	419	809	1.93	86.4	54.5	73.6	
	1:6:1 Ca:P (0.16%FNF)	504	893	1.77	85.2	55.9	75.8	
	1:2:1 Ca:P (0.07%FNF)	455	870	1.89	86.1	52.8	74.0	
	1:6:1 Ca:P (0.07%FNF)	376	732	1.89	86.5	49.4	73.0	
	1:2:1 Ca:P (0.16%FNF)	500	922	1.83	85.4	61.2	76.5	
	1:6:1 Ca:P (0.16%FNF)	435	865	2.25	85.6	60.1	76.9	
	1:2:1 Ca:P (0.07%FNF)	27	40	0.026	85.6	55.6	72.9	
	EEM	0.001	0.01	0.05	0.4	1.4	1.7	
Pr (Ca:P)	NS	NS	NS	0.01	0.001	0.001		
Pr (Fitasa)	NS	NS	NS	NS	0.05	NS		
Pr (fòsfor inorg.)	NS	NS	NS	NS	0.001	NS		
Yi i col., 1996		GMD	CMD	IC	MS	P	Ca	
96 porcs: 48 truges i 48 mascles castrats	34% soja 48	297	630	2.12	91.9	35.4	69.6	
	29% farina morenc	315	631	2.00	91.6	38.8	67.9	
	25% dextrosa	342	654	1.91	90.9	41.7	67.3	
	Fitasa: varis nivells	351	670	1.91	91.3	44.1	71.2	
	3 nivells de FNF	308	613	1.99	90.9	42.3	68.0	
	U Fit	367	724	1.97	90.8	47.4	69.8	
		365	703	1.93	91.8	53.3	75.9	
		400	757	1.89	91.1	52.2	73.5	
		406	764	1.88	90.6	50.0	69.4	
		423	739	1.75	90.2	54.5	73.6	
		446	754	1.89	90.4	61.8	74.1	
		17	33	0.014	0.26	1.64	2.24	
		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	NS	
	0.01	0.01	NS	NS	0.01	NS		
	NS	0.05	NS	0.01	NS	NS		
Han i col., 1997		GMD	CMD	IC	P	Ca	N	
48 porcs Estudi comparatiu de l'acció fitasa cereal i microbiana	-75% morenc	408b	1436	3.51	52.1bc	54.2a	71.9b	
	-21% farina soja	537a	1717	3.20	66.1a	56.0a	74.3ab	
	+ Fit	529a	1663	3.10	59.4ab	61.6a	79.4a	
	+ CE	564a	1764	3.13	47.0c	41.9b	75.5ab	
	+ 1.7% FBc	35	110	0.020	3.6	3.4	1.7	
	: addició de 10- EEM	0.02	NS	NS	0.01	0.01	0.03	
	Pr							
a vegetal								

Taula 2.5c. Efectes de l'addició de fitasa en dietes de porcs sobre els paràmetres productius i la digestibilitat de nutrients. (continuació)

	i	Resultats productius					Digestibilitat								
		GMD	CMD	IC	P	Ca	MS	Ca	MS	Ca	MS				
Harper i col., 1997	189 porcs entre mascles castrats i truges joves	66/69% morenc 29/24% soja 48 Fitasa: dos nivells	16 17	+ 500 U Fit	GMD	866a	2141a	2.47a	48.5a	64.4	87.8				
					CMD	1814b	2.55b	38.0b	63.2	88.5					
	140 porcs 29.5 kg PV	77/82% morenc 21/16% soja 44 Fitasa: tres nivells Diferents nivells de P per addició de fosfat monocalcic			GMD	876	2869	3.26	28.7	58.5	86.1				
					CMD	928	2923	3.14	33.9	57.6	86.0				
Kempe i col., 1997	96 mares	: dieta Holanda : morenc-soja	DH DH + Fit DMS DMS + Fit EEM Pr		GMD	934	3056	3.22	39.5	57.7	85.2				
					CMD	917	2948	3.22	32.6	57.1	85.8				
O'Quinn i col., 1997	72 porcs 45-55 kg PV	75-80% sorgo 23-19% soja Fitasa: dos nivells			GMD	929	2898	3.12	37.4	60.0	86.0				
					CMD	936	2957	3.14	41.3	57.2	85.5				
Liu i col., 1998		78/85% morenc 17/11% soja 49 Fitasa: 500 U/kg	Ca:P (CP)		GMD	37	137	0.012	6.2	4.4	1.0				
					CMD	0.01	0.01	0.01	0.001	NS	0.001	NS	0.001	NS	
					GMD	0.01	NS	NS	0.001	NS	NS				
					CMD	0.01	NS	NS	0.001	NS	NS				
					GMD	4930	4830	4700	4820	78	0.044				
					CMD	4830	4700	4820	78	0.044					
					GMD	970	3320	3.42	47.2	61.0	92.1				
					CMD	910	3210	3.53	60.8	70.8	92.5				
					GMD	980	3290	3.36	62.8	71.3	92.8				
					CMD	1000	3380	3.38	0.94	1.49	0.22				
					GMD	24	65	0.005	<0.01	<0.01	NS				
					CMD	0.01	0.04	NS	<0.01	<0.01	NS				
					GMD	887	2823	3.17	43.2	61.4	87.5				
					CMD	899	2787	3.10	45.5	62.3	87.3				
					GMD	928	2912	3.13	35.6	53.6	86.6				
					CMD	931	2959	3.16	1.4	1.3	0.4				
					GMD	16	52	0.004	NS	0.01	NS				
					CMD	NS	NS	NS	NS	0.01	NS				

Taula 2.5c. Efectes de l'addició de fitasa en dietes de porcs sobre els paràmetres productius i la digestibilitat de nutrients. (continuació)

	a i SE <sup>1</sup>	Resultats productius				Digestibilitat										
		GMD	CMD	IC	P	MS	MO	Cendres	Ca	Mg	P	MS	MO	Ca	Mg	P
Roberson, 1999	213 porcs. Prova realitzada en 2 fases Fitasa: 1200U/kg	GMD	418	968	2.29	57.6b	53.1b									
		CMD	439	944	2.15	68.1b	66.2a									
	59/ 62% morenc 21/ 26% soja 48 10/ 5 % sèrum sec Fitasa: 500 U/kg	GMD	456	950	2.07	71.1a	60.1b									
		CMD	439	962	2.19	66.8b	56.4b									
Jongbloed i col., 2000	192 porcs de 22 a 45 kg PV	GMD	9	8	0.011	2.3	2.2									
		CMD	NS	NS	NS	0.036	0.033									
Grandhi, 2001	72 porcs castrats i 72 truques joves	GMD	561a	997	1.78	46.8	39.4									
		CMD	481b	867	1.80	50.8	44.4									
Sands i col., 2001	Porcs destetats a 21d	GMD	545a	938	1.72	54.0	42.7									
		CMD	453b	843	1.83	45.9	39.3									
Valencia i Chavez, 2002	100 porcs destetats a 21 d	GMD	454b	903	1.98	48.4	42.1									
		CMD	12	39	0.025	2.8	4.0									
Grandhi, 2001	72 porcs castrats i 72 truques joves	GMD	691c	1690b	2.46a	81.8c	84.0b	45.6d	47.1d	22.9b	25.0e					
		CMD	758b	1769ab	2.34ab	82.5b	84.5ab	49.2c	53.5d	25.3ab	29.9d					
Sands i col., 2001	Porcs destetats a 21d	GMD	772b	1743ab	2.28bcd	82.0e	83.9b	50.1c	55.8d	23.9a	41.5c					
		CMD	836a	1792ab	2.15cd	82.5b	84.3ab	53.9b	59.1b	23.6b	45.7b					
Valencia i Chavez, 2002	100 porcs destetats a 21 d	GMD	874a	1861a	2.14a	83.3a	84.9a	56.3a	62.0a	27.0a	51.3a					
		CMD	32.9	130	0.118	0.338	0.315	1.28	1.86	2.01	2.17					
Grandhi, 2001	72 porcs castrats i 72 truques joves	GMD	<0.001	0.040	<0.001	0.015	NS	0.001	0.001	NS	0.001					
		CMD	<0.001	NS	NS	0.001	NS	NS	0.001	0.001	NS	0.001				
Sands i col., 2001	Porcs destetats a 21d	GMD	491	918	1.832	91.0	89.9	68.0								
		CMD	517	896	1.721	90.2	88.7	72.3								
Valencia i Chavez, 2002	100 porcs destetats a 21 d	GMD	430	854	1.969	91.1	90.4	58.5								
		CMD	482	923	1.887	92.1	91.4	64.2								
Grandhi, 2001	72 porcs castrats i 72 truques joves	GMD	60	150	0.06	1.82	2.17	10.2								
		CMD	0.05	NS	0.05	NS	NS	NS	0.05	NS	NS					
Sands i col., 2001	Porcs destetats a 21d	GMD	0.01	NS	NS	NS	NS	NS								
		CMD	NS	NS	NS	NS	NS	NS								
Valencia i Chavez, 2002	100 porcs destetats a 21 d	GMD	289	479	1.70	48.0	55.9	20.2	-0.7	-3.7	-11.4					
		CMD	229	501	2.29	41.5	55.5	26.6	5.6	3.4	0.4					
Grandhi, 2001	72 porcs castrats i 72 truques joves	GMD	296	508	1.72	60.2	62.3	20.3	-0.7	-3.7	-11.4					
		CMD	350	530	1.52	66.2	69.2	29.7	16.4	8.3	2.8					
Sands i col., 2001	Porcs destetats a 21d	GMD	313	502	1.62	58.3	58.9	30.2	12.3	6.9	-3.8					
		CMD	14.9	23.3	0.07	1.59	1.95	3.27	2.52	2.16	1.87					

<sup>#</sup>: ACP: morenc amb alt contingut en fòsfor; NML: morenc normal

Taula 2.5c. Efectes de l'addició de fitasa en dietes de porcs sobre els paràmetres productius i la digestibilitat de nutrients. (continuació)

	1	Resultats productius				Digestibilitat		
		GMD	CMD	IC	MS	P	Hidrolisi FF <sup>15</sup> en fleum	
Omogbenigun i col., 2003	35-50% morenc 23/27% soja 48 Fitasa AO:Acid Orgànic							
Torrallardona i col., 2003	32 mascles i 32 femelles 24 kg PV  farina gira-sol 750 U/kg  cic,							

SE: suplementació enzimàtica; <sup>2</sup>PV: pes viu; <sup>3</sup>EEM: error estàndard de la mitja; <sup>4</sup>Pr: probabilitat; <sup>5</sup>GMD: guany mig (g); <sup>6</sup>CMD: consum mig (g); <sup>7</sup>IC: índex de conversió (g/g); <sup>8</sup>sèr: sèrum (mg/dl); <sup>9</sup>NS: no

<sup>10</sup>MS: matèria seca; <sup>11</sup>Ret: retenció (P i Ca en g/d; Mg, Zn, Cu, Mn en mg/d); <sup>12</sup>MO: matèria orgànica; <sup>13</sup>ED: energia digestible; <sup>14</sup>Fit: Fitasa; <sup>15</sup>FF: fòsfor fitic; <sup>16</sup>CP: control positiu; <sup>17</sup>CN: control

suplir el fòsfor no fític, i per tant, disminuir la seva concentració en la dieta, sense que hagi perjudici per l'animal. Pointillart (1991), en estudis de garrins menjant una dieta de moresc i segó de sègol, va establir que 1200 U/kg de fitasa de segó podrien reemplaçar tot el fòsfor no fític de la dieta. Kornegay i Qian (1996), en un estudi de garrins que consumiren dieta de moresc i soja, descrigueren que 246 U/kg de fitasa poden reemplaçar 0.1% FNF. O'Quinn i col. (1997) en un estudi de creixement per a porcs i dietes de sorgo i soja, observaren que 300 U/kg de fitasa podrien reemplaçar tot el fòsfor no fític. Finalment, Roberson (1999) estudiant garrins que menjaren dietes de moresc i soja, descrigué que 500 U/kg de fitasa a la dieta poden reemplaçar 0.1% FNF.

Taula 2.6. Requeriments en la dieta de fòsfor no fític i relació Ca:P per varies classes de porcs. (NRC 1988)

Classe de porc	Requeriment de FNF (%)	Relació Ca:FNF recomanable
3 - 5 kg	0.55	1.6:1
5 - 10 kg	0.40	2:1
10 - 20 kg	0.32	2.2:1
20 - 50 kg	0.23	2.6:1
50 - 80 kg	0.19	2.6:1
80 - 100 kg	0.15	3:1

## **2.5. Cereals**

Per poder fer un ús més òptim del grans de cereal es requereix tenir un bon coneixement de les seves estructures i composicions. Les implicacions pràctiques de l'estructura de la llavor són nombroses, i estan relacionades amb les diverses fases de la producció del gra, collita, emmagatzematge i el seu ús. La composició química dels diferents grans de cereal varia de manera àmplia, influenciada per la genètica, el sòl i els factors climàtics i culturals. Les diferents variacions es troben en les quantitats relatives de proteïna, carbohidrats, lípids, vitamines, minerals i pigments.

La composició, la química i els aspectes de processament són àrees d'interès científic fonamentals per assolir una producció millor d'aliment per a animals o humans.

Fins no fa gaire en l'alimentació avícola del nostre país s'utilitzava quasi de manera exclusiva el morenc. Però l'ús d'aquest cereal porta implícits alguns inconvenients (com ara el fet que s'ha d'importar, encarint-ne el producte, i la política de la Unió Europea), i en els darrers anys s'està canviant la metodologia de treball a seguir, augmentant la quantitat de cereals que són més propis d'Espanya, com l'ordi i el blat. Els cereals aporten energia als animals que els consumeixen, i per això són un dels components bàsics de les dietes. A més, d'aquesta aportació energètica, són importants els enzims endògens presents, però també es caracteritzen per la presència de factors antinutritius, com per exemple el mateix fitat.

### **2.5.1. Morenc.**

El morenc (*Zea mays*) és, per bastant, el gra de cereal més gran d'entre els més comuns, tenint un pes de 250-350 mg (Hoseney, 1994). El gra de morenc està compost de quatre principals parts:

- a) la coberta o segó (format pel pericarp i la coberta protectora del gra), constituint entre el 5 i el 6% del gra;
- b) el germen i l'embrió, és relativament gran, essent entre el 10 i el 14% del gra;
- c) l'endosperma, que és el dipòsit de nutrients que donen suport a la germinació. És la fracció més gran de les que formen el gra. Compost per midó, que és l'aportació d'energia del gra. Les cèl·lules d'endosperma estan compactades amb grànuls de midó encaixats en una matriu de proteïnes amorfes. També hi ha cossos proteics encaixats en aquesta matriu.
- d) el 'tip cap', punt de unió amb la panotxa.

El gra de morenc més emprat presenta la següent composició típica: 72% de midó (24% d'amilosa i 76% d'amilopectina), 10% de proteïna, 4% de greix, 10% de fibra, 3% de sucres i 1% de cendres (Johnson, 1991). El gra de morenc també conté minerals, essent el potassi (0.37%), el fòsfor (0.29%) i el magnesi (0.14%) els que estan en major concentració.

### 2.5.2. Blat.

El gra de blat (*Triticum aestivum*) presenta de mitjana una llargada de 8 mm i un pes de 35 mg. La mida del gra varia àmpliament depenent de la collita i la seva localització (Hoseney, 1994). Les parts del gra de blat són:

- a) Les cobertes que protegeixen el germen i l'endosperma o albumen. Presenta diferents capes, que des de l'exterior a l'interior són:
  - a) Pericarpi del fruit, que prové de cèl·lules dels teixits de l'ovari de la planta mare i format per epicarpi, mesocarpi i endocarpi.
  - b) Tegument seminal o testa.
  - c) Tegument miscel·lar o banda hialina.
- b) Endosperma o albumen, la primera capa de la qual és l'aleurona o base proteica, degut a la seva riquesa en reserves nitrogenades. La resta és albumen farinaci, format de midó i també de reserves proteiques. Les cèl·lules de la paret d'endosperma estan formades per pentosans, altres hemicel·luloses i  $\beta$ -glucans, però no cel·lulosa.
- c) Germen o embrió, situat en la part inferior de la cara dorsal del gra, essent el 2.5-3.5% del gra. El germen té dos parts principals, l'eix embriònic i l'scutellum, que funciona com a òrgan d'emmagatzematge. El germen és relativament alt en proteïna (25%), sucres (18%), oli i cendres (5%). No conté midó.

La composició de nutrients del gra de blat és la següent: 12% de proteïna, 2% de lípids, 59% de midó, 2% de sucres reductors, 7% de pentosans, 2% de cel·lulosa, 2% de cendres i amb un 14% de contingut d'humitat (Mattern, 1991).

### 2.5.3. Ordi.

Estructuralment, es poden distingir les següents parts en el gra d'ordi (*Hordeum vulgare*) (Pérez-Vendrell, 1992):

- a) les cobertes, que representen el 13% de la matèria seca del gra. Les cobertes són molt pobres en proteïnes, però riques en cel·lulosa, hemicel·lulosa i lignina. Quasi tota la lignina del gra

es troba a les cobertes i això fa que aquestes presentin parets cel·lulars rígides i difícils de diferir malgrat ser triturades.

- b) el pericarpí;
- c) la testa;
- d) l'aleurona. Les cèl·lules de l'aleurona són les productores dels enzims (amilases,  $\beta$ -glucanases, proteases, etc.), que són necessaris per a la germinació i futur creixement del gra. Aquestes cèl·lules presenten parets molt primes, i formades bàsicament d'arabinoxilans i cel·lulosa, mentre que a l'interior de les cèl·lules es concentren les proteïnes, i el fòsfor en forma d'àcid fític. L'aleurona de l'ordi està constituïda per dos o tres capes de cèl·lules, que són d'una gran importància, i que signifiquen el 7% de la matèria seca del gra, el 13% del contingut total de proteïna, i és on es troben la majoria d'aminoàcids essencials, junt amb una part del greix i dels sucres lliures del gra.
- e) l'endosperma, és la fracció més important, representant el 76% del pes sec total del gra. L'endosperma es compon principalment de midó (75-85%) i de proteïnes de reserva (hordèines i glutenines). Les parets cel·lulars dins d'aquesta capa són més primes que les de les altres fraccions i es componen bàsicament de  $\beta$ -glucans [ $\beta(1,3)$ -(1,4)-D-glucans], que formen el 70-75% de les parets. A l'endosperma no es troba ni cel·lulosa ni lignina, i en conseqüència, tant la proteïna com l'energia aportada pel midó, són més disponibles. Però alhora, les proteïnes de reserva són pobres en aminoàcids essencials (lisina, metionina i treonina), la qual cosa implica un valor biològic inferior al del gra d'ordi sencer.
- f) l'embrió o germen, forma el 3% de la composició del gra. El germen és una fracció molt rica en greix i fòsfor.

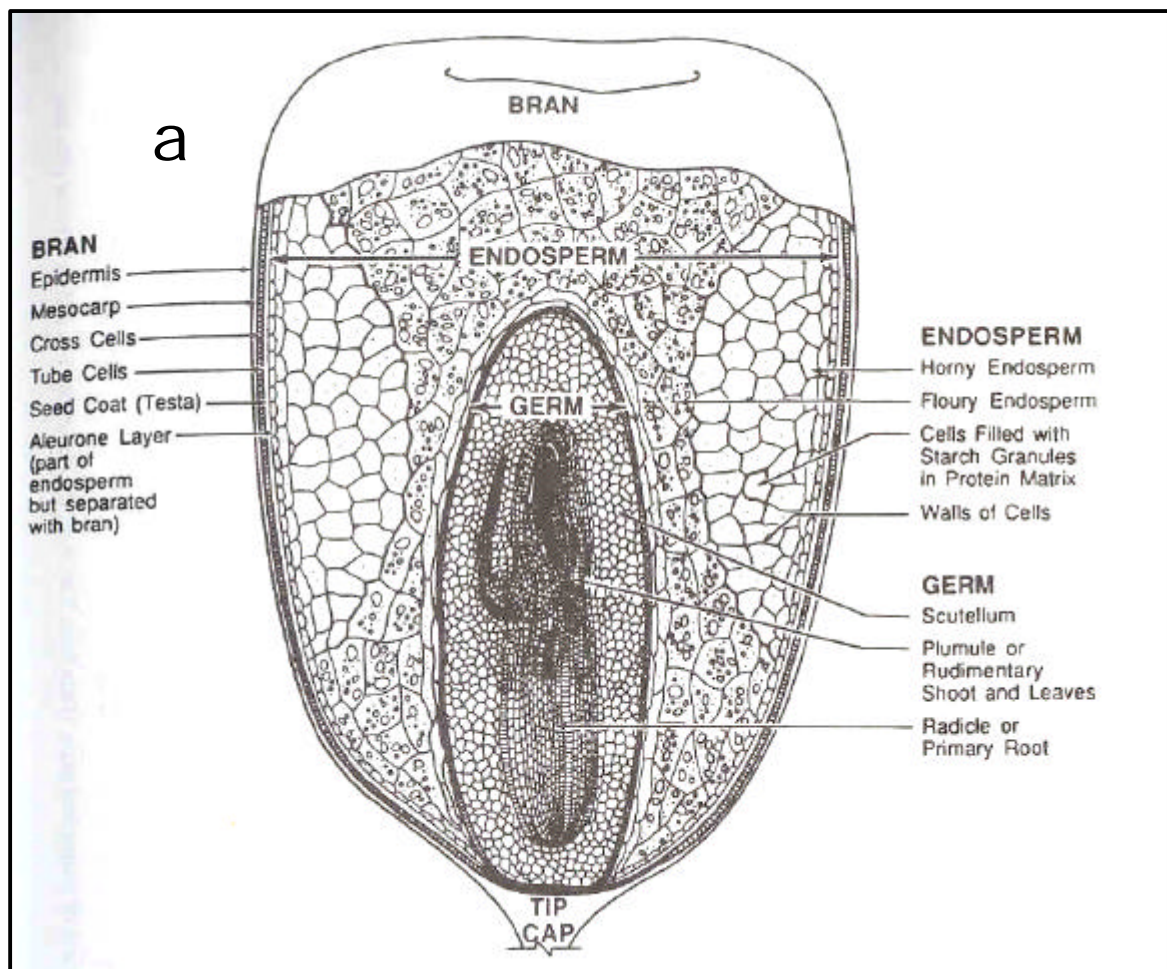
El pericarpí i l'aleurona formen el 7-8% del gra. El pericarpí i la testa, són de composició molt semblant a la de les cobertes però sense la presència de la lignina. Tant en la testa com en l'aleurona es troben concentrats els polifenols, formant complexos amb les proteïnes, que fan que aquestes siguin poc digestibles.

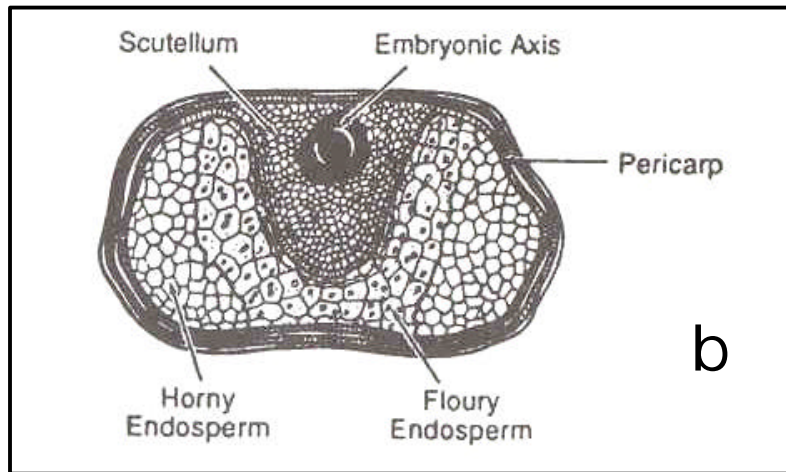
Els valors, en mitjana, de la composició de nutrients d'algunes classes d'ordi són: 13% de proteïna, 5% de fibra, 2% d'extracte eteri. Les quantitats de minerals en el gra d'ordi és bastant desigual, amb els següents minerals presents amb una concentració més gran: 0.56% de fòsfor, 0.51% de potassi, 0.14% de magnesi, i 0.04% de calci (Hockett, 1991).

En la Figura 2.10 es poden observar unes representacions dels grans dels tres cereals descrits anteriorment [a) moresc, b) blat, i c) ordi]. Per altra banda, la concentració de fòsfor fític i l'activitat fitàsica dels cereals es pot veure en les Taula 2.1 i Taula 2.3, respectivament.

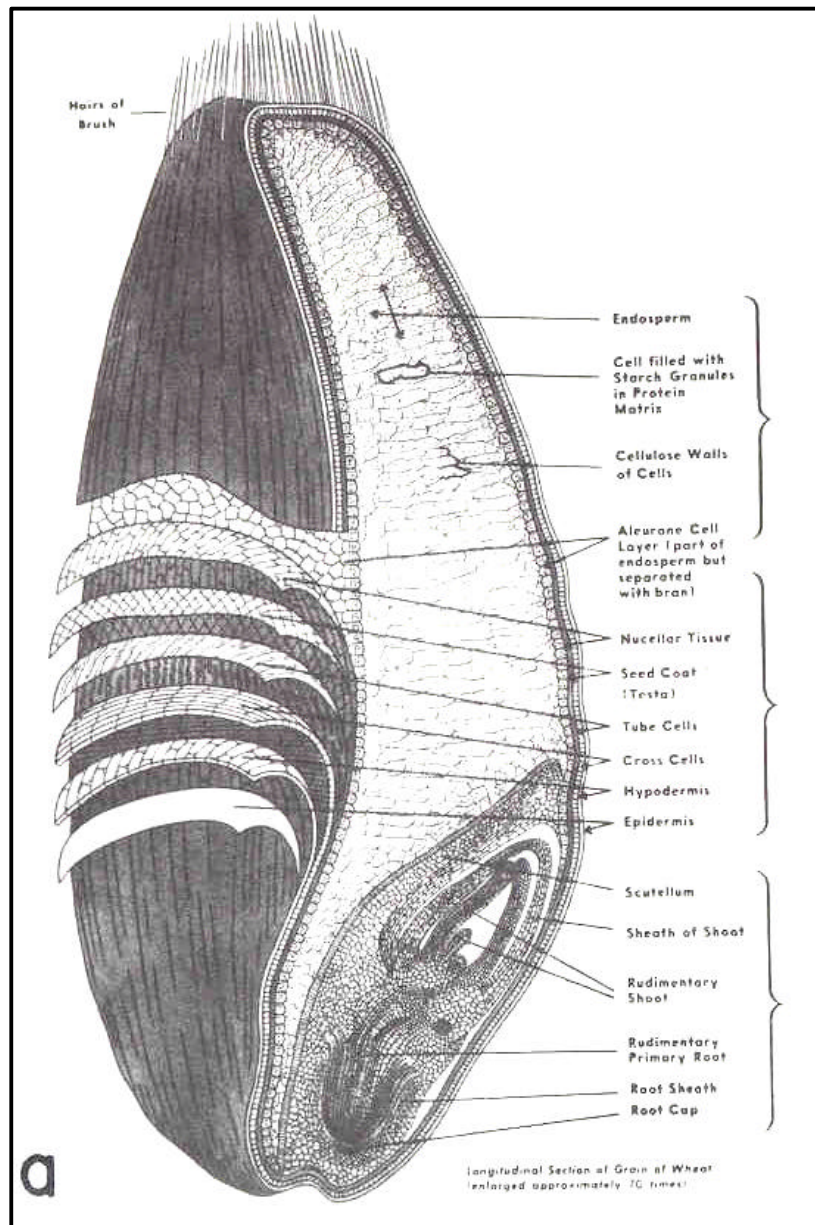
Figura 2.10. Representació esquemàtica dels grans dels cereals emprats en la prova: 10.1) moresc (a, tall longitudinal; b, tall transversal), 10.2 blat (a, tall longitudinal; b, tall transversal) i 10.3 ordi. (Lorenz i Kulp, 1991).

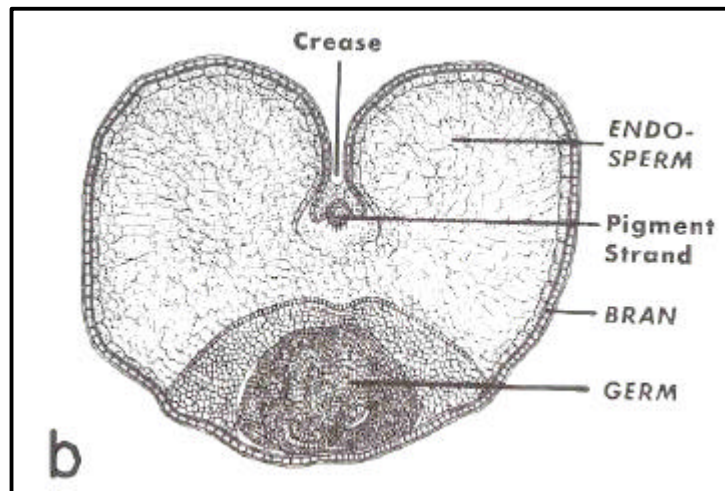
10.1 moresc



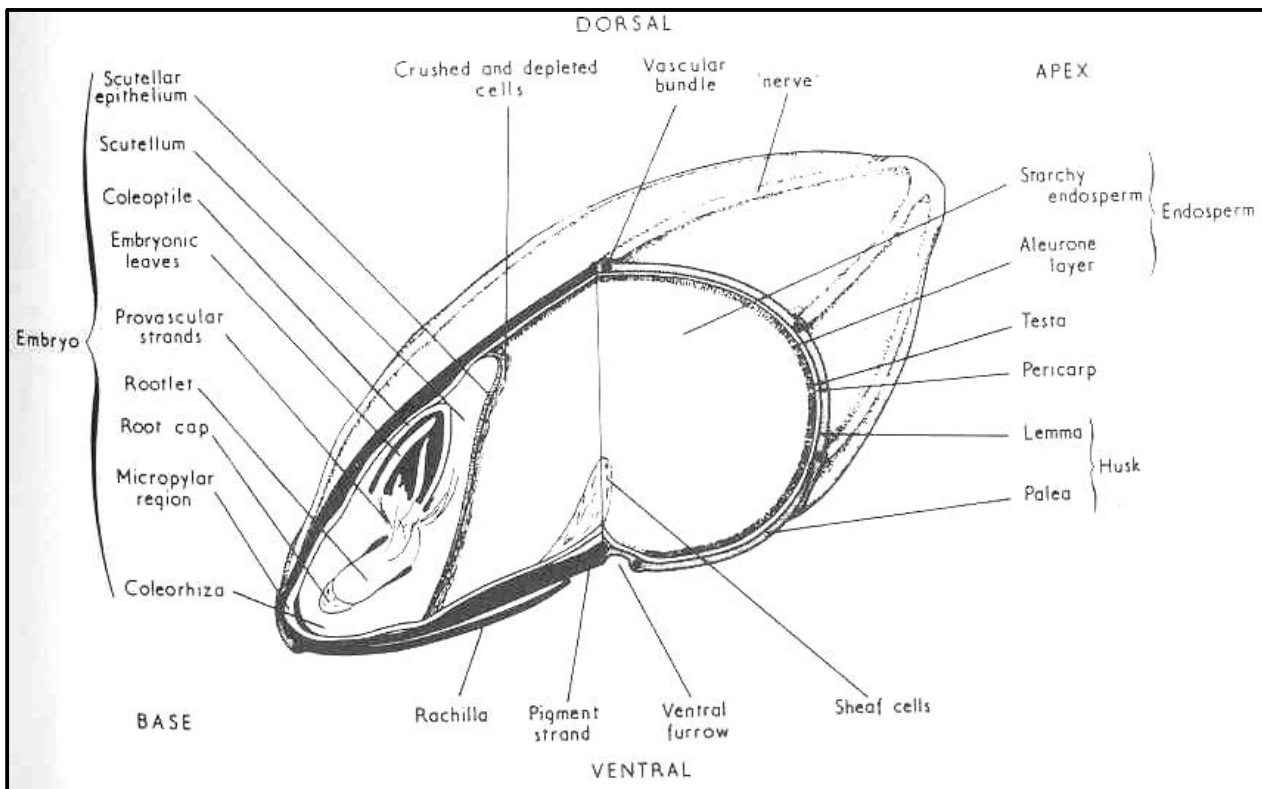


10.2 blat





10.3 ordi

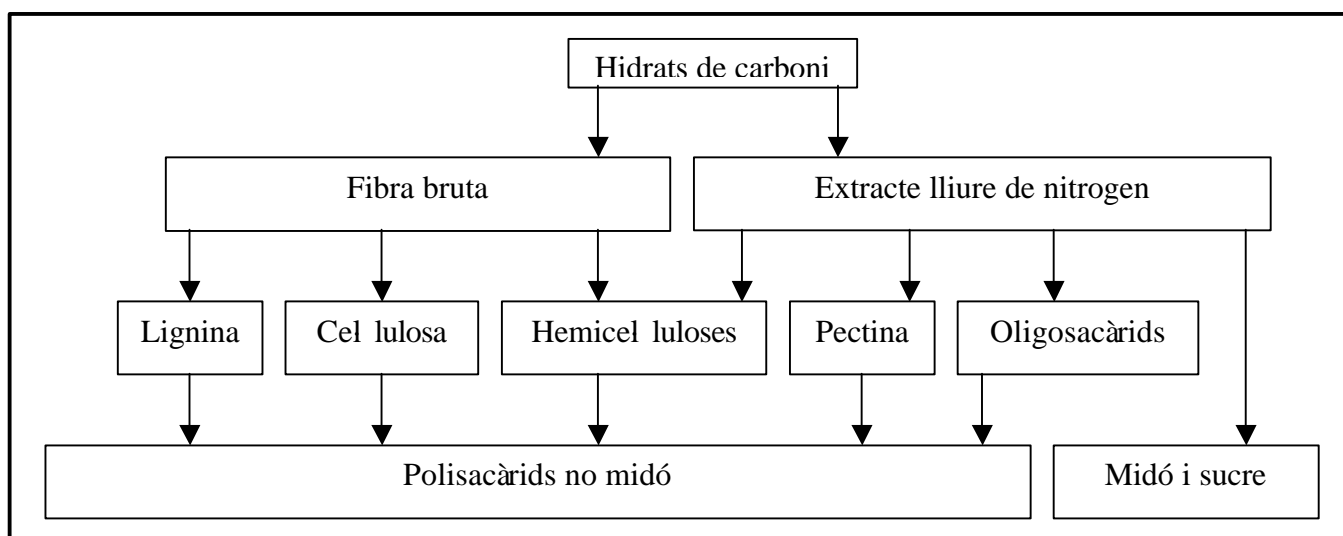


## **2.6. Polisacàrids no amilacis (PNA) i enzims degradadors**

Els hidrats de carboni són els components principals de les matèries primeres d'origen vegetal dels pinsos per a animals monogàstrics, constituint més del 70% de la matèria seca (Figura 2.11). Una bona part d'aquests hidrats és el midó, entre el 50 i el 70%, mentre que un 10-15% corresponen als

polisacàrids no amilacis, els quals estan compostos d'una fracció soluble i una altra insoluble, aquesta última denominada, a pH 7, fibra neutre detergent (FND). La fracció soluble conté pectina, part d'hemicel·luloses i oligosacàrids (glucosa, fructosa, galactosa). La fracció insoluble dels PNA comprèn cel·lulosa (llargues cadenes de  $\beta$ -1,4-D-glucosa) i hemicel·luloses en gran part. Aquestes hemicel·luloses estan constituïdes per heteropolisacàrids formats per entre dos i quatre monosacàrids en una estructura ramificada. Els monosacàrids principals són pentoses (xilosa, arabinosa), però també se'n troben presents hexoses (galactosa, manosa i glucosa) (Bakker i col., 1998). La fracció hemicel·lulòsica més representativa del blat, triticale i sègol són els arabinoxilans. Estan compostos per una cadena principal de  $\beta$ -1,4-xilopiranososa lligada a residus d'arabinofuranosa en posicions 1-2 i 1-3. Per altra banda, la més representativa de l'ordi són els  $\beta$ -glucans, que són cadenes de glucosa amb enllaços  $\beta$ (1,4) i  $\beta$ (1,3).

Figura 2.11. Classificació dels carbohidrats (Brenes i col., 2002)



La presència d'arabinosa en els arabinoxilans (pentosans) i els enllaços periòdics  $\beta$ (1,3) en els  $\beta$ -glucans impedeixen la creació de ponts d'enllaços inter- i intramoleculars en les cadenes, i augmenta així la seva solubilitat, capacitat de retenció d'aigua i la seva viscositat (Classen, 1997).

### 2.6.1. *b*-Glucans.

Els  $\beta$ -glucans constitueixen la classe més abundant de polisacàrids degut a l'àmplia presència de la cel·lulosa ( $\beta$ -1,4-glucà). Tanmateix, alguns altres  $\beta$ -glucans són produïts tant per fonts microbiana com no microbiana (plantes) (Marquardt, 1997). Els  $\beta$ -glucans són homopolímers de D-glucosa units en configuració  $\beta$ . Algunes molècules són relativament senzilles amb una cadena lineal de residus glicosil units per enllaços simples; altres consisteixen en una varietat d'enllaços tant en cadenes lineals com ramificats. Els grups d'enllaç presents en les molècules són  $\beta(1,4)$ ;  $\beta(1,3)$ ;  $\beta(1,6)$ ;  $\beta(1,3)$  i  $\beta(1,6)$ ;  $\beta(1,3)$  i  $\beta(1,4)$ ;  $\beta(1,2)$  i  $\beta(1,4)$ .

Taula 2.7. Nomenclatura i acció dels enzims degradadors de  $\beta$ -glucans (extreta de Marquardt, 1997).

Codi	Nom comú	Nom sistemàtic	Acció
3.2.1.4	Cel·lulasa	1,4-(1,3;1,4)- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohidrolasa	Endohidròlisi d'enllaços 1,4 en cel·lulosa i $\beta$ -D-glucans contenint enllaços 1,3 i 1,4.
3.2.1.6	Laminarinasa	1,4-(1,3;1,4)- $\beta$ -D-glucan 3(4) glucanohidrolasa	Endohidròlisi d'enllaços 1,3 o 1,4 en $\beta$ -D-glucans, quan el residu de glucosa, el grup reductor del qual està implicat en l'enllaç a hidrolitzar, és substituït per si mateix en el C-3.
3.2.1.21	$\beta$ -Glucosidasa	$\beta$ -D-glucosidasa glucohidrolasa	Hidròlisi de residus $\beta$ -D-glucosil no reductors terminals, amb l'alliberament de $\beta$ -D-glucosa.
3.2.1.39	Endo-1,3- $\beta$ -glucanasa	1,3- $\beta$ -D-glucan glucanohidrolasa	Endohidròlisi d'enllaços 1,3 en 1,3- $\beta$ -D-glucans.
3.2.1.58	Exo-1,3- $\beta$ -glucanasa	1,3- $\beta$ -D-glucan glucanohidrolasa	Exohidròlisi d'enllaços 1,3 en 1,3- $\beta$ -D-glucans, amb alliberament d' $\alpha$ -glucosa.
3.2.1.71	Endo-1,2- $\beta$ -glucanasa	1,2- $\beta$ -D-glucan glucanohidrolasa	Endohidròlisi d'enllaços 1,2 en 1,2- $\beta$ -D-glucans.
3.2.1.74	Exo-1,4- $\beta$ -glucanasa	1,4- $\beta$ -D-glucan glucanohidrolasa	Exohidròlisi d'enllaços 1,4 en 1,4- $\beta$ -D-glucans.
3.2.1.75	Endo-1,6- $\beta$ -glucanasa	1,6- $\beta$ -D-glucan glucanohidrolasa	Endohidròlisi d'enllaços 1,6 en 1,6- $\beta$ -D-glucans.

La producció d'enzims degradadors de  $\beta$ -glucans és una característica pròpia d'organismes, encara que els fongs són els productors més comuns d'aquests enzims. Els enzims que hidrolitzen  $\beta$ -glucans es classifiquen segons el tipus d'enllaç  $\beta$ -glucosídic que trenquen i el seu mecanisme d'atac al substrat. En la Taula 2.7 es presenta un llistat dels diferents enzims degradadors de  $\beta$ -glucans. S'ha vist que la hidròlisi parcial dels  $\beta$ -glucans, particularment la forma endo- de l'enzim, no només redueix la viscositat dels  $\beta$ -glucans, sinó que també millora el valor nutritiu dels cereals. Les exo- $\beta$ -

glucanases, que trenquen les cadenes pels extrems, tenen relativament poc efecte en la viscositat de  $\beta$ -glucans. La degradació completa dels  $\beta$ -glucans a glucosa s'aconsegueix per la interacció sinèrgica de les endo- i les exoglucanases.

La presència d'enzims degradadors de  $\beta$ -glucans produeix augments de digestibilitats dels diferents nutrients, havent-se descrit millores en la proteïna (des d'un 2 a un 11%), en greixos (des d'un 2 a un 14%) o en el midó (entre un 5 i un 7%). (Almirall i Esteve-García, 1995; Almirall i col., 1995; Francesch i col., 1999).

### **2.6.2. Arabinoxilans.**

Els arabinoxilans extrets del blat estan ben caracteritzats, i consisteixen, de manera predominant, en pentoses (arabinosa i xilosa), i per això, també es denominen pentosans. Els arabinoxilans es componen de un esquelet  $\beta(1,4)$ -D-xilopiranosil, amb un o més residus d' $\alpha$ -L-arabinofuranosil substituïts en la posició 2 o 3. També estan constituïts, en alguns casos, en menor quantitat, però no menys importants, per hexoses i àcids hexurònics. És per aquest motiu que sovint són anomenats més correctament com a heteroxilans. A més, també poden incloure diferents àcids fenòlics i acetil èsters (Marquardt, 1997).

La fracció d'hemicel·luloses es compon principalment de xilans units a les fibres de cel·lulosa per enllaços pont d'hidrogen, podent formar matrius amb unions que atrapen els complexos.

Els pentosans presents en el blat poden produir una disminució d'un 10% en la digestibilitat del midó, d'un 14% en la de la proteïna i d'un 24% en el cas dels lípids, així com la reducció del creixement animal i del consum de la dieta (Choct i Annison, 1990). També s'han establert que a major contingut d'arabinoxilans, menor és l'energia metabolitzable del blat (Choct i Annison, 1992).

La xilanasa, EC 3.2.1.8 (o xilan endo-1,4- $\beta$ -xilosidasa o endo-1,4- $\beta$ -xilanasa, amb el nom sistemàtic de 1,4- $\beta$ -D-xilan xilanohidrolasa), és l'enzim que hidrolitza a l'atzar els enllaços 1,4- $\beta$ -D-xilosídics en 1,4- $\beta$ -D-xilans (Webb, 1992).

### **2.6.3. *$\alpha$ -Galactòsids.***

Representen els oligosacàrids presents en cereals com el morenc. S'inclouen dins d'aquest grup la rafinosa, la verbascosa i l'estaquiosa. La rafinosa és un oligòmer de sacarosa i galactosa, l'estaquiosa constituït per una sacarosa i un digalactòsid, verbascosa constituït per una sacarosa més un trigalactòsid, estant tots els monosacàrids units per enllaços  $\alpha$ .

Els principals enzims degradadors d'aquests polisacàrids són l' $\alpha$ -galactosidasa (EC 3.2.1.22), també anomenat melibiasa i amb el nom sistemàtic  $\alpha$ -D-galactosidasa galactohidrolasa, hidrolitzant el residu no reductor de l' $\alpha$ -D-galactosa en  $\alpha$ -D-galactòsids, incloent els oligosacàrids de galactosa, galactomannans i galactolípid. L'altre enzim és la  $\beta$ -galactosidasa (EC 3.2.1.23), o lactasa amb el nom sistemàtic  $\beta$ -D-galactosidasa galactohidrolasa, hidrolitzant els residus  $\beta$ -D-galactosa no reductors terminals en  $\beta$ -D-galactòsids (Webb, 1992).

## **2.7. Utilització de la fitasa en la nutrició avícola**

En la Taula 2.8 es mostra un resum de les dades recollides de la bibliografia referent a estudis de pollastres (Taula 2.8a), estudis de gallines (Taula 2.8b) i altres aus, com els galls dindi, ànecs i perdius (Taula 2.8c) sobre l'aplicació de l'enzim fitasa en els paràmetres productius, de digestibilitat de nutrients i la retenció mineral. Els requeriments de fòsfor no fític per a broilers, depenen de la fase de la creixement de l'animal: 0.33% per a 0-21 dies; 0.31% per a 22-42 dies; 0.28% per a 43-53 dies (Waldroup, 2001). Aquestes recomanacions estan determinades per a dietes de morenc-soja, per la qual cosa poden canviar significativament quan s'utilitzi altres tipus d'ingredients (Cepero, 1992).

### **2.7.1. *Efectes de la fitasa en els paràmetres productius.***

Hi ha molts estudis que demostren que l'addició de fitasa microbiana millora el guany de pes de l'animal i el consum de pinso en pollastres broilers (Simons i col., 1990; Denbow i col., 1995; Ahmad i col., 2000; Murai i col., 2002) i en indiots (Yi i col., 1996a). Les millores observades en el creixement en els animals quan menjaren dietes baixes en P amb fitasa podria ser degut a un o més

dels motius següents (Sebastian i col., 1998): a) un increment en el fòsfor absorbit; b) l'alliberament dels minerals del complexe fitat-mineral; c) utilització de l'inositol, encara que potser qüestionable si tot el fòsfor provinent de l'àcid fític pot ser alliberat dins el temps de trànsit de l'aliment; d) un increment en la digestibilitat; o e) una disponibilitat augmentada dels aminoàcids. No obstant, Perney i col. (1993) van descriure que l'addició de fitasa en la dieta a dietes de moresc-soja no millorà el guany de pes o el consum de pinso, però sí que incrementava les cendres en els dits i en la tibia i el fòsfor no fític plasmàtic. Així mateix, alguns autors han descrit augments en el pes de l'animal i en el consum de pinso, però no en l'índex de conversió (Broz i col., 1994; Sebastian i col., 1996a).

La concentració mineral en el plasma de la sang també es veu afectada per la fitasa. Així, en nombrosos estudis, l'addició de fitasa microbiana en dietes baixes en nivell de fòsfor augmenta la concentració de fòsfor no fític i redueix la de calci (Perney i col., 1993; Sebastian i col., 1996a; Carlos i Edwards, 1998). Zyla i col. (1999) van trobar que l'addició de fitasa al pinso de broiler s'incrementava significativament el contingut de cendres de l'os quan s'utilitzaven entre 600 i 1000 U de fitasa per kg i 0.15% de FNF en comparació a la dieta amb el mateix nivell de FNF i sense fitasa afegida.

Van der Klis i col. (1997) van mostrar que, en dietes de gallines ponedores, el creixement de l'animal, les cendres de la tibia, i la densitat mineral de l'os pot estar afectat positivament per l'addició de 100, 200 o 300 U/Kg en dietes que contenen 0.12% de FNF. Punna i Roland (1999) van trobar efectes positius quan la fitasa era afegida en 300 U/kg a dietes amb nivells de FNF corresponents al 0.1%. Finalment, Ulm i Paik (1999) van mostrar que l'addició de fitasa podria millorar el consum de pinso si s'afegien 500 U/kg de l'enzim a dietes amb 0.37 i 0.24% de FNF.

### ***2.7.2. Efectes de la fitasa sobre la disponibilitat de proteïna i aminoàcids.***

Teòricament, la fitasa hauria de ser capaç d'alliberar la proteïna unida al fitat per a la seva utilització. Yi i col. (1996a), en femelles de galls dindi, van trobar que, a un nivell de 0.45% de FNF en una dieta que contenia un 22.5% de proteïna bruta, l'addició de fitasa tendia a millorar la

digestibilitat aparent i la vertadera del nitrogen i els aminoàcids, amb l'excepció de la cistina i la metionina. Sebastian i col. (1997) van mostrar que, en mascles, afegir fitasa incrementava la digestibilitat ileal aparent de la proteïna bruta però que no tenia influència en la digestibilitat ileal aparent dels aminoàcids, excepte per la metionina i la fenilalanina. Ravindran i col. (1999b) van mostrar que afegint 1200 U de fitasa per kg es podien obtenir efectes beneficiosos sobre la digestibilitat ileal aparent de la proteïna i aminoàcids en un grup d'ingredients de la dieta, essent més grans en blat, sorgo, i més petits en la colza 00; conclouent que les respostes per l'addició de fitasa han de ser més importants segons els efectes en el grau d'unió fitat-proteïna dels diferents ingredients.

És d'esperar que les interaccions fitat-proteïna influeixin en la digestió i l'absorció de les proteïnes i els aminoàcids. Però per a que aquests efectes siguin significatius depenen del caràcter i de la configuració del complex que varia amb les fonts de proteïna; i sembla que algunes proteïnes s'enllacen al fitat i d'altres no. Segons Champagne (1988), l'àcid fític s'uneix amb proteïnes de soja, blat, colza i cacauet, però no amb les de segó d'arròs, germen de morenc i cotó. O'Dell i de Boland (1976) van suggerir que l'accessibilitat dels grups enllaçants és el factor clau que determina que el fitat s'uneixi amb la proteïna.

### **2.7.3. Efectes de la fitasa sobre la disponibilitat de fòsfor.**

S'han realitzat diversos estudis on es descriuen els beneficis de la fitasa en la disponibilitat del fòsfor total o fític en broilers (Denbow i col., 1995; Sebastian i col., 1996a; Qian i col., 1997; Waldroup i col., 2000; Shirley i Edwards, 2003), en gallines (Carlos i Edwards, 1998; Keshavarz, 2000a) i en indiots (Qian i col., 1996b; Yi i col., 1996a). Nelson i col. (1971) van ser els primers que mostraren que afegint fitasa d'*Aspergillum ficuum* a les dietes de broiler es millorava la utilització de fòsfor fític basant-se en el contingut de cendres dels ossos. Els resultats millors s'obtingueren en els casos en què els animals consumiren dietes amb nivells de fòsfor inferiors als recomanats, estant per sobre del 20% de millora. La quantitat alliberada de fòsfor fític per la fitasa microbiana depèn de la concentració de fòsfor fític de la dieta (Kornegay i col., 1996) o de la font

emprada de fitasa (Simons i col., 1990). Viveros i col. (2002a) van establir que la fitasa permetia una bona utilització del fòsfor en dietes de morenc, segó de sègol i soja, observant els millors resultats en presència de la fitasa microbiana, mentre que la fitasa endògena del segó de sègol no influï a tant, i que els resultats no eren tan bons. Broz i col. (1994) van indicar que amb l'addició de 125, 250 o 500 U/kg de fitasa, a dietes de morenc-soja amb 0.16% de FNF, es millorava significativament la utilització de fòsfor. Zanini i Sazzad (1999) també van comprovar que afegint 500 U/kg de fitasa a dietes de morenc-soja amb 0.40% de FNF es millorava la utilització de fòsfor i, per tant, es reduï a l'excreció d'aquest mineral; resultats similars als obtinguts per Yi i col. (1996b), després d'afegir 350, 700 i 1050 U/kg en dietes de morenc-soja amb nivells de fòsfor no fític entre el 0.27 i el 0.45%, o Lan i col. (2002), que van afegir 250, 500, 750 i 1000 U/kg a dietes de morenc-soja amb 0.24% de FNF.

Leske i Coon (1999), en un estudi amb gallines, usant dietes amb 0.1% de fòsfor no fític, van mostrar que l'addició de 300 U/kg de fitasa en pinso de posta es millorava la retenció de fòsfor total. També s'ha vist que la quantitat de fòsfor excretat pot reduir-se en dietes de gallines si se li afegeix 500 U/kg (Um i Paik, 1999). Keshavarz i Austic (2004) han vist que es pot reduir l'excreció de fòsfor en un 48% afegint 300 U/kg de fitasa a dietes amb 0.2% de FNF. Finalment, Rodehutsord i col. (2003) van observar la reducció d'un 50% en l'excreció de fòsfor degut a l'addició de 500 U/kg de fitasa en dietes de galls dindi.

#### ***2.7.4. Efectes de la fitasa sobre la disponibilitat de minerals.***

Tal com s'ha descrit en l'apartat 3, l'àcid fític té un potencial quelant molt fort i forma complexos amb cations, fent que aquests resultin biològicament no disponibles. Teòricament, tots els minerals que estan units són alliberats quan la fitasa microbiana hidrolitza la molècula d'àcid fític. Hi ha molts estudis que indiquen que l'addició de fitasa microbiana millora la disponibilitat d'aquests minerals en broilers (Broz i col., 1994; Sebastian 1996a, 1996b; Biehl i col., 1997; Zanini i Sazzad, 1999; Lan i col., 2002), en gallines (Sohail i Roland, 2000) i en galls dindi (Qian i col., 1996b; Zyla i col., 1996).

Els efectes de la fitasa sobre el calci són els més estudiats, degut a la gran relació metabòlica d'ambdós minerals. S'han estudiat tant els efectes degut a la inclusió individual de l'enzim, com la combinació amb d'altres factors que influeixen en la disponibilitat del calci, com per exemple la vitamina D3 (Edwards, 1993; Roberson i Edwards, 1994; Mitchell i Edwards, 1996b). Qian i col. (1996b) van descriure augments en la retenció de calci en dietes de galls dindi amb nivells elevats de fitasa (600-900 U/kg), però que aquestes millores estaven afectades amb la relació Ca:P, disminuint quan la relació augmenta i també augmenta la concentració de fòsfor no fític. Viveros i col. (2002b) descrigueren millores en la utilització de calci en dietes amb morenc-soja per a broilers. En un estudi de càlcul d'equivalències de fitasa en dietes de broilers, Kornegay i col. (1996) determinà que 500 U/Kg de fitasa es corresponen aproximadament a 0.87 g de calci.

El zinc és un dels minerals més vulnerable a la complexació per fitat (Sauveur, 1989). Llavors la deficiència de zinc és molt probable que es produeixi si els animals mengen una dieta que incloguin plantes amb una concentració elevada de fitat (Sebastian i col., 1998). Roberson i Edwards (1994) van descriure que l'addició de fitasa no tenia cap efecte en la retenció de zinc en broilers, però sí quan s'afegia vitamina D3 en la dieta. Sebastian i col. (1996) van mostrar que la fitasa microbiana augmentava la retenció relativa de zinc des de -27.6 fins a 34.7%, un augment del 62.3%. Mohanna i Nys (1999) van descriure que afegir 800 U/kg de fitasa microbiana en dietes de broilers permetia reduir el zinc de la dieta en 14 mg/kg.

Aoyagi i Baker (1995) van estudiar els efectes de la fitasa microbiana sobre la utilització del coure de la dieta en pollastres, trobant que l'enzim afegit no tenia cap efecte beneficiós sobre la disponibilitat del coure, si no que a més en reduïa la biodisponibilitat en un 21%. Sebastian i col (1996a) van observar un increment de la retenció relativa del coure del 19.2%, passant des de -24.6% fins a -5.4%.

És difícil realitzar estudis de biodisponibilitat de minerals com el zinc o el coure, ja que pot passar que els seus requeriments no estiguin ben definits, o que la concentració d'aquests minerals sigui superior als requeriments després d'afegir el corrector mineral als pinsos. Així, doncs, no és senzill

avaluar els efectes dels enzims sobre aquests minerals, i per això s'obtenen tantes diferències en els resultats, o, que fins i tot es puguin trobar valors negatius.

Taula 2.8a. Efectes de l'addició de fitasa en dietes de pollastres.

	Tipus dieta i SE <sup>1</sup>	Resultats
Simons i col., 1990	Broilers mascles d'1 dia.	Moresc-soja-soja. 5 nivells de Fit (250, 500, 750, 1000 i 1500 U/kg). Fit en el 50% quan la Fit s'afegí al pinso.
Swick i col., 1991		-soja. Tres nivells de Fit. Tres il·lers com les gallines poden utilitzar el fòsfor fític si s'afegeix Fit microbiana als pinsos, obtenint -se de fòsfat
Simons i col., 1992	Broilers mascles. Gallines White Leghorn	Moresc-soja. varis nivells de FNF i varis nivells de Fit.
Vogt, 1992	Broilers. Dades de 6 setmanes.	Moresc-soja. Varis nivells de P. 4 nivells de Fit.
Edwards, 1993		-soja. 4 varis nivells de Fit.
Perney i col., 1993		-soja. 3 nivells de Fit i 4 de
Roberson i Edwards, 1994		-soja. 4 nivells de Fit i 3 de mb l'increment de FNF, però no per la Fit. Les cendres del
Aoyagi i Baker, 1995		-soja. Varis nivells de Cu, -(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> i de Fit. -soja quan es millora la utilització de P fític, amb la -(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> .
Denbow i col., 1995		ó-casèina-dextrosa, deficient µg/kg de 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> . -soja. 3 nivells FNF à en les dietes de cotó
Windisch i Kirchgeßner, 1995	Broilers.	Pels nivells superiors a 600 U/kg, afegir Fit millora les dades de creixement dels animals així com la retenció i utilització de P. La retenció i utilització de Ca s'incrementà pels nivells superiors de Fit.
Huyghebaert, 1996a	Broilers mascles.	-se en gran part per la suplementació de Fit en dietes baixes de P. des per la Fit. L'excreció de fòsfor pot
Huyghebaert, 1996b	Broilers mascles.	Moresc-soja. Diferents valors de relació Ca:P. 500 U/kg de Fit. s l'anàlisi de regressions lineal (pel percentatge de cendres de la tibia) la mitjana de l'equivalència de fòsfor
Kornegay i col., 1996	Broilers mascles d'1 dia.	-soja. 6 nivells de Fit en i percentatge de cendres de dits en nivells baixos de

Suplementació enzimàtica

Taula 2.8a. Efectes de l'addició de fitasa en dietes de pollastres (continuació).

		Resultats	
Mitchell i Edwards, 1996a	Broilers mascles d'1 dia.	-soja. 3 nivells de FNF (0,45, 0,9, 1,8) µg/kg de 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> i 600 U/kg de Fit.	-soja pot ser reemplaçat tant per Fit com per l'1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> , mentre
Mitchell i Edwards, 1996b	Broilers mascles d'1 dia	-soja. Varis nivells de Ca i P: 5 g/kg de 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> i 600 U/kg de Fit.	600 U/kg de Fit poden reemplaçar efectivament un 0,1% de FNF, sense afectarà adversament el creixement de l'animal. La combinació de 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> i Fit pot reemplaçar un 0,2% de FNF.
Sebastian i col., 1996a	Broilers mascles d'1 dia.	Moresc-soja. Addició de 600 U/ kg de Fit.	n en 12,5, 12,2, 19,3 i 62,3%. La Fit microbiana augmentà la concentració de P en plasma en 15,7% i
Sebastian i col., 1996b	Broilers mascles d'1 dia.	Moresc-soja. Addició de 600 U/ kg de Fit. Tres nivells de calci en la dieta.	Is en els broilers. Els nivells de Ca en la dieta tingueren un efecte significativament sobre la resposta -se resultats òptims de creixement i la utilització mineral en dietes amb la concentració més
Yi i col., 1996a	Broilers mascles d'1 dia.	-soja. 3 nivells de FNF (0,36, 0,72, 1,44) µg/kg de 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> i 600 U/kg de Fit.	ana de P alliberat per la Fit calculada amb equacions lineals i no -lineals de P i nivells de Fit per les dietes en forma de fosfat defluorinat.
Biehl i Baker, 1997	Pollastres mascles i femelles.	-soja. Varis nivells de Fit.	rada amb la Fit microbiana
Biehl i col., 1997	Polletes femelles, entre 8 i 21 d. Estudi disponibilitat de Fe.	-soja. 4 nivells de relació Ca:P, 3, 4, 5, 6 µg/kg de 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> i 600 U/kg de Fit.	3 hidroxilada no milloraren la utilització de Fe (i Cu) de la mateixa manera que poden
Qian i col., 1997	Broilers mascles d'1 dia.	-soja. 4 nivells de relació Ca:P, 3, 4, 5, 6 µg/kg de 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> i 600 U/kg de Fit.	3. Les més millors respostes es van obtenir quan els broilers menjaren dietes amb Fit entre 3, de 660 µg/kg.
Sebastian i col., 1997	Broilers mascles.	Moresc-soja. 3 nivells de relació Ca:P, 600U/kg de Fit.	-Ca baix foren comparables als ats en la dieta P normal-Ca normal als 28 dies. -Ca baix mostraren respostes òptimes en el creixement en ambdós sexes,
Denbow i col., 1998	Broilers mascles, de 7 a 21 d.	-soja. 3 nivells (400, 800 i 1600 U/kg de Fit).	addició de Fit a dietes amb baix FNF pot millorar la disponibilitat de P i, llavors, augmentar el creixement i
Ferguson i col., 1998	Broilers mascles.	-soja. 500 U/kg de Fit. Addició	a dieta basal. La dieta basal amb Fit pot reduir l'excreció de P en un 50%.
Huff i col., 1998	Broilers.	Moresc normal, moresc HAP* i soja. 500 U/kg de Fit.	en almenys un 11% en dietes preparades amb moresc efectes sobre
Cabahug i col., 1999	Broilers mascles de 7 dies.	Blat, sorgo i soja, contenint 3 nivells d'àcid fític, 2 de FNF i 3 de Fit (400 i 800 U/kg).	a, fòsfor i nitrogen en broilers. No hagueren diferències en la resposta per la Fit per les addicions de
Ibrahim i col., 1999	Broilers mascles i femelles.	-moresc-soja. 4 nivells de FNF	ducció de 0,56% en P total. En aquestes condicions, els animals excreten diàriament dues

Taula 2.8a. Efectes de l'addició de fitasa en dietes de pollastres (continuació).

				Resultats
Leske i Coon, 1999	Broilers mascles de 10 d.			it també és dependent dels ingredients.
McKnight, 1999a	Broilers mascles d'1 d.		-soja. 3 nivells de Lys. 600	ció de P es va reduir en un 32% per les
McKnight, 1999b	Broilers mascles d'1 d.			
Mohanna i Nys, 1999			Moresc-soja. 800 U/kg de Fit. Varis nivells de Zn i Mn.	la deposició de Zn en l'os, quan el Zn de la dieta va ser menor a 60 mg/kg.
Namkung i Lesson, 1999	Broilers mascles d'1 dia.		Moresc-soja. 1149 U/kg de Fit.	ts d'aminoàcids totals,
Rama Rao i col., 1999	Broilers mascles, de 3 a 30 d.		-soja. 2 nivells de Fit (250 i	eta
Ravindran i col., 1999b	Broilers mascles.		3 cereals, 4 llavors d'oleaginoses, 2 subproductes. 1200 U/kg de Fit	roteïna/aminoàcid dels ingredients, però
Sohail i Roland, 1999	Broilers mascles. Dades entre 4 i 6 setmanes.		Moresc-soja. Tres nivells de FNF (0.43, 0.33 i 0.23%), dos de Ca (0.85 i 0.75%) i dos de Fit (300 i 600U/kg).	les dietes que contenen valors més baixos de FNF, Ca o
Zanini i Sazzad, 1999	Broilers mascles d'1 dia.		Moresc-soja. 500 U/kg de Fit, 2 concentracions d'energia.	ontingut
Zhang i col., 1999	Broilers mascles d'1 dia.		-soja. Tres nivells	de pinso i l'índex de conversió en broilers de creixement i finalització. L'índex de conversió
Zyla i col., 1999	Broilers d'1 dia.		-soja. 5 nivells Fit (200, 400, 600,	oncentració de 1000 U/kg de Fit en les dietes s'augmentà la viscositat intestinal.
Ahmad i col., 2000	Broilers de 90 dies.		Moresc-arros-segó. 1075 U/kg de Fit.	% de FNF.
Waldroup i col., 2000	Broilers, entre 0 i 3 setmanes.			Is són suficients per -se un creixement òptim, amb
Peter i col., 2000	Pollastres mascles, de 8 a 21 d.		-dextrosa-farina de . Varis	L'addició de Fit a dietes de gluten de more sc deficientes en aminoàcids no millorà la utilització de proteïnes ni dels aminoàcids.

Taula 2.8a. Efectes de l'addició de fitasa en dietes de pollastres (continuació).

	des estudi	Resultats
Yan i col., 2000	Pollastres mascles d'1 dia.	de la dieta i l'addició de Fit. La reducció del -se una reducció del 37,5% del fòsfor fecal; mentre que quan s'usa moresc HAP* es pot reduir el fòsfor
Zyla i col., 2000a	Broilers d'1 dia.	y de pes, ingesta de pinso, l'índex de conversió, i les cendres dels dits,
Zyla i col., 2000b	Broilers d'1 dia.	esultà en majors increments en el guany de pes, consum de pinso i cendres del dit i reduí la
Camden i col., 2001	Broilers mascles d'1 dia.	, reflectits en augments en
Ravindran i col., 2001	Broilers mascles.	ergia són els responsables de les millores del creixement observades quan la -sorgo-soja. Es confirma, també, que la Fit microbiana té efectes positius sobre més
Yan i col., 2001		en les concentracions de 0.24, 0.151 i 0.109% de FNF per optimitzar els valors
Zyla i col., 2001	Broilers d'1 dia.	El suplement de dietes de pollastres amb fòsfor càlcic no és necessari quan se subministren activitats adequades de enzims fosforolítics i degradadors de paret cel·lular, i el pinso està formulat amb concentracions adequades de calc i àcid cítric. Això portaria a considerables reduccions del fòsfor excretat, sense comprometre el creixement, salut o estat nutritiu dels animals.
Attia i col., 2002	Broilers d'1 dia.	Els enzims corregiren parcialment l'impacte negatiu del segó d'arròs (del 15 o 30%) en les cendres, Ca i P de la fibra, Ca en plasma i en la fosfatasa alcalina. La inclusió de Fit en dietes amb 15% de segó d'arròs va mitigar la hipertrofia del pàncreas.
Edens i col., 2002	Pollastres d'1 dia.	és possible reduir el P fecal a costa del creixement si es redueix el P total de la dieta. uida. -la.
Lan i col., 2002	Broilers mascles d'1 dia, fins a 42 dies.	-soja millorà significativament el creixement dels broilers, i augmentà el ria seca i proteïna, i la retenció de P, Ca i Cu però disminuí
Peter i Baker, 2001	Pollastres femelles de 7 dies.	ra la utilització dels aminoàcids sulfurats en dietes de soja.
Punna i Roland, 2001	# en les	# que no pas els que tenien la major incidència. # en els pollastres amb una baixa incidència
Murai i col., 2002	Pollastres mascles d'1 dia.	Les activitats de l'enzim en una Fit no -GM millora el creixement i el valor nutritiu de la dieta en pollastres. Tanmateix, l'eficàcia de l'activitat fitàsica podria no ser diferent entre els productes de la Fit GM i no -GM.
Rutherford i col., 2002	Broilers mascles i femelles de 28 d.	er la dieta amb segó d'arròs (17%), però no en la resta

Taula 2.8a. Efectes de l'addició de fitasa en dietes de pollastres (continuació).

		Resultats	
Viveros i col., 2002a	de Fit	-soja-segò de sègol tractat/ gò de sègol sense tractar. 500 U/kg	Es va observar una menor eficàcia de les fitases vegetals respecte les microbianes en la utilització de P, relacionat amb l'estret marge d'actuació de l'enzim amb el pH i la limitada estabilitat amb les temperatures.
Viveros i col., 2002b	Broilers mascles d'1 dia.	Moresc-soja. 500 U/kg de Fit.	-se sense modificar el creixement de l'animal. A més, l'addició de Fit
Applegate i col., 2003b	Broilers mascles.		
Augspurger i col., 2003	Pollastres mascles.	-soja. Varis nivells de FNF i de <i>E. coli</i> .	<i>E. coli</i> és més efectiva que les comercials en pollastres joves, obtenint -se resultats superiors en guany de
Brenes i col., 2003	Broilers d'1 dia.	-soja. 2 nivells FNF (0.25 i 1000 U/kg de dos tipus de Fit (Fit A i Fit B). Betaina.	-soja baixes de FNF millora el creixement i incrementa la utilització de Ca, P
Debicki-Garnier i Hruby, 2003	Broilers mascles d'1 dia.	Blat-soja. 500 i 1000 U/kg de dos tipus de Fit (Fit A i Fit B). Betaina.	di de les fitases, Fit A resultà en un millor creixement comparant amb Fit B, suggerint que Fit A va ser
Gheisari i col., 2003	Broilers.		e s'observà amb 1000 U de
Hall i col., 2003	Broilers d'1 dia.	-soja. 4 nivells de Fit (750, 3000 i 6000 U/kg).	-blat-soja. La magnitud de les millores al nivell més baix de FNF va ser més gran que els
Keshavarz, 2003a	-300 i Hy-Line W-98. Des d'1	- soja. Varis nivells de FNF	pes i les cendres dels ossos augmentaren per sobre de les 750 U/kg.
Miles i col., 2003	Broilers mascles.	Moresc normal, moresc HAP*, soja. 600 U/kg de Fit.	La Fit va arreglar completament els efectes adversos de les dietes amb nivells de FNF baixos durant el període de creixement i de posta, però només ho va fer parcialment en les dietes que presentaven nivells molt baixos de FNF.
Payne i Southern, 2003	Broilers d'1 dia.	-soja. 2 nivells FNF. Dos tipus	ra comparat amb
Pos i col., 2003	Broilers.	-soja. Dos tipus de Fit (750	litera.
Ribeiro i col., 2003		Moresc, segó d'arròs i soja. 280 U/kg de Fit. 3 nivells de FNF.	nt del consum de pinso.
Shirley i Edwards, 2003	Broilers d'1 dia.	Moresc-soja. 8 nivells de Fit (entre 93.75 i 12000 U/kg).	-se en els nivell
			lar el creixement dels broilers respecte als que menjaren dietes

# DT: Discondroplasia tibial. § GM: Genèticament modificat.

Taula 2.8a. Efectes de l'addició de fitasa en dietes de pollastres (continuació).

				Resultats
Wu i col., 2003	Broilers d'1 dia.	Dues dietes: Moresc-soja. Blat-soja. 0.25 i 0.45% FNF. 500 u/kg de Fit.		que menjaren una
Yan i col., 2003a		-soja. 1000 U/kg de Fit. 3		menjaren els nivells recomanats pel NRC.
Yan i col., 2003b	Broilers mascles, de 42 a 63 d.	Moresc-soja. 6 nivells de FNF (de 0.10 a 0.35%) i 800 U/kg de Fit.		t afectat pel nivell de FNF,
Cowieson i col., 2004	Broilers femelles de 6 setmanes.	Dieta blat comercial, amb glucosa. Addició de 1000 U/kg Fit i/o 1g IP <sub>6</sub> .		6 augmenta l'excreció de minerals i aminoàcids endògens en pollastres broilers. Una part dels efectes epen de la reducció en les pèrdues
Onyango i col., 2004	Broilers, de 8 a 22 d.	-soja. 3 nivells de FNF. 3 tipus		
Rutherford i col., 2004	Broilers mascles.	Moresc-soja. Dieta baixa de FNF. 2 nivells Fit (500 i 750 U/kg).		Els efectes de Fit en digestibilitat il eal de P fíic, P total i aminoàcid va ser similar dels dos nivells de inclusió de la Fit. La Fit microbiana millora la digestibilitat de P fíic i P total, així com la digestibilitat d'aminoàcids per a una dieta de moresc-soja.
Wu i col., 2004	Broilers mascles 1 d.	Blat-soja. Addició de 500 U/kg Fit i/o 1000 U/kg xilanasa.		na va ser igual d'efectiva que la xilanasa en millorar el creixement dels broilers que gment de l'EMA i a una reducció en el pes i llargada

Taula 2.8b. Efectes de l'addició de fitasa en dietes de gallines.

				Resultats
Newkirk i col., 1993	Gallines.	-soja. Inclusió de xilanasa, Fit, i		ducció d'ous i l'índex de conversió, especialment a nivell alts de P. La Fit sola va reduir
Jeroch i Peter., 1994	Gallines.	-soja. Addició de fòsfor		El creixement de les gallines augmentà significativament tant per la inclusió de Fit o de fòsfor mineral.
Balander i col., 1997	Gallines Dekalb, 20 setmanes	-soja. Addició 0.1% FNF i 500		
Gordon i Roland, 1997	Polletes de gallines Hy-Line W-36.	Fórmula comercial, variant el nivell de FNF i Ca. Addició de Fit.		0%, quan s'afegeix Fit, sense efectes importants en la
Kaminska, 1997	Gallines Hisex marró, entre 48 i 70 setmanes.	Moresc-soja. 5 nivells de FNF i 300U/kg de Fit.		sumiren 0.1% FNF sense Fit. L'addició de Fit
Van der Klis i col, 1997	Gallines ponedores Leghorn LSL	Blat, moresc i soja. 3 nivells diferents de P. 3 nivells de Fit.		0 U/kg de Fit afegida alguns paràmetres referents a la qualitat de l'ou van ser pitjors que
Zimmerman i Dvorak., 1997	Gallines.	Moresc-soja. Varis nivells de fòsfor mineral, de calci i de Fit.		dre de
Carlos i Edwards, 1998	Gallines Hy-Line W36.	a ponedores.		gons les dades
Gordon i Roland, 1998	-Line, de 58	Moresc-soja. 600 U/kg de Fit, 5 µg/kg de 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> .		a Fit (i en menor extensió 1'1,25 -(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> ) poden ser usats per a augmentar la utilització de P
Pan i col., 1998	Gallines ponedores.	-soja. 3 nivells de Ca, 2 nivells		i l'impacte del nivell baix de Ca en la dieta en el creixement de la gallina.
Parsons, 1999		-soja. Sègol-soja.		EMAn en un 2, 3 i 2.8%, respectivament.
Punna i Roland, 1999	Gallines Hy-Line W-36, 19 setmanes de vida.	-soja. Varis nivells de FNF.		dició Pi, Fit pot reduir en gran manera la quantitat de P excretat.
Roland i col., 1999	es.	-soja. Quatre nivells de FNF i 300 U/kg de		ò no mostraren influència en les
Roland i Punna, 1999		-soja. 250 U/kg de Fit.		-soja per a gallines elimina l'addició de FNF sense afectar la posta.
		-soja. 2 nivells de FNF (0.1 i		ndement dels nivells de FNF. Fit millora el contingut
		-soja. 4 nivells de FNF. 300		la majoria de les reduccions en el creixement de les polletes que
				ativament el creixement de les polletes que menjaren 0.1% de FNF.

Taula 2.8b. Efectes de l'addició de fitasa en dietes de gallines. (continuació).

			Resultats
Scott i col., 1999	Gallines ponedores, entre 18 i 67 setmanes.	Moresc-soja. Dos nivells de fòsfor i calci. 2 nivells de Fit (250 i 500 U/kg).	compensar la reducció de FNF en dietes de gallines, però també pot proporcionar una indicació que els alts tant de FNF com de Fit, especialment amb nivells baixos de Ca.
Um i Paik, 1999	Polletes de gallines.	-soja. Diferents nivells de	
Boling i col., 2000a	Gallines ponedores.	-soja amb nivell baix de P. 4	utilització de P en dietes de moresc-soja per gallines i que les dietes amb 0.10% FNF més 100 U/kg
Boling i col., 2000b	Gallines ponedores, de 20 a 70 setmanes.	-soja. Varies nivells de FNF	etes de moresc-soja contenint 0.15% FNF o contenint 0.10% FNF més 300
Keshavarz, 2000a	Polletes de gallines de 30 setmanes.	Moresc-soja. 300 U/kg de Fit.	-la en un 15%. L'excreció
Keshavarz, 2000b	Polletes de gallines d'1 dia.	Moresc-civada-soja. 300 U/kg de Fit, 3 nivells de FNF.	control que menà la dieta sense Fit.
Punna i Roland, 2000	Polletes de gallines ponedores Hy-line.	Moresc-soja. 4 nivells FNF(0.13, 0.23, 0.33 i 0.43%) i 300 U/kg de Fit.	que menjaren dietes amb 0,3% i 0,4%FNF no desenvoluparen símptomes de deficiència
Sohail i Roland, 2000	Gallines Hy-Line W-36, de 38 setmanes.	Moresc-soja. 300 U/kg de Fit, 3 nivells de Ca.	d'aproximadament 3g/d per gallina, però no influir significativament quan la ingesta de Ca és de 3,4
Jatal i Scheideler, 2001	Gallines ponedores Hy-Line W-36, des de 40 a 60 setmanes.	Moresc-soja. 4 nivells de FNF. Dos tipus de Fit: 250 U/kg Fit A, 300 U/kg Fit B.	NF amb Fit afegida al final del cicle de producció. Hi ha un alt risc en
Tangendjaja i col., 2002	Gallines de 23 setmanes.	d'arròs i soja. 3 tipus de	anes van ser efectives en millorar la utilització de P en gallines que menjaren dietes amb baix
Vallardi i col., 2002	-Line W-36, entre tmanes.	-soja. 2 nivells FNF (0.12 i	it microbiana va ser suficient per millorar els signes de deficiència (augment de l'índex de
Ceylan i col., 2003	Gallines Hy-Line W-36, des de la setmana 20 fins a la 40.	Moresc normal, moresc HAP*, soja. 5 nivells de FNF. 300 U/kg de Fit.	P* permet aportar menys fosfat bicàlcic en dietes de gallines comparat amb el moresc normal sense dos tipus de moresc.
Keshavarz, 2003b		-soja. 2 nivells Fit (150 i 300 vell baix de FNF	
Klein Holkenborg i col., 2003	Gallines ponedores, de 26 setmanes.	-soja-gira-sol. 2 tipus de Fit:	Els nivells baixos de FNF no afectaren negativament el creixement de les gallines. Afegint Fit es millorà la digestibilitat ileal de P.

Taula 2.8b. Efectes de l'addició de fitasa en dietes de gallines. (continuació).

Resultats			
Lim i col., 2003	Gallines marrons entre 21 i 41 setmanes.	Moresc-soja-segó de blat. 2 nivells de Ca i FNF. 300 U/kg de Fit.	ficativament
Shaw i col., 2003		rceres de blat. 300 U/kg de Fit.	
Keshavarz i Austic, 2004		-ordi-soja. 300 U/kg de Fit. 2	afegit amb aminoàcids limitants

Taula 2.8c. Efectes de l'addició de fitasa en dietes de gall dindi i d'altres animals.

		us dieta i SE	Resultats
Ledoux i col., 1995	Galls dindi femelles d'1 d.	Moresc-soja. 1000 U/kg de Fit. 2 nivells de FNF.	r Fit no influí en la composició corporal, cendres dels dits o força dels ossos.
Ravindran i col., 1995b	Pollets de gall dindi d'1 d.	-farina de moresc-dextrosa. 3	d de la
Qian i col., 1996c	Pollets de gall dindi d'1 d.	-farina de moresc-glucosa. 4 60%) i 3 de Fit (600, 800 i 1000	t incrementar la matèria seca, pes i proporció de cendres i el contingut mineral de les cendres en ix a augmentar el contingut de P i Ca de la tibia i significativament
Qian i col., 1996b	Pollets de gall dindi d'1 dia.	Moresc-soja. 2 nivells de FNF. 4 nivells de la relació Ca:P. 3 nivells de Fit.	i 0.27% de FNF, respectivament, quan la relació Ca:P estava entre 1.1 i 1.4:1.
Yi i col., 1996b	Pollets femelles de gall dindi.	-soja. 2 nivells de FNF (0.45 i # (22.5 i	its, digestibilitats ideals de N i aminoàcids, i la retenció # que les dietes amb
Zyla i col., 1996	Pollets de gall dindi de 7 dies.	-soja. 3 nivells FNF, 1000 U, 1000 U fosfatasa àcida/g, 42 U	eixement pot ser significativament millorada per l'aplicació
Atia i col., 2000		-soja. 500 U/kg de Fit. 4 nivells	reduir els requeriments de P de la dieta dels galls dindi en creixement quan els nivells de
Esteve-García, 2001	Galls dindi femelles.	-soja. 5 nivells de Fit (125, 250,	t en les cendres de tibia i 412 U/kg basat en el P retingut, quan el nivell de FNF de la dieta és de 0.25%.
Applegate i col., 2003a	Pollets de gall dindi mascles, de 10 a 21 d.	-soja. 3 tipus de Fit: 2 it A, Fit B), 1 d' <i>E. coli</i> ,	S'ha demostrat que la Fit d' <i>E. coli</i> és més efectiva que l es Fit comercials en indriots. La retenció de P degut a la Fit d' <i>E. coli</i> va ser del 68.2%, valor superior al de la dieta control sense Fit afegida (58.9%).
Rodehutscord i col., 2003	Galls dindi mascles.	-blat-soja-pèsols. Inactivació	ietes amb Fit,
Farrell i Martin, 1998	Ànecs.	-soja. Dos nivells de segó	que depèn del nivell de segó d'arròs.
Orban i col., 1999	Ànecs.	Moresc-soja. 2 nivells de Fit: (750 i 1500 U/kg de Fit) 3 nivells de FNF.	b fòsfor de
Bahitýarca i Parlat, 1997	Perdius 9 dies d'edat.	-soja. Diferents nivells de FNF.	

PB: Proteïna Bruta.

## **2.8. Referències bibliogràfiques.**

- Adeola, O.** 1995. Digestive utilization of minerals by weanling pigs fed copper- and phytase-supplemented diets. *Can. J. Anim. Sci.* 75, 603-610.
- Adeola, O., B. V. Lawrence, A. L. Sutton i T. R. Cline.** 1995. Phytase-induced changes in mineral utilization in zinc-supplemented diets for pigs. *J. Anim. Sci.* 73, 3384-3391.
- Ahmad, T., S. Rasool, M. Sarwar, A. Haq i Z. Hasan.** 2000. Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Tech.* 83, 103-114.
- Almirall, M. i E. Esteve-García.** 1995. In vitro stability of a  $\beta$ -glucanase preparation from *Trichoderma longibrachiatum* and its effect in a barley based diet fed to broiler chicks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 54, 149-158.
- Almirall, M., M. Francesch, A. M. Pérez-Vendrell, J. Brufau i E. Esteve-García.** 1995. The differences in intestinal viscosity by barley and  $\beta$ -glucanase alter digesta enzyme activities and ileal nutrient digestibilities more in broilers than in cocks. *J. Nutr.* 125, 947-955.
- Anònim.** 1989. Phytase and phytate degradation in humans. *Nutr. Rev.* 5, 155-157.
- Aoyagi, S. i D. H. Baker.** 1995. Effect of microbial phytase and 1,25-dihydroxycholecalciferol on dietary copper utilization in chicks. *Poult. Sci.* 74, 121-126.
- Applegate, T. J., B. C. Joern, D. L. Nussbaum-Wagler i R. Angel.** 2003b. Water-soluble phosphorus in fresh broiler litter is dependent upon phosphorus concentration fed but not on fungal phytase supplementation. *Poult. Sci.* 82, 1024-1029.
- Applegate, T. J., D. M. Webel i X. G. Lei.** 2003a. Efficacy of a phytase derived from *Escherichia coli* and expressed in yeast on phosphorus utilization and bone mineralization in turkey poults. *Poult. Sci.* 82, 1726-1732.
- Atia, F. A., P. E. Waibel, I. Hermes, C. W. Carlson i M. M. Walser.** 2000. Effect of dietary phosphorus, calcium, and phytase on performance of growing turkeys. *Poult. Sci.* 79, 231-239.
- Attia, Y. A., E. M. A. Qota, F. A. M. Aggoor i A. Kies.** 2002. Impact of phytase, cell wall-degrading enzymes or dietary formulation based on available amino acid on the utilization of rice bran in the diets for broiler chicks. En: Proc. 11th European Poultry Conference. Bremen, Alemanya. pp 1-22.
- Augspurger, N. R., D. M. Webel, X. G. Lei i D. H. Baker.** 2003. Efficacy of an *E. coli* phytase expressed in yeast for releasing phytate-bound phosphorus in young chicks and pigs. *J. Anim. Sci.* 81, 474-483.

- Bahtiyarca, Y. i S. S. Parlat.** 1997. Effects of phytase on the performance and availability of phosphorus in corn-soybean meal diets by young Japanese quails. *Arch. Geflügelkd.* 61 (6), 270-273.
- Bakker, G. C. M., R. A. Dekker, R. Jongbloed i A. W. Jongbloed.** 1998. Non-starch polysaccharides in pig feeding. *The Veterinary Quaterly.* 20 (Suppl. 3), S59-S64.
- Balander, R. J., C. J. Flegal i T. Sefton.** 1997. The effect of phytase on egg production and egg specific gravity in laying hens. En: Alltech's 13th Annual Symposium (Poster).
- Bandurski, R. S. i B. Axelrod.** 1951. The chromatographic identification of some biologically important phosphate esters. *J. Biol. Chem.* 193, 405-410.
- Barrientos, L. G., J. J. Scott i P. N. Murthy.** 1994. Specificity of hydrolysis of phytic acid by alkaline phytase from lily pollen. *Plant Physiol.* 106, 1489-1495.
- Beers, S. i A. W. Jongbloed.** 1992. Effect of supplementary *Aspergillus niger* phytase in diets for piglets on their performance and apparent digestibility of phosphorus. *Anim. Prod.* 55, 425-430.
- Biehl, R. R. i D. H. Baker.** 1996. Efficacy of supplemental 1 $\alpha$ -hydroxycholecalciferol and microbial phytase for young pigs fed phosphorus- or amino acid-deficient corn-soybean meal diets. *J. Anim. Sci.* 74, 2960-2966.
- Biehl, R. R. i D. H. Baker.** 1997. Microbial phytase improves amino acid utilization in young chicks fed diets based on soybean meal but not diets based on peanut meal. *Poult. Sci.* 76, 355-360.
- Biehl, R. R., J. L. Emmert i D. H. Baker.** 1997. Iron bioavailability in soybean meal as affected by supplemental phytase and 1 $\alpha$ -hydroxycholecalciferol. *Poult. Sci.* 76, 1424-1427.
- Bittar, K. i J. G. Reinhold.** 1972. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosa of rat, chicken, calf, and man. *Biochim. Biophys. Acta* 268, 442-452.
- Blatny, P., F. Kvasnicka i E. Kenndler.** 1995. Determination of phytic acid in cereal grains, legumes, and feeds by capillary isotachopheresis. *J. Agric. Food Chem.* 43, 129-133.
- Boling, S. D., M. W. Douglas, M. L. Johnson, X. Wang, C. M. Parsons, K. W. Koelkebeck i R. A. Zimmerman.** 2000b. The effects of dietary available phosphorus levels and phytase on performance of young and older laying hens. *Poult. Sci.* 79, 224-230.
- Boling, S. D., M. W. Douglas, R. B. Shirley, C. M. Parsons i K. W. Koelkebeck.** 2000a. The effects of various dietary levels of phytase and available phosphorus on performance of laying hens. *Poult. Sci.* 79, 535-538.
- Bondi, A. A.** 1988. Importancia nutritiva de los minerales. En: *Nutrición Animal*. Ed. Acribia, S.A. Saragossa, Espanya.
- Bos, K. D., C. Verbeek, C. H. P. van Eeden, P. Slump i M. G. E. Wolters.** 1991. Improved determination of phytate for Ion-exchange chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 39, 1770-1772.

- Brearley, C. A. i D. E. Hanke.** 1996. Inositol phosphates in barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone tissue are stereochemically similar to the products of breakdown of InsP<sub>6</sub> *in vitro* by wheat-bran phytase. *Biochem. J.* 318, 279-286.
- Brenes, A., A. Viveros, I. Arija, C. Centeno, M. Pizarro i C. Bravo.** 2003. The effect of citric acid and microbial phytase on mineral utilization in broiler chicks. *Anim. Feed Sci. Tech.* 110, 201-219.
- Brenes, J., A. Viveros, A. Brenes.** 2002. Los enzimas en nutrición porcina (I). *Anaporc.* 219, 52-77.
- Brooks, S. P. J., D. Oberleas, B. A. Dawson, B. Belonje i B. J. Lampi.** 2001. Proposed phytic acid standard including a method for its analysis. *J. AOAC Int.* 84 (4), 1125-1129.
- Broz, J., P. Oldale, A. H. Perrin-Voltz, G. Rychen, J. Schulze i C. Simoes Nunes.** 1994. Effects of supplemental phytase on performance and phosphorus utilisation in broiler chickens fed a low phosphorus diet without addition of inorganic phosphates. *Brit. Poultry Sci.* 35, 273-280.
- Bruce, J. A. M. i F. Sundstøl.** 1994. The effect of microbial phytase in diets for pigs on apparent ileal and faecal digestibility, pH and flow of digesta measurements in growing pigs fed a high-fibre diet. *Can. J. Anim. Sci.* 75, 121-127.
- Cabahug, S., V. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 1999. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus contents. I. Effects on bird performance and toe ash. *Brit. Poultry Sci.* 40, 660-666.
- Camden, B. J., P. C. H. Morel, D. V. Thomas, V. Ravindran i M. R. Bedford.** 2001. Effectiveness of exogenous microbial phytase in improving the bioavailabilities of phosphorus and other nutrients in maize-soya-bean meal diets for broilers. *Anim. Sci.* 73, 289-297.
- Carlos, A. B. i H. M. Edwards jr.** 1998. The effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and phytase on the natural phytate phosphorus utilization by laying hens. *Poult. Sci.* 77, 850-858.
- Carlsson, N.-G., E.-L. Bergman, E. Skoglund, K. Hasselblad i A.-S. Sandberg.** 2001. Rapid analysis of inositol phosphates. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1695-1701.
- CEFIC.** 2002. Phosphorus - key nutrient in poultry nutrition. *International Poultry Production.* 10 (5), 7-9.
- Cepero Briz, R.** 1992. Requerimientos y aportes de fósforo en nutrición avícola. *Mundo ganadero.* 2, 53-61.
- Cerdan, S., C. A. Hansen, R. Johanson, T. Inubushi i J. R. Williamson.** 1986. Nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of myo-inositol phosphates including inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate. *J. Biol. Chem.* 261 (31), 14676-14680.
- Ceylan, N., S. E. Scheideler i H. L. Stilborn.** 2003. High available phosphorus corn and phytase in layer diets. *Poult. Sci.* 82, 789-795.

- Champagne, E. T.** 1988. Effects of pH on mineral-phytate, protein-mineral- phytate, and mineral-fiber interactions. Possible consequences of atrophic gastritis on mineral bioavailability from high fiber foods. *J. Am. College of Nutr.* 7, 499-508.
- Choct, M. i G. Annison.** 1990. Anti-nutritive activity of wheat pentosans in broiler diets. *Br. Poult. Sci.* 31, 811-821.
- Choct, M. i G. Annison.** 1992. Anti-nutritive effect of wheat pentosans in broiler chickens roles of viscosity and gut microflora. *Br. Poult. Sci.* 33, 821-834.
- Classen, H. L.** 1997. Enzymes in action. *Feed Mix (Enzymes Special Issue)*. 12-16.
- Cooper, J.W.** 1980. Introduction to nuclear magnetic resonance. En: *Spectroscopy techniques for organic chemists*. Ed Wiley, Nova York, USA.
- Cowieson, A. J., T. Acamovic i M. R. Bedford.** 2004. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *Brit. Poultry Sci.* 42 (1), 101-108.
- Cromwell, G. L., R. D. Coffey, H. J. Monegue i J. H. Randolph.** 1995. Efficacy of low-activity, microbial phytase in improving the bioavailability of phosphorus in corn-soybean meal diets for pigs. *J. Anim. Sci.* 73, 449-456.
- Cromwell, G. L., T. S. Stahly, R. D. Coffey, H. J. Monegue i J. H. Randolph.** 1993. Efficacy of phytase in improving the bioavailability of phosphorus in soybean meal and corn-soybean meal diets for pigs. *J. Anim. Sci.* 71, 1831-1840.
- De Boever, J. L., W. Eeckhout i C. V. Boucque.** 1994. The possibilities of near infrared reflection spectroscopy to predict total-phosphorus, phytate phosphorus and phytase activity in vegetable feedstuffs. *Netherlands Journal of Agricultural Science.* 42 (4), 357-369.
- Debicki-Garnier, A. M. i M. Hruby.** 2003. The effect of phytase and betaine on broiler performance and excreta characteristics. En: *Proc 14th European Symposium of Poultry Nutrition*. Lillehammer, Noruega. pp 14-15.
- Denbow, D. M., E. A. Grabau, G. H. Lacy, E. T. Kornegay, D. R. Russell i P. F. Umbeck.** 1998. Soybeans transformed with a fungal phytase gene improve phosphorus availability for broilers. *Poult. Sci.* 77, 878-881.
- Denbow, D. M., V. Ravindran, E. T. Kornegay, Z. Yi i R. M. Hulet.** 1995. Improving phosphorus availability in soybean meal for broilers by supplemental phytase. *Poult. Sci.* 74, 1831-1842.
- Dieckmann, A., R. Timmler i M. Rodehutsord.** 2002. Investigation on the optimal Ca:P ration in studies on P availability in broiler chicken. En: *Proc. 11th European Poultry Conference*. Bremen, Alemanya, p. 104.

- Duskova, D., M. Marounek i P. Brezina.** 2000. Determination of phytic acid in feeds and faeces of pigs and poultry by capillary isotachopheresis. *J. Sci. Food Agric.* 81, 36-41.
- Dvoráková, J., J. Kopecký, V. Havlíček i V. Kren.** 2000. Formation of myo-inositol phosphates by *Aspergillus niger* 3-phytase. *Folia Microbiol.* 45 (2), 128-132.
- Edens, F. W., C. R. Parkhurst, P. R. Ferket, G. B. Havenstein i A. E. Sefton.** 2002. A demonstration of postpellet application of dry phytase to broiler diets. *J. Appl. Poult. Res.* 11, 34-45.
- Edwards jr, H. M.** 1993. Dietary 1,25-dihydroxicholecalciferol supplementation increases natural phytate phosphorus utilization in chickens. *J. Nutr.* 123, 567-577.
- Eeckhout, W. i M. De Paepe.** 1994. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 47, 19-29.
- Engelen, A. J., F. C. van der Heeft, P. H. G. Randsdorp i E. L. C. Smit.** 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.* 77 (3), 760-764.
- Engelen, A. J., F. C. van der Heeft, P. H. G. Randsdorp, W. A. C. Somers, J. Schaefer i B. J. C. van der Vat.** 2001. Determination of phytase activity in feed by a colorimetric enzymatic method: collaborative interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 84 (3), 629-633.
- Esteve-García, E.** 2001. Mineral balance and tolerance of phytase SP in turkeys. Comunicació personal.
- Farrell, D. J. i E. A. Martin.** 1998. Strategies to improve the nutritive value of rice bran in poultry diets. III. The addition of inorganic phosphorus and a phytase to duck diets. *Brit. Poultry Sci.* 39, 601-611.
- Ferguson, N. S., R. S. Gates, J. L. Taraba, A. H. Cantor, A. J. Pescatore, M. L. Straw, M. J. Ford i D. J. Burnham.** 1998. The effect of dietary protein and phosphorus on ammonia concentration and litter composition in broilers. *Poult. Sci.* 77, 1085-1093.
- Francesch, M., S. Pérez-Moya, I. Badiola i J. Brufau.** 1999. Effect of cereal and feed enzyme on water consumption, dietary metabolizable energy and nutrient digestibility in broiler chickens. En: Proc. 12<sup>th</sup> European Symposium on Poultry Nutrition. Veldhoven, Holanda. pp. 242-245.
- Gentile, J. M., K. R. Roneker, S. E. Crowe, W. G. Pond i X. G. Lei.** 2003. Effectiveness of an experimental consensus phytase in improving dietary phytate-phosphorus utilization by weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 81, 2751-2757.
- Gheisari, A., R. Bahadorani i J. Pourreza.** 2003. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and phytate phosphorus availability of corn-wheat-soybean meal diet in broiler chicks. En: Proc. 14<sup>th</sup> European Symposium of Poultry Nutrition. Lillehammer, Noruega. pp. 42-44.
- Gordon, R. W. i D. A. Roland sr.** 1997. Performance of commercial laying hens fed various phosphorus levels, with and without supplemental phytase. *Poult. Sci.* 76, 1172-1177.

- Gordon, R. W. i D. A. Roland sr.** 1998. Influence of supplemental phytase on calcium and phosphorus utilization in laying hens. *Poult. Sci.* 77, 290-294.
- Graf, E.** 1986. *En: Phytic acid chemistry and applications.* Editor: E. Graf, Pilatus Press, Minneapolis, USA.
- Graf, E., K. L. Empson, K. L. i J. W. Eaton.** 1987. Phytic acid: a natural antioxidant. *J. Biol. Chem.* 262 (24), 11647-11650.
- Grandhi, R. R.** 2001. Effect of supplemental phytase and ideal dietary amino acid ratios in covered and hullless-barley-based diets on pig performance and excretion of phosphorus and nitrogen in manure. *Can. J. Anim. Sci.* 81, 115-124.
- Greiner, R.** 2002a. Purification and characterization of three phytases from germinated lupine seeds (*Lupinus albus* var. *amiga*). *J. Agric. Food Chem.* 50, 6858-6864.
- Greiner, R. i M. L. Alminger.** 1999. Purification and characterization of a phytate-degrading enzyme from germinated oat (*Avena sativa*). *J. Sci. Food Agric.* 79, 1453-1460.
- Greiner, R., M. L. Alminger i N.-G. Carlsson.** 2001. Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of baker's yeast. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2228-2233.
- Greiner, R., M. L. Alminger, N.-G. Carlsson, M. Muzquiz, C. Burbano, C. Cuadrado, M. M. Pedrosa i C. Goyoaga.** 2002b. Pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytases of legume seeds. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6865-6870.
- Greiner, R., U. Konietzny i K. D. Jany.** 1998. Purification and properties of a phytase from rye. *Journal of Food Biochemistry.* 22, 143-161.
- Hall, I. E., R. B. Shirley, R. I. Bakalli, S. E. Aggrey, G. M. Pesti i H. M. Edwards jr.** 2003. Power of two methods for the estimation of bone ash of broilers. *Poult. Sci.* 82, 414-418.
- Han, Y. M., F. Yang, A. G. Zhou, E. R. Miller, P. K. Ku, M. G. Hogberg i X. G. Lei.** 1997. Supplemental phytases of microbial and cereal sources improve dietary phytate phosphorus utilization by pigs from weanling through finishing. *J. Anim. Sci.* 75, 1017-1025.
- Han, Y. M., K. R. Roneker, W. G. Pond i X. G. Lei.** 1998. Adding wheat middlings, microbial phytase, and citric acid to corn-soybean meal diets for growing pigs may replace inorganic phosphorus supplementation. *J. Anim. Sci.* 76, 2649-2656.
- Harper, A. F., E. T. Kornegay i T. C. Schell.** 1997. Phytase supplementation of low-phosphorus growing-finishing pig diets improves performance, phosphorus digestibility, and bone mineralization and reduces phosphorus excretion. *J. Anim. Sci.* 75, 3174-3186.
- Hatzack, F. R., i S. K. Rasmussen.** 1999. High-performance thin-layer chromatography method for inositol phosphate analysis. *J. Chromat. B.* 736, 221-229.

- Hatzack, F., F. Hübel, W. Zhang, P. E. Hansen i S. K. Rasmussen.** 2001. Inositol phosphates from barley low-phytate grain mutants analysed by metal-dye detection HPLC and NMR. *Biochem. J.* 354, 473-480.
- Haug, W. i H. J. Lantzsch.** 1983. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *J. Sci. Food Agric.* 34, 1423-1426.
- Helander, E., M. Näsi i K. Partanen.** 1995. Effects of supplementary *Aspergillus niger* phytase on the availability of plant phosphorus, other minerals and nutrients in growing pigs fed on high-pea diets. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* 76, 66-79.
- Hockett, E. A.** 1991. Barley. En: *Handbook of cereal science and technology*. Editat per K. J. Lorenz i K. Kulp. Ed. Dekker. New York, USA. pp: 133-198.
- Hoseney, R. C.** 1994. *Principles of cereal, science and technology*. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, USA.
- Huff, W. E., P. A. Moore, P. W. Waldroup, J. M. Balog, G. R. Huff, N. C. Rath, T. C. Daniel i V. Raboy.** 1998. Effect of dietary phytase and high available phosphorus corn on broiler chicken performance. *Poult. Sci.* 77, 1899-1904.
- Hull, S. R., J. S. S. Gray i R. Montgomery.** 1999. Autohydrolysis of phytic acid. *Anal. Biochem.* 273, 252-260.
- Huyghebaert, G.** 1996a. The response of broiler chicks to phase feeding for P, Ca and phytase. *Arch. Geflügelkd.* 60 (3), 132-141.
- Huyghebaert, G.** 1996b. Effects of dietary calcium, phosphorus, Ca/P-ratio and phytase on zootechnical performances and mineralisation in broiler chicks. *Arch. Geflügelkd.* 61 (2), 53-61.
- Ibrahim, S., J. P. Jacob i R. Blair.** 1999. Phytase supplementation to reduce phosphorus excretion of broilers. *J. Appl. Poult. Res.* 8, 414-425.
- Jalal, M. A. i S. E. Scheideler.** 2001. Effect of supplementation of two different sources of phytase on egg production parameters in laying hens and nutrient digestibility. *Poult. Sci.* 80, 1463-1471.
- Jayarajah, C. N., H.-R. Tang, J. A. Robertson i R. R. Selvendran.** 1997. Dephytinisation of wheat bran and the consequences for fibre matrix non-starch polysaccharides. *Food Chem.* 58 (1-2), 5-12.
- Jeroch, H. i W. Peter.** 1994. The effectiveness of microbial phytase addition to layer rations on maize and wheat basis. *Journal für landwirtschaftliche Forschung*. November, 361-368.
- Johnson, K., L. G. Barrientos, L. Le i P. N. Murthy.** 1995. Application of two-dimensional total correlation spectroscopy for structure determination of individual inositol phosphates in a mixture. *Anal. Biochem.* 231, 421-431.

- Johnson, L. A.** 1991. Barley. En: Handbook of cereal science and technology. Editat per K. J. Lorenz i K. Kulp. Ed. Dekker. New York, USA. pp: 55-132.
- Jongbloed, A. W. i P. A. Kemme.** 1998. Disponibilitat del fósfor en ingredients alimenticis para ganado porcino. Anaporc. 175, 26-39.
- Jongbloed, A. W., P. A. Kemme i Z. Mroz.** 1990. The effect of *Aspergillus niger* phytase in diets for pigs on concentration and apparent digestibility of dry matter, total phosphorus and inositol phosphates in different sections of the alimentary tract. Rapport IVVO n° 221.
- Jongbloed, A. W., Z. Mroz, R. van der weij-Jongbloed i P. A. Kemme.** 2000. The effects of microbial phytase, organic acids and their interaction in diets for growing pigs. Livestock Production Science. 67, 113-122.
- Kaminska, B. Z.** 1997. Effect of supplemental phytase to laying hens diets of different phosphorus content. J. Anim. Feed Sci. 6, 369-378.
- Karn, J. F.** 2001. Phosphorus nutrition of grazing cattle: a review. Anim. Feed Sci. Tech. 89, 133-153.
- Kemme, P. A.** 1998. Phytate and phytases in pig nutrition, impact on nutrient digestibility and factors affecting phytase efficacy. Tesi Doctoral.
- Kemme, P. A. i A. W. Jongbloed.** 1993. Effect of *Aspergillus niger* phytase, soaking and age on the digestibilities of proximate components, Ca and P in diets for pigs. Rapport IVVO-DLO n° 245.
- Kemme, P. A., A. Lommen, L. H. De Jonge, J. D. Van der Klis, A. W. Jongbloed, Z. Mroz i A. C. Beynen.** 1999a. Quantification of inositol phosphates using <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy in animal nutrition. J. Agric. Food Chem. 47, 5116-5121.
- Kemme, P. A., A. W. Jongbloed, Z. Mroz i A. C. Beynen.** 1997a. The efficacy of *aspergillus niger* phytase in rendering phytate phosphorus available for absorption in pigs is influenced by pig physiological status. J. Anim. Sci. 75, 2129-2138.
- Kemme, P. A., A. W. Jongbloed, Z. Mroz, J. Kogut i A. C. Beynen.** 1999b. Digestibility of nutrients in growing-finishing pigs is affected by *Aspergillus niger* phytase, phytate and lactic acid levels 2. Apparent total tract digestibility of phosphorus, calcium and magnesium and ileal degradation of phytic acid. Livestock Production Science. 58, 119-127.
- Kemme, P. A., J. S. Radcliffe, A. W. Jongbloed i Z. Mroz.** 1997b. The effects of sow parity on digestibility of proximate components and minerals during lactation as influenced by diet and microbial phytase supplementation. J. Anim. Sci. 75, 2147-2153.
- Kerovuo, J., J. Rouvinen i F. Hatzack.** 2000. Analysis of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: indication of a novel reaction mechanism. Biochem. J. 352, 623-628.

- Kerovuo, J., M. Lauraeus, P. Nurminen, N. Kalkkinen i J. Apajalahti.** 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (6), 2079-2085.
- Keshavarz, K.** 2000a. Nonphytate phosphorus requirement of laying hens with and without phytase on a phase feeding program. *Poult. Sci.* 79, 748-763.
- Keshavarz, K.** 2000b. Reevaluation of nonphytate phosphorus requirement of growing pullets with and without phytase. *Poult. Sci.* 79, 1143-1153.
- Keshavarz, K.** 2003a. Effects of continuous feeding of low-phosphorus diets with and without phytase during the growing and laying periods on performance of two strains of leghorns. *Poult. Sci.* 82, 1444-1456.
- Keshavarz, K.** 2003b. The effect of different levels of non phytate phosphorus with and without phytase on the performance of four strains of laying hens. *Poult. Sci.* 82, 71-91.
- Keshavarz, K. i R. E. Austic.** 2004. The use of low-protein, low-phosphorus, amino acid- and phytase- supplemented diets on laying hens performance and nitrogen and phosphorus excretion. *Poult. Sci.* 83, 75-83.
- Kirby, L. K. i T. S. Nelson.** 1988. Total and phytate phosphorus content of some feed ingredients derived from grains. *Nutr. Reports Intern.* 37 (2), 277-280.
- Klein Holkenborg, A. B. M., A. G. van der Lee, P. H. M. de Bot, G. Hemke i A. Kies.** 2003. Effect of different phytase sources on ileal phosphorus digestibility in layers. 14th European Symposium of Poultry Nutrition. 40-41.
- Kleplacka, M.** 1990. Infrared spectroscopy study of interactions between phytate and protein in rapeseed. *Acta Alimentaria.* 19 (4), 295-304.
- Kornegay, E. T. i H. Qian.** 1996. Replacement of inorganic phosphorus by microbial phytase for young pigs fed on a maize-soyabean-meal diet. *Br. J. Nutr.* 76, 563-578.
- Kornegay, E. T., D. M. Denbow, Z. Yi i V. Ravindran.** 1996. Response of broilers to graded levels of microbial phytase added to maize-soyabean-meal-based diets containing three levels of non-phytate phosphorus. *Br. J. Nutr.* 75, 839-852.
- Lan, G. Q., N. Abdullah, S. Jalaludin i Y. W. Ho.** 2002. Efficacy of supplementation of a phytase-producing bacteria culture on the performance and nutrient use of broiler chickens fed corn-soybean meal diets. *Poult. Sci.* 81, 1522-1532.
- Lantzsch, H. J., S. Wjst i W. Drochner.** 1995. The effect of dietary calcium on the efficacy of microbial phytase in rations for growing pigs. *J. Anim. Physiol. a Anim. Nutr.* 73, 19-26.
- Ledoux, D. R., K. Zyla i T. L. Veum.** 1995. Substitution of phytase for inorganic phosphorus for turkeys hens. *J. Appl. Poultry Res.* 4, 157-163.

- Lehrfeld, J.** 1994. HPLC separation and quantitation of phytic acid and some inositol phosphates in foods: problems and solutions. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2726-2731.
- Lei, X. G., P. K. Ku, E. R. Miller, M. T. Yokoyama i D. E. Ullrey.** 1994. Calcium level affects the efficacy of supplemental microbial phytase in corn-soybean meal diets of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 72, 139-143.
- Lei, X., P. K. Ku, E. R. Miller, D. E. Ullrey i M. T. Yokoyama.** 1993. Supplemental microbial phytase improves bioavailability of dietary zinc to weanling pigs. *J. Nutr.* 123, 1117-1123.
- Leske, K. L. i C. N. Coon.** 1999. A bioassay to determine the effect of phytase on phytate phosphorus hydrolysis and total phosphorus retention of feed ingredients as determined with broilers and laying hens. *Poult. Sci.* 78, 1151-1157.
- Li, D., X. Che, Y. Wang, C. Hong i P. A. Thacker.** 1998. Effect of microbial phytase, vitamin D3, and citric acid on growth performance and phosphorus, nitrogen and calcium digestibility in growing swine. *Anim. Feed Sci. Tech.* 73, 173-186.
- Lim, H. S., H. Namkung i I. K. Paik.** 2003. Effects phytase supplementation on the performance, egg quality, and phosphorus excretion of laying hens fed different levels of dietary calcium and nonphytate phosphorus. *Poult. Sci.* 82, 92-99.
- Liu, J., D. W. Bollinger, D. R. Ledoux i T. L. Veum.** 1998. Lowering the dietary calcium to total phosphorus ratio increases phosphorus utilization in low-phosphorus corn-soybean meal diets supplemented with microbial phytase for growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 76, 808-813.
- Liu, J., D. W. Bollinger, D. R. Ledoux i T. L. Veum.** 2000. Effects of dietary calcium:phosphorus ratios on apparent absorption of calcium and phosphorus in the small intestine, cecum, and colon of pigs. *J. Anim. Sci.* 78, 106-109.
- López Álvarez, J. A.** 2002. Estabilidad de la fitasa de la *Peniophora Lycii* frente a los tratamientos térmicos de los piensos. *Anaporc.* 218, 80-85.
- Lorenz, K. J. i Kulp, K.** 1991. *Handbook of Cereal Science and Technology.* Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- Marquardt, R. R.** 1997. Enzyme enhancement of the nutritional value of cereals: role of viscous, water-soluble, nonstarch polysaccharides in chick performance. En: *Enzymes in Poultry and Swine Nutrition.* Editat per Marquardt, R. R. i Han Z. Capítol 2.
- Matsui, T., Y. Nakagawa, A. Tamura, C. Watanabe, K. Fujita, T. Nakajima i H. Yano.** 2000. Efficacy of yeast phytase in improving phosphorus bioavailability in a corn-soybean meal-based diet for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 78, 94-99.
- Mattern, P. J.** 1991. Barley. En: *Handbook of cereal science and technology.* Editat per K. J. Lorenz i K. Kulp. Ed. Dekker. New York, USA. pp: 1-54.

- McKnight, W. F.** 1999a. Performance responses of broilers fed diets formulated to equal nutrient levels with and without Natuphos. En: BASF Technical Symposium (Use of Natuphos phytase in broiler nutrition and waste management). Atlanta, USA. pp 9-32.
- McKnight, W. F.** 1999b. The impact of phytase and high available phosphorus corn on broiler performance and phosphorus excretion. En: BASF Technical Symposium (Use of Natuphos phytase in broiler nutrition and waste management). Atlanta, USA. pp 57-66.
- Mendoza Parra, M. A.** 2002. Les phytases: Structure, caractérisation et applications. <http://www.123bio.net/revue/phytases>.
- Miles, D. M., P. A. Moore, D. R. Smith, D. W. Rice, H. L. Stilborn, D. R. Rowe, B. D. Lott, S. L. Branton i J. D. Simmons.** 2003. Total and water-soluble phosphorus in broiler litter over three flocks with alum litter treatment and dietary inclusion of high available phosphorus corn and phytase supplementation. *Poult. Sci.* 82, 1544-1549.
- Mitchell, R. D. i H. M. Edwards jr.** 1996a. Additive effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and phytase on phytate phosphorus utilization and related parameters in broiler chickens. *Poult. Sci.* 75, 111-119.
- Mitchell, R. D. i H. M. Edwards jr.** 1996b. Effects of phytase and 1,25-dihydroxycholecalciferol on phytate utilization and the quantitative requirement for calcium and phosphorus in young broiler chickens. *Poult. Sci.* 75, 95-110.
- Mohanna, C. i Y. Nys.** 1999. Changes in zinc and manganese availability in broiler chicks induced by vegetal and microbial phytases. *Anim. Feed Sci. Tech.* 77, 241-253.
- Mroz, Z., A. W. Jongbloed and P. A. Kemme.** 1994. Apparent digestibility and retention of nutrients bound to phytate complexes as influenced by microbial phytase and feeding regimen in pigs. *J. Anim. Sci.* 72, 126-132.
- Mun Choi, Y., H. Joo Suh i J. Man Kim.** 2001. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp KHU-10. *Journal of Protein Chemistry.* 20 (4), 287-292.
- Murai, A., T. Kobayashi, T. Okada i J. Okumura.** 2002. Improvement of growth and nutritive value in chicks with non-genetically modified phytase product from *Aspergillus niger*. *Brit. Poultry Sci.* 43, 687-695.
- Murry, A. C., R. D. Lewis i H. E. Amos.** 1997. The effect of microbial phytase in a pearl millet-soybean meal diet on apparent digestibility and retention of nutrients, serum mineral concentration, and bone mineral density of nursery pigs. *J. Anim. Sci.* 75, 1284-1291.
- Nair, V. C., J. Laflamme i Z. Duvnjak.** 1991. Production of phytase by *Aspergillum ficuum* and reduction of phytic acid content in canola meal. *J. Sci. Food Agric.* 54, 355-365.

- Nakano, T., T. Joh, K. Narita i T. Hayakawa.** 2000. The pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytases from wheat bran of *Triticum aestivum* L. cv. Nourin #61. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 (5), 995-1003.
- Namkung, H. i S. Leeson.** 1999. Effect of phytase enzyme on dietary nitrogen-corrected apparent metabolizable energy and the ileal digestibility of nitrogen and amino acids in broiler chicks. *Poult. Sci.* 78, 1317-1319.
- Näsi, J. M., E. H. Helander i K. H. Partanen.** 1995. Availability for growing pigs of minerals and protein of a high phytate barley-rape seed meal diet treated with *Aspergillus niger* phytase or soaked with whey. *Anim. Feed Sci. Tech.* 56, 83-98.
- Näsi, M.** 1990. Microbial phytase supplementation for improving availability of plant phosphorus in the diet of the growing pigs. *Journal of Agricultural science in Finland.* 62, 435-443.
- Näsi, M., J. Piironen i K. Partanen.** 1999. Efficacy of *Trichoderma reesei* phytase and acid phosphatase activity ratios in phytate phosphorus degradation in vitro and in pigs fed maize-soybean meal or barley-soybean meal diets. *Anim. Feed Sci. Tech.* 77, 125-137.
- Newkirk, R. W., H. L. Classen, M. R. Bedford i J. Inbarr.** 1993. The effects of dietary xylanase, phytase and phosphorus on the performance of laying hens. *Poult. Sci.* 72 (Suppl. 1), 17.
- NRC** (1998).
- O'Dell, B. L. i de Boland, A. R.** 1976. Complexation of phytate with proteins and cations in corn germ and oilseed meal. *J. Agric. Food Chem.* 24, 804-807.
- Omogbenigun, F. O., C. M. Nyachoti i B. A. Slominski.** 2003. The effect of supplementing microbial phytase and organic acids to a corn-soybean based diet fed to early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 81, 1806-1813.
- Onyango, E. M., M. R. Bedford i O. Adeola.** 2004. The yeast production system in which *Escherichia coli* phytase is expressed may affect growth performance, bone ash, and nutrient use in broiler chicks. *Poult. Sci.* 83, 421-427.
- O'Neill, I. K., M. Sargent i M. L. Trimble.** 1980. Determination of phytate in foods by phosphorus-31 Fourier transform nuclear magnetic resonance spectrometry. *Anal. Chem.* 52, 1288-1291.
- O'Quinn, P. R., D. A. Knabe i E. J. Gregg.** 1997. Efficacy of Natuphos in sorghum-based diets of finishing swine. *J. Anim. Sci.* 75, 1299-1307.
- Orban, J. I., O. Adeola i R. Strohshine.** 1999. Microbial phytase in finisher diets of white pekin ducks: effect on growth performance, plasma phosphorus concentration, and leg bone characteristics. *Poult. Sci.* 78, 366-377.
- Paboef, F., A. Pontillart, M. Mahe, H. L. Lacroix, L. Neveu, C. Calvar, B. Landrain i H. Roy.** 2002. Réduction des rejets en phosphore des porcs charcutiers par la suppression de la

supplémentation minérale en phosphore et par l'ajout de phytase microbienne dans des régimes à activité phytasique modérée. Journées de la Recherche Porcine. 34, 175-182.

**Pallauf, J., G. Rimbach, S. Pippig, B. Schindler i E. Most.** 1994. Effect of phytase supplementation to a phytate-rich diet based on wheat, barley and soya on the bioavailability of dietary phosphorus, calcium, magnesium, zinc and protein in piglets. *Agribiol. Res.* 47 (1), 39-48.

**Pan, C. F., F. A. Igbasan, W. Guenter i R. R. Marquardt.** 1998. The effects of enzyme and inorganic phosphorus supplements in wheat- and rye-based diets on laying hens performance, energy, and phosphorus availability. *Poult. Sci.* 77, 83-89.

**Pandey, A., G. Szakacs, C. R. Soccol, J. A. Rodríguez-León i V. T. Soccol.** 2001. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource technology.* 77, 203-214.

**Parrish, F. W., J. P. Madacsi, B. Q. Phillippy, A. G. Wilfred i S. M. Bucu.** 1990. Determination of phytic acid in cottonseed by near- infrared reflectance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 38 (2), 407-409.

**Parsons, C. M.** 1999. The effects of dietary available phosphorus and phytase level on long-term performance of layong hens. En: BASF Technical Symposium (Use of Natuphos phytase in layer nutrition and management). Atlanta, USA. pp. 24-33.

**Paterson, J.** 2003. Cattle phosphorus requirements may be lowered. *Feedstuffs.* April, 21, 11-14.

**Payne, R. L. i L. L. Southern.** 2003. A comparison of two sources of phytase on growth performance and bone ash in commercial broilers. En: Proc. 14th European Symposium of Poultry Nutrition. Lillehammer, Noruega. pp 25-26.

**Pérez-Vendrell, A. M.** 1992. Determinació analítica dels  $\beta$ -glucans de l'ordi. Aplicació a la caracterització dels ordis conreats a Espanya. Tesi doctoral. Tarragona.

**Perney, K. M., A. H. Cantor, M. L. Straw i K. L. Herkelman.** 1993. The effect of dietary phytase on growth performance and phosphorus utilization of broiler chicks. *Poult. Sci.* 72, 2106-2114.

**Peter, C. M. i D. H. Baker.** 2001. Microbial phytase does not improve protein-amino acid utilization in soybean meal fed to young chickens. *J. Nutr.* 131, 1792-1797.

**Peter, C. M., T. M. Parr, E. N. Parr, D. M. Webel i D. H. Baker.** 2001. The effects of phytase on growth performance, carcass characteristics, and bone mineralization of late-finishing pigs fed maize-soyabean meal diets containing no supplemental phosphorus, zinc, copper and manganese. *Anim. Feed Sci. Tech.* 94, 199-205.

**Peter, C. M., Y. Han, S. D. Boling-Frankenbach, C. M. Prsons i D. H. Baker.** 2000. Limiting order of amino acids and the effects of phytase on protein quality in corn gluten meal fed to young chicks. *J. Anim. Sci.* 78, 2150-2156.

- Phillippy, B. Q., K. D. White, M. R. Johnston, S.-H. Tao i M. R. S. Fox.** 1987. Preparation of inositol phosphates from sodium phytate by enzymatic and nonenzymatic hydrolysis. *Anal. Biochem.* 162, 115-121.
- Phillippy, B. i M. R. Johnston.** 1985. Determination of phytic acid in foods by ion chromatography with post-column derivatization. *J. Food Sci.* 50, 541-542.
- Pointillart, A.** 1991. Enhancement of phosphorus utilization in growing pigs fed phytate rich diets by using rye bran. *J. Anim. Sci.* 69, 1109-1115.
- Pointillart, A., A. Fourdin i N. Fontaine.** 1987. Importance of cereal phytase activity for phytate phosphorus utilization by growing pigs fed diets containing triticale or corn. *J. Nutr.* 117, 907-913.
- Pos, J., H. Enting i A. Veldman.** 2003. Effect of phytase and dietary calcium level on litter quality and broiler performance. En: *Proc. 14th European Symposium of Poultry Nutrition.* Lillehammer, Noruega. pp 27-28.
- Punna, S. i D. A. Roland sr.** 1999. Influence of supplemental microbial phytase on first cycle hens fed phosphorus-deficient diets from day one of age. *Poult. Sci.* 78, 1407-1411.
- Punna, S. i D. A. Roland sr.** 2000. Dietary supplementation of phytase and hy-line W-36 pullets fed varying levels of dietary phosphorus from day 1 through 18 wk. *J. Appl. Poult. Res.* 9, 35-42.
- Punna, S. i D. A. Roland sr.** 2001. Influence of dietary phytase supplementation on incidence and severity in broilers divergently selected for tibial dyschondroplasia. *Poult. Sci.* 80, 735-740.
- Qian, H., E. T. Kornegay i D. E. Conner jr.** 1996a. Adverse effects of wide calcium:phosphorus ratios on supplemental phytase efficacy for weanling pigs fed two dietary phosphorus levels. *J. Anim. Sci.* 74, 1288-1297.
- Qian, H., E. T. Kornegay i D. M. Denbow.** 1996b. Phosphorus equivalence of microbial phytase in turkey diets as influenced by calcium to phosphorus ratios and phosphorus levels. *Poult. Sci.* 75, 69-81.
- Qian, H., E. T. Kornegay i D. M. Denbow.** 1997. Utilization of phytate phosphorus and calcium as influenced by microbial phytase, cholecalciferol, and the calcium:total phosphorus ratio in broiler diets. *Poult. Sci.* 76, 37-46.
- Qian, H., E. T. Kornegay i H. P. Veit.** 1996c. Effects of supplemental phytase and phosphorus on histological, mechanical and chemical traits of tibia and performance of turkeys fed on soyabean-meal-based semi-purified diets high in phytate phosphorus. *Br. J. Nutr.* 76, 263-272.
- Radcliffe, J. S., Z. Zhang i E. T. Kornegay.** 1998. The effects of microbial phytase, citric acid, and their interaction in a corn-soybean meal-based diet for weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 76, 1880-1886.

- Rama Rao, S. V., V. Ravindra Reddy i V. Ramasubba Reddy.** 1999. Enhancement of phytate phosphorus availability in the diets of commercial broilers and layers. *Anim. Feed Sci. Tech.* 79, 211-222.
- Ravindran, V., E. T. Kornegay, D. M. Denbow, Z. Yi i R. M. Hulet.** 1995b. Response of turkey poults to tiered levels of Natuphos phytase added to soybean meal-based semi-purified diets containing three levels of nonphytate phosphorus. *Poult. Sci.* 74, 1843-1854.
- Ravindran, V., P. H. Selle i W. L. Bryden.** 1999a. Effects of phytase supplementation, individually and in combination, with glycanase, on the nutritive value of wheat and barley. *Poult. Sci.* 78, 1588-1595.
- Ravindran, V., P. H. Selle, G. Ravindran, P. C. H. Morel, A. K. Kies i W. L. Bryden.** 2001. Microbial phytase improves performance, apparent metabolizable energy, and ileal amino acid digestibility of broilers fed a lysine-deficient diet. *Poult. Sci.* 80, 338-344.
- Ravindran, V., S. Cabahug, G. Ravindran i W. L. Bryden.** 1999b. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. *Poult. Sci.* 78 (5), 699-706.
- Ravindran, V., W. L. Bryden i E. T. Kornegay.** 1995a. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Biol. Rev.* 6 (2), 125-143.
- Rebollar, P. G. i G. G. Mateos.** 2000. El fósforo en nutrición animal. Necesidades, valoración de materias primas y mejora de la disponibilidad (I). *Anaporc.* 203, 90-112.
- Reddy, N.R., M. D. Pierson, S. K. Sathe i D. K. Salunkhe.** 1989. Phytates in cereals and legumes. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Ribeiro, A. M. L., A. J. Mireles i K. C. Klasing.** 2003. Interactions between dietary phosphorus level, phytase supplementation and pelleting on performance and bone parameters of broilers fed high levels of rice bran. *Anim. Feed Sci. Tech.* 103, 155-161.
- Riond, J. L.** 2003. Phytate und phytases in horses. <http://www.forschungpferd.ch/proj/13a0101a.html>
- Roberson, K. D.** 1999. Estimation of the phosphorus requirement of weanling pigs fed supplemental phytase. *Anim. Feed Sci. Tech.* 80, 91-100.
- Roberson, K. D. i H. M. Edwards jr.** 1994. Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and phytase on zinc utilization in broiler chicks. *Poult. Sci.* 73, 1312-1326.
- Rodehutschord, M., P. Wendt i E. Strobel.** 2003. Reducing the phosphorus concentration in diets for turkeys between 10 and 22 weeks of age. *Brit. Poultry Sci.* 44 (4), 591-597.
- Roland sr, D. A. i S. Punna.** 1999. Effect of dietary supplementation of phytase on Hy-Line W-36 pullets fed varying levels of dietary phosphorus 1. Day one to 18 weeks. En: BASF Technical Symposium (Use of Natuphos phytase in layer nutrition and management). Atlanta, USA. pp 36-46.

- Roland sr, D. A., X. Zhang, G. R. McDaniel i S. K. Rao. 1999.** Efectiveness of Natuphos phytase in improving performance of broilers breeder hens. En: BASF Technical Symposium. (Use of Natuphos phytase in broiler nutrition and waste management). Atlanta, USA. pp. 1-6.
- Rounds, M. A. i S. S. Nielsen. 1993.** Anion-exchange high-performance liquid chromatography with post-column detection for the analysis of phytic acid and other inositol phosphates. *J. Chromat. A.* 653, 148-152.
- Rutherford, S. M., T. K. Chung i P. J. Moughan. 2002.** The effect of microbial phytase on ileal phosphorus and amino acid digestibility in the broiler chicken. *Brit. Poultry Sci.* 44, 598-606.
- Rutherford, S. M., T. K. Chung, P. C. H. Morel i P. J. Moughan. 2004.** Effect of microbial phytase on ileal digestibility of phytate phosphorus, total phosphorus and amino acids in a low-phosphorus diet for broilers. *Poult. Sci.* 83, 61-68.
- Sandberg, A. S. 2002.** Bioavailability of minerals in legumes. *Brit. J. Nutr.* 88, 3, S281-S285.
- Sandberg, A.-S. i H. Andersson. 1988.** Effect of dietary phytase on the digestion of phytate in the stomach and small intestine of humans. *J. Nutr.* 118, 469-473.
- Sandberg, A.-S. i R. Ahderinne. 1986.** HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates in foods and intestinal contents. *J. Food Sci.* 51 (3), 547-550.
- Sandberg, A.-S., H. Andersson, N. G. Carlsson i B. Sandström. 1987.** Degradation products of bran phytate formed during digestion in the human small intestine: effect of extrusion cooking on digestibility. *J. Nutr.* 117, 2061-2065.
- Sandberg, A.-S., L. R. Hulthén i A. M. Türk. 1996.** Dietary *Aspergillus niger* phytase increases iron absorption in humans. *J. Nutr.* 126, 476-480.
- Sands, J. S., D. Ragland, C. Baxter, B. C. Joern, T. E. Sauber i O. Adeola. 2001.** Phosphorus bioavailability, growth performance, and nutrient balance in pigs fed high available phosphorus corn and phytase. *J. Anim. Sci.* 79, 2134-2142.
- Sauveur, B. 1989.** Phosphore phytique et phytases dans l'alimentation des volailles. *INRA Prod. Anim.* 2 (5), 343-351.
- Saxena, H. C. 1996.** Need for reappraisal. Practical aspects of calcium, phosphorus and vitamin D3 nutrition for broilers. *World Poultry.* 12, 57.
- Schinkell, A. P. 1999.** Swine management. [http://www.ansc.purdue.edu/courses/ansc443/Class\\_notes/Nutrition.html](http://www.ansc.purdue.edu/courses/ansc443/Class_notes/Nutrition.html)
- Scott, T. A., R. Kampen i F. G. Silversides. 1999.** The effect of phosphorus, phytase enzyme, and calcium on the performance of layers fed corn-based diets. *Poult. Sci.* 78, 1742-1749.
- Sebastian, S., S. P. Touchburn i E. R. Chavez. 1998.** Implications of phytic acid and supplemental microbial phytase in poultry nutrition: a review. *Worlds Poultry Sci. J.* 54, 27-47.

- Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague.** 1996a. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and utilization of dietary calcium, phosphorus, copper, and zinc in broiler chickens fed corn-soybean diets. *Poult. Sci.* 75, 729-736.
- Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague.** 1996b. Efficacy of supplemental microbial phytase at different dietary calcium levels on growth performance and mineral utilization of broiler chickens. *Poult. Sci.* 75, 1516-1523.
- Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague.** 1997. Apparent digestibility of protein and amino acids in broiler chickens fed a corn-soybean diet supplemented with microbial phytase. *Poult. Sci.* 76, 1760-1769.
- Selle, P. H., D. J. Cadogan i W. L. Bryden.** 2003. Effects of phytase supplementation of phosphorus-adequate, lysine-deficient, wheat-based diets on growth performance of weaner pigs. *Austral. J. Agric. Res.* 54, 323-330.
- Shelton, J. L., L. L. Southern, T. D. Bidner, M. A. Persica, J. Braun, B. Cousins i W. F. McKnight.** 2003. Effect of microbial phytase on energy availability, and lipid and protein deposition in growing swine. *J. Anim. Sci.* 81, 2053-2062.
- Shirley, R. B. i H. M. Edwards jr.** 2003. Graded levels of phytase past industry standards improves broiler performance. *Poult. Sci.* 82, 671-680.
- Simons, P. C. M., A. W. Jongbloed, H. A. J. Versteegh i P. A. Kemme.** 1992. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in poultry and pigs. En: *Nutrition Conference for the Feed Industry*. Atlanta, USA. pp. 100-109.
- Simons, P. C. M., H. A. J. Versteegh, A. W. Jongbloed, P. A. Kemme, P. Slump, K. D. Bos, M. G. E. Wolters, R. F. Beudeker i G. J. Verschoor.** 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *Br. J. Nutr.* 64, 525-540.
- Skoglund, E., M. Näsi i A.-S. Sandberg.** 1998. Phytate hydrolysis in pigs fed a barley-rape seed meal diet treated with *Aspergillus niger* phytase or steeped with whey. *Can. J. Anim. Sci.* 75, 175-180.
- Skoglund, E., N. G. Carlsson i A.-S. Sandberg.** 1997. Determination of isomers of inositol mono- to hexaphosphates in selected foods and intestinal contents using high-performance ion chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 45, 431-436.
- Smith, T. N., G. M. Pesti, R. I. Bakalli, J. Kilburn i H. M. Edwards Jr.** 2001. The use of near-infrared reflectance spectroscopy to predict the moisture, nitrogen, calcium, total phosphorus, gross energy, and phytate phosphorus content of broiler excreta. *Poult. Sci.* 80, 314-319.
- Snow, J. L., M. W. Douglas i C. M. Parsons.** 2003. Phytase effects on amino acid digestibility in molted laying hens. *Poult. Sci.* 82, 474-477.

- Sohail, S. S. i D. A. Roland sr.** 1999. Influence of supplemental phytase on performance of broilers four to six weeks of age. *Poult. Sci.* 78, 550-555.
- Sohail, S. S. i D. A. Roland sr.** 2000. Influence of phytase on calcium utilization in comercial layers. *J. Appl. Poult. Res.* 9, 81-87.
- Soonchanrernying, S. i H. M. Edwards Jr.** 1993. Phytate content of excreta and phytate retention in the gastrointestinal tract of young chickens. *Poult. Sci.* 72, 1906-1916.
- Spencer, J. D., G. L. Allee i T. E. Sauber.** 2000. Phosphorus bioavailability and digestibility of normal and genetically modified low-phytate corn for pigs. *J. Anim. Sci.* 78, 675-681.
- Stahl, C. H., K. R. Roneker, J. R. Thornton i X. G. Lei.** 2000. A new phytase expressed in yeast effectively improves the bioavailability of phytate phosphorus to weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 78, 668-674.
- Swick, R. A. i F. J. Ivey.** 1991. Effect of dietary phytase addition on broiler performance in phosphorus deficient diets. Comunicació personal.
- Tangendjaja, B., T. K. Chung i J. Broz.** 2002. Effects of different sources of microbial phytase on production performance of brown-egg layers fed diets containing a high level of rice bran. *J. Appl. Poult. Res.* 11, 212-216.
- Torrallardona, D., D. Solà-Oriol, J. Broz i J. Brufau.** 2003. Effects of dicalcium phosphate level and of phytase on performance and P excretion in growing pigs. En: 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs. Banff, Canadà Vol.2, 323-325.
- Traylor, S. L., G. L. Cromwell, M. D. Lindemann i D. A. Knabe.** 2001. Effects of level supplemental phytase on ileal digestibility of amino acids, calcium, and phosphorus in dehulled soybean meal for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 79, 2634-2642.
- Um, J. S. i I. K. Paik.** 1999. Effects of microbial phytase supplementation on egg production, eggshell quality, and mineral retention of laying hens fed different levels of phosphorus. *Poult. Sci.* 78, 75-79.
- Valaja, J., S. Plaami i H. Siljander-Rasi.** 1998. Effect of microbial phytase on digestibility and utilisation of phosphorus and protein in pigs fed wet barley protein with fibre. *Anim. Feed Sci. Tech.* 72, 221-233.
- Valencia, Z. i E. R. Chavez.** 2002. Phytase and acetic acid supplementation in the diet of early weaned piglets: effect on performance and apparent nutrient digestibility. *Nutrition Research.* 22, 623-632.
- Vallardi González, M., R. Morales López i E. Ávila González.** 2002. Efecto de la adición de fitasa como fuente de fósforo inorgánico en dietas para gallinas de postura. *Téc Pecu Méx.* 40 (2), 181-186.

- Van der Klis, J. D., H. A. J. Versteegh, P. C. M. Simons i A. K. Kies.** 1997. The efficacy of phytase in corn-soybean meal-based diets for laying hens. *Poult. Sci.* 76, 1535-1542.
- Viveros, A., A. Brenes, I. Arija i C. Centeno.** 2002. Effects of microbial phytase supplementation on mineral utilization and serum enzyme activities in broilers chicks fed different levels of phosphorus. *Poult. Sci.* 81, 1172-1183.
- Viveros, A., C. Centeno, A. Brenes, R. Canales i A. Lozano.** 2000. Phytase and acid phosphatase activities in plant feedstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4009-4013.
- Viveros, A., I. Arija, C. Centeno i A. Brenes.** 2002a. Efecto de la administración de fitasas de origen vegetal y microbiano sobre la utilización del fósforo en pollos broilers. *Investigaciones Agrarias.* 17 (1-2), 81-92.
- Vogt, H.** 1992. Effect of supplemental phytase to broiler rations different in phosphorus content. 2nd trial. *Arch. Geflügelkd.* 56, 5, 222-226.
- Vohra, A. i T. Satyanarayana.** 2003. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology.* 23 (1), 29-60.
- Vollhardt, K. P. C.** 1987. Ácidos carboxílicos y espectroscopia infrarroja. En: *Química Orgánica.* Ed. Omega S.A., Barcelona, Espanya.
- Waldroup, P. K.** 2001. Dietary nutrient allowances for chickens and turkeys. *Feedstuffs.* July, 11, 56-65.
- Waldroup, P. W., J. H. Kersey, E. A. Saleh, C. A. Fritts, F. Yan, H. L. Stilborn, R. C. Crum jr i V. Raboy.** 2000. Nonphytate phosphorus requirement and phosphorus excretion of broiler chicks fed diets composed of normal or high available phosphate corn with and without microbial phytase. *Poult. Sci.* 79, 1451-1459.
- Ward, N. E.** 2002. Phytase stability may be improved by new technology. *Feedstuffs.* March, 4, 11-12.
- Webb, E. C.** 1992. *Enzyme nomenclature.* Academic Press, INC. Londres, Regne Unit. p. 349.
- Windisch, W. i M. Kirchgeßner.** 1996. Effect of microbial phytase supplementation on performance data and metabolism of phosphorus, calcium and nitrogen at different levels of calcium supply in broilers. *Arch. Geflügelkd.* 60 (1), 42-47.
- Wodzinsky, R. J. i A. H. J. Ullah.** 1996. Phytase. *Advances in Applied Microbiology.* 42, 263-302.
- Wu, Y. B., V. Ravindran, D. G. Thomas, M. J. Birtles i W. H. Hendriks.** 2004. Influence of phytase and xylanase, individually or in combination, on performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology in broilers fed wheat-based diets containing adequate level of phosphorus. *Brit. Poultry Sci.* 45 (1), 76-84.

- Wu, Y. B., V. Ravindran i W. H. Hendriks.** 2003. Effects of microbial phytase, produced by solid-state fermentation, on the performance and nutrient utilisation of broilers fed maize- and wheat-based diets. *Brit. Poultry Sci.* 44 (5), 710-718.
- Wyss, M., L. Pasamontes, R. Rémy, J. Kohler, E. Kuszniir, M. Gadiant, F. Müller i A. P. G. M. van Loon.** 1998. Comparison of the thermostability properties of three acid phosphatases from molds: *Aspergillus fumigatus* phytase, *A. niger* phytase, and *A. niger* pH 2.5 acid phosphatase. *Applied and Environmental Microbiology.* 64 (11), 4446-4451.
- Yan, F., C. A. Fritts i P. Waldroup.** 2003a. Evaluation of modified dietary phosphorus levels with and without phytase supplementation on live performance and fecal phosphorus levels in broiler diets. 1. Full-term feeding recommendations. *J. Appl. Poult. Res.* 12, 174-182.
- Yan, F., J. H. Kersey i P. W. Waldroup.** 2001. Phosphorus requirement of broiler chicks three to six weeks of age as influenced by phytase supplementation. *Poult. Sci.* 80, 455-459.
- Yan, F., J. H. Kersey, C. A. Fritts i P. Waldroup.** 2003b. Phosphorus requirement of broiler chicks six to nine weeks of age as influenced by phytase supplementation. *Poult. Sci.* 82, 294-300.
- Yan, F., J. H. Kersey, C. A. Fritts, P. W. Waldroup, H. L. Stilborn, R. C. Crum jr, D. W. Rice i V. Raboy.** 2000. Evaluation of normal yellow dent corn and high available phosphorus corn in combination with reduced dietary phosphorus and phytase supplementation for broilers grown to market weights in litter pens. *Poult. Sci.* 79, 1282-1289.
- Yanke, L. J., H. D. Bae, L. B. Selinger i K. J. Cheng.** 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology.* 144, 1565-1573.
- Yi, Z. i E. T. Kornegay.** 1996. Sites of phytase activity in the gastrointestinal tract of young pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 61, 361-368.
- Yi, Z., E. T. Kornegay i D. M. Denbow.** 1996a. Effect of microbial phytase on nitrogen and amino acid digestibility and nitrogen retention of turkey poult fed corn-soybean meal diets. *Poult. Sci.* 75, 979-990.
- Yi, Z., E. T. Kornegay, V. Ravindran i D. M. Denbow.** 1996b. Improving phytate phosphorus availability in corn and soybean meal for broilers using microbial phytase and calculation for phosphorus equivalency values for phytase. *Poult. Sci.* 75, 240-249.
- Yi, Z., E. T. Kornegay, V. Ravindran, M. D. Lindemann i J. H. Wilson.** 1996c. Effectiveness of Natuphos® phytase in improving the bioavailabilities of phosphorus and other nutrients in soybean meal-based semipurified diets for young pigs. *J. Anim. Sci.* 74, 1601-1611.
- Zacharias, B., H. Ott i W. Drochner.** 2003. The influence of dietary microbial phytase and copper on copper status in growing pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 106, 139-148.
- Zanini, S. F. i M. H. Sazzad.** 1999. Effects of microbial phytase on growth and mineral utilisation in broilers fed on maize soyabean-based diets. *Brit. Poultry Sci.* 40, 348-352.

- Zhang, X., D. A. Roland, G. R. McDaniel i S. K. Rao.** 1999. Effect of Natuphos phytase supplementation to feed on performance and ileal digestibility of protein and amino acids of broilers. *Poult. Sci.* 78, 1567-1572.
- Zimmerman, B., H. J. Lantzsch, R. Mosenthin, F. J. Schöner, H. K. Biesalski i W. Drochner.** 2002. Comparative evaluation of the efficacy of cereal and microbial phytases in growing pigs fed diets with marginal phosphorus supply. *J. Sci. Food Agric.* 82, 1298-1304.
- Zimmerman, B., H. J. Lantzsch, R. Mosenthin, H. K. Biesalski i W. Drochner.** 2003. Additivity of the effect of cereal and microbial phytases on apparent phosphorus absorption in growing pigs fed diets with marginal P supply. *Anim. Feed Sci. Tech.* 104, 143-152.
- Zimmerman, R. i R. Dvorak.** 1997. Reducing fecal phosphorus with lower dietary phosphorus and allzyme phytase. En: *Alltech's 13th Annual Symposium (Poster)*.
- Zyla, K., A. Wikiera, J. Koreleski, S. Swiatkiewicz, J. Piironen i D. R. Ledoux.** 2000b. Comparison of the efficacies of a novel *Aspergillus niger* mycelium with separate and combined effectiveness of phytase, acid phosphatase, and pectinase in dephosphorylation of wheat-based feeds fed to growing broilers. *Poult. Sci.* 79, 1434-1443.
- Zyla, K., D. Gogol, J. Koreleski, S. Swiatkiewicz i D. R. Ledoux.** 1999. Simultaneous application of phytase and xylanase to broiler feeds based on wheat: feeding experiment with growing broilers. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1841-1848.
- Zyla, K., D. R. Ledoux, M. Kujawski i T. L. Veum.** 1996. The efficacy of an enzymic cocktail and a fungal mycelium in dephosphorylating corn-soybean meal-based feeds fed to growing turkeys. *Poult. Sci.* 75, 381-387.
- Zyla, K., J. Koreleski, S. Swiatkiewicz, A. Wikiera, M. Kujawski, J. Piironen i D. R. Ledoux.** 2000a. Effects of phosphorolytic and cell wall-degrading enzymes on the performance of growing broilers fed wheat-based diets containing different calcium levels. *Poult. Sci.* 79, 66-76.
- Zyla, K., J. Koreleski, S. Swiatkiewicz, D. R. Ledoux i J. Piironen.** 2001. Influence of supplemental enzymes on the performance and phosphorus excretion of broilers fed wheat-based diets to 6 weeks of age. *Anim. Feed Sci. Tech.* 89, 113-118.

## **OBJECTIUS**



El principal objectiu d'aquest treball és estudiar els efectes que l'addició de fitasa microbiana en diferents tipus de dietes per a aus produeix tant en el seu valor nutricional, com en els rendiments productius de les aus, i en el seu impacte mediambiental.

Amb el propòsit d'aconseguir aquest objectiu es van plantejar altres objectius més concrets:

- Avaluar l'efecte de l'addició de la fitasa microbiana i la consegüent reducció del percentatge de inclusió del fòsfor no fític en pinsos per a aus, sobre la biodisponibilitat i la retenció de fòsfor i altres minerals, en funció de la diferent composició de les matèries primeres utilitzades (per exemple, ordi, blat, segó de blat). Aquest objectiu es va pretendre assolir amb els assaigs 1, 2, 3 i 4.
- Estimar el valor de l'equivalència del fòsfor no fític amb les unitats fitasa, a realitzar en l'assaig 1.
- Valorar les millores que la fitasa pot produir, en el valor energètic de les dietes i en la digestibilitat de les diferents fraccions nutritives: proteïna i aminoàcids, fibra i altres hidrats de carboni, midó i lípids, en els assaigs 1, 2, 3, 4 i 5.
- Estudiar la utilitat de incorporació de fitasa en dietes riques en fitasa endògena i en PNA (a base de blat i ordi) i la seva interacció amb altres enzims que poden estar incorporats en aquest tipus de dietes, en l'assaig 5.
- Determinar els productes de la degradació de l'àcid fític per efecte de la fitasa, estudiant la hidròlisi en diferents punts del tracte digestiu dels animals, mitjançant la tècnica analítica de RMN, mostrant-se en el capítol 9.

L'aplicació pràctica d'aquest projecte no se centra només en avaluar la reducció en el medi ambient del fòsfor procedent de les dejeccions d'aus degut al fòsfor no fític incorporat en les dietes, si no, a més, estudiar quines millores globals produeix aquest enzim en l'aprofitament general d'altres

nutrients (nitrogen, calci i altres minerals, quantitat global d'excretes, etc.), minimitzant les seves pèrdues i, per tant, el seu impacte ambiental.

---

---

**EFFECTES DE L'ADDICIÓ DE FITASA MICROBIANA EN EL  
CREIXEMENT DE BROILERS I BIODISPONIBILITAT I EXCRECIÓ  
MINERAL SEGONS EL TIPUS DE DIETA**

J. JUANPERE<sup>1</sup>, A. M. PÉREZ-VENDRELL<sup>1</sup>, E. ANGULO<sup>2</sup> i J. BRUFAU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament de Nutrició Animal, IRTA, Centre Mas Bové, Apartat 415, 43280 Reus, Espanya.

<sup>2</sup>Departament de Producció Animal, UDL, Alcalde Rovira Roure, 177, 25198, Lleida, Espanya.

**Animal Feed Science and Technology (enviat)**



#### **4.1. Introducció**

El fòsfor és un mineral essencial pel creixement animal. Però el fòsfor present en les llavors és en forma de fòsfor fític que no és disponible, degut a la manca o a la limitació de la fitasa endògena en l'aviram. El fòsfor fític es troba unit a alguns cations, com Ca, Mg i K, a proteïnes i a lípids, produint sals insolubles. La baixa utilització del fòsfor fític causa l'addició en excés de fòsfor no fític en el pinso, provocant alguns problemes, com un increment en l'excreció de fòsfor, i consegüentment indueix a problemes mediambientals.

El moresc i el blat són els dos principals cereals emprats en el pinso per a aviram. Els beneficis de la fitasa en dietes de moresc estan ben documentats per a la nutrició de broilers i gallines (Simons i col., 1990; Broz i col., 1994; Mitchell i Edwards, 1996; Van der Klis i col., 1997; Um i Paik, 1999). L'addició de fitasa també té efectes positius en la biodisponibilitat de minerals en broilers (Broz i col., 1994; Sebastian i col., 1996a; Yi i col., 1996; Camden i col., 2001). Encara que el percentatge de fòsfor fític en ambdós cereals és similar (70-80% del fòsfor total pel moresc i 60-80% pel blat, Reddy i col., 1989), la quantitat de fitasa endògena és la principal diferència entre els cereals. Mentre que l'activitat fitàsica endògena del moresc és molt baixa (15 U/kg), l'activitat fitàsica endògena del blat es troba entre 1000 i 1400 U/kg (Eeckhout i De Paepe, 1994), que podria tenir un efecte en la disponibilitat del fòsfor fític. Tanmateix, s'han realitzat pocs estudis al voltant de la inclusió de fitasa en dietes de blat per a pollastres d'engreix (Ravindran i col., 1999; Zyla i col., 1999; Rutherford i col., 2002).

El principal objectiu d'aquest assaig va ser avaluar les millores degudes a l'addició de fitasa microbiana en dietes de blat (amb una elevada activitat fitàsica endògena), i comparar-los amb els resultats obtinguts per les dietes de moresc, sense activitat fitàsica endògena. També es va intentar determinar el nivell òptim de l'enzim fitasa pel cas de les dietes de blat.

## **4.2. Materials i mètodes**

### ***4.2.1. Maneig dels animals***

Es van utilitzar dos vuitanta-vuit pollastres broiler de l'estirp Ross 308 d'1 dia de vida. Només es van fer servir els animals lliures de qualsevol senyal clínic (això és, sense problemes de potes o altres membres, ulls oberts i comportament actiu). Els pollastres es posaren en 48 gàbies situades en dues bateries Petersime<sup>1</sup> provē des de calefacció elèctrica i ventilació forçada, en una habitació sense finestres. Els animals van tenir 23 hores de llum i 1 hora de foscor des del dia 1 fins al 4, 20 h de llum des del dia 4 al 10, i 18 h de llum des del dia 10 fins al final de la prova. Durant la primera setmana, la temperatura de la sala era de 30 – 35°C, entre 29 i 32°C durant la segona setmana, i la darrera setmana entre 27 i 30°C. El pinso en farina i l'aigua es van subministrar *ad libitum* durant tot l'assaig. La prova va acabar als 24 dies.

### ***4.2.2. Tractaments i disseny experimental***

Es van usar quatre tipus de dietes que diferien en el cereal emprat (morenc o blat) i en dos nivells de fòsfor no fític (FNF): 4.5 g/kg (P-normal) i 2.7 g/kg (P-deficient). A les dietes de morenc es va afegir una sola dosi de l'enzim fitasa (600 FTU/kg), mentre que per les dietes de blat es va fer un estudi dosi-resposta amb diferents nivells de l'enzim (0, 200, 400, 600 FTU/kg), com es pot observar en la Taula 4.1. Cada tractament experimental es va replicar sis vegades i cada rèplica contenia vuit broilers mascles.

### ***4.2.3 Fabricació del pinso i composició de les dietes***

Tots els ingredients (excepte el llard, la sal, el fosfat bicàlcic, el carbonat càlcic, el corrector vitamínic i mineral i els productes provats) es van moldre a en un molí de 30 CV, a una mida de sedàs de 3 mm. Es va utilitzar una sola dieta per a tot l'assaig. La composició de les dietes base es mostra en la Taula 4.2. El blat va ser de la varietat Cartaya de la collita de 1998. La fitasa microbiana (EC 3.1.3.8) emprada en aquest estudi va ser Natuphos 5000G de BASF. A partir del

---

<sup>1</sup> Petersime Incubator Company, Gettysburg, Ohio, USA.

dia 18, es va incloure en les dietes 5 g de òxid de titani (IV) per quilo de pinso com a marcador de digestibilitat.

#### **4.2.4. Anàlisis químiques**

Totes les mostres de dietes experimentals i matèries primeres es van moldre a 0.5 mm abans d'analitzar. Les mostres s'analitzaren segons els mètodes oficials acceptats per l'AOAC (1990) per a matèria seca (codi 934.01), proteïna bruta (976.05), extracte eteri (920.39), cendres (942.05) i fibra bruta (978.10). La concentració de fòsfor total es va analitzar espectrofotomètricament pel mètode de molibdo-vanadat (965.17; AOAC, 1990). Les concentracions de calci i zinc es van analitzar per espectrofotometria d'absorció atòmica per flama. L'activitat fitàsica present en les matèries primeres i dels pinsos finals es van analitzar segons Engelen i col. (1994). En les matèries primeres, es va determinar el contingut de fòsfor fític seguint el mètode descrit per Haug i Lantzschi (1983). La concentració de diòxid de titani present en pinsos i excretes es va analitzar segons Short i col. (1996).

#### **4.2.5. Paràmetres productius**

Els pollastres es van pesar conjuntament a l'arribada a la granja, i per lot als 21 dies. El consum de pinso, guany mig diari i l'índex de transformació es van calcular en el període comprès entre els 0 i 21 dies. La mortalitat es registrà cada dia, incloent la causa de la mort. El dotzè dia es va avaluar el percentatge d'animals amb els culs bruts. El consum d'aigua i de pinso i la relació aigua/pinso es va registrar des del dia 15 fins al 17. Al final de l'assaig, es van emprar tots els animals per obtenir la concentració de cendres en dits, com a indicador de la deposició de fòsfor (qualitat de l'os), segons el mètode descrit per Potter i col. (1995).

#### **4.2.6. Assaig de balanç**

Es va utilitzar el mètode de marcador, amb òxid de titani (IV) per determinar l'energia metabolitzable aparent (EMA) i les retencions aparents de fòsfor total, calci i zinc de les dietes experimentals. En el dia 21 es van recollir les excretes, durant un període curt de temps, es van guardar a -20°C, i finalment es van liofilitzar. Posteriorment, les mostres d'excreta es van moldre i

guardar per a analitzar. Va determinar-se l'energia bruta de les mostres de pinsos i excreta mitjançant un calorímetre adiabàtic IKA C-400 (DIN 51900, 1977) per obtenir l'EMA.

#### **4.2.7. Estudis sobre la retenció de minerals**

En el vint-i-dosè dia es van sacrificar totes els animals per injecció intravenosa de pentobarbital sòdic per tal de recollir mostres. Es van tallar els dits del mig de tots els animals (entre el segon i en tercer tars), en van guardar i pesar, i calcinar per tal d'obtenir els valors de cendres dels dits (Cabahug i col., 1999). Tots els procediments van ser aprovats per la Comissió Ètica d'Experimentació Animal de l'IRTA.

#### **4.2.8. Càlculs**

Els valors d'EMA de les dietes es van calcular mitjançant la fórmula següent, fent-se les correccions apropiades per les diferències en el contingut d'humitat.

$$EMA = EB_{al} - [ ( TiO_{2,al} / TiO_{2,exc} ) \times EB_{exc} ]$$

on  $EB_{al}$  és l'energia bruta del pinso,  $EB_{exc}$  és l'energia bruta de l'excreta,  $TiO_{2,al}$  és la concentració de diòxid de titani en el pinso i  $TiO_{2,exc}$  el contingut de diòxid de titani en l'excreta.

Els valors d'energia metabolitzable corregida per una retenció de nitrogen zero ( $EMAn$ ) de les dietes es van calcular segons la fórmula següent:

$$EMAn_{,al} = EMA - [ ( Guany Mig Diari \times 200 \times 8.22 ) / ( Consum Mig Diari \times 6.25 ) ]$$

Les correccions es van fer assumint que el guany de pes està format per 200 g de proteïna per quilo guanyat (Blum i col., 1977), que la proteïna equival a 6.25 vegades el nitrogen Kjeldahl i que l'equivalent d'energia és 8.22 kcal/g N guanyat.

Els coeficients de digestibilitat ileal aparent de nutrients es van calcular de la següent manera, emprant el procediment de marcador inert:

$$Dig X = \{ 1 - [ ( TiO_{2,al} \times X_{exc} ) / ( TiO_{2,exc} \times X_{al} ) ] \}$$

On  $X_{al}$  és la concentració en la dieta i  $X_{exc}$  és la concentració en l'excreta.

#### **4.2.9. Anàlisi estadística**

Les dades es varen analitzar amb una anàlisi de variances amb disseny de blocs a l'atzar, emprant els procediments del General Linear Model (GLM) del Statistical Analysis System Institute Inc. (1985). Els efectes estadístics es van analitzar per cada tipus de dieta (morenc o blat). Les diferències significatives registrades entre les mitjanes dels tractaments per a cada paràmetre es van comparar pel test de Duncan de rangs múltiples amb un 5% de nivell de probabilitat.

Els efectes principals del nivell de FNF i de l'addició de fitasa microbiana van ser analitzats pels següents grups de contrastos lineals:

- a) Nivell de FNF: T-1 i T-4 enfront de T-2 i T-5.
- b) Addició de fitasa microbiana: T-2 i T-5 enfront de T-3 i T-8.

En les dietes de blat, es van examinar les equacions lineals i no lineals dels paràmetres avaluats per a fòsfor no fític (sense fitasa afegida) i per a fitasa afegida en les dietes amb 2.7 g FNF/kg per a trobar l' $R^2$  més elevat. El guany de pes i la concentració de cendres dels dits van ser les variables utilitzades per a calcular les equacions de l'equivalència de P, segons el mètode descrit per Denbow i col. (1995).

## **4.3. Resultats**

### ***4.3.1. Matèries primeres i pinsos***

Abans de començar l'assaig de creixement, es va realitzar un test per determinar l'activitat fitàsica de les dietes, especialment en les dietes de blat, per confirmar l'increment gradual de les dosis. Els resultats es mostren en la Taula 4.3. Els valors analitzats de les dietes van ser superiors als calculats, per exemple 577 enfront de 428 FTU/kg pel T-5, però en les dietes de morenc els valors analitzats i calculats van ser molt similars (5 enfront de 10 FTU/kg per T-1).

### ***4.3.2. Paràmetres productius***

Els pollastres broiler que menjaren dietes de morenc P-deficients consumiren significativament ( $P < 0.01$ ) menys que els que menjaren les dietes P-deficients més fitasa o les dietes P-normal (Taula 4.4). Resultats similars es van obtenir entre els tractaments per l'índex de transformació. El consum d'aigua i pinso va ser avaluat entre els 15 i 17 dies, no observant-se diferències en el consum d'aigua, encara que en el consum de pinso i la relació aigua/pinso van ser diferents estadísticament ( $P < 0.05$ ). El consum de pinso dels animals que menjaren dietes P-deficient va ser més baix que la dels que menjaren dietes P-normal i l'addició de fitasa millorà numèricament aquest paràmetre. En les dietes de blat no s'observaren respostes en cap dels paràmetres productius després d'afegir fitasa (Taula 4.4).

#### **4.3.3. Valors energètics i retenció mineral**

L'energia metabolitzable aparent (EMA) i l'energia metabolitzable aparent corregida per nitrogen (EMAN) de les dietes no canviaren significativament ni en les dietes de morenc ni en les de blat (Taula 4.5) ni per efecte del nivell de fòsfor ni pel nivell de fitasa en cap de les dietes. Les concentracions de humitat i cendres dels dits van incrementar-se significativament ( $P < 0.0001$ ) degut a l'addició de fitasa a les dietes de blat. Les concentracions de cendres dels dits dels animals que menjaren dietes de morenc P-deficients més fitasa afegida van ser significativament més grans que les dels animals que menjaren dietes de morenc P-deficients (Taula 4.6), però en cap cas els resultats no van igualar els obtinguts pels animals que consumiren dietes P-normal. En animals que menjaren dietes de blat, els valors de cendres dels dits incrementaren amb els valors superiors de fitasa afegida (118.8 i 117.3 g/kg per 400 i 600 FTU/kg, respectivament, enfront de 109.3 i 110.7 per 0 i 200 FTU/kg, respectivament), però totes elles eren estadísticament menors que els resultats de les dietes P-normal (132.6 g/kg).

Els coeficients de retenció aparent de fòsfor total i calci es mostren en la Taula 4.6, mentre que la ingesta i excreció diària d'aquests minerals així com la de zinc es mostren en la Taula 4.7. Les dietes control de morenc (4.5 FNF/kg) mostraren els valors de retenció més baixos per fòsfor total i calci. Disminuint el nivell de fòsfor de la dieta, els coeficients de retenció milloraren

significativament per fòsfor total (de 0.63 a 0.78) i per calci (de 0.29 a 0.40). La inclusió de fitasa a les dietes P-deficient produïren els valors més grans de retenció en tots els casos, assolint-se valors de 0.84 i 0.47 per fòsfor total i calci, respectivament. En general, l'excreció mineral segueix patrons contraris a la retenció: l'excreció de minerals dels animals que menjaren dietes amb fitasa va ser significativament menor que les dietes P-normal: 40 enfront de 107 mg/animal/d, respectivament, pel fòsfor total i 178 enfront de 331 mg/animal/d, respectivament, pel calci. L'excreció de zinc va ser 2.5 enfront de 3.2 mg/animal/d per les dietes P-deficient i P-normal, respectivament.

En les dietes de blat, tots els nivells de inclusió de fitasa milloraren la retenció aparent de fòsfor total (al voltant del 30% respecte la dieta P-normal). No s'observaren diferències significatives entre els tractaments en la retenció de calci. Les dietes P-deficients presentaren excrecions de fòsfor total i calci menors, i no es trobaren increments degut a l'addició de fitasa (Taula 4.7). No es trobaren diferències significatives en l'excreció de zinc.

Es van estudiar les equacions lineals i no lineals de diferents paràmetres respecte el nivell de fitasa i la concentració de FNF en les dietes de blat, essent el pes final i la concentració de cendres dels dits les que s'ajustaven millor, els resultats dels quals estan en la Taula 4.8. Els valors equivalents de fòsfor no fític per la fitasa derivats de les equacions prèvies van ser similars, generalment, per al pes final i les concentracions de cendres de dits, que van ser usats per la seva importància metabòlica i econòmica (Taula 4.9). Els valors de les mitjanes de FNF equivalent va ser utilitzat per calcular alguns paràmetres com el P alliberat, el percentatge de P fític alliberat i el P alliberat per 100 U de fitasa. La quantitat total de P alliberat augmentà, però l'eficàcia de 100 unitats d'activitat fitàsica canviaren segons els nivells de fitasa emprats. L'equivalència de P calculada per a 250, 500, 750 i 1000 U de fitasa va ser 0.50, 0.85, 1.20 i 1.55 g, respectivament, que implica que l'alliberació de fòsfor fític es trobaria entre el 22 i el 68%, i una equivalència de 605 U de fitasa per a 1 g de P de fosfat bicàlcic per quilo de pinso.

#### **4.4. Discussió**

En la Taula 4.3 poden observar-se els valors d'activitat fitàsica en dietes de morenc i de blat. Els valors analitzats segueixen les mateixes pautes que les formulades. Encara que les activitats fitàsiques trobades en les dietes de blat van ser més altes que les esperades, es va obtenir un increment uniforme dels nivells de fitasa en els tractaments. Això podria ser explicat si s'assumeix que el blat té una activitat fitàsica endògena menor que la que realment té, però, a més, cal considerar la variabilitat en el mètode analític usat, que podria produir alguna sobreestimació dels resultats.

L'addició de fitasa a dietes de morenc-soja P-deficient millorà els paràmetres productius de broilers als 21 dies arribant fins a valors similars als obtinguts amb els que menjaren dietes P-normal. Com que l'índex de transformació no va canviar, l'increment de pes corporal està relacionat a un major consum de pinso, comparable a la dieta control positiu de morenc. S'han descrit resultats molt semblants en la literatura (Sebastian i col., 1996a; Sebastian i col., 1996b; Kornegay i col., 1996; Namkung i Leeson, 1999; Lan i col., 2002), utilitzant en tots casos nivells similars de fòsfor no fític (entre 2.0 i 3.3 g FNF/kg de dieta). Llavors, en aquests casos, la inclusió de fitasa permet que els animals consumien i creixien com els animals que menjaren el control positiu amb un nivell més gran de fòsfor no fític, tal com recomana el NRC (1994). Tanmateix, en dietes de blat, l'addició gradual de fitasa no varià cap dels paràmetres productius (Taula 4.4), encara que amb els nivells de fitasa superiors (400 – 600 U/kg) s'obtingueren resultats millors de creixement i consum. Considerant que la fitasa microbiana afegida va ser la mateixa en les dietes de morenc i de blat, i consegüentment amb la mateixa activitat, la manca de diferències estadístiques en dietes de blat podria ser atribuïda a una major activitat fitàsica endògena del blat, tal com descriuen Eeckhout i De Paepe (1994), estant corroborat per l'anàlisi dels pinsos (Taula 4.3). Les millores en el guany de pes i l'índex de transformació per l'addició de fitasa han estat descrites en dietes de blat amb diferent continguts d'àcid fític (Cabahug i col., 1999), especialment a nivells baixos, mostrant una interacció significativa fitasa × fòsfor no fític; observant petites diferències en els paràmetres

productius amb nivells afegits de fitasa entre 400 i 800 U/kg. En aquest assaig, els paràmetres productius assoliren un plateau a nivells de fitasa exògena superiors a 400 U/kg, trobant-se llavors només petites variacions en les respostes.

Tal com es pot veure en la Taula 4.5, no es trobaren diferències significatives entre els tractaments en els valors energètics de les dietes. L'energia metabolitzable aparent de les dietes de moresc van estar molt propers als formulats teòricament: 12.90 MJ/kg (valor teòric) enfront de 12.74 i 12.96 MJ/kg (valors experimentals). En les dietes de blat, la disminució del fòsfor no fític i l'addició gradual de l'enzim fitasa incrementà els valors energètics de les dietes per sobre del 4%, però no estadísticament significatiu. Ravindran i col. (1999) van descriure resultats similars, no trobant canvis significatius en l'EMA quan la fitasa va ser afegida a dietes amb blat amb valors baixos d'EMA, mentre que utilitzant blat amb valors normals d'EMA, l'enzim fitasa millorà els valors energètics. Aquests autors també van descriure millores de l'energia degudes a l'addició de la fitasa properes al 4-5%, i Ravindran i col. (2000) també van trobar valors similars en dietes de blat-sorgo. Ravindran i col. (1999) postularen que la fitasa podria actuar com una xilanasa exògena trencant les parets cel·lulars i millorant l'acció entre els enzims digestius i els continguts cel·lulars. És de notar que el valor de l'EMA utilitzat per Ravindran i els valors utilitzats en aquest estudi són molts similars (12.40 MJ/kg i 12.48 MJ/kg, respectivament).

La mineralització dels ossos es va estimar avaluant els valors de concentració de cendres dels dits (Taula 4.6). En les dietes de moresc, l'addició de fitasa a dietes P-deficient incrementà la concentració de cendres de dits però no s'arribà als valors de les dietes P-normal; les millores podrien ser degudes a l'alliberament de minerals (P, Ca, Zn, Cu) del complex fitat per la fitasa que permetria als animals distribuir-los i utilitzar-los per a constituir els ossos (Ravindran i col., 1995). Resultats similars es van observar en les dietes de blat; els animals que menjaren dietes de blat amb fitasa afegida en les dosis més grans (400 – 600 U/kg) mostraren valors de cendres dels dits més grans o iguals que no pas els animals que menjaren dietes de moresc.

El nivell de fòsfor no fític tingué més efectes en la retenció aparent de fòsfor total que el nivell de fitasa (Taula 4.7). La presència d'enzim incrementà numèricament la retenció aparent de fòsfor total en ambdós tipus de dietes, mentre que s'observaren diferències estadísticament significatives quan es disminuï el nivell de fòsfor no fític. Això podria indicar que havent més fòsfor no fític en la dieta, hi hauria una menor eficiència en la utilització del fòsfor; però els animals podrien utilitzar quantitats semblants de fòsfor, i que el mineral no utilitzat és excretat, observant-se resultats comparables en un altre dels nostres assaigs (Juanpere i col., 2004). Tal com mostra la Taula 4.7, els pollastres consumiren diàriament menys fòsfor en dietes P-deficients, excretant menys fòsfor, mantenint constant la quantitat de fòsfor utilitzat. Kornegay i col. (1996) trobaren resultats similars als presentats en aquest assaig després de l'addició de fitasa també en dietes de morenc-soja. En aquell estudi, els autors van trobar augments en la retenció aparent i la quantitat de fòsfor i calci retingut i una reducció de l'excreció de P, quan es provaren dietes P-deficients i la inclusió de fòsfor no fític disminuï el coeficient de retenció aparent de fòsfor. En les dietes de blat, els coeficients de retenció de fòsfor total van ser millors després de l'addició de fitasa, produint-se els resultats més grans amb els nivells propers a 200 o 400 U de fitasa/kg, encara que només numèricament, per la qual cosa es pot assumir que la presència de l'enzim microbià millorà la retenció aparent de fòsfor total, i que la millora no segueix un patró dosi-resposta. Kornegay (1999) va revisar algunes proves amb broilers on la inclusió de fitasa a dietes de blat P-deficient incrementà la retenció de fòsfor fític i total.

L'excreció de fòsfor dels animals que menjaren dietes de blat no va ser afectada per la inclusió de l'enzim fitasa. El fòsfor total de la dieta va ser el principal factor que afectà l'excreció de fòsfor. Els pollastres que menjaren les dietes P-deficient mostraren un menor consum de pinso que els animals que menjaren les dietes P-normal, que implicaria un menor consum de fòsfor total que produeix també una menor excreció d'aquest mineral. Zyla i col. (2001) també va obtenir una disminució en l'excreció de P (en un 45%) quan es disminuï ren les concentracions de fòsfor no fític i total en dietes de blat.

Els valors més grans de la retenció de Ca es varen trobar en dietes de moresc P-deficient més fitasa, mentre que en les dietes de blat, els millors coeficients de la retenció de calci es van obtenir després de l'addició de fitasa encara que no estadísticament significatives. Les millores en la retenció de calci degut a la fitasa en dietes de moresc està ben descrita en la bibliografia. Zanini i Sazzad (1999) trobaren que l'addició de 500 U de fitasa/kg a dietes de moresc que contenien 4 g de FNF/kg augmentaren la concentració i utilització de Ca en 100 mg/animal/d, mentre que Sebastian i col. (1996b) observaren que la fitasa microbiana (600 U/kg) afegida a dietes P-deficients (3 g FNF/kg) milloraven tant la retenció de P i Ca i la utilització d'aquests minerals en pollastres broilers que menjaren dietes de moresc-soja.

En la Taula 4.6, es mostra que no es troba diferències estadísticament significatives entre els tractaments en la retenció de calci, i que ni la disminució en el fòsfor total de la dieta ni l'addició de fitasa van afectar aquests resultats, que podria estar influenciat pels grans valors de la fitasa endògena en dietes de blat.

En les dietes de blat formulades per contenir diferents nivells de fitasa, es va estudiar la regressió lineal i no lineal de diferents paràmetres, com el pes final, la concentració de cendres dels dits, la retenció de fòsfor i calci i l'excreció de fòsfor i calci. Els resultats que millor s'ajustaven foren els de pes final i la concentració de cendres dels dits, i són els que es van utilitzar per calcular l'equivalència de P, segons el procediment descrit en la literatura per varis autors (Denbow i col., 1995, Kornegay i col., 1996 i Yi i col., 1996 en broilers i Qian i col., 1996 en galls dindi). Alguns d'aquests autors van utilitzar altres paràmetres com el consum de pinso (Denbow i col., 1995) o retenció de fòsfor (Qian i col., 1996). Els resultats d'aquest assaig indiquen que van ser necessàries 605 U de fitasa/kg per substituir 1 g de P en forma de fosfat bicàlcic. Aquest valor es va obtenir de l'expressió  $Y \text{ (g P)} = 2.855 + 1.398 * 10^{-3} X \text{ (unitats de fitasa)}$ , obtingut de la mitjana d'ambdós paràmetres (pes final i concentració de cendres dels dits). La majoria dels estudis citats prèviament presentaren que les equacions no lineals s'ajustaven millor que les lineals. En aquest treball, l'interval d'activitat fitàsica en pinsos va estar entre 0 i 600 U/kg, mentre que altres autors usen

valors el doble de gran (Denbow i col., 1995). L'interval 0-600 U/kg correspondria a la primera part de la corba, on el creixement és major, i es poden assimilar amb una recta (en el nostre cas,  $R^2 = 0.55$  pel pes final i  $0.77$  per les cendres dels dits). Els resultats de la regressió no lineal ajustada per a la concentració de cendres dels dits presentava uns valors més alts de  $R^2$  i una major probabilitat ( $P < 0.001$ ) (dades no mostrades), però també uns errors estàndards massa grans, donant una pitjor resolució dels paràmetres avaluats.

El valor calculat de l'equivalència de fòsfor de 605 U de fitasa/kg en dietes que contenen 2.7 g de FNF per quilo de dieta és menor que els trobats en altres estudis. Denbow i col. (1995) van trobar un valor mitjà entre 2.0 i 2.7 g de P per quilo en dietes de morenc igual a 821 U de fitasa/kg (utilitzant els paràmetres guany de pes i concentració de cendres dels dits), i, quan les dietes contenen 2.7 g P/kg, el valor obtingut era 1128 U/Kg, el doble del trobat en aquest estudi, explicació que podria venir donada per la fitasa endògena. És de suposar que en utilitzar blat en les dietes, i tenir una major activitat endògena, no necessitarà l'addició d'una quantitat elevada de fitasa microbiana exògena. Yi i col. (1996) van trobar que 1g de P era equivalent a 785 U fitasa/kg en forma de fosfat defluorinat, quan els pollastres menjaren dietes de morenc-soja formulada a 2.7 de fòsfor no fític per quilo de pinso. En galls dindi que també menjaren dietes de morenc i contenen 2.7 g FNF/kg, Qian i col. (1996) van trobar que 1 de P era equivalent a 652 U de fitasa/kg. D'acord amb tots aquests resultats obtinguts, el valor trobat per l'equivalència de fòsfor amb les unitats fitasa sembla variar amb el nivell de FNF de la dieta i amb la font de FNF. Els fosfats minerals tenen diferents biodisponibilitats, així que, generalment, la biodisponibilitat del fosfat bicàlcic acostuma a ser major que la del fosfat monocàlcic quan aquest darrer es emprat com a estàndard, i aquesta biodisponibilitat varia en gran manera amb els estàndards de referència i les condicions experimentals utilitzats (Soares, 1995).

El fòsfor alliberat per cada 100 U de fitasa va ser 0.20 i 0.15 g/kg pels valors de 250 i 1000 U/kg, respectivament, observant-se que la quantitat disminueix a mida que la fitasa augmenta, tal com Kornegay i col. (1996) també observaren. Per tal de millorar la precisió d'aquests resultats, seria

necessari establir més nivells de fòsfor no fític. No obstant, els resultats trobats van ser prou semblants als d'altres autors considerant que en el present treball els pollastres van consumir dietes de blat, i que en la majoria de les dietes descrites en la literatura per estudiar l'equivalència de P s'usa el moresc com a cereal.

Els resultats d'aquest estudi demostren que l'addició de fitasa a dietes de moresc-soja deficientes de fòsfor permet mantenir la mateixa productivitat que les dietes formulades seguint els requeriments del NRC, amb nivells semblants de retenció mineral i disminuint l'excreció de minerals. L'addició gradual de fitasa a dietes de blat-soja deficientes de fòsfor no va modificar la productivitat dels animals, encara que a nivells alts de fitasa (400 i 600 U/kg) milloraren la retenció de fòsfor.

Basant-se en les dades de pes final i concentració de cendres dels dits, els resultats d'utilitzar la regressió lineal mostren que 1 g de P de fosfat bicàlcic podria ser equivalent a 605 U de fitasa/kg de dieta de blat.

Taula 4.1. Tractaments experimentals avaluats.

Tractaments	Cereal	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa <sup>1</sup> (FTU/kg)
T-1	Moresc	4.5	-
T-2	Moresc	2.7	-
T-3	Moresc	2.7	600
T-4	Blat	4.5	-
T-5	Blat	2.7	-
T-6	Blat	2.7	200
T-7	Blat	2.7	400
T-8	Blat	2.7	600

<sup>1</sup> Enzim usat: Natuphos 5000G (activitat fitàsica: 5831 U/g), (aportat per BASF)

Taula 4.2. Composició de les dietes base experimentals.

Ingredient (g/kg)	Dietes de moresc		Dietes de blat	
	P-Normal	P-deficient	P-Normal	P-deficient
Moresc	542.8	565.5	-	-
Blat	-	-	619.8	645.9
Farina de soja 480 g CP/kg	370.2	366.8	293.7	286.4
Llard	43.1	35.4	41.2	34.0
DL-Metionina	2.5	2.5	2.6	2.6
L-Lisina HCl	-	0.1	1.9	2.0
L-Treonina	-	-	0.2	0.2
Carbonat càlcic	15.5	14.2	16.0	14.6
Fosfat bicàlcic	17.1	6.8	16.2	5.9
Sal	4.7	4.7	4.4	4.4
Clorur de colina	0.1	0.1	-	-
Minerals i vitamines	4.0	4.0	4.0	4.0
Contingut estimat de nutrients (g/kg):				
Energia metabolitzable (MJ/kg)	12.90	12.90	12.48	12.48
Protèina bruta	219.7	220.0	220.0	220.0
Lisina	12.0	12.0	12.0	12.0
Met + Cys	9.2	9.2	9.2	9.2
Calci	11.0	8.1	11.0	8.1
Fòsfor Total	6.4	4.6	6.8	5.0
Fòsfor no fític	4.5	2.7	4.5	2.7
Fòsfor fític	1.9	1.9	2.3	2.3
Fitasa endògena (U/kg)	6	6	410	428

<sup>1</sup> Un quilo de pinso conté: Vitamina A, 12000 IU; Vitamina D<sub>3</sub>, 2400 IU; Vitamina E, 30 mg; Vitamina K<sub>3</sub>, 3 mg; Vitamina B<sub>1</sub>, 2.2 mg; Vitamina B<sub>2</sub>, 8.0 mg; Vitamina B<sub>6</sub>, 5.0 mg; Vitamina B<sub>12</sub>, 11.0 g; Àcid fòlic, 1.5 mg; Biotina, 150 g; Pantotenat càlcic, 25 mg; Àcid Nicotínic, 65 mg; Etoxiquina, 150 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; Zn, 40 mg; Mn, 60 mg; Se, 0.15 mg; I, 0.33 mg.

Taula 4.3. Activitat fitàsica trobada en les dietes experimentals.

Tractaments	Cereal	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	Enzim fitasa analitzat (FTU/g)
T-1	Moresc	4.5	-	10
T-2	Moresc	2.7	-	36
T-3	Moresc	2.7	600	674
T-4	Blat	4.5	-	476
T-5	Blat	2.7	-	577
T-6	Blat	2.7	200	938
T-7	Blat	2.7	400	1215
T-8	Blat	2.7	600	1461

Taula 4.4. Paràmetres productius de broilers que menjaren les dietes experimentals.

Cereal	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/kg)	Pes final (g)	GMD (g/d)	CMD (g/d)	IT (g/g)	Consum d'aigua (g)	Consum de pinso (g)	Relació aigua/pinso (g/g)	Culs bruts
moresc	4.5	-	641 <sup>a</sup>	28 <sup>a</sup>	42 <sup>a</sup>	1.48	117	50 <sup>a</sup>	2.4 <sup>b</sup>	0.35
moresc	2.7	-	562 <sup>b</sup>	25 <sup>b</sup>	37 <sup>b</sup>	1.52	100	39 <sup>b</sup>	2.6 <sup>a</sup>	0.39
moresc	2.7	500	621 <sup>a</sup>	27 <sup>a</sup>	41 <sup>a</sup>	1.51	114	45 <sup>ab</sup>	2.5 <sup>ab</sup>	0.39
		Error estàndard	14.2	0.7	0.8	0.015	6.2	2.5	0.07	0.111
		Pr > F	**	**	**	NS	NS	*	*	NS
Blat	4.5	-	592	26	41	1.59	112	49	2.3	0.35
Blat	2.7	-	533	23	38	1.63	80	36	1.8	0.39
Blat	2.7	200	563	25	40	1.60	99	44	2.2	0.39
Blat	2.7	400	574	25	39	1.57	108	44	2.5	0.47
Blat	2.7	600	563	25	41	1.66	110	48	2.3	0.31
		Error estàndard	13.5	0.6	1.0	0.023	8.1	3.63	0.20	0.086
		Pr > F	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Contrasts (Pr > T)										
Dietes P-deficient vs. P-normal										
			***	***	***	NS	**	**	NS	NS
No enzim vs. fitasa										
			*	*	**	NS	*	*	NS	NS

NS: no estadísticament significatiu; \* (P &lt; 0.05); \*\* (P &lt; 0.01); \*\*\* (P &lt; 0.001).

<sup>a, b</sup> Mitjanes en una columna sense lletra comuna difereixen significativament (P < 0.05).

Taula 4.5. Energia metabolitzable aparent de les dietes experimentals.

Cereal	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	EMA (MJ/kg MS)	EMAn (MJ/kg MS)
Moresc	4.5	-	13.0	12.3
Moresc	2.7	-	12.8	12.2
Moresc	2.7	600	12.7	12.1
		Error estàndard	0.14	0.15
		Pr > F	NS	NS
Blat	4.5	-	12.0	11.4
Blat	2.7	-	12.1	11.5
Blat	2.7	200	12.1	11.5
Blat	2.7	400	12.5	11.9
Blat	2.7	600	12.0	11.5
		Error estàndard	0.13	0.13
		Pr > F	NS	NS
<b>Contrasts (Pr &gt; T)</b>				
Dieta P-normal vs. Dieta P-deficient			NS	NS
No enzim vs. Fitasa			NS	NS

NS: no estadísticament significatiu.

Taula 4.6. Concentracions de cendres dels dits i de minerals en l'excreta; retenció aparent de fòsfor total i calci de les dietes.

Cereal	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	Cendres dits (g/kg)	Fòsfor total en excreta (%/MS)	Coefficient retenció fòsfor total	Calci en excreta (%/MS)	Coefficient retenció calci
Moresc	4.5	-	132 <sup>a</sup>	0.92 <sup>a</sup>	0.63 <sup>b</sup>	2.83 <sup>a</sup>	0.29 <sup>b</sup>
Moresc	2.7	-	109 <sup>c</sup>	0.37 <sup>b</sup>	0.78 <sup>a</sup>	1.74 <sup>b</sup>	0.40 <sup>a</sup>
Moresc	2.7	600	117 <sup>b</sup>	0.36 <sup>b</sup>	0.80 <sup>a</sup>	1.48 <sup>b</sup>	0.47 <sup>a</sup>
		Error estàndard	15.3	0.029	0.032	0.113	0.017
		Pr > F	**	***	**	***	***
Blat	4.5	-	133 <sup>a</sup>	0.95 <sup>a</sup>	0.53 <sup>b</sup>	2.75 <sup>a</sup>	0.18
Blat	2.7	-	109 <sup>c</sup>	0.47 <sup>b</sup>	0.69 <sup>a</sup>	2.01 <sup>b</sup>	0.17
Blat	2.7	200	111 <sup>c</sup>	0.40 <sup>c</sup>	0.73 <sup>a</sup>	1.75 <sup>b</sup>	0.16
Blat	2.7	400	119 <sup>b</sup>	0.43 <sup>bc</sup>	0.72 <sup>a</sup>	1.77 <sup>b</sup>	0.21
Blat	2.7	600	117 <sup>b</sup>	0.44 <sup>bc</sup>	0.71 <sup>a</sup>	1.86 <sup>b</sup>	0.25
		Error estàndard	11.6	0.023	0.050	0.122	0.020
		Pr > F	***	***	NS	***	***
<b>Contrasts (Pr &gt; T)</b>							
Dieta P-normal vs. Dieta P-deficient			***	***	NS	***	***
No enzim vs. Fitasa			***	NS	NS	NS	NS

NS: no estadísticament significatiu; \*\* (P &lt; 0.01); \*\*\* (P &lt; 0.001).

<sup>a, b</sup> Mitjanjes en una columna sense lletra comuna difereixen significativament (P < 0.05).

Taula 4.7. Ingesta i excreció diària de minerals dels animals que menjaren les dietes experimentals.

Cereal	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/kg)	Ingesta (mg/animal/d)		Excreció (mg/animal/d)		
			Fòsfor total	Calci	Fòsfor total	Calci	Zinc
Morenc	4.5	-	285 <sup>a</sup>	432 <sup>a</sup>	107 <sup>a</sup>	331 <sup>a</sup>	3.2 <sup>a</sup>
Morenc	2.7	-	183 <sup>b</sup>	317 <sup>b</sup>	40 <sup>b</sup>	190 <sup>b</sup>	2.6 <sup>b</sup>
Morenc	2.7	500	203 <sup>b</sup>	335 <sup>b</sup>	40 <sup>b</sup>	178 <sup>b</sup>	2.5 <sup>b</sup>
	Error estàndard		4.7	7.5	4.7	17.9	0.14
	Pr > F		***	***	***	***	**
Blat	4.5	-	272 <sup>a</sup>	425 <sup>a</sup>	127 <sup>a</sup>	367 <sup>a</sup>	2.7
Blat	2.7	-	184 <sup>c</sup>	279 <sup>c</sup>	58 <sup>b</sup>	251 <sup>b</sup>	2.7
Blat	2.7	200	201 <sup>b</sup>	285 <sup>c</sup>	55 <sup>b</sup>	239 <sup>b</sup>	2.8
Blat	2.7	400	185 <sup>c</sup>	279 <sup>c</sup>	53 <sup>b</sup>	218 <sup>b</sup>	2.7
Blat	2.7	600	200 <sup>bc</sup>	331 <sup>b</sup>	58 <sup>b</sup>	249 <sup>b</sup>	2.7
	Error estàndard		5.2	8.6	4.6	21.2	0.18
	Pr > F		***	***	***	***	NS
Contrasts (Pr > T)							
Dietes P-deficient vs. P-normal			***	***	***	***	NS
No enzim vs. Fitasa			***	***	NS	NS	NS

NS: no estadísticament significatiu; \*\* (P &lt; 0.01); \*\*\* (P &lt; 0.001).

<sup>a, b</sup> Mitjanes en una columna sense lletres comunes diferencien significativament (P < 0.05).

Taula 4.8. Equacions de resposta per pes final i cendres de dits de broilers que menjaren dietes de blat amb nivells creixents de fòsfor no fític i de fitasa afegida.

Ítem	Fòsfor no fític	R <sup>2</sup>	Fitasa afegida	R <sup>2</sup>
<b>Dietes de blat</b>				
Pes final (g)	$Y = 442.09 + 33.27X$	0.99	$Y = 542.49 + 0.052X$	0.55
Cendres dits (g/kg)	$Y = 74.379 + 12.949X$	0.86	$Y = 109.23 + 0.016X$	0.77

Taula 4.9. Valors calculats d'equivalència de fòsfor per a dietes de blat.

Fitasa, U / kg dieta	250	500	750	1000
	FNF equivalent, g/kg			
Pes final <sup>1</sup>	3.41	3.80	4.19	4.58
Cendres dits <sup>2</sup>	3.00	3.31	3.61	3.92
Mitjana de FNF equivalent, g/kg <sup>3</sup>	3.20	3.55	3.90	4.25
P alliberat, g/kg	0.50	0.85	1.20	1.55
% de P fític <sup>4</sup>	22	37	52	68
P alliberat (g/kg) / 100 U de fitasa	0.202	0.171	0.160	0.155

<sup>1</sup>  $Y = 3.018 + 1.566 * 10^{-3} X$ ,  $r^2 = 0.99$ ; on  $Y = \text{FNF (g/kg)}$  i  $X = \text{activitat fitasa (Unitats per quilogram)}$

<sup>2</sup>  $Y = 2.691 + 1.230 * 10^{-3} X$ ,  $r^2 = 0.99$ ; on  $Y = \text{FNF (g/kg)}$  i  $X = \text{activitat fitasa (Unitats per quilogram)}$

<sup>3</sup> Valors de pes final i cendres dits amb un pes estadístic igual.

<sup>4</sup> Fòsfor fític en aquesta dieta era de 2.3 g/kg.

#### **4.5. Referències bibliogràfiques**

**Association of Official Analytical Chemists.** 1990. Official methods of analysis. 15th ed., Assoc. Anal. Chem., Washington D. C.

**Blum, J. C., M. Plouzeau i P. Stevans.** 1977. Influence des conditions d'élevage et de préparation sur la qualité des viandes de volaille et sur les oeufs. *Revue Française de Diététique* 82: 7-32.

**Broz, J., P. Oldale, A. H. Perrin-Voltz, G. Rychen, J. Schulze i C. Simoes Nunes.** 1994. Effects of supplemental phytase on performance and phosphorus utilisation in broiler chickens fed a low phosphorus diet without addition of inorganic phosphates. *Brit. Poultry Sci.* 35, 273–280.

- Cabahug, S., V. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 1999. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus contents. I. Effects on bird performance and toe ash. *Brit. Poultry Sci.* 40, 660–666.
- Camden, B. J., P. C. H. Morel, D. V. Thomas, V. Ravindran i M. R. Bedford.** 2001. Effectiveness of exogenous microbial phytase in improving the bioavailabilities of phosphorus and other nutrients in maize-soya-bean meal diets for broilers. *Anim. Sci.* 73, 289-297.
- Denbow, D. M., V. Ravindran, E. T. Kornegay, Z. Yi i R. M. Hulet.** 1995. Improving phosphorus availability in soybean meal for broilers by supplemental phytase. *Poult. Sci.* 74, 1831–1842.
- DIN 51900.** 1977. Determination of the gross calorific value by the bomb calorimeter and calculation of the net calorific value. Deutsches Institut für Normung e. V., Berlin, Germany..
- Eeckhout, W. i M. De Paepe.** 1994. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 47, 19–29.
- Engelen, A. J., F. C. van der Heeft, P. H. G. Randsdorp i E. L. C. Smit.** 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.* 77(3), 760–764.
- Haug, W. i H. J. Lantzsch.** 1983. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *J. Sci. Food Agric.* 34, 1423–1426.
- Juanpere, J., A. M. Pérez-Vendrell i J. Brufau.** 2004. Effect of microbial phytase on broilers fed barley based diets in the presence or not of endogenous phytase. *Anim. Feed Sci. Tech.* 115 (3-4), 265-279.
- Kornegay, E. T.** 1999. A review of phosphorus digestion and excretion as influenced by microbial phytase in poultry. BASF Technical Symposium, January 16, Atlanta, BASF Corp., Mount Olive.
- Kornegay, E. T., D. M. Denbow, Z. Yi i V. Ravindran.** 1996. Response of broilers to graded levels of microbial phytase added to maize-soyabean-meal-based diets containing three levels of non-phytate phosphorus. *Br. J. Nutr.* 75, 839–852.

- Lan, G. Q., N. Abdullah, S. Jalaludin i Y. W. Ho.** 2002. Efficacy of supplementation of a phytase-producing bacteria culture on the performance and nutrient use of broiler chickens fed corn-soybean meal diets. *Poult. Sci.* 81, 1522-1532
- Mitchell, R. D. I H. M. Edwards.** 1996. Effects of phytase and 1,25-dihydroxycholecalciferol on phytate utilization and the quantitative requirement of calcium and phosphorus in young broiler chickens. *Poult. Sci.* 75, 95–110.
- Namkung, H. I S. Leeson.** 1999. Effect of phytase enzyme on dietary nitrogen-corrected apparent metabolizable energy and the ileal digestibility of nitrogen and amino acids in broiler chicks. *Poult. Sci.* 78, 1317-1319.
- NRC** (1994).
- Potter, L. M., M. Potchanakorn, V. Ravindran i E. T. Kornegay.** 1995. Bioavailability of phosphorus in various phosphate sources using body weight and toe ash as response criteria. *Poult. Sci.* 74, 813–820.
- Qian, H., E. T. Kornegay i D. M. Denbow.** 1996. Phosphorus equivalence of microbial phytase in turkey diets as influenced by calcium to phosphorus ratios and phosphorus level. *Poult. Sci.* 75, 69–81.
- Ravindran, V., W. L. Bryden i E. T. Kornegay.** 1995. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Biol. Rev.* 6, 125–143.
- Ravindran, V., S. Cabahug, G. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 2000. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus levels. II. Effects on apparent metabolizable energy, nutrient digestibility and nutrient retention. *Brit. Poultry Sci.* 41, 193–200.
- Ravindran, V., P. H. Selle i W. L. Bryden.** 1999. Effects of phytase supplementation, individually and in combination, with glycanase, on the nutritive value of wheat and barley. *Poult. Sci.* 78, 1588–1595.

- Reddy, N. R., M. D. Pierson, S. K. Sathe i D. K. Salunkhe.** 1989. Phytates in cereals and legumes. CRC Press, Boca Raton.
- Rutherford, S. M., T. K. Chung i P. J. Moughan.** 2002. The effect of microbial phytase on ileal phosphorus and amino acid digestibility in the broiler chicken. *Brit. Poultry Sci.* 44, 598-606.
- Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague.** 1996a. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and utilization of dietary calcium, phosphorus, copper, and zinc in broiler chickens fed corn-soybean diets. *Poult. Sci.* 75, 729–736.
- Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague.** 1996b. Efficacy of supplemental microbial phytase at different dietary calcium levels on growth performance and mineral utilization of broiler chickens. *Poult. Sci.* 75, 1516–1523.
- Short, F. J., P. Gorton, J. Wiseman i K. N. Boorman.** 1996. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Anim. Feed Sci. Tech.* 59, 215-221.
- Simons, P. C. M., H. A. J. Versteegh, A. W. Jongbloed, P. A. Kemme, P. Slump, K. D. Bos, M. G. E. Wolters, R. F. Beudeker i G. J. Verschoor.** 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *Br. J. Nutr.* 64, 525–540.
- Soares, Jr., J. H.** 1995. Phosphorus availability. In: Ammerman, C. B., Baker, D. H., Lewis, A. J. (Eds), *Bioavailability of nutrients for animals*, Academic Press, San Diego, pp. 257-285.
- Statistical Analysis System Institute Inc.** 1985. *SAS User's Guide: Statistics*, Ver. 5. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Um, J. S i I. K. Paik.** 1999. Effects of microbial phytase supplementation on egg production, eggshell quality, and mineral retention of laying hens fed different levels of phosphorus. *Poult. Sci.* 78, 75–79.
- Van der Klis, J. D., H. A. J. Versteegh, P. C. M. Simons i A. K. Kies.** 1997. The efficacy of phytase in corn-soybean meal-based diets for laying hens. *Poult. Sci.* 76, 1535–1542.

**Yi, Z., E. T. Kornegay, V. Ravindran i D. M. Denbow.** 1996. Improving phytate phosphorus availability in corn and soybean meal for broilers using microbial phytase and calculation for phosphorus equivalency values for phytase. *Poult. Sci.* 75, 240–249.

**Zanini, S. F. i M. H. Sazzad.** 1999. Effects of microbial phytase on growth and mineral utilisation in broilers fed on maize soyabean-based diets. *Brit. Poultry Sci.* 40, 348–352.

**Zyla, K., D. Gogol, J. Koreleski, S. Swiatkiewicz i D. R. Ledoux.** 1999. Simultaneous application of phytase and xylanase to broiler feeds based on wheat: feeding experiment with growing broilers. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1841–1848.

**Zyla, K., J. Koreleski, S. Swiatkiewicz, D. R. Ledoux i J. Piironen.** 2001. Influence of supplemental enzymes on the performance and phosphorus excretion of broilers fed wheat-based diets to 6 weeks of age. *Anim. Feed Sci. Technol.* 89: 113-118.

**EFFECTE DE LA FITASA MICROBIANA EN BROILERS ALIMENTATS  
AMB DIETES D'ORDI EN PRESENCIA O NO DE FITASA ENDÒGENA**

J. JUANPERE, A. M. PÉREZ-VENDRELL i J. BRUFAU

Departament de Nutrició Animal, IRTA, Centre Mas Bové, Apartat 415, 43280 Reus, Espanya

**Animal Feed Science and Technology, vol. 115 (3-4) pp. 265-279**



## **5.1. Introducció**

La fitasa és un enzim àmpliament estudiat en els darrers anys, pel gran interès en diversos aspectes: nutritiu, ja que l'addició de fitasa incrementa la utilització per part dels animals del fòsfor de les plantes, principalment en forma de fitat; i ambiental, ja que l'addició de fitasa disminueix l'excreció de fòsfor, reduint l'eutroficació.

Fitasa és un enzim fosfatasa àcida amb activitat estereasa, que és capaç d'hidrolitzar l'hexafosfat de mio-inositol a grups ortofosfats inorgànics i alliberar mio-inositol lliure d'alguns èsters fosfònics més baixos (Reddy i col., 1989).

Pot trobar-se fitasa endògena intestinal, però aquesta té una activitat molt baixa. La majoria de les fitases provenen d'ingredients de la dieta o és d'origen microbià (Ravindran i col., 1995), Així, la 6-fitasa (EC 3.1.3.26) en pinsos prové bàsicament de cereals i llegums, mentre que els microorganismes presents en el tracte intestinal produeixen la 3-fitasa (EC 3.1.3.8). La temperatura òptima per a l'activitat fitàsica es troba entre 45 i 60° C, disminuint ràpidament a temperatures més elevades (Wodzinski i Ullah, 1996).

Els efectes positius associats a l'addició de fitasa a dietes d'aviram inclouen millores en el creixement (Perney i col., 1993; Ravindran i col., 2001) i la digestibilitat, especialment de proteïnes (Broz i col., 1994; Kornegay i Qian, 1996; Sebastian i col., 1996). S'han fet pocs estudis per estudiar la influència del tractament per calor sobre l'activitat enzimàtica, o la inactivació de l'enzim en pinsos en forma de granulat (Edwards i col., 1999; Jongbloed i Kemme, 1990; Viveros i col., 1994; Viveros i col., 2002). La velocitat de destrucció del fitat pel procés d'autoclau sembla ser més baixa quan el fitat està associat a proteïnes i/o cations en productes naturals com cereals o olis de llavors. En algunes matèries primeres, com l'arròs o el blat, el fitat és molt estable a l'escalfament, però en altres productes naturals, per exemple alguns llegums, el fitat es degrada ràpidament en un temps petit (Reddy i col., 1989).

El principal objectiu d'aquesta prova fou avaluar els efectes d'una fitasa microbiana afegida al pinso en el creixement del pollastre broiler, i sobre l'energia de la dieta i la retenció de minerals en dietes que contenien fitasa endògena o no, segons la presència de cereal (ordi) autoclavat o no tractat.

## **5.2. Material i mètodes**

### ***5.2.1. Maneig dels animals.***

S'utilitzaren tres-cents vuitanta-quatre pollastres d'engreix mascles d'un dia d'edat de la raça Ross 308. La prova acabà als 24 dies. Només s'incloueren en l'experiment els animals lliures de qualsevol senyal clínic (això és, sense problemes de potes o altres membres, ulls oberts i comportament actiu). Els pollastres es van posar en 48 gàbies en dues bateries Petersime<sup>2</sup> provē des amb calefacció elèctrica, en una sala sense finestres i amb ventilació forçada. Els programes de llum i temperatura varen ser els estàndards emprats en la granja. L'aigua i el pinso en forma de farina van ser subministrats *ad libitum* durant tot l'experiment.

### ***5.2.2. Tractaments i disseny experimental***

S'utilitzaren sis tractaments, variant en la presència o absència de fitasa microbiana, el cereal emprat (ordi no tractat o autoclavat) i en la concentració de fòsfor no fític (FNF) (4.5 g/kg i 2.7 g/kg) (Taula 5.1). L'ordi es va tractar per vapor calent (autoclavat a 105°C durant 15 min, amb 10 mm de doblada). Després del procés es va confirmar la destrucció de fitasa endògena. Es van utilitzar vuit rèpliques de cada tractament experimental, contenint cada rèplica vuit pollastres broiler mascles.

### ***5.2.3. Producció del pinso i composició nutritiva de les dietes***

Abans de fer la barreja, tots els ingredients del pinso, excepte el greix, la sal, el fosfat bicàlcic, el carbonat càlcic, les vitamines i el corrector mineral, es van moldre mitjançant un molí de martell de 30 CV fins que les partícules passaren pel tamís de 3 mm. Durant tot l'experiment es va oferir una

---

<sup>2</sup> Petersime Incubator Company, Gettysburg, Ohio, USA.

sola dieta en forma de farina. Les dietes bassals es formularen per ser isonitrogenades i isocalòriques (Taula 5.2).

L'energia metabolitzable (EM) es va estimar a partir dels valors d'EM dels ingredients de les taules de composició dels aliments de l'INRA (Sauvant i col., 2002). L'ordi era de la varietat Baraka de la collita del 2000. La fitasa microbiana (EC 3.1.3.8) emprada en l'estudi era una preparació experimental (SP-1002 en pols amb una activitat fitàsica de 3295 U/kg, de Hoffman-La Roche). Les dietes inclouen, des del primer dia, 5 g de diòxid de titani (TiO<sub>2</sub>) per quilo de pinso com a marcador de digestibilitat.

#### **5.2.4. Anàlisis químiques**

Abans d'analitzar, totes les mostres de les dietes experimentals i de les matèries primeres es van moldre en tamís de 0.5 mm. Les mostres foren analitzades utilitzant mètodes estàndards (AOAC, 1990) per matèria seca (codi 934.01), proteïna bruta (codi 976.05), extracte eteri (codi 920.39), cendres (codi 942.05) i fibra bruta (codi 978.10). La concentració de fòsfor total es va analitzar colorimètricament pel mètode del molibdo-vanadat (codi 965.17). La concentració de calci es va analitzar per espectroscòpia d'absorció atòmica de flama. L'activitat fitàsica present en les matèries primeres i en els pinsos finals es va analitzar pel mètode descrit per Engelen i col. (1994). L'activitat  $\beta$ -glucanàsica es va determinar amb un mètode basat en la utilització de substrat acolorit, que en aquest cas fou Azo-glucà d'ordi (McCleary i col., 1997). Es va construir una corba estàndard a partir de les dades obtingudes després d'incloure l'enzim en diferents concentracions en els pinsos controls (sense enzim incorporat en la fabricació). El contingut de  $\beta$ -glucans es determinà segons McCleary i Glennie-Holmes (1985). El contingut de fòsfor fític es determinà en les matèries primeres i el pinso mitjançant el mètode descrit per Haug i Lantzsch (1983). La concentració de diòxid de titani present en pinsos i excretes s'analitzà segons Short i col. (1996).

#### **5.2.5. Paràmetres productius.**

Els pollastres es pesaren conjuntament quan arribaren a la granja. Entre els dies 7 i 21 es calcularen el consum de pinso, guany mig diari i índex de conversió del pinso. La mortalitat s'enregistrà

diàriament, incloent la causa de la mort. En el dia 11, s'avaluà el percentatge d'animals amb culs bruts. Des del dia 14 fins al 17 s'enregistrà el consum d'aigua, consum de pinso i la relació aigua/pinso. La qualitat de l'os i la deposició del fòsfor s'avaluaren amb la mesura de la concentració de cendres dels dits en el final de l'experiment, utilitzant dos ocells per gàbia (16 pollastres per tractament de la dieta), segons el mètode descrit per Potter i col. (1995).

#### **5.2.6. Prova de balanç**

Es va emprar el diòxid de titani com a marcador en la metodologia per determinar l'energia metabolitzable aparent (EMA) i la retenció aparent de fòsfor total i calci de les dietes experimentals. Les excretes es recolliren el dia 21 durant un període curt de temps, es guardaren a -20°C, i finalment es liofilitzaren. Posteriorment, les mostres d'excreta es molgueren i es guardaren per a analitzar. L'energia bruta de les mostres de les dietes i les excretes s'analitzaren amb un calorímetre amb bomba adiabàtica IKA, C-400 (DIN 51900, 1977) per obtenir l'energia metabolitzable aparent (EMA).

#### **5.2.7. Estudis de retenció mineral.**

Tots els animals se sacrificaren en els dies 22, 23 o 24 per injecció intravenosa de pentobarbital sòdic. Es tragueren i es pesaren els pàncrees. S'agafaren les mostres ileals des del diverticle de Meckel fins a 15 cm abans a la unió ili-cecal, i es guardaren en gel fins a determinar la viscositat intestinal de la digesta fresca. Les mostres d'aquesta digesta se centrifugaren a 12000 rpm durant 5 minuts a 15° C, i després el sobrenadant es recollí i emmagatzemat en gel fins a determinar la viscositat, usant un viscosímetre digital Brookfield, mantingut a 30°C i llegida després d'un període d'estabilització d' 1 min. Després de l'eutanàsia, s'agafaren els dits del mig de dos pollastres per rèplica (entre el segon i el tercer metatars), es guardaren en bosses de plàstic i posteriorment foren pesats i calcinats per obtenir els valors de cendres dels dits (Cabahug i col., 1999). Abans de l'eutanàsia, s'agafaren mostres de sang per punció cardíaca. El plasma se separà per centrifugació de la sang durant 10 min a 2000\* g, i es determinaren les concentracions de fòsfor i calci en el plasma (Lima i col, 1997).

### 5.2.8. Cura dels animals

Tots els procediments experimentals utilitzats estan aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de l'IRTA.

### 5.2.9. Càlculs

Mitjançant la següent fórmula es calcularen els valors d'EMA de les dietes. Es feren les correccions apropiades per diferències en el contingut de la humitat.

$$\text{EMA} = \text{EB}_{\text{dieta}} - [ (\text{TiO}_{2,\text{dieta}} / \text{TiO}_{2,\text{exc}}) \times \text{EB}_{\text{exc}} ]$$

on  $\text{EB}_{\text{dieta}}$  és l'energia bruta del pinso i  $\text{EB}_{\text{exc}}$  és l'energia bruta de l'excreta. Els coeficients de digestibilitat aparent ileal es calcularen amb la següent fórmula, utilitzant el procediment del marcador inert.

$$\text{Dig X} = 1 - [ (\text{TiO}_{2,\text{diet}} \times \text{X}_{\text{exc}}) / (\text{TiO}_{2,\text{exc}} \times \text{X}_{\text{diet}}) ]$$

on  $\text{X}_{\text{diet}}$  és la concentració en la dieta i  $\text{X}_{\text{exc}}$  és la concentració en l'excreta.

### 5.2.10. Anàlisi estadística.

Les dades s'analitzaren com un disseny de blocs a l'atzar via anàlisi de variances, usant els procediments del General Linear Models (GLM) del Statistical Analysis System Institute Inc. (1985). La significància estadística es va establir a  $P < 0.05$ . Si es trobaren efectes principals significants, les mitjanes es compararen pel test Duncan de rangs múltiples.

Els efectes de l'addició de fitasa microbiana i el tractament de l'ordi s'examinaren en un conjunt de contrastos lineals:

Addició de fitasa microbiana: T-2, T-5 vs. T-3, T-6

Tractament d'ordi: T-2, T-3 vs. T-5, T-6

### **5.3. Resultats i discussió**

#### ***5.3.1. Matèries primeres i pinsos***

Abans de començar la prova, es va realitzar un estudi per determinar les condicions d'autoclau necessàries per inactivar l'activitat fitàsica endògena present en l'ordi. Els resultats d'aquesta prova es presenten en la Taula 5.3. Per tant, tot l'ordi Baraka es va dividir en dues meitats, i una d'elles es va autoclavar a 105°C durant 15 min (10 mm de profunditat), i es va usar en els tractaments 4, 5 i 6. L'activitat fitàsica del pinso determinada per anàlisi es mostren en la Taula 5.4. El procés d'autoclau inactivà la fitasa endògena present en l'ordi (T-4 i T-5 vs. T-1 i T-2), i les activitats fitàsiques mesurades en els tractaments T-3 i T-6 confirmen l'addició de 500 U/kg de la fitasa microbiana exògena. Aquests resultats estan en acord amb els trobats per Jongbloed i Kemme (1990) que van descriure la inactivació de la fitasa endògena a temperatures superiors a 60°C. Després del procés d'autoclau, es va observar una reducció del fòsfor fític en totes les dietes, estant al voltant del 8% pel fòsfor fític de l'ordi (dades no mostrades). Altres característiques de l'ordi (com els continguts de  $\beta$ -glucans i de pentosans) no es veieren afectades pel tractament de calor.

#### ***5.3.2. Paràmetres productius***

En la Taula 5.5 es mostren les dades corresponents al creixement animal avaluat durant el període entre els dies 7 i 21. Es van trobar diferències estadísticament significants entre els tractaments en tots els paràmetres. Els animals que consumiren les dietes T-2 i T-5 (deficients en FNF) menjaren significativament menys pinso, creixeren a una velocitat significativament més lenta, i aconseguint-se un pes final més baix que pels que menjaren les dietes control T-1 i T-4, respectivament. L'addició de fitasa exògena a les dietes deficients de P millorà el creixement animal a nivells comparables als animals que menjaren dietes amb control positiu. No s'observaren efectes per la presència de fitasa endògena en les dietes T-1 a T-3 en relació a les dietes T-4 a T-6, respectivament. Potkansky (2000) descrigué que la fitasa del cereal mostra només el 40-79% de l'eficàcia de la fitasa microbiana degut al pH baix present en el tracte intestinal del broiler.

El procés d'autoclau incrementà la viscositat de l'ordi, resultant en una major quantitat de culs bruts als 11 dies en pollastres que consumiren les dietes amb ordi autoclavat (per exemple, 41% per a T-1 i 85% per a T-4, Taula 5.6). Els animals que consumiren ordi autoclavat presentaren unes viscositats significativament més altes que els broilers que consumiren ordi no tractat ( $P < 0.001$ ). El percentatge de culs bruts estava ben correlacionat amb la viscositat intestinal (Taula 5.6). El procés d'autoclau afecta alguns paràmetres nutritius, per exemple, el midó. Segons Reddy i col. (1989), el tractament de calor pot causar gelatinització de les molècules de midó, així que és d'esperar un increment en la viscositat intestinal en els animals que menjaren dietes amb cereal autoclavat. Gracia i col (2003) també van descriure les modificacions de paràmetres com les estructures de proteïna i de fibra degut al procés tèrmic. En ordi no germinat, l'activitat  $\beta$ -glucanàsica és molt baixa o no n'hi ha (Fincher, 1992). Knuckles i Chiu (1999) afirmaren que el procés d'autoclau disminueix l'activitat  $\beta$ -glucanasa entre un 50 i un 75%, mentre que Izydorczyk i col. (2000) afirmen que, en absència de  $\beta$ -glucanasa el pes molecular dels  $\beta$ -glucans solubles és més gran, com a resultat de l'augment de la viscositat intestinal. No obstant, les baixes activitats  $\beta$ -glucanasa trobades en l'ordi cru no explica totalment l'increment de la viscositat mesurada després del procés d'autoclau.

El consum d'aigua dels animals que menjaren dietes deficientes de P (T-2 i T-5) va ser significativament més baix que la d'aquells que menjaren les dietes control (T-1 i T-4), d'igual manera que el consum de pinso (Taula 5.6). L'addició de la fitasa microbiana a les dietes deficientes de P millorà el consum d'aigua i pinso fins a nivells similars als de les dietes control positiu (T-3 vs. T-1, i T-6 vs. T-4, respectivament). Els broilers que menjaren ordi autoclavat també mostraren un consum d'aigua superior al dels animals que menjaren les dietes amb l'ordi sense tractar (143.7 g/d versus 133.3 g/d).

En la Taula 5.7 es presenten els valors energètics de les dietes experimentals. La inclusió de cereal autoclavat en les dietes no modificà els valors energètics. En les dietes que contenien ordi sense tractar, no s'observaren efectes en els valors d'EMA degut a la fitasa exògena, mentre que l'addició

de fitasa a les dietes deficients de P millorà els valors de l'energia en les dietes amb ordi autoclavat (T-6 vs. T-5, Taula 5.7).

### **5.3.3. Estudis de retenció mineral**

Els resultats de la determinació de la matèria seca i de les cendres dels dits es mostren en la Taula 5.8. Es van trobar diferències estadísticament significatives entre els tractaments en la concentració de les cendres dels dits. Els animals que menjaren els tractaments T-2 i T-5 (deficients de P) mostraren valors més baixos que la resta d'animals. Els pollastres dels tractaments T-3 i T-6 presentaren majors percentatges de cendres en dits que aquells que menjaren les dietes T-2 i T-5, observant-se que la fitasa microbiana corregeix parcialment la deficiència de fòsfor en la dieta. Aquests resultats podrien ser usats com a indicadors de la biodisponibilitat de fòsfor, i per corroborar una deposició més gran de P quan s'afegeix l'enzim fitasa als pinsos.

En la Taula 5.8 es poden observar les dades corresponents a la concentració plasmàtica de calci i fòsfor dels broilers. Els animals que menjaren dietes deficients de P van tenir concentracions de fòsfor en plasma significativament menors ( $P < 0.001$ ), comparat als broilers que menjaren les dietes control, i també concentracions majors de calci ( $P < 0.001$ ). Aquest efecte va ser més pronunciat quan els broilers van menjar ordi tractat, on s'inactivà la fitasa endògena. La inclusió de fitasa microbiana augmentà els nivells de fòsfor en plasma i reduí la concentració de calci, però els valors obtinguts no van igualar els dels animals que menjaren les dietes control positiu, seguint un patró similar al percentatge de cendres en dits. En el nostre estudi, la fitasa endògena de l'ordi no influí en les concentracions minerals del plasma, doncs no es trobaren diferències significatives degut al tractament de l'ordi. La fitasa és un enzim depenent de pH, tal com és ben conegut. La majoria de fitases microbianes presenten dos intervals de pH òptim, 2.5 - 3.0 i 5.5 - 6.0, mentre que el pH òptim de la fitasa endògena del cereal és 5.5 - 6.0. Ravindran i col. (1995) van descriure que les fitases microbianes són més efectives i consistents que les fitases de les plantes, ja que el proventricle és el lloc d'acció de l'enzim, i que el proventricle té un pH de 4.8 (Denbow, 2000). Al pH del proventricle, la fitasa microbiana provada mostrà una activitat màxima del voltant del 86%

(Simon i Igbasan, 2002). Les fitases dels cereals són menys estables en pH àcid del tracte digestiu i poden ser inactivades. Llavors, la fitasa microbiana és l'enzim que actua en la retenció mineral. Aquestes observacions estan d'acord amb Simons i col. (1990), qui trobaren que la fitasa de les plantes són menys efectives que les microbianes en la utilització del fòsfor. Això és degut al petit interval de pH en què es desenvolupa l'acció enzimàtica.

Tal com era d'esperar, la concentració de calci en plasma va ser més baixa després de l'addició de fitasa microbiana. Alguns autors (Han i col., 1997; Orban i col., 1999) han descrit que la concentració en plasma de calci disminueix i la concentració de fòsfor augmenta quan s'inclou fitasa en dietes deficientes de P. Quan el nivell de P en les dietes és baix, es produeix un augment en la concentració de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , i creix l'absorció intestinal de fòsfor. Quan els animals mengen dietes amb fitasa microbiana afegida, els grups fosfats del fitat es degraden i pot ser absorbit, i llavors ser usat per al creixement.

En la Taula 5.8 es mostren els pesos dels pàncrees. No s'observaren diferències estadístiques en el pes del pàncrees degut a la presència o no de fitasa endògena o pel nivell FNF de la dieta.

En la Taula 5.9 es mostren les concentracions de fòsfor i calci de l'excreta recollida als 21 dies. Tal com es pot observar, el contingut de P trobat en l'excretes dels animals que menjaren dietes deficientes de P (T-2, T-3, T-5 i T-6) va ser menor que la determinada en les excretes dels animals que menjaren les dietes control (T-1 i T-4) (un 40% menys de fòsfor), encara que es va trobar una interacció positiva entre l'enzim fitasa i el procés d'autoclau. Les concentracions de calci en les excretes dels animals que menjaren les dietes deficientes de P van ser un 30% menors que les trobades en les excretes dels animals que menjaren les dietes control. L'addició de l'enzim fitasa microbiana en els tractaments T-3 i T-6 va millorar significativament la retenció de fòsfor ( $P < 0.001$ ) si es compara a les dietes control T-1 i T-4, respectivament (Taula 5.9). Aquests resultats estan d'acord amb els trobats en un estudi previ de l'IRTA (dades no publicades). La retenció de calci va ser menor en els tractaments T-4 i T-6 que la de les dietes amb ordi sense tractar ( $P < 0.001$ ). L'addició de fitasa microbiana a les dietes amb ordi sense tractar no millorà la retenció de Ca en les

dietes deficientes de P (T-2 vs. T-3), però en les dietes amb ordi autoclavat la inclusió de la fitasa millorà la retenció de Ca fins a nivells similars als de les dietes control (T-5 i T-6 vs. T-4). Amb el tractament per calor, els cations bivalents units als grups fosfats del fitat són alliberats, i llavors minerals com el calci o el zinc esdevenen més disponibles (Reddy i col., 1989).

En aquest experiment, els animals menjaren dietes amb una alta relació Ca:FNF (3:1), similar als usats per Denbow i col. (1995) i Qian i col. (1996). Posteriorment, Dieckmann i col. (2002) van descriure que, en estudis de disponibilitat de fòsfor, la relació Ca:FNF de la dieta no hauria d'estar per sota de 1:1 ni per sobre de 2:1. A relacions superiors, la retenció de calci disminueix dràsticament en, aproximadament, 40% i 20%, respectivament. S'haurien de realitzar més estudis per confirmar aquests resultats de retenció i excreció amb relacions baixes de Ca:P.

En general, no s'observaren efectes importants per la presència o no de fitasa endògena de l'ordi, però la inclusió de fitasa microbiana a dietes d'ordi deficientes de fòsfor augmentà la retenció aparent de fòsfor i reduí la presència d'aquest element en l'excreta de broilers (per sobre del 45%), resultant un factor favorable pel medi ambient. A més, el percentatge de cendres dels dits i la concentració plasmàtica de fòsfor i calci també van ser influïts pels continguts de fòsfor de la dieta i la presència o no de fitasa exògena, seguint una tendència similar als paràmetres productius, i mostrant la seva utilitat com a indicadors del metabolisme del fòsfor en avicultura.

Taula 5.1. Tractaments experimentals.

Tractaments	Dieta	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa * (FTU/kg)
T-1	Ordi sense tractar - soja	4.5	-
T-2	Ordi sense tractar - soja	2.7	-
T-3	Ordi sense tractar - soja	2.7	500
T-4	Ordi autoclavat - soja	4.5	-
T-5	Ordi autoclavat - soja	2.7	-
T-6	Ordi autoclavat - soja	2.7	500

\* Enzim usat: Phytase SP 1002 CT batch PPQ 6883 en pols (Activitat fitàsica: 3295 U/g) (aportat per Roche Vitamins Ltd, Basle)

Taula 5.2. Composició de les dietes base.

<b>INGREDIENT (g/kg)</b>	<b>P Normal</b>	<b>P deficient</b>
Ordi	583.03	576.62
Farina de soja 480g CP/kg	187.51	229.12
Llard	60.00	60.00
Farina de soja extrusionada	122.21	101.41
DL-metionina	4.16	2.94
L-lisina HCl	1.54	1.28
L-treonina	0.63	0.18
Carbonat càlcic	5.66	4.25
Fosfat bicàlcic	6.65	6.08
Sal	4.60	4.12
Minerals i vitamines <sup>1</sup>	4.00	4.00
Contingut estimat de nutrients: (g/kg)		
Energia metabolitzable (MJ/kg)	12.48	12.48
Protèina bruta	213.8	223.5
Fibra bruta	42.2	42.5
Extracte eteri	100.0	96.2
Cendres	66.6	55.7
Lisina	11.5	12.0
Met + Cys	10.1	9.2
Calci	11.0	8.1
Fòsfor total	6.7	5.0
Fòsfor no fític	4.5	2.7
Fòsfor fític	2.2	2.3
Fitasa endògena (U/kg)	249	247

<sup>1</sup> Un kg de pinso conté: Vitamina A, 12000 IU; Vitamina D<sub>3</sub>, 2400 IU; Vitamina E, 30 mg; Vitamina K<sub>3</sub>, 3 mg; Vitamina B<sub>1</sub>, 2.2 mg; Vitamina B<sub>2</sub>, 8.0 mg; Vitamina B<sub>6</sub>, 5.0 mg; Vitamina B<sub>12</sub>, 11.0 g; Àcid fòlic, 1.5 mg; Biotina, 150 g; Pantotenat càlcic, 25 mg; Àcid nicotínic, 65 mg; Etoxiquina, 150 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; Zn, 40 mg; Mn, 60 mg; Se, 0.15 mg; I, 0.33 mg.

Taula 5.3. Efecte del procés d'autoclau (105°C) en les característiques de l'ordi.

Ordi en farina	Temps d'autoclau (min)			
	0	10	15	20
Fitasa (U/kg)	191	52	2	0
Viscositat (mPa.s)	7.70	4.51	4.50	4.72
Pentosans totals (g/kg DM)	70.2	70.4	73.1	72.2
$\beta$ -Glucans totals (g/kg DM)	45.2	43.9	44.6	45.2

Ordi sencer	Temps d'autoclau (min)			
	0	10	15	20
Fitasa (U/kg)	221	41	0	0
Viscositat (mPa.s)	7.74	5.76	4.55	4.67
Pentosans totals (g/kg DM)	74.5	71.5	68.0	66.8
$\beta$ -Glucans totals (g/kg DM)	45.5	44.9	45.0	45.1

Taula 5.4. Activitat fitàsica determinada per anàlisi en les dietes experimentals.

Tractaments	Dieta	Fòsfor fític (g/kg)	no afegit (FTU/g)	fitasa Enzim analitzat (FTU/g)	fitasa
T-1	Ordi no tractat - soja	4.5	-	162	
T-2	Ordi no tractat - soja	2.7	-	196	
T-3	Ordi no tractat - soja	2.7	500	765	
T-4	Ordi autoclavat - soja	4.5	-	0	
T-5	Ordi autoclavat - soja	2.7	-	12	
T-6	Ordi autoclavat - soja	2.7	500	567	

Taula 5.5. Paràmetres productius (7-21 dies).

Tractaments	Ordi	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	Pes final (g)	GMD (g/d)	CMD (g/d)	IT (g/g)
T-1	No tractat	4.5	-	623 <sup>a</sup>	34 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	1.41 <sup>cd</sup>
T-2	No tractat	2.7	-	559 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>	42 <sup>b</sup>	1.38 <sup>d</sup>
T-3	No tractat	2.7	500	640 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>	49 <sup>a</sup>	1.38 <sup>d</sup>
T-4	Autoclavat	4.5	-	628 <sup>a</sup>	34 <sup>a</sup>	51 <sup>a</sup>	1.49 <sup>a</sup>
T-5	Autoclavat	2.7	-	547 <sup>b</sup>	29 <sup>b</sup>	43 <sup>b</sup>	1.47 <sup>ab</sup>
T-6	Autoclavat	2.7	500	611 <sup>a</sup>	34 <sup>a</sup>	49 <sup>a</sup>	1.45 <sup>bc</sup>
				Error estàndard	11.5	0.9	0.012
				Pr > F	***	***	***
Contrasts (Pr > T)							
				Enzim vs. Sense enzim	***	***	NS
				Ordi tractat vs. no tractat	NS	NS	***

NS: No significant ( $P \geq 0.05$ ), \*\*\*  $P \leq 0.001$ .Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament ( $P < 0.05$ ).

Taula 5.6. Consum de pinso i aigua (14-17 dies), viscositat intestinal estudiada al final del període i percentatge de culs bruts (11 dies).

Tractaments	Ordi	Fòsfor no fíic (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	Consum d'aigua (g/d)	Consum de pinso (g/d)	Relació aigua / pinso (g/g)	Viscositat intestinal (mPa.s)	Culs bruts (%)
T-1	No tractat	4.5	-	143 <sup>a</sup>	62 <sup>a</sup>	2.4 <sup>b</sup>	23 <sup>b</sup>	41 <sup>c</sup>
T-2	No tractat	2.7	-	117 <sup>c</sup>	49 <sup>b</sup>	2.4 <sup>b</sup>	23 <sup>b</sup>	54 <sup>bc</sup>
T-3	No tractat	2.7	500	141 <sup>a</sup>	59 <sup>a</sup>	2.3 <sup>b</sup>	14 <sup>b</sup>	73 <sup>ab</sup>
T-4	Autoclavat	4.5	-	150 <sup>a</sup>	61 <sup>a</sup>	2.4 <sup>b</sup>	52 <sup>a</sup>	85 <sup>a</sup>
T-5	Autoclavat	2.7	-	130 <sup>b</sup>	50 <sup>b</sup>	2.6 <sup>a</sup>	45 <sup>a</sup>	78 <sup>ab</sup>
T-6	Autoclavat	2.7	500	149 <sup>a</sup>	58 <sup>a</sup>	2.6 <sup>a</sup>	66 <sup>a</sup>	77 <sup>ab</sup>
		Error estàndard		3.7	1.5	0.06	7.2	1.0
		Pr > F		***	***	**	***	*
Contrasts (Pr > T)								
		Enzim vs. Sense enzim		***	***	NS	NS	NS
		Ordi tractat vs. no tractat		**	NS	***	***	NS

NS: No significant ( $P \geq 0.05$ ), \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ .  
 Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament ( $P < 0.05$ ).

Taula 5.7. Energia metabolitzable aparent de les dietes experimentals.

Tractaments	Ordi	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	EMA (MJ/kg MS)	EMAn (MJ/kg MS)
T-1	No tractat	4.5	-	12.6 <sup>bc</sup>	11.8 <sup>c</sup>
T-2	No tractat	2.7	-	12.4 <sup>c</sup>	11.6 <sup>c</sup>
T-3	No tractat	2.7	500	12.8 <sup>bc</sup>	12.0 <sup>bc</sup>
T-4	Autoclavat	4.5	-	13.2 <sup>ab</sup>	12.5 <sup>ab</sup>
T-5	Autoclavat	2.7	-	12.6 <sup>bc</sup>	11.8 <sup>bc</sup>
T-6	Autoclavat	2.7	500	13.5 <sup>a</sup>	12.7 <sup>a</sup>
<i>Error estàndard.</i>				0.23	0.22
				**	**
<b>Contrasts (Pr&gt;T)</b>					
Enzim vs. No enzim				**	**
Ordi tractat vs. no tractat				NS	*

NS: No significant ( $P \geq 0.05$ ), \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Les mitjanes dins una columna sense lletra comuna difereixen significativament ( $P < 0.05$ ).

Taula 5.8. Composició mineral del plasma de broiler, concentració de matèria seca i de cendres dels dits, i pes de pàncreas expressat com a % de pes corporal.

Tractaments	Ordi	Fòsfor no fíic (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	Calci plasma (mg/dl)	Fòsfor plasma (mg/dl)	Matèria seca dietes (g/kg)	Cendres dits (g/kg)	Pàncreas (%/PV)
T-1	No tractat	4.5	-	12.7 <sup>c</sup>	7.2 <sup>a</sup>	345 <sup>a</sup>	127 <sup>a</sup>	0.39
T-2	No tractat	2.7	-	15.4 <sup>b</sup>	4.4 <sup>c</sup>	320 <sup>cd</sup>	104 <sup>c</sup>	0.42
T-3	No tractat	2.7	500	13.5 <sup>c</sup>	5.5 <sup>b</sup>	329 <sup>bc</sup>	118 <sup>b</sup>	0.39
T-4	Autoclavat	4.5	-	12.7 <sup>c</sup>	7.3 <sup>a</sup>	336 <sup>ab</sup>	128 <sup>a</sup>	0.41
T-5	Autoclavat	2.7	-	16.3 <sup>a</sup>	3.8 <sup>c</sup>	313 <sup>d</sup>	105 <sup>a</sup>	0.42
T-6	Autoclavat	2.7	500	13.2 <sup>c</sup>	6.1 <sup>b</sup>	330 <sup>b</sup>	120 <sup>b</sup>	0.41
		Error estàndard		0.32	0.24	3.4	2.0	0.01
		Pr > F		***	***	***	***	NS
Contrasts (Pr > T)								
		Enzim vs. Sense enzim		***	***	***	***	NS
		Ordi tractat vs. no tractat		NS	NS	NS	NS	NS

NS: No significant ( $P \geq 0.05$ ), \*\*\*  $P \leq 0.001$ .Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament ( $P < 0.05$ ).

Taula 5.9. Retenció aparent i excreció de fòsfor total i de calci de les dietes experimentals.

Tractaments	Ordi	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	Retenció de P total (g/kg MS)	P total en excreta (g/kg MS)	Retenció de calci	Calci en excreta (g/kg MS)
T-1	No tractat	4.5	-	0.58 <sup>cd</sup>	7.3 <sup>a</sup>	0.57 <sup>a</sup>	14.9 <sup>b</sup>
T-2	No tractat	2.7	-	0.62 <sup>bc</sup>	4.2 <sup>c</sup>	0.45 <sup>b</sup>	10.5 <sup>d</sup>
T-3	No tractat	2.7	500	0.65 <sup>b</sup>	4.1 <sup>c</sup>	0.47 <sup>b</sup>	10.0 <sup>d</sup>
T-4	Autoclavat	4.5	-	0.54 <sup>d</sup>	7.8 <sup>a</sup>	0.30 <sup>c</sup>	16.8 <sup>a</sup>
T-5	Autoclavat	2.7	-	0.58 <sup>cd</sup>	4.7 <sup>b</sup>	0.23 <sup>d</sup>	11.9 <sup>c</sup>
T-6	Autoclavat	2.7	500	0.69 <sup>a</sup>	3.8 <sup>c</sup>	0.35 <sup>c</sup>	10.5 <sup>d</sup>
		Error estàndard		0.02	0.2	0.02	0.4
		Pr > F		***	***	***	***
Contrasts (Pr > T)							
		Enzim vs. Sense enzim		***	***	**	**
		Ordi tractat vs. no tractat		NS	NS	***	***

NS: No significant ( $P \geq 0.05$ ), \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ .  
 Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament ( $P < 0.05$ ).

#### **5.4. Referències bibliogràfiques**

- Association of Official Analytical Chemists.** 1990. Official methods of analysis. 15th ed., Assoc. Anal. Chem., Washington D. C.
- Broz, J., P. Oldale, A. H. Perrin-Voltz, G. Rychen, J. Schulze i C. Simoes Nunes.** 1994. Effects of supplemental phytase on performance and phosphorus utilisation in broiler chickens fed a low phosphorus diet without addition of inorganic phosphates. *Brit. Poultry Sci.* 35, 273-280.
- Cabahug, S., V. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 1999. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus contents. I. Effects on bird performance and toe ash. *Brit. Poultry Sci.* 40, 660-666.
- Denbow, D. M.** 2000. En: Whittow, G. C. (Ed), *Sturkie's Avian Physiology*. Academic Press, San Diego, p. 314.
- Denbow, D. M., V. Ravindran, E. T. Kornegay, Z. Yi i R. M. Hulet.** 1995. Improving phosphorus availability in soybean meal for broilers by supplemental phytase. *Poult. Sci.* 74, 1831-1842.
- Dieckmann, A., R. Timmler i M. Rodehutschord.** 2002. Investigation on the optimal Ca:P ratio in studies on P availability in broiler chicken. En: *Proc. 11<sup>th</sup> European Poultry Conference*. *Arch. Geflügelk.*, 66 (Sonderheft II), p.104.
- DIN 51900.** 1977. Determination of the gross calorific value by the bomb calorimeter and calculation of the net calorific value. Deutsches Institut für Normung e. V., Berlin, Germany.
- Edwards Jr, H. M., A. B. Carlos, A. B. Kasim i R. T. Toledo.** 1999. Effects of steam pelleting and extrusion of feed on phytate phosphorus utilization in broiler chickens. *Poult. Sci.* 78, 96-101.
- Engelen, A. J., F. C. van der Heeft, P. H. G. Randsdorp i E. L. C. Smit.** 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.* 77(3), 760-764.
- Fincher, G. B.** 1992. En: Shewry, P.R. (Ed), *Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*. CAB International, Wallingford, p. 420.

- Gracia, M. I., M. A. Latorre, M. García, R. Lázaro i G. G. Mateos.** 2003. Heat processing of barley and enzyme supplementation of diets for broilers. *Poult. Sci.* 82: 1281-1291.
- Han, Y. M., F. Yang, A. G. Zhou, E. R. Miller, P. K. Ku, M. G. Hogberg i X. G. Lei.** 1997. Supplemental phytases of microbial and cereal sources improve dietary phytate phosphorus utilization by pigs from weanling through finishing. *J. Anim. Sci.* 75, 1017-1025.
- Haug, W. i H. J. Lantzsch.** 1983. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *J. Sci. Food Agr.* 34, 1423-1426.
- Izydorczyk, M.S., J. Storsley, D. Labossiere, A. W. Mac-Gregor i B. G. Rossnagel.** 2000. Variation in total and soluble beta-glucan content in hullless barley: effects of thermal, physical, and enzymic treatments. *J. Agric. Food Chem.* 48 (4): 982-989.
- Jongbloed, A. W. i P. A. Kemme.** 1990. Effect of pelleting mixed feeds on phytase activity and the apparent absorbability of phosphorus and calcium in pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 28, 233-242.
- Knuckles, B. E. i M.-C- M. Chiu.** 1999. beta-Glucanase activity and molecular weight of beta-glucans in barley after various treatments. *Cereal Chem.* 76, 92-95.
- Kornegay, E. T. i H. Qian.** 1996. Replacement of inorganic phosphorus by microbial phytase for young pigs fed on a maize-soyabean-meal diet. *Brit. J. Nutr.* 76, 563-578.
- Lima, F.R., C. X. Mendonça, Jr, J. C. Alvarez, J. M. F. Garzillo, E. Ghion i P. M. Leal.** 1997. Biological Evaluation of commercial dicalcium phosphates as sources of available phosphorus for broiler chicks. *Poult. Sci.* 76, 1707-1713.
- Mc Cleary, B.V. i M. Glennie-Holmes.** 1985. Enzymic quantification of (1-3),(1-4)- $\beta$ -d-glucan in barley and malt. *J. Inst. Brew.* 91,285-295.
- Mc Cleary, B.V. i T. S. Gibson i D. C. Mugford.** 1997. Measurement of total starch in cereal products by amyloglucosidase- $\alpha$ -amylase method: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 80, 571-579.

- Orban, J. I., O. Adeola i R. Strohline.** 1999. Microbial phytase in finisher diets of white pekin ducks: effect on growth performance, plasma phosphorus concentration, and leg bone characteristics. *Poult. Sci.* 78, 366-377.
- Perney, K. M., A. H. Cantor, M. L. Straw i K. L. Herkelman.** 1993. The effect of dietary phytase on growth performance and phosphorus utilization of broiler chicks. *Poult. Sci.* 72, 2106-2114.
- Potkansky, A.** 2000. The comparison of plant and microbial phytases in the feeding. In: *Proceeding of the International Symposium on Phytase in Animal Nutrition*. Grela, E. R., ed., Lublin, pp. 21-27.
- Potter, L. M., M. Potchanakorn, V. Ravindran i E. T. Kornegay.** 1995. Bioavailability of phosphorus in various phosphate sources using body weight and toe ash as response criteria. *Poult. Sci.* 74, 813-820.
- Qian, H., H. P. Veit, E. T. Kornegay, V. Ravindran i D. M. Denbow.** 1996. Effects of supplemental phytase and phosphorus on histological and other tibial bone characteristics and performances of broilers fed semi-purified diets. *Poult. Sci.* 75, 618-626.
- Ravindran, V., P. H. Selle, G. Ravindran, P. C. H. Morel, A. K. Kies i W. L. Bryden.** 2001. Microbial phytase improves performance, apparent metabolizable energy, and ileal amino acid digestibility of broilers fed a lysine-deficient diet. *Poult. Sci.* 80, 338-344.
- Ravindran, V., W. L. Bryden i E. T. Kornegay.** 1995. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Biol. Rev* 6(2), 125-143.
- Reddy, N.K., M. D. Pierson, S. K. Sathe i D.K. Salunkhe.** 1989. *Phytates in cereals and legumes*. CRC Press, Boca Raton.
- Sauvant, D., J.-M. Perez i G. Tran.** 2002. *Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage*. INRA, Paris, France.

- Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague.** 1996. Efficacy of supplemental microbial phytase at different dietary calcium levels on growth performance and mineral utilization of broiler chickens. *Poult. Sci.* 75, 1516-1523.
- Short, F. J., P. Gorton, J. Wiseman i K. N. Boorman.** 1996. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Anim. Feed Sci. Tech.* 59, 215-221.
- Simon, O. i F. Igbasan.** 2002. *In vitro* properties of phytases from various microbial origins. *Int. J. Food Sci. Tech.* 37, 813-822
- Simons, P. C. M., H. A. J. Versteegh, A. W. Jongbloed, P. A. Kemme, P. Slump, K. D. Bos, M. G. E. Wolters, R. F. Beudeker i G. J. Verschoor.** 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *Brit. J. Nutr.* 64, 525-540.
- Statistical Analysis System Institute Inc.** 1985. SAS User's Guide: Statistics, Ver. 5. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Viveros, A., A. Brenes, I. Arija i C. Centeno.** 2002. Effects of microbial phytase supplementation on mineral utilization and serum enzyme activities in broilers chicks fed different levels of phosphorus. *Poult. Sci.* 81, 1172-1183.
- Viveros, A., A. Brenes, M. Pizarro i M. Castaño.** 1994. Effect of enzyme supplementation of a diet based on barley, and autoclave treatment, on apparent digestibility, growth performance and gut morphology of broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 237-251.
- Wodzinski, R. J. i A. H. J. Ullah.** 1996. Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 263-302.



**EFFECTE DE L'ADDICIÓ DE FITASA MICROBIANA A DIETES AMB  
SUBPRODUCTES EN PRESENÇA O NO DE FITASA ENDÒGENA**



## **6.1. Introducció**

L'addició de enzims microbians a pinsos utilitzats en avicultura ha incrementat en els darrers anys. En alguns casos, s'afegeixen per reforçar l'acció dels enzims endògens, ja sigui dels ingredients de la dieta o del propi animal, que moltes vegades són poc actius en les condicions del tracte gastrointestinal. Un exemple d'aquests enzims és la fitasa.

La fitasa es troba involucrada en el metabolisme del fòsfor, facilitant el trencament de l'enllaç fòsfor-fitat, reduint la capacitat de l'àcid fític de quelar minerals, especialment els bivalents, o d'unir-se amb molècules de midó i proteïnes (Ravindran i col., 1995). L'alliberament d'aquestes nutrients permet millores en la productivitat avícola, i una millor utilització del fòsfor present en les llegums i els cereals i subproductes emprats en la fabricació del pinso.

La fitasa microbiana [3-fitasa (EC 3.1.3.8)] més emprada és la que procedeix de llevats o fongs, i en especial la procedent del gènere *Aspergillus*. Les fitases originàries d'aquests microorganismes presenten dos intervals òptims de pH, entre 2.5-3 i 5.5-6 que facilita la seva acció dins el tracte intestinal. Les fitases vegetals [6-fitasa (EC 3.1.3.26)] tenen un interval de pH òptim entre 4.5 i 5.5 (Reddy i col., 1989) per sota del pH intestinal.

El marge de temperatures òptimes de les fitases es troben entre 45 i 60°C (Wodzinski i Ullah, 1996), disminuint ràpidament la seva activitat a temperatures més elevades, no trobant-se activitat a temperatures superiors a 100°C (Juanpere i col., 2004). Les temperatures de fabricació dels pinsos acostumen a ser entre 70 i 90°C, i per tant, es fàcil pensar que l'activitat fitàsica dels ingredients de la dieta pot reduir-se o anul·lar-se per efecte de la temperatura. Comercialment, les fitases microbianes es presenten amb una coberta protectora que comporta no veure's afectades per la temperatura, especialment quan el pinso es prepara en forma de grànul (López-Álvarez, 2002).

En avicultura, la majoria d'estudis que s'han realitzat sobre els efectes de la disminució de la fitasa endògena s'han realitzat en cereals (Jongbloed i Kemme, 1990), no existint massa informació sobre com afecta en subproductes i les seves conseqüències. En canvi, sí que s'han realitzat estudis de la degradació de la fitasa en subproductes (segó de blat) en estudis d'humans. Sandberg i col. (1986,

1987 i 1996) han desenvolupat estudis en els que descriuen mètodes per inactivar la fitasa, avaluar la metodologia emprada, i estudiar els efectes en la dieta dels humans, trobant que l'absorció de ferro amb dietes amb segó de blat cru o segó de blat amb la fitasa inactivada era quasi bé igual, augmentant significativament quan s'afegia fitasa microbiana activa a la dieta (Sandberg i col.,1997).

Dins dels estudis referits a subproductes en pollastres, trobem que Viveros i col. (2002) van passar segó de sègol per autoclau a 120° i 15 min, per a després subministrar-ho en dietes de moresc-soja. Ribeiro i col (2003) van utilitzar dietes de moresc-soja amb segó d'arròs, que és alt en fitat, i van sotmetre la dieta a un procés de granulació (a 85°C). Aquests autors van trobar que la granulació no afectà negativament l'activitat fitàsica de les dietes.

Els principals objectius d'aquest assaig foren l'avaluació dels efectes en la biodisponibilitat de fòsfor i altres minerals per l'addició de fitasa exògena a dietes de moresc-soja amb segó de blat, depenent de la presència o no d'activitat fitàsica endògena del segó de blat.

## **6.2. Material i mètodes**

### ***6.2.1. Maneig dels animals***

S'utilitzaren dos-cents vuitanta-vuit pollastres mascles de la raça Ross 308 d'1 dia de vida. La prova va durar 24 dies. Només es van utilitzar els animals sense problemes de potes, amb ulls oberts i un comportament actiu. Els pollastres es posaren en 48 gàbies situades en dos bateries Petersime, en una nau sense finestres i amb calefacció elèctrica i ventilació forçada. Els programes de llum i temperatura emprats foren els habituals en la granja, seguint el següent programa:

1a setmana: 30-35° C	0-4 dies: 23 h de llum
2a setmana: 29-32° C	4-10 dies: 20 h de llum
3a setmana: 27-30° C	10 fins al final: 18 h de llum

L'aigua i el pinso en forma de farina es varen subministrar *ad libitum* durant tot l'experiment.

### **6.2.2. Tractaments i disseny experimental**

Els animals es distribuïren en vuit tractaments, que variaven en el subproducte emprat (tractat o no per l'autoclau), el nivell de subproducte (0, 5 o 10%), i el nivell de fitasa exògena (500 U per kg de pinso), tal com es mostra en la Taula 6.1. El blat es va tractar en autoclau per un procés de vapor calent (a 105° C durant 10 minuts, en safates de 10 mm de profunditat), comprovant-se la total eliminació de l'activitat fitàsica en finalitzar el procés (Taula 6.2). Tots els tractaments experimentals es replicaren sis vegades, i cada rèplica contenia sis animals. Els animals només reberen un pinso durant tot l'assaig.

### **6.2.3. Fabricació del pinso i composició nutritiva de les dietes**

Tots els ingredients inclosos en els pinsos, excepte el greix, la sal, el fosfat bicàlcic, el carbonat càlcic, vitamines i el corrector mineral, i els productes avaluats, varen ser mòlts en un molí de 30 CV, a una mida de tamís de 3mm. Les dietes base es formularen per tal que fossin totes iguals en proteïnes i en energia, tal com es veu en la Taula 6.3. El segó de blat i el moresc van ser de la collita de 2000. La fitasa microbiana (E.C. 3.1.3.8) utilitzada en l'assaig era una preparació experimental (SP-1002 en forma de pols, amb una activitat fitàsica de 3295 U/kg, de l'empresa Roche Vitamins). Des del primer dia de l'assaig, els pinsos contenien diòxid de titani (TiO<sub>2</sub>) com a marcador de digestibilitat, en una concentració de 5g per kg de pinso.

### **6.2.4. Anàlisi química**

Totes les mostres de les dietes experimentals i les matèries primeres es passaren pel molí amb un sedàs de 0.5 mm. Les mostres s'analitzaren utilitzant els mètodes estàndards de l'AOAC (1990) per matèria seca (Codi 934.01), extracte eteri (Codi 920.39), cendres (Codi 942.05), proteïna bruta (976.05) i fibra bruta (Codi 978.10). La concentració de fòsfor total s'analitzà colorimètricament pel mètode del molibdo-vanadat (Codi 965.17). La concentració de calci es va analitzar per espectrofotometria d'absorció atòmica de flama. El biòxid de titani en els pinsos, les excretes i els continguts ileals s'analitzaren segons el procediment descrit per Short i col. (1996). L'activitat

fitàsica present en les matèries primeres i els pinsos finals s'analitzaren segons Engelen i col. (1994).

#### **6.2.5. Paràmetres productius i assaig de balanç**

Els animals es pesaren conjuntament en arribar a la granja i per gàbia als 21 dies, tanmateix com el pinso. Així es calculà el consum de pinso, el guany de pes mig diari i l'índex de transformació entre 1 i 21 dies. La mortalitat s'enregistrà diàriament, incloent la causa de la mort. En el desè dia, es va avaluar el percentatge d'animals amb culs bruts. Entre els dies 15 i 19 de l'assaig es registraren el consum d'aigua, de pinso, i s'obtingué la relació aigua/pinso. L'energia metabolitzable aparent (EMA) es determinà pel procediment del marcador d'òxid de titani. Les excretes es recolliren en el 21è dia de l'assaig, durant un període curt de temps, per tal que fossin fresques, van ser emmagatzemades a  $-20^{\circ}$  C, i finalment liofilitzades; posteriorment, es molgueren i s'emmagatzemaren pel seu anàlisi. L'energia bruta de les mostres dels pinsos i de les excretes foren analitzades mitjançant un combústió complerta en un calorímetre adiabàtic IKA C-400 (DIN 51900, 1977) per obtenir l'EMA de les dietes.

#### **6.2.6. Estudis sobre la retenció de minerals**

Tots els animals es varen sacrificar mitjançant injecció intravenosa de pentobarbital sòdic en els dies 22, 23 i 24 de l'assaig experimental. Es recolliren mostres intestinals des del diverticle de Meckel fins a 15 cm abans a la unió ili-cecal, que foren emmagatzemades en gel, per tal de mesurar la viscositat intestinal de la digesta fresca. Les mostres d'aquests continguts digestius es centrifugaren a 12000 rpm durant 5 min a  $15^{\circ}$  C, i els sobrenadants recollits es guardaren en gel fins que la viscositat fos determinada mitjançant un viscosímetre digital Brookfield, mantingut a  $30^{\circ}$ C i llegida després d'1 min. Abans de l'eutanàsia, es recolliren mostres de sang de dos animals per rèplica, per punció cardíaca. El plasma se separà per centrifugació de la sang a  $2000 \times g$  durant 10 minuts (Lima i col., 1997), i es determinà la concentració de fòsfor i calci del plasma. Tanmateix, després de l'eutanàsia, es tallaren els dits del mig de dos animals de cada rèplica (entre el segon i el

tercer tars), que foren pesats i calcinats per tal d'obtenir els valors de cendres dels dits (Cabahug i col., 1999).

### 6.2.7. Cura dels animals

Totes els procediments emprats amb els pollastres han estat aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de l'IRTA

### 6.2.8. Càlculs

Els valors d'EMA de les dietes es calcularen segons la fórmula següent, tenint en compte que es realitzaren les correccions apropiades per diferències en el contingut d'humitat.

$$EMA = EB_{dieta} - ((TiO_2, dieta / TiO_2, excreta) \times EB_{excreta})$$

on  $EB_{dieta}$  i  $EB_{excreta}$  són l'energia bruta del pinso i de l'excreta, respectivament.

Els valors d'EMA corregida per una retenció de nitrogen zero (EMAn) es calcularen segons la fórmula següent:

$$EMAn, dieta = EMA - [ ( GMD \times 0.2 \times 8220 ) / ( CMD \times 6.25 ) ]$$

Els coeficients de digestibilitat dels nutrients es calcularen usant el procediment de marcador per la següent fórmula:

$$Dig X = 1 - ( (TiO_2, dieta \times X_{excreta}) / (TiO_2, excreta \times X_{dieta}) )$$

on  $X_{dieta}$  i  $X_{excreta}$  són la concentració del nutrient X en la dieta i en l'excreta, respectivament.

### 6.2.9. Anàlisi estadística

Les dades es varen analitzar amb una anàlisi de variança amb disseny de blocs a l'atzar, emprant els procediments General Lineal Models (GLM) del Statistical Analysis System Institute Inc. (1985).

La significància estadística s'acceptà quan  $P < 0.05$ . Quan es trobaren que els efectes principals eren significatius, les mitjanes individuals foren comparades mitjançant el test de Duncan de interval múltiple. Els efectes principals de l'addició de fitasa microbiana, del tractament amb autoclau i del nivell de inclusió del segó de blat foren analitzats pels següents grups de contrastos:

Addició de fitasa microbiana: T-1, T-5 i T-7 enfront de T-4, T-6 i T-8.

Tractament de segó de blat: T-2 i T-3 enfront de T-5 i T-7.

Nivell inclusió de segó de blat: T-2 i T-5 enfront de T-3 i T-7.

### **6.3. Resultats**

#### ***6.3.1. Tractament del segó de blat***

Prèviament a la prova experimental en granja, es van realitzar uns estudis per optimitzar les condicions emprades en el procés d'autoclau necessàries per inactivar la fitasa endògena del segó de blat. Els resultats obtinguts en el nostre laboratori (1219 U de fitasa per g pel segó de blat normal, i menys de 5 U/g pel segó de blat a 10, 15, 20 i 30 minuts) ens van demostrar que les condicions eren les adequades. En la Taula 6.2, es presenten els valors de l'activat fitàsica obtinguts en les dietes usades en l'assaig experimental, segons anàlisi realitzat per l'empresa DSM Nutritional Products, en la seva seu de Basilea. L'anàlisi de les dades ens permet comprovar com els tres primers pinsos, que tenen un creixement en la concentració de segó de blat, presenten la mateixa tendència en l'activitat fitàsica, amb el doble de valors de la dieta amb 10% de segó respecte a la dieta amb 5% (153 U/g per la dieta amb 10% i 83 U/g per la dieta amb un 5% de segó), essent aquests valors lleugerament superiors als valors teòrics (Taula 6.3). Observant els valors de fitasa dels T-4, T-6 i T-8 es confirma que la quantitat de fitasa exògena afegida es troba propera a les 500 U de fitasa/kg. També es pot comprovar com les dietes amb el segó passat per l'autoclau i la dieta sense segó tenen activitats fitàsiques molt baixes, tal com correspon, i que estan per sota del límit de detecció de 50 U/Kg.

#### ***6.3.2. Paràmetres productius***

Tant el pes dels animals en el darrer dia de la prova com el guany de pes mig diari i el consum mig diari de pinso es veieren afectats tant per la presència de fitasa microbiana exògena en les dietes com per la presència de fitasa endògena del segó de blat (Taula 6.4). Es pot dir que l'addició de fitasa exògena va fer augmentar el pes final en uns 30-35 grams respecte als animals que no menjaren fitasa microbiana, essent el guany mig d'uns 2 grams, la mateixa quantitat que va créixer

el consum de pinso. L'índex de transformació (relació entre consum de pinso i guany de pes) va donar una significància de  $P = 0.0541$  per a l'addició de fitasa exògena a les dietes, amb valors més interessants per a la producció quan la fitasa és afegida, mentre que quan el segó és passat per l'autoclau no s'obtingueren diferències estadísticament significatives. La inclusió de 10% de segó en les dietes experimentals de moresc-soja va produir animals més grans i amb una eficàcia millor ( $P < 0.001$ ), però tant en les dietes amb un 5% com per un 10% els animals consumiren igual quantitat de pinso.

Si tenim en compte, però, el període de temps dels dies 15 a 19, podem comprovar com el consum de pinso i aigua es veu afectat tant per l'addició de la fitasa exògena, com pel nivell de segó en la dieta ( $P < 0.05$ ) o com per l'eliminació de la fitasa endògena ( $P < 0.001$ ), tal com es pot observar en la Taula 6.5. En tots tres casos, la relació entre l'aigua beguda i el pinso consumit es manté igual, no essent estadísticament diferent.

### **6.3.3. Viscositat intestinal**

En la Taula 6.5 es mostren els valors obtinguts de viscositat intestinal de tots els animals. L'anàlisi jeràrquic de tots els tractaments ens mostra que no hi ha diferències pel que fa a la viscositat, tot i que el valor més baix es troba pels T-1 i T-8 (2.8 mPa.s) i el més alt pel T-6 (4.5 mPa.s), essent més del 60% superior un de l'altre. Aquesta manca de diferència en els resultats també es veu reflectida en efectuar les anàlisis dels diferents contrastos. Es va observar que cap dels tres factors estudiats van fer canviar la viscositat del contingut intestinal.

### **6.3.4. Valors energètics i digestibilitat de nutrients**

En la Taula 6.6 es mostren els valors de l'EMA i l'EMAn. El valor energètic més gran s'obtingué per la dieta amb 10% de segó i fitasa (T-8), mentre que els més baixos fou per les dietes T-1 i T-2, és a dir, la dieta sense segó i la dieta amb un 5% de segó no tractat, respectivament.

No es produïren diferències significatives per l'eliminació de la fitasa endògena del segó de blat en cap dels dos paràmetres. Sí que se n'observaren en ambdós paràmetres quan s'analitzà el factor fitasa i el nivell de segó. Es van obtenir valors energètics més elevats quan, per una part, s'incloué

fitasa en la dieta, i per altra banda, s'inclogué segó en un 10%, ja que per mantenir les nivell energètic de la dieta, també inclogué en la dieta un 6% de llard.

Pel que fa a la digestibilitat ileal de proteïna (Taula 6.6) es mostren només els resultats corresponents a la mitjana dels tractaments, ja que per problemes de quantitat de mostra, es van barrejar les diferents rèpliques per obtenir només una rèplica sola. Per tant, es presenten les dades com a informació de quines són, tot i no tenir opció de realitzar l'estudi estadístic. Veient les dades es pot observar que el valor més alt s'obté per la dieta amb 10% de segó i sense tractar (85.0%), mentre que per les dietes amb 10% de segó i autoclavat presenten els valors més baixos (81.5% per la dieta sense fitasa i 81.4% per la dieta amb fitasa) conjuntament amb la dieta amb un 5% de segó no tractat (81.4%).

La digestibilitat fecal de midó va ser bastant elevada, obtenint-se valors dins d'un petit interval, que va des del 93.1% de T-3 fins al 95.0% del T-2. L'aplicació de fitasa en les dietes va produir diferències entre els tractaments amb una significància de  $P = 0.0575$ . Tenint en compte aquest grau de significància, els millors resultats s'obtingueren després d'afegir la fitasa microbiana. Les dietes amb 5% de segó donaren millors resultats que les que tenien un 10% en la seva composició ( $P < 0.01$ ), donant un percentatge major en un 1.7% (94.8 enfront de 93.1%). No s'obtingueren millores degut a la presència de la fitasa endògena del segó de blat.

### ***6.3.5. Efectes sobre la disponibilitat de minerals***

Les dades de la composició mineral del plasma dels animals emprats en l'assaig es troben en la Taula 6.7. Observant les dades es pot veure que la presència de fitasa microbiana en la dieta produeix un augment en la concentració de fòsfor no fític (en més d'un 25%). La quantitat de fòsfor en el plasma va lligada a la concentració de calci. La presència de fitasa exògena en les dietes fa disminuir la presència de calci en el plasma, cosa que es ratifica en realitzar el contrast corresponent a la presència de fitasa microbiana ( $P < 0.0001$ ), havent-hi un descens des de 14.3 fins a 13.2 mg/dl. L'eliminació de la fitasa endògena del segó de blat no va tenir cap efecte sobre la concentració de

calci, però si en la del fòsfor no fític, provocant una disminució propera al 12% (de 6.3 a 5.6 mg/dl). No s'observà cap efecte per la diferent quantitat de segó de blat present en les dietes.

La concentració de cendres en els dits es un bon indicador de la mineralització per l'aportació de la dieta. Només s'observaren efectes significatius deguts a l'addició de fitasa microbiana en la dieta, amb augments que van des de 11.3 a 12.0%, per les dietes sense fitasa i amb fitasa, respectivament. Per acabar de comprovar aquest fet, es mesurà la quantitat de fòsfor en els dits, obtenint-se que la presència de fitasa exògena provocà un increment estadísticament significatiu des de 14.5 fins a 15.0% ( $P < 0.01$ ).

La ingestió, excreció i retenció aparent de fòsfor total es mostren en la Taula 6.8. Amb els resultats dels contrastos lineals obtinguts només s'observaren efectes en la quantitat ingerida de fòsfor total deguda a l'addició de fitasa exògena i a l'eliminació de l'endògena del segó. Es produeix un augment en la ingestió del fòsfor total propera al 10% (21 grams) quan s'afegeix la fitasa microbiana, i hi ha una disminució del consum (19 grams) en eliminar la fitasa endògena, ambdues variacions en el mateix sentit que la ingesta de pinso. No s'observaren variacions estadístiques en la retenció aparent de fòsfor total en cap dels tres contrastos estudiats. Malgrat no ser significatius, si que es poden observar unes tendències a augmentar la retenció de fòsfor total després de l'addició de fitasa microbiana en les dietes (62.7% sense fitasa i 65.8% amb fitasa,  $P = 0.10$ ) i per l'augment en el nivell de segó (60.9% per les dietes amb 5% de segó i 62.6% per les dietes amb 10% de segó,  $P = 0.40$ ), i a disminuir per l'eliminació de la fitasa endògena mitjançant l'autoclau (62.8% sense fitasa i 60.9% amb fitasa,  $P = 0.45$ ). Pel que fa a l'excreció del fòsfor total, s'observaren tendències a ser menors després d'afegir la fitasa a la dieta, d'augmentar el segó i d'eliminar la fitasa endògena del segó.

#### **6.4. Discussió**

Amb l'estudi realitzat s'ha pogut comprovar que temperatures superiors a 100°C permeten inactivar l'enzim fitasa de subproductes de molinera, amb una alta activitat fitàsica endògena. Segons dades d'anàlisi del laboratori IRTA, el segó de blat utilitzat en la composició de les dietes presentava una activitat de 1219 U/g en el seu estat natural. S'ha pogut determinar que l'activitat dels pinsos ja fabricats era nul·la o quasi bé nul·la en els tractaments T-5 a T-8 (Taula 6.2), tenint en compte que l'únic ingredient amb una quantitat important de fitasa endògena era el segó. Sandberg i els seus col·laboradors (1987) ja van descriure que cuinant una dieta de segó per a humans, encara que siguin condicions molt fortes, pot fer perdre l'activitat fitàsica del segó, sense que observessin canvis en el contingut de midó, dels components de la fibra de la dieta o del fitat. En un altre estudi del mateix grup (Sandberg i col., 1996), els autors van aconseguir inactivar la fitasa endògena de mostres de 100 grams de segó després de passar-lo per un autoclau a una temperatura de 120°C durant 6 minuts. Les condicions emprades en aquesta prova van diferir en una menor temperatura (però encara superior a la temperatura de desnaturalització de l'enzim) i més temps (10 minuts), utilitzant-se aquest temps ja que les mostres que es posaven en l'autoclau cada vegada eren superiors a 1 quilo de pes.

La inclusió de la fitasa microbiana en les dietes experimentals de moresc-soja amb segó de blat van produir augments significatius en el creixement dels pollastres i en el consum de pinso (Taula 6.4). Les millores trobades en ambdós paràmetres permeten que l'índex de transformació pugui considerar-se que és diferent degut a la presència de l'enzim exogen a una significància del 5.4%, una mica superior al 5% que tenim establert com a límit acceptat. L'índex va ser millor productivament parlant, és a dir més baix, quan la fitasa fou afegida als pinsos. Aquests resultats estan d'acord amb el que troben altres autors (Broz i col., 1994; Windisch i Kirchgeßner, 1996; Ahmad i col., 1999). Com és ben sabut, les dietes de moresc-soja són les més emprades en els estudis de creixement i de digestibilitat, tant en porcs com en pollastres. Per això, encara que en el nostre estudi el segó de blat s'addiciona de manera gradual, la base de la dieta està composta pel

morenc com a cereal, i per tant com a aportació principal d'energia, i la soja, com a aportació proteica.

L'eliminació de la fitasa endògena del segó de blat, juntament amb la baixa activitat de la dieta base de morenc-soja va produir un menor consum de pinso, i com a resultat, un menor creixement dels animals. Les dues disminucions, que són de l'ordre del 6-7%, no van fer variar l'índex de transformació, mantenint-se la relació en presència o no de fitasa endògena. Es pot pensar, doncs, que la fitasa endògena no fa variar molt les dades productives. Però no és així, ja que l'animal té un pes inferior en uns 25 g respecte a l'animal que consumeix fitasa endògena de la dieta, i, a més, en aquest segon cas, l'índex de transformació també és menor.

Les dades referents al consum d'aigua i pinso, durant la tercera setmana del període experimental (Taula 6.5), semblen confirmar que, la fitasa exògena influeix incrementant aquests paràmetres i que l'eliminació de la fitasa endògena els disminueix. De manera similar, la relació entre l'aigua beguda i el pinso ingerit es va mantenir constant, encara que sembla que la tendència sigui a augmentar (més aigua beguda per cada gram de pinso consumit) quan hi ha fitasa afegida o segó tractat.

Els valors obtinguts de viscositat intestinal no es modificaren per la fitasa, ja sigui l'exògena afegida o l'endògena inactivada. En qualsevol cas, els valors obtinguts són baixos, com és habitual en dietes en què el morenc representa l'ingredient principal (veure dades en l'assaig 5, capítol 8). Amb l'observació de les dades de cada tractament (Taula 6.5), no es pot treure massa idees de com afecta el procés d'autoclau o l'addició de fitasa exògena. Les dietes amb un increment lineal de segó sense tractar presenten un increment similar de viscositat. Per tant, això pot fer pensar que el segó com a matèria primera fa incrementar la viscositat, tot i tenir-ne només 1.59 mPa.s a pH 1.5. En presència de fitasa exògena, la viscositat presenta un comportament irregular, encara que no significatiu: es manté igual sense segó; amb 5% de segó, augmenta des de 3.5 a 4.5 mPa.s; i amb 10% de segó, disminueix des de 3.4 a 2.8 mPa.s.

L'addició de fitasa microbiana en les dietes de moresc, soja i segó de blat va produir augments en els valors energètics de les dietes, cosa que també es donà en contrastar les dietes amb 10% de segó respecte les que en portaven un 5%. L'augment dels valors energètics per la fitasa està ben documentat (Ravindran i col., 1995 i 2001; Ravindran, 1999), podent ser explicat per la hidròlisi de l'àcid fític que fa que les proteïnes i el midó que poden estar units siguin més disponibles. La millora per una major quantitat de segó de blat en la dieta no és massa clara. L'addició de segó de blat fa disminuir la presència de moresc en la dieta, el qual té més del doble d'energia metabolitzable (13.85 MJ/kg) que el segó (6.56 MJ/kg) (Leeson i Summers, 1991), el que semblaria que els valors energètics haguessin de disminuir. Però per evitar aquesta disminució, i en el nostre cas també compensar-la, s'afegeix una major quantitat de llard, amb una energia metabolitzable de 35.96 MJ/kg, que fa augmentar 0.12 MJ/kg l'energia de la dieta amb 10% de segó respecte a les dietes que en tenen un 5%.

La inclusió d'un 10% de segó en les dietes va permetre una millora en les digestibilitats fecals dels nutrients. Tal com s'acaba de dir, en aquesta dieta la quantitat de greixos és més elevada que en les anteriors, per la qual cosa és més fàcil que pugui ser assimilat en el cos i augmentar-ne la retenció. En canvi, l'augment de la quantitat de segó en les dietes va propiciar una disminució en la digestibilitat fecal del midó, segurament deguda a què augmentant el segó també s'augmenta la concentració de PNA, i per tant fent menys disponible el midó. La inclusió de la fitasa microbiana no va variar la digestibilitat de lípids deixant-la igual, però sí que millorà la de midó encara que va ser en una significància de  $P = 0.0575$ . Com se sap la fitasa permet que el midó enllaçat al grup fosfat de l'àcid fític s'alliberi augmentant la seva utilització, tal com descriuen Ravindran i col. (2000).

La concentració plasmàtica de calci disminuï i la de fòsfor no fític augmentà després de l'addició de fitasa microbiana en les dietes (Taula 6.7). L'eliminació de la fitasa endògena pel procés de temperatura (T-2 i T-3 enfront de T-5 i T-7) va tenir una influència negativa en la concentració de fòsfor no fític, disminuint-la, passant de 6.3 a 5.6 mg/dl ( $P < 0.05$ ), observant-se que amb una  $P =$

0.0754 la concentració de calci augmenta des de 13.8 fins a 14.3 mg/dl. Probablement, el procés d'autoclau ha produït modificacions en el fitat, que poden ser de tipus d'estructura, canviant la seva conformació, o també pel trencament d'enllaços, la qual cosa ha permès que augmenti la concentració de calci lliure en el segó, i per tant en resulti més disponible. Com que sembla que hi ha un augment en la concentració de calci, es podria entendre el perquè de la disminució de la concentració del fòsfor no fític. Encara que veient aquesta disminució ens pot portar a pensar que la temperatura modifica l'estructura de l'àcid fític, canviant la conformació i produint uns altres tipus d'enllaços, que no pas el trencament total de l'enllaç fitat-fòsfor, doncs hauria de augmentar la concentració de fòsfor. De produir-se així, s'estaria en desacord amb Mulimani i col. (2003), els quals van observar que l'autoclau produeix reduccions significatives d'àcid fític en lleguminoses, que contenen una concentració molt elevada d'aquest (18 – 26%).

L'addició de l'enzim fitasa microbiana en les dietes de morenc i soja amb segó de blat va augmentar la concentració de cendres dels dits (Taula 6.7) significativament en un 0.7%, aproximadament. L'augment en la quantitat de les cendres indica que més minerals s'han dipositat en els ossos dels animals, gràcies al fet que s'ha augmentat la seva disponibilitat pel trencament del complex fitat-minerals per acció enzimàtica. Deposició que es confirmà amb l'anàlisi de la concentració de fòsfor en les cendres dels dits, amb un augment del 0.5% en valor absolut (de 14.5 a 15.0%). Alguns autors ja han descrit l'augment de la concentració de minerals en ossos, ja sigui en els dits, com en el nostre cas, o en tibia (Zanini i Sazzad, 1999), encara que també hi ha estudis que mostren que l'aplicació de fitasa microbiana en dietes de morenc i soja (sense segó) no produeixen variació en la concentració de fòsfor en tibia en broilers (Broz i col., 1994; Sebastian i col., 1996a, b) i en porcs (Young i col., 1993). Aquests autors descriuen millores amb les cendres i fòsfor, però també en altres minerals com el Ca, Cu o Zn, encara que no en tots els casos els resultats siguin significatius. L'eliminació de la fitasa endògena del segó no va produir variacions en la retenció aparent de fòsfor total (Taula 6.8). La manca de variacions també es va produir en el cas de l'addició de fitasa microbiana. En la bibliografia, generalment, l'addició de fitasa a dietes de morenc-soja representa

un increment en la retenció de fòsfor total (Cabahug i col.,1999; Zanini i Sazzad, 1999; Pérez-Vendrell, 2000b; Rutherford i col., 2004), cosa que no passa en aquest estudi en els tractaments T-1 i T-4, que es corresponen a dietes de morenc-soja sense segó afegit amb i sense fitasa exògena, respectivament. Però, a més, el valor obtingut pel tractament T-1 (66.2%) és bastant elevat si el considerem per a valors normals per a aquest tipus de dietes trobats tant en els nostres assaigs (veure dades de l'assaig 1; Juanpere i col., 2001, 2002) com en treballs d'altres autors (Sebastian i col., 1996a; Lan i col., 2002).

Quan s'augmenta la quantitat de segó inclòs en les dietes, també s'augmenta la concentració de fòsfor total present, ja que el segó té una elevada concentració de minerals en la seva composició (11.6 g de fòsfor total/kg en el segó de blat enfront de 2.8 g/kg de morenc i 6.1 g/kg de soja, segons Eeckhout i De Paepe, 1994). Una de les condicions fixades en el moment de formular és que les dietes han de tenir 2.7 g de fòsfor no fític per quilo de pinso, per tant hi ha d'haver un increment en la concentració de fòsfor fític. En principi, aquest fet no ha de tenir influència en la retenció aparent del fòsfor si ens fixem amb la fitasa microbiana afegida a la dieta, doncs en fer els contrastos de les dietes amb i sense fitasa es contrarestarien els possibles efectes, i per la mateixa raó en l'anàlisi dels efectes de la fitasa endògena. On si que es podrien produir diferències seria en l'estudi del contrast del nivell de segó, ja que, com s'ha dit anteriorment, les dietes amb 10% de segó tenen una major concentració tant de fòsfor total com de fític, però aquestes diferències no s'han trobat.

Un paràmetre important per avaluar els beneficis de la fitasa és el de l'excreció de fòsfor total. Amb l'enzim s'aconsegueix una millor utilització i, per tant, hauria de disminuir la quantitat excretada per l'animal. En aquest experiment, amb dietes baixes amb fòsfor no fític, l'excreció no es veu modificada per la presència de l'enzim exogen, ja que en les dietes amb nivells de fòsfor no fític igual a 0.45%, nivell recomanat pel NRC, el que s'excreta és l'excedent afegit en la dieta. Les dades no són sorprenents doncs ja s'ha observat en altres experiments duts a terme pel nostre grup (Pérez-Vendrell i col., 2000a)

L'augment de la concentració de segó de blat té una especial incidència en els valors energètics de la dieta i en la digestibilitats fecal de midó i lípids (Taula 6.6). En posar un 10% de segó, l'EMA i l'EMAn de la dieta augmentaren ambdós significativament. En afegir el segó, aportació principal de fibra de la dieta, (i per tal d'assajar dietes isoenergètiques) s'ha de fer una modificació de la composició de la dieta, ja que disminueix el valor energètic de la dieta (el segó te menys energia que el morenc) i augmenta la quantitat de greix o llard a afegir. Aquest greix més disponible és el que fa augmentar l'energia metabolitzable de la dieta. L'addició d'una major quantitat de segó de blat va fer disminuir la digestibilitat del midó en quasi bé un 2%, resultat que està en desacord amb el trobat per Jorgensen i col. (1996), on en un estudi amb concentracions més elevades de segó (19 i 38%) no van observar variacions, amb una digestibilitat del 97%, en dietes d'ordi.

La finalitat de l'ús del segó en animals monogàstrics i en humans és diferent. En els animals fa disminuir la viscositat, fent que el contingut que passa per l'intestí sigui més assimilable, mentre que en els humans actua com a arrossegador de substàncies, com per exemple el colesterol. Ambdós efectes, no obstant, són produïts per la gran concentració de PNA que presenta el segó. Tal com s'ha dit, en augmentar el nivell de segó, s'ha de posar més greix, nutrient que esdevé més disponible, per sobre del que pot haver-hi en el morenc o la soja, i consegüentment, s'incrementa la seva digestibilitat.

L'augment de la concentració de segó, disminució del morenc present, que és de 70 g/kg de la dieta al 5% a la del 10% de segó, i la pujada que tot això implica en el greix a afegir a la dieta (de 39 a 60 g/kg per les dietes del 5% i 10%, respectivament), fan que els animals que menjaren les dietes amb una major presència de segó presentaren un pes final superior als altres, amb un increment del consum de pinso i una disminució de l'índex de transformació (Taula 6.4). Tal com s'ha descrit anteriorment, el factor que té una major acció és la quantitat de greix, que permet una major aportació energètica disponible, i els subseqüents resultats en els paràmetres productius.

En general, la inclusió de fitasa en dietes de morenc-soja deficitàries en fòsfor, en presència de segó de blat, va tenir efectes beneficiosos sobre la producció de pollastres broilers, amb una millor

aportació energètica de la dieta, però sense tenir repercussions pel que fa a l'excreció de fòsfor, que es mantingué igual. Quan en aquestes dietes s'afegeix segó de blat, sembla que afegir un 10% pot ser més beneficiós que l'addició d'un 5%, ja que els resultats productius i de digestibilitat de nutrients són més positius. L'eliminació de la fitasa endògena del segó de blat present en dietes de moresc-soja deficientes de fòsfor no seria recomanable ja que va suposar un menor consum de pinso i creixement dels animals, i una disminució en el fòsfor no fític en plasma. Les digestibilitats de nutrients i retencions minerals no variaren per l'eliminació de la fitasa.

Taula 6.1. Tractaments experimental emprats.

Tractaments	Segó de blat	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa <sup>1</sup> (U/kg)
T-1	0% No tractat	2.7	-
T-2	5% No tractat	2.7	-
T-3	10% No tractat	2.7	-
T-4	0% No tractat	2.7	500
T-5	5% Autoclavat	2.7	-
T-6	5% Autoclavat	2.7	500
T-7	10% Autoclavat	2.7	-
T-8	10% Autoclavat	2.7	500

<sup>1</sup> Enzim usat: Phytase SP 1002 CT batch PPQ 6883 en forma de pols (Activitat fitàsica: 3169 U/g) (subministrat per Roche Vitamins Ltd, Basilea)

Taula 6.2. Activitat fitàsica trobada en les dietes experimentals.

Tractaments	Segó de blat	Enzim fitasa afegit (U/g)	Enzim fitasa analitzat (U/g) <sup>1</sup>
T-1	0% No tractat	-	< 50
T-2	5% No tractat	-	83
T-3	10% No tractat	-	153
T-4	0% No tractat	500	657
T-5	5% Autoclavat	-	<50
T-6	5% Autoclavat	500	626
T-7	10% Autoclavat	-	< 50
T-8	10% Autoclavat	500	660

<sup>1</sup> anàlisi realitzat per Roche Vitamins Ltd.

Taula 6.3. Composició de les dietes experimentals.

INGREDIENT (g/kg)	Segó de blat		
	0%	5%	10%
Moresc	604.0	536.9	467.2
Segó de blat	-	50.0	100.0
Farina de soja 480 g/kg	343.1	339.5	334.5
Llard	18.1	39.1	60.0
DL-metionina	2.6	2.6	2.7
L-lisina HCl	0.7	0.7	0.7
Carbonat càlcic	12.0	12.0	12.0
Fosfat bicàlcic	10.7	10.5	10.2
Sal	4.7	4.7	4.7
Clorur de colina 50%	0.2	0.2	0.2
Minerals i vitamines <sup>1</sup>	4.0	4.0	4.0
Composició estimada de nutrients (g/kg)			
Energia metabolizable (MJ/kg)	12.5	12.5	12.5
Protèina bruta	205.1	206.5	210.0
Fibra bruta	24.3	26.6	28.8
Extracte eteri	47.0	67.2	87.3
Cendres	55.4	56.2	56.9
Lisina	12.0	12.0	12.0
Met + Cys	9.2	9.2	9.3
Calci	8.1	8.1	8.1
Fòsfor total	6.0	6.3	6.6
Fòsfor no fític	2.7	2.7	2.7
Fòsfor fitat	3.3	3.6	3.9
Fitasa endògena (U/kg)	6	66	127

<sup>1</sup> Un kg de pinso conté: Vitamina A, 12000 IU; Vitamina D<sub>3</sub>, 2400 IU; Vitamina E, 30 mg; Vitamina K<sub>3</sub>, 3 mg; Vitamina B<sub>1</sub>, 2.2 mg; Vitamina B<sub>2</sub>, 8.0 mg; Vitamina B<sub>6</sub>, 5.0 mg; Vitamina B<sub>12</sub>, 11.0 g; Àcid fòlic, 1.5 mg; Biotina, 150 g; Pantotenat càlcic, 25 mg; Àcid Nicotínic, 65 mg; Etoxiquina, 150 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; Zn, 40 mg, Mn, 60 mg, Se, 0.15 mg, I, 0.33 mg

Taula 6.4. Paràmetres productius 1-21 dies.

Tractament	Segó de blat		Enzim fitasa afegit (U/g)	Pes final (g)	GMD (g/d)	CMD (g/d)	IT (g/g)
T-1	0%	No tractat	-	650 <sup>cd</sup>	29 <sup>cd</sup>	40 <sup>b</sup>	1.39 <sup>a</sup>
T-2	5%	No tractat	-	702 <sup>ab</sup>	31 <sup>ab</sup>	43 <sup>a</sup>	1.38 <sup>a</sup>
T-3	10%	No tractat	-	740 <sup>a</sup>	33 <sup>a</sup>	43 <sup>a</sup>	1.31 <sup>c</sup>
T-4	0%	No tractat	500	682 <sup>bc</sup>	30 <sup>bc</sup>	42 <sup>ab</sup>	1.37 <sup>ab</sup>
T-5	5%	Autoclavat	-	642 <sup>d</sup>	29 <sup>d</sup>	40 <sup>b</sup>	1.38 <sup>a</sup>
T-6	5%	Autoclavat	500	689 <sup>b</sup>	31 <sup>b</sup>	41 <sup>ab</sup>	1.35 <sup>b</sup>
T-7	10%	Autoclavat	-	708 <sup>ab</sup>	32 <sup>ab</sup>	41 <sup>ab</sup>	1.30 <sup>c</sup>
T-8	10%	Autoclavat	500	732 <sup>a</sup>	33 <sup>a</sup>	43 <sup>a</sup>	1.30 <sup>c</sup>
<i>Error estàndard</i>				13.2	0.6	0.7	0.010
<i>Pr &gt; F</i>				***	***	**	***
<b>Contrasts (Pr &gt; T)</b>							
No enzim vs Fitasa				**	***	**	0.0541
No tractat vs Autoclau				**	**	**	NS
5% de segó vs 10% de segó				**	***	NS	***

NS: no significatiu, \*\* P ≤ 0.01, \*\*\* P ≤ 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P ≤ 0.05).

Taula 6.5. Consum d'aigua i pinso entre els dies 15 i 19, i viscositat intestinal al final de la prova.

Tractaments	Segó de blat		Enzim fitasa afegit (U/g)	Consum de pinso (g)	Consum d'aigua (g)	Relació aigua/pinso (g/g)	Viscositat intestinal (mPa.s)
T-1	0%	No tractat	-	67 <sup>bc</sup>	154	2.3	2.4
T-2	5%	No tractat	-	71 <sup>b</sup>	152	2.2	3.1
T-3	10%	No tractat	-	74 <sup>a</sup>	162	2.2	3.6
T-4	0%	No tractat	500	70 <sup>b</sup>	152	2.2	2.9
T-5	5%	Autoclavat	-	66 <sup>c</sup>	137	2.1	3.5
T-6	5%	Autoclavat	500	69 <sup>bc</sup>	155	2.2	4.5
T-7	10%	Autoclavat	-	69 <sup>bc</sup>	148	2.2	3.4
T-8	10%	Autoclavat	500	70 <sup>b</sup>	156	2.2	2.8
<i>Error estàndard</i>				1.5	4.9	0.05	0.61
<i>Pr &gt; F</i>				**	NS	NS	NS
<b>Contrasts (Pr &gt; T)</b>							
No enzim vs Fitasa				*	*	NS	NS
No tractat vs Autoclau				**	**	NS	NS
5% de segó vs 10% de segó				*	*	NS	NS

NS: no significatiu, \* P ≤ 0.05, \*\* P ≤ 0.01, \*\*\* P ≤ 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P ≤ 0.05).

Taula 6.6. Energia metabolitzable aparent de les dietes experimentals.

Tractaments	Segó de blat	Enzim fitasa afegit (U/g)	EMA (MJ/kg)	EMAn (MJ/kg)	Digestibilitat		
					Fecal de midó (%)	Fecal de lípids (%)	Ileal de proteïna (%)
T-1	0%	No tractat	14.3 <sup>d</sup>	13.5 <sup>d</sup>	93.4 <sup>bc</sup>	78.8 <sup>d</sup>	82.6
T-2	5%	No tractat	14.3 <sup>d</sup>	13.8 <sup>bcd</sup>	95.0 <sup>a</sup>	82.3 <sup>bc</sup>	81.4
T-3	10%	No tractat	15.2 <sup>a</sup>	14.4 <sup>a</sup>	93.1 <sup>c</sup>	84.5 <sup>ab</sup>	85.0
T-4	0%	No tractat	14.6 <sup>bcd</sup>	13.8 <sup>bcd</sup>	94.6 <sup>ab</sup>	79.3 <sup>d</sup>	84.3
T-5	5%	Autoclavat	14.4 <sup>cd</sup>	13.6 <sup>cd</sup>	94.6 <sup>ab</sup>	81.3 <sup>cd</sup>	83.5
T-6	5%	Autoclavat	14.9 <sup>abc</sup>	14.0 <sup>abc</sup>	94.5 <sup>abc</sup>	80.6 <sup>cd</sup>	84.0
T-7	10%	Autoclavat	15.0 <sup>ab</sup>	14.2 <sup>ab</sup>	93.2 <sup>c</sup>	85.0 <sup>ab</sup>	81.5
T-8	10%	Autoclavat	15.3 <sup>a</sup>	14.4 <sup>a</sup>	94.1 <sup>abc</sup>	85.4 <sup>a</sup>	81.4
<i>Error estàndard</i>			0.19	0.19	0.53	1.08	-
<i>Pr &gt; F</i>			***	**	*	***	-
Contrasts (Pr > T)							
No enzim vs Fitasa			*	*	0.0575	NS	-
No tractat vs Autoclau			NS	NS	NS	NS	-
5% de segó vs 10% de segó			***	**	**	**	-

NS: no significatiu, \* P ≤ 0.05, \*\* P ≤ 0.01, \*\*\* P ≤ 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P ≤ 0.05).

Taula 6.7. Composició mineral del plasma, i composició dels dits dels animals.

Tractaments	Segó de blat	Enzim fitasa afegit (U/g)	Calci en plasma (mg/dl)	Fòsfor no fític en plasma (mg/dl)	Màteria seca dits (%)	Cendres dits (%/MS)	Fòsfor en dits (%/cendres)
T-1	0%	No tractat	14.3 <sup>a</sup>	5.1 <sup>c</sup>	32.4 <sup>cd</sup>	10.9 <sup>c</sup>	14.3
T-2	5%	No tractat	14.0 <sup>ab</sup>	6.2 <sup>ab</sup>	32.5 <sup>bcd</sup>	11.4 <sup>abc</sup>	14.5
T-3	10%	No tractat	13.4 <sup>bc</sup>	6.4 <sup>ab</sup>	32.2 <sup>d</sup>	11.7 <sup>ab</sup>	14.5
T-4	0%	No tractat	13.4 <sup>bc</sup>	7.0 <sup>a</sup>	33.6 <sup>a</sup>	12.1 <sup>a</sup>	14.9
T-5	5%	Autoclavat	14.0 <sup>ab</sup>	5.2 <sup>c</sup>	31.9 <sup>d</sup>	11.3 <sup>bc</sup>	14.6
T-6	5%	Autoclavat	13.1 <sup>c</sup>	6.8 <sup>ab</sup>	33.3 <sup>ab</sup>	12.0 <sup>ab</sup>	14.9
T-7	10%	Autoclavat	14.5 <sup>a</sup>	5.9 <sup>bc</sup>	32.2 <sup>d</sup>	11.3 <sup>bc</sup>	14.6
T-8	10%	Autoclavat	13.0 <sup>c</sup>	6.9 <sup>a</sup>	33.2 <sup>abc</sup>	12.1 <sup>a</sup>	15.1
			<i>Error estàndard</i>	0.35	0.28	0.2	0.2
			<i>Pr &gt; F</i>	***	***	**	NS
<b>Contrasts (Pr &gt; T)</b>							
		No enzim vs Fitasa	***	***	**	***	**
		No tractat vs Autoclau	NS	*	NS	NS	NS
		5% de segó vs 10% de segó	NS	NS	NS	NS	NS

NS: no significatiu, \* P ≤ 0.05, \*\* P ≤ 0.01, \*\*\* P ≤ 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P ≤ 0.05).

Taula 6.8. Retenció aparent, ingesta i excreció de fòsfor total de les dietes experimentals.

Tractaments	Segó de blat	Enzim fitasa afegit (U/g)	Fòsfor total en excreta (%/MS)	Retenció aparent de fòsfor total (%)	Ingesta de fòsfor total (g)	Excreció de fòsfor total (mg)
T-1	0%	No tractat	-	66.2	193 <sup>c</sup>	65
T-2	5%	No tractat	-	62.8	228 <sup>a</sup>	85
T-3	10%	No tractat	-	62.7	208 <sup>b</sup>	77
T-4	0%	No tractat	500	66.2	206 <sup>b</sup>	70
T-5	5%	Autoclavat	-	59.1	192 <sup>c</sup>	79
T-6	5%	Autoclavat	500	61.2	205 <sup>b</sup>	75
T-7	10%	Autoclavat	-	62.8	207 <sup>b</sup>	77
T-8	10%	Autoclavat	500	67.4	228 <sup>a</sup>	74
			<i>Error estàndard</i>	0.035	2.3	3.7
			<i>Pr &gt; F</i>	NS	NS	***
<b>Contrasts (Pr &gt; T)</b>						
No enzim vs Fitasa			NS	NS	***	NS
No tractat vs Autoclau			NS	NS	***	NS
5% de segó vs 10% de segó			NS	NS	NS	NS

NS: no significatiu, \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament ( $P \leq 0.05$ ).

## 6.5. Referències bibliogràfiques

Ahmad, T., S. Rasool, M. Sarwar, A. Haq i Z. Hasan. 2000. Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chickens. Anim. Feed Sci. Tech. 83, 103-114.

Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official methods of analysis. 15th ed., Assoc. Anal. Chem., Washington D. C.

Broz, J., P. Oldale, A. H. Perrin-Voltz, G. Rychen, J. Schulze i C. Simoes Nunes. 1994. Effects of supplemental phytase on performance and phosphorus utilisation in broiler chickens fed a low phosphorus diet without addition of inorganic phosphates. Brit. Poultry Sci. 35, 273-280.

- Cabahug, S., V. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 1999. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus contents. I. Effects on bird performance and toe ash. *Brit. Poultry Sci.* 40, 660-666.
- DIN 51900.** 1977. Determination of the gross calorific value by the bomb calorimeter and calculation of the net calorific value. Deutsches Institut für Normung e. V., Berlin, Germany.
- Eeckhout, W. i M. De Paepe.** 1994. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 47, 19-29.
- Engelen, A. J., F. C. van der Heeft, P. H. G. Randsdorp i E. L. C. Smit.** 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.* 77(3), 760-764.
- Jongbloed, A. W. i P. A. Kemme.** 1990. Effect of pelleting mixed feeds on phytase activity and the apparent absorbability of phosphorus and calcium in pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 28, 233-242.
- Jorgensen, H., X.-Q. Zhao, K. E. Bach Knudsen i B. O. Eggum.** 1996. The influence of dietary fibre source and level on the development of the gastrointestinal tract, digestibility and energy metabolism in broiler chickens. *British journal of nutrition.* 75, 379-395.
- Juanpere, J., A. M. Pérez-Vendrell i J. Brufau.** 2002. Effect of microbial phytase on mineral bioavailability of broilers fed nsp-rich diets (barley) in the presence or not of endogenous phytase. En: 11th European Poultry Conference, Bremen, Alemanya (Pòster).
- Juanpere, J., A. M. Pérez-Vendrell i J. Brufau.** 2004. Effect of microbial phytase on broilers fed barley based diets in the presence or not of endogenous phytase. *Anim. Feed Sci. Tech.* 115 (3-4), 265-279.
- Juanpere, J., A. M. Pérez-Vendrell, A.M., Ll. Llauradó i J. Brufau.** 2001. Effects of phytase supplementation, individually and in combination with other dietary enzymes on broiler nutrient availability of diets rich in NSP. En: 13th European Symposium of Poultry Nutrition, Blankenberge, Bèlgica (Pòster).

- Lan, G. Q., N. Abdullah, S. Jalaludin i Y. W. Ho.** 2002. Efficacy of supplementation of a phytase-producing bacteria culture on the performance and nutrient use of broiler chickens fed corn-soybean meal diets. *Poult. Sci.* 81, 1522-1532.
- Lesson, S. i J. D. Summers.** 1991. Commercial poultry nutrition. University Books. Guelph, Canadà.
- Lima, F. R., C. X. Mendonça Jr, J. C. Alvarez, J. M. F. Garzillo, E. Ghion i P. M. Leal.** 1997. Biological evaluations of commercial dicalcium phosphates as sources of available phosphorus for broiler chicks. *Poult. Sci.* 76, 1707-1713.
- López-Álvarez, J. A.** 2002. Estabilidad de la fitasa de la *Peniophora Lycii* frente a los tratamientos térmicos de los piensos. *Anaporc.* 218, 80-85.
- Mulimani, V. H., N. S. Kadi i S. Thippeswamy.** 2003. Effect of processing on phytic acid content in different red gram (*Cajanus cajan* L.) varieties. *J. Food Sci. Techn.-Mysore* 40 (4), 371-373.
- Pérez-Vendrell, A.M., J. Juanpere, M. Francesch i J. Brufau.** 2000a. Effects of microbial phytase on broiler performance and mineral excretion according type of diet. En: 3rd European Symposium of Feed Enzymes, Noordwijkerhout, Holanda. (Pòster)
- Pérez-Vendrell, A.M., R. Salvadó, E. Angulo i J. Brufau.** 2000b Efectos de la adición de fitasa microbiana sobre la retención aparente de fósforo, calcio y zinc en pollos broiler en función del tipo de dieta. En: 3a Conferència-Saló de Fabricants de Pinsos del Mediterrani, Reus, Espanya. (Pòster)
- Ravindran, V.** 1999. Protein and Energy effects of microbial phytase in poultry diets. BASF Technical Symposium: Use of Natuphos phytase in layer nutrition and management. Atlanta, USA. 1-21.
- Ravindran, V., P. H. Selle, G. Ravindran, P. C. H. Morel, A. K. Kies i W. L. Bryden.** 2001. Microbial phytase improves performance, apparent metabolizable energy, and ileal amino acid digestibility of broilers fed a lysine-deficient diet. *Poult. Sci.* 80, 338-344.
- Ravindran, V., S. Cabahug, G. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 2000. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-

phytate phosphorus levels. II. Effects on apparent metabolisable energy, nutrient digestibility and nutrient retention. *Brit. Poultry Sci.* 41, 193-200.

**Ravindran, V., W. L. Bryden i E. T. Kornegay.** 1995. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Biol. Rev.* 6 (2), 125-143.

**Reddy, N.K., M. D. Pierson, S.K. Sathe i D.K. Salunkhe.** 1989. Phytates in cereals and legumes. CRC Press, Boca Raton, USA.

**Ribeiro, A. M. L., A. J. Mireles i K. C. Klasing.** 2003. Interactions between dietary phosphorus level, phytase supplementation and pelleting on performance and bone parameters of broilers fed high levels of rice bran. *Anim. Feed Sci. Tech.* 103, 155-161.

**Rutherford, S. M., T. K. Chung, P. C. H. Morel i P. J. Moughan.** 2004. Effect of microbial phytase on ileal digestibility of phytate phosphorus, total phosphorus and amino acids in a low-phosphorus diet for broilers. *Poult. Sci.* 83, 61-68.

**Sandberg A. S., H. Andersson, B. Kivisto i B. Sandstrom.** 1986. Extrusion cooking of a high-fibre cereal product. 1. Effects on digestibility and absorption of protein, fat, starch, dietary fibre and phytate in the small intestine. *Br J Nutr.* 55(2), 245-254.

**Sandberg, A. S., H. Andersson, N. G. Carlsson i B. Sandström.** 1987. Degradation products of bran phytate formed during digestion in the human small intestine: effect of extrusion cooking on digestibility. *J. Nutr.* 117, 2061-2065.

**Sandberg, A.S., L. R. Hulthén i A. M. Türk.** 1996. Dietary *Aspergillus niger* phytase increases iron absorption in humans. *J. Nutr.* 126, 476-480.

**Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague.** 1996a. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and utilization of dietary calcium, phosphorus, copper, and zinc in broiler chickens fed corn-soybean diets. *Poult. Sci.* 75, 729-736.

**Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague.** 1996b. Efficacy of supplemental microbial phytase at different dietary calcium levels on growth performance and mineral utilization of broiler chickens. *Poult. Sci.* 75, 1516-1523.

**Short, F. J., P. Gorton, J. Wiseman i K. N. Boorman.** 1996. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Anim. Feed Sci. Tech.* 59, 215-221.

**Statistical Analysis System Institute Inc.** 1985. *SAS User's Guide: Statistics, Ver. 5.* SAS Institute Inc., Cary, NC.

**Windisch, W. i M. Kirchgeßner.** 1996. Effect of microbial phytase supplementation on performance data and metabolism of phosphorus, calcium and nitrogen at different levels of calcium supply in broilers. *Arch. Geflügelkd.* 60, 1, 42-47.

**Wodzinsky, R. J. i A. H. J. Ullah.** 1996. Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 263-302.

**Zanini, S. F. i M. H. Sazzad.** 1999. Effects of microbial phytase on growth and mineral utilisation in broilers fed on maize soyabean-based diets. *Brit. Poultry Sci.* 40, 348-352.

**Young, L. G., M. Leunissen i J. L. Atkinson.** 1993. Addition of microbial phytase to diets of young pigs. *J. Anim. Sci.* 71: 2147-2150.



**EFFECTE DE L'ADDICIÓ DE DIFERENTS NIVELLS DE FITASA  
MICROBIANA EN DIETES DE BLAT EN PRESÈNCIA O NO DE FITASA  
ENDÒGENA**



## **7.1. Introducció**

L'enzim fitasa hidrolitza l'àcid fític a mio-inositol i a àcid fosfòric. L'ús d'aquest enzim s'ha vist incrementat darrerament en la indústria agroalimentària, pel fet d'augmentar la disponibilitat i la utilització del fòsfor present en les llegums i els cereals emprats en la fabricació del pinso. El fòsfor, en forma de fitat, és poc disponible per les aus, degut, entre altres motius, a la baixa activitat de la fitasa endògena del tracte intestinal. A més, la fitasa endògena present en el pinso, varia molt en funció del tipus d'ingredient usat (Ravindran i col., 1995). Aquesta fitasa [6-fitasa (EC 3.1.3.26)] té un interval òptim de pH al voltant de 4.5-5.5 (Reddy i col., 1989) cosa que fa que l'enzim no sigui molt actiu al pH gastrointestinal. A més, el seu rang de temperatura òptima es troba entre 45 i 60° C, disminuint ràpidament la seva activitat a temperatures més elevades (Wodzinski i Ullah, 1996), temperatures que estan per sota de les utilitzades en la fabricació de pinso i, per tant, molt probablement serà destruïda per la temperatura. És per això que en el pinso s'afegeix fitasa d'origen microbià [3-fitasa (EC 3.1.3.8)], ja sigui d'origen bacterià, de fongs o de llevats, essent una de les més emprades la provinent de l'*Aspergillus niger*. La fitasa d'aquest origen presenta dos punts de pH òptims a 2.5 i 5.5, i una temperatura òptima de 55-60° C, tot i que comercialment es presenta amb una coberta que la protegeix de temperatures més elevades.

L'addició de la fitasa microbiana en els pinsos produeix una millora dels paràmetres productius (Ravindran i col., 2001; Wu i col., 2003) i de la digestibilitat de nutrients (Kornegay, 1999; Ravindran i col., 2000; Juanpere, 2002; Baidoo i col., 2003; Wu i col., 2003) tant en porcs com aviram. A més, a llarg termini, hi ha una millora mediambiental, amb la reducció de l'excreció de fòsfor i de la contaminació del sòl.

S'han realitzat alguns estudis sobre l'activitat fitàsica endògena dels cereals. Barrier-Guillot i col. (1996) en un estudi sobre 56 mostres de blat, trobaren que l'activitat variava des de 206 a 775 U/kg, amb una mitjana de 508 U/kg. Però no s'han fet molts estudis referent al tractament per la temperatura sobre l'activitat enzimàtica, o per la inactivació en els pinsos granulats (Edwards i col., 1999; Carlson i Poulsen, 2003). En algunes matèries primeres, com l'arròs o el blat, el fitat és molt

estable a l'escalfament, però en altres productes com algunes llegums, el fitat es degrada ràpidament en un període curt de temps (Reddy i col., 1989). La velocitat de destrucció del fitat per l'autoclau sembla ser més petita quan el fitat està associada amb proteïnes i/o cations en productes naturals com cereals. Carlson i Poulsen (2003) trobaren que el fitat total es podia arribar a degradar entre el 17 i 79%, deixant les mostres de cereal en remull a temperatures de fins a 40°C durant més de 8 hores.

Els principals objectius d'aquest assaig foren l'avaluació de la biodisponibilitat de fòsfor i altres minerals, i del creixement dels animals, depenent de la presència o no d'activitat fitàsica endògena en el blat; i, l'estudi dels efectes de diferents nivells de fitasa exògena, alguns més alts dels habituals.

## **7.2. Material i mètodes**

### ***7.2.1. Maneig dels animals***

S'utilitzaren dos-cents vuitanta-vuit pollastres mascles de la raça Ross 308 d'1 dia de vida. La prova va acabar als 24 dies. Només es van utilitzar els animals sense problemes de potes, amb ulls oberts i un comportament actiu. Els pollastres es posaren en 48 gàbies situades en dos bateries Petersime, en una nau sense finestres i amb calefacció elèctrica i ventilació forçada. Els programes de llum i temperatura emprats foren els habituals en la granja.

1a setmana: 30-35° C

2a setmana: 29-32° C

3a setmana: 27-30° C

0-4 dies: 23 h de llum

4-10 dies: 20 h de llum

10 fins al final: 18 h de llum

L'aigua i el pinso en forma de farina es varen subministrar *ad-libitum* durant tot l'experiment.

### ***7.2.2. Tractaments i disseny experimental***

Els animals es distribuïren en vuit tractaments, que variaven en el cereal emprat (tractat o no per l'autoclau), el nivell de fòsfor no fíctic (4.5 i 2.7 g FNF per kg de pinso), i el nivell de fitasa exògena (0, 500 i 5000 U per kg de pinso), tal com es mostra en la Taula 7.1. El blat es va tractar en autoclau per un procés de vapor calent (a 120° C durant 10 minuts, en safates de 10 mm de profunditat),

comprovant-se la total eliminació de l'activitat fitàsica en finalitzar el procés. Tots els tractaments experimentals es replicaren vuit vegades, i cada rèplica contenia sis animals. Els animals només reberen un pinso durant tot l'assaig.

### ***7.2.3. Fabricació del pinso i composició nutritiva de les dietes***

Tots els ingredients inclosos en els pinsos, excepte el greix, la sal, el fosfat bicàlcic, el carbonat càlcic, vitamines i el corrector mineral, i els productes avaluats, varen ser mòlts en un molí de 30 CV, a una mida de tamís de 3mm. Les dietes base es formularen per tal que fossin totes iguals en proteïnes i en energia, tal com es veu en la Taula 7.2. El blat era de la variant Soissons de la collita de 2002. La fitasa microbiana (E.C. 3.1.3.8) utilitzada en l'assaig era una preparació experimental (SP-1002 en forma de pols, amb una activitat fitàsica de 3295 U/kg, de l'empresa Hoffman-La Roche). En tots els tractaments s'inclogué, des del primer dia, la mateixa dosi de xilanasa (40 ppm), per evitar els efectes antinutritius dels pentosans del blat. La xilanasa emprada fou Safizym XP-20 LOT N° 3361, de l'empresa Lesaffre Developement. Des del primer dia de l'assaig, els pinsos contenien diòxid de titani (TiO<sub>2</sub>) com a marcador de digestibilitat, en una concentració de 5g per kg de pinso.

### ***7.2.4. Anàlisi química***

Totes les mostres de les dietes experimentals i les matèries primeres es passaren pel molí amb un sedàs de 0.5 mm. Les mostres s'analitzaren utilitzant els mètodes estàndards de l'AOAC (1990) per matèria seca (Codi 934.01), extracte eteri (Codi 920.39), cendres (Codi 942.05) i fibra bruta (Codi 978.10). La concentració de proteïna bruta dels pinsos es determinà pel mètode de Dumas (AOAC, Codi 990.03). La concentració de fòsfor total s'analitzà colorimètricament pel mètode del molibdo-vanadat (Codi 965.17). Les concentracions de calci, ferro i zinc s'analitzaren per espectrofotometria d'absorció atòmica de flama. El diòxid de titani en els pinsos, les excretes i els continguts ileals s'analitzaren segons el procediment descrit per Short i col. (1996). L'activitat fitàsica present en les matèries primeres i els pinsos finals s'analitzaren segons Engelen i col. (1994).

### ***7.2.5. Paràmetres productius i assaig de balanç***

Els animals es pesaren conjuntament en arribar a la granja i per gàbia als 21 dies, igual que el pinso. Així es calculà el consum de pinso, el guany de pes mig diari i l'índex de transformació entre 1 i 21 dies. La mortalitat s'enregistrà diàriament, incloent la causa de la mort. Entre els dies 15 i 19 de l'assaig es registraren el consum d'aigua, de pinso, i s'obtingué la relació aigua/pinso. L'energia metabolitzable aparent (EMA) es determinà pel procediment del marcador d'òxid de titani. Les excretes es recolliren en el 21è dia de l'assaig, durant un període curt de temps, foren emmagatzemades a  $-20^{\circ}$  C, i finalment liofilitzades; posteriorment, es molgueren i s'emmagatzemaren per la seva anàlisi. L'energia bruta de les mostres dels pinsos i de les excretes foren analitzades mitjançant un calorímetre de bomba adiabàtica IKA C-400 (DIN 51900) per obtenir-ne l'EMA de les dietes.

#### ***7.2.6. Estudis sobre la retenció de minerals***

Tots els animals es varen sacrificar mitjançant injecció intravenosa de pentobarbital sòdic en els dies 22, 23 i 24 de l'assaig experimental. Es recolliren mostres intestinals des del diverticle de Meckel fins a 15 cm abans a la unió ili-cecal, i emmagatzemades en gel, per tal de mesurar la viscositat intestinal de la digesta fresca. Les mostres d'aquests continguts digestius es centrifugaren a 12000 rpm durant 5 min a  $15^{\circ}$  C, i els sobrenadants recollits es guardaren en gel fins que la viscositat fos determinada mitjançant un viscosímetre digital Brookfield, mantingut a  $30^{\circ}$ C i llegit després d'1 min. Abans de l'eutanàsia, es recolliren mostres de sang per punció cardíaca. El plasma se separà per centrifugació de la sang a  $2000 \times g$  durant 10 minuts (Lima i col., 1997), i llavors es determinà la concentració de fòsfor i calci del plasma. Després de l'eutanàsia, es tallaren els dits del mig de dos animals de cada rèplica (entre el segon i el tercer tars), que foren pesats i calcinats per tal d'obtenir els valors de cendres dels dits (Cabahug i col., 1999).

#### ***7.2.7. Cura dels animals***

Totes els procediments emprats han estat aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de l'IRTA

#### ***7.2.8. Càlculs***

Els valors d'EMA de les dietes es calcularen segons la fórmula següent, tenint en compte que es realitzaren les correccions apropiades per diferències en el contingut d'humitat.

$$EMA = EB_{dieta} - ((TiO_{2,dieta} / TiO_{2,excreta}) \times EB_{excreta})$$

on  $EB_{dieta}$  i  $EB_{excreta}$  són l'energia bruta del pinso i de l'excreta, respectivament.

Els valors d'EMA corregida per una retenció de nitrogen zero (EMAn) es calcularen segons la fórmula següent:

$$EMAn_{dieta} = EMA - [ ( GMD \times 0.2 \times 8220 ) / ( CMD \times 6.25 ) ]$$

Els coeficients de digestibilitat dels nutrients es calcularen usant el procediment de marcador per la següent fórmula:

$$Dig X = 1 - ( (TiO_{2,dieta} \times X_{excreta}) / (TiO_{2,excreta} \times X_{dieta}) )$$

on  $X_{dieta}$  i  $X_{excreta}$  són la concentració del nutrient X en la dieta i en l'excreta, respectivament.

### **7.2.9. Anàlisi estadística**

Les dades es varen analitzar com una anàlisi de variança amb disseny de blocs a l'atzar, emprant els procediments General Lineal Models (GLM) del Statistical Analysis System Institute Inc. (1985). La significància estadística s'acceptà quan  $P < 0.05$ . Quan es trobaren que els efectes principals eren significants, les mitjanes individuals foren comparades mitjançant el test de Duncan de rangs múltiples. Els efectes principals de l'addició de fitasa microbiana i del tractament del blat foren analitzats pels següents grups de contrastos:

Addició de fitasa microbiana: T-2 i T-6 enfront de T-3, T-4, T-7 i T-8.

Tractament del blat: T-2, T-3 i T-4 enfront de T-6, T-7 i T-8.

Nivell enzim fitasa microbiana afegit (500 vs 5000 U/kg): T-3 i T-7 enfront de T-4 i T-8.

Nivell de fòsfor no fític (4.5 g/kg vs 2.7 g/kg): T-1 i T-5 enfront de T-2 i T-6.

### **7.3. Resultats**

#### ***7.3.1. Paràmetres productius***

Els estudis previs van demostrar que les condicions emprades en l'autoclaui per inactivar l'enzim fitasa endògena del blat foren efectives. En aquests estudis només es va mirar l'activitat fitàsica, és a dir, la resta de paràmetres que es poden veure afectats pel procés tèrmic de l'autoclaui no es van avaluar. En la Taula 7.3, es poden observar els valors obtinguts de l'activitat fitàsica en les dietes usades en l'assaig experimental. Es pot veure que en les dietes control positiu (4.5 g/kg) i control negatiu (2.7 g/kg i 0 U) amb blat no tractat, presenten valors quasi idèntics, i que la petita diferència es correspon al valor teòric obtingut en la formulació. En utilitzar el blat passat per l'autoclaui, l'activitat fitàsica del control negatiu desapareix, mentre que en el control positiu queda un valor residual (103 U/kg). Els valors de les dietes amb fitasa microbiana exògena, demostren que hi ha un augment gradual tal com es pretenia. Així com que els valors de l'activitat de les dietes amb blat tractat en autoclaui són menors que els de les dietes amb blat no tractat (418 i 4636 enfront de 814 i 4836, respectivament).

Els pollastres que menjaren les dietes control positiu són els que tingueren un pes més elevat, amb un major guany mig diari, respecte als altres animals (Taula 7.4). Tots els animals que van menjar dietes deficientes de fòsfor van tenir un creixement menor que els anteriors, encara que similars entre ells, excepte en el cas dels animals que menjaren dietes control negatiu i sense fitasa, que encara tingueren un pes més baix. Aquests animals (tractament T-6) tingueren un pes final inferior en 120-125 grams, respecte als pollastres del T-5. En els contrastos lineals, es van trobar diferències significatives pel que fa a la presència d'enzim fitasa microbià exogen, amb pesos superiors en presència de l'enzim, així com també se'n trobaren per l'efecte de l'autoclaui, on en general la diferència de pes és d'uns 35 grams. Proporcionalment, es van trobar els mateixos resultats quant al guany mig diari, tenint en compte que aquest valor és el quocient del pes final pels dies de durada de l'assaig. No es trobaren diferències entre el consum mig diari dels tractaments, malgrat que la presència d'enzim sembla que faci augmentar el consum, segons es desprèn de l'estudi del contrast

lineal de les dietes amb presència de fitasa microbiana (T-3, T-4, T-7 i T-8) respecte les que no en tenen (T-2 i T-6) ( $P = 0.05$ ). Amb tots aquests resultats, s'obté els valors de l'índex de transformació. El valor més baix, és a dir, el millor productivament parlant, es correspon a la dieta control positiu amb blat no tractat (1.353 g/g), mentre que els pitjors valors són per les dietes deficient de fòsfor amb el blat passat per l'autoclau, ja sigui amb o sense enzim exogen. Els contrastos ens confirmem aquests resultats, en què, per una banda, l'addició de fitasa microbiana produeix millores significatives en tots els paràmetres ( $P = 0.05$ ), originats amb independència del nivell de fitasa incorporat a la dieta, doncs no s'observen diferències entre la presència de 500 o 5000 U de fitasa per quilo. Per altra banda, els millors resultats s'obtenen amb el blat sense tractar ( $P = 0.001$ ).

No s'obtingueren resultats significatius quant a consum en el control d'aigua i pinso realitzat des del dia 15 fins al 19 de l'experiment, així com en la relació entre aquests dos paràmetre (Taula 7.5). Encara que en el cas del consum d'aigua i de la relació els valors corresponents al T-1 donin més alts (163.8 enfront a 124.8-136.6, i 2.25 enfront a 1.77-1.98, respectivament) degut a la gran variació de les dades obtingudes fan que aquestes no siguin significatives.

No es produïren diferències significatives en els valors de viscositat dels continguts intestinals dels animals, degut a la presència de l'enzim xilanasa en tots els tractaments en la mateixa dosi (40 ppm), amb valors que varien des de 2.60 mPa.s per la dieta deficient de fòsfor i blat autoclavat amb una dosi de 5000 U de fitasa/kg, fins a 3.42 mPa.s per la dieta amb un nivell normal de fòsfor i blat passat per l'autoclau (Taula 7.5). Una mesura relacionada amb la viscositat intestinal és el nombre d'animals que presenten femtes adherides a la cloaca. En aquest assaig no es realitzà aquesta mesura, ja que en el desè dia de la prova els animals mostraren la cloaca neta.. Cal tenir en compte que en tots els pinsos s'incorporà xilanasa per evitar els possibles problemes derivats de la presència de polisacàrids no amilacis. Avaluant l'efecte del procés d'autoclau del blat sobre la viscositat intestinal, es veu que surt significativa ( $P < 0.05$ ), presentant una viscositat més elevada els tractaments amb blat autoclavat.

### **7.3.2. Valors energètics**

En la Taula 7.6 es mostren els valors de l'EMA. Els majors valors són el corresponents a les dietes amb 5000 U de fitasa per quilo de pinso, en ambdós casos, és a dir, amb blat sense tractar i el passat per l'autoclau (3672 i 3664 kcal/kg, respectivament), mentre que els valors més baixos es corresponen a les dietes amb nivell deficient de fòsfor i blat sense tractar, sense i amb 500 U de fitasa per quilo de pinso (3579 i 3571 kcal/kg, respectivament). Una situació similar es troba per la EMAn, coincidint que el valor més alt s'obtenen pels T-4 i T-8 (3484 i 3491 kcal/kg, respectivament) i el més baix pel T-3 (3388 kcal/kg). En l'avaluació dels contrastos, es van obtenir resultats significatius els estudis referents al tractament de blat sobre l'EMAn (amb valors energètics més elevats quan el blat es va passar per l'autoclau) i la inclusió de 500 o 5000 U de fitasa per quilo en ambdós paràmetres (amb valors més elevats amb 5000 U de fitasa per quilo). La dieta amb nivells deficients de fòsfor, amb blat sense tractar i 5000 U de fitasa per quilo de pinso és la que va produir la millor digestibilitat ileal de proteïna (84.6%). No s'obtingueren diferències significatives pel que fa als contrastos en dos dels casos estudiats, és a dir, ni pel tractament del blat ni per l'addició de fitasa microbiana, mentre que la inclusió de 5000 U/kg de fitasa produeix un augment en la digestibilitat ileal de proteïnes respecte a la inclusió de 500 unitats.

### **7.3.3. Efectes sobre la retenció de minerals**

Les dades de la composició mineral del plasma dels animals emprats en l'assaig es troben en la Taula 7.7. En el cas de la mesura de la concentració de fòsfor no fític, s'observa que els animals que menjaren les dietes control negatiu en tenen una menor concentració en sang que els animals que menjaren les dietes control negatiu més 5000 U de fitasa per quilo de pinso (6.6 i 6.4 mg/dl per T-2 i T-5 enfront de 8.2 i 7.9 mg/dl per T-4 i T-8, respectivament). L'addició de fitasa microbiana va incrementar-ne significativament la concentració ( $P < 0.01$ ), mentre que no es va trobar cap efecte en el cas del tractament del blat. La disminució del nivell de fòsfor total de la dieta va produir una disminució de la concentració de calci en el plasma dels animals que menjaren dietes amb blat passat per l'autoclau, efecte que no es va veure contrarestat per l'addició de la fitasa exògena; en

canvi, quan es mira les dades corresponents a les dietes amb blat sense tractar, s'observa que la concentració obtinguda varia molt lleugerament, però només numèricament i no significativa. Referent als contrastos estudiats només es produïren diferències significatives pel FNF degut a la presència d'enzim exogen i al nivell de l'enzim (augmentant-ne la concentració amb l'addició d'enzim) i pel zinc en plasma segons si el nivell d'enzim era 500 o 5000 U/kg de fitasa (168 i 142 ìg/dl, respectivament). Degut a la gran variabilitat de les mesures, no es trobaren diferències estadístiques en les concentracions de ferro i zinc en plasma.

El valor més alt del percentatge de cendres als dits dels pollastres es va obtenir pels animals que menjaren la dieta control positiu amb blat sense tractar (12.7%), mentre que pels que menjaren la dieta control negatiu amb blat passat per l'autoclau el percentatge és el més baix (10.7%). La resta de tractaments donaren valors que no difereixen entre sí. L'efecte tractament del blat no va donar diferències significatives, però sí que se'n van obtenir en avaluar l'addició de fitasa microbiana ( $P < 0.01$ ), on les majors concentracions s'obtenen després d'afegir 5000 U de fitasa per quilo de pinso.

La quantitat de minerals en l'excreta i les retencions aparents de fòsfor total i calci es mostren en la Taula 7.8. El percentatge de fòsfor total en l'excreta mostra clarament un cert paral·lisme amb la reducció de fòsfor total produïda en la formulació dels pinsos. La quantitat és més alta en les dues dietes de control positiu (0.99% per T-1 i 0.95% per T-5), i en la resta de les sis dietes la quantitat es manté entre 0.4 i 0.5%, però ni per l'addició de fitasa microbiana ni pel tractament del blat es trobaren diferències significatives, ja que en el càlcul no és té en compte cap d'aquestes dues dietes. Així doncs, no es trobaren diferències pel que fa a l'excreció de fòsfor. Diferències que sí s'observaren en la retenció aparent de fòsfor total. En les dietes amb blat sense tractar, l'addició de les 5000 U de fitasa microbiana per quilo de pinso, va millorar-ne significativament el resultat tant respecte al control positiu com al control negatiu, no existint diferències entre els resultats depenent de la dosi afegida. Per altra banda, en les dietes amb blat passat per autoclau, la reducció de FNF de la dieta beneficia la retenció del fòsfor total, augmentant-la al voltant del 10%, quantitat que només es millorà numèricament en afegir la fitasa microbiana. Globalment, però, no es produïren millores

estadístiques degut a la presència o no de l'enzim microbià, pel tractament del blat o pels dos nivells més alts d'enzim afegit.

El nivell de calci en l'excreta està relacionat directament amb la quantitat d'inclusió en el pinso, tal com passava en el cas del fòsfor total. Les excretes corresponents als animals que menjaren els controls positiu amb blat sense tractar (2.24% Ca) i amb blat passat per autoclau (2.14% Ca) es va trobar que eren els que tenien més calci, mentre que les excretes corresponents als animals que menjaren les altres dietes es va trobar que presentaven valors més baixos, aproximadament del 50%. En l'estudi dels contrastos, ni l'addició de fitasa microbiana ni el tractament del blat ni el nivell de fitasa van donar resultats estadísticament significatius. Però, pel que fa a la retenció aparent del calci els resultats van ser just al contrari de la concentració del mineral en l'excreta, ja que les retencions de les dietes amb control positiu (32.7% pel T-1 i 41.4% pel T-5) donen valors més baixos que les retencions de les altres dietes, on s'observa que el valor més alt de tots s'obté per la dieta control negatiu i amb blat sense tractar (56.8%). Per tant, i veient aquests resultats, s'ha vist que l'addició de fitasa microbiana exògena produeix resultats significatius, amb una disminució de la retenció, sent el valor més alt quan no hi ha l'enzim endogen; per altra banda, també s'obtingueren resultats estadísticament significatius amb una major retenció quan s'utilitza dietes amb blat sense tractar que no pas quan el blat és passat per l'autoclau (53.6% en presència de fitasa endògena i 50.4% sense fitasa endògena).

En aquest estudi també s'avaluà la concentració de zinc i ferro en l'excreta. Les concentracions d'ambdós minerals en les excretes dels diferents tractaments no registraren diferències, no veient-se efectes ni per afegir la fitasa ni pel tractament del blat, degut a la alta variabilitat de les dades obtingudes. La reducció de la quantitat de FNF de la dieta mostra una certa tendència a disminuir la quantitat de ferro en l'excreta, amb els valors més baixos per les concentracions corresponents a les dietes control negatiu amb fitasa exògena i amb blat sense tractar (648 i 659 ppm per a T-3 i T-4, respectivament). Es pot veure en l'estudi dels contrastos lineals que no s'obtingueren resultats significativament diferents en afegir fitasa microbiana, però sí que s'obtingueren en analitzar el

tractament per temperatura del blat, amb valors més alts pel cas del blat autoclavat (718 ppm) que pel blat sense tractar (668 ppm).

La reducció de la concentració de FNF de la dieta, i també de la concentració de fòsfor total i del consum, es veu reflectida en les dades de ingestió de fòsfor total (Taula 7.9). Els pollastres que van ingerir menys fòsfor fou els que van menjar els pinsos que tenia un nivell de FNF de 2.7 g/kg sense cap enzim afegit, tant pel cas que el blat es passà per l'autoclau com si no es passà, tot i que aquest darrer cas és el que en tingué una menor quantitat. L'addició de l'enzim exogen produí una major ingesta de fòsfor, malgrat que no s'observaren diferències entre els que menjaren 500 o 5000 U/kg de fitasa microbiana. Tanmateix, els animals que menjaren pinso amb blat tractat menjaren més fòsfor total que els altres. Pel que fa a la ingestió de la resta de minerals estudiats, és a dir, calci, zinc i ferro (Taula 7.9) l'addició de fitasa microbiana produí diferències significatives pel calci i pel ferro, amb una reducció de la ingesta de calci en augmentar la quantitat de fitasa afegida i una disminució pel cas del ferro en afegir 500 U/kg, augmentant de nou en augmentar la dosi de fitasa a 5000U/kg. Referent al tractament de blat, es veieren afectades les ingestions de calci i de zinc. En ambdós casos, els animals en menjaren més quan el blat del pinso es passà per l'autoclau.

#### **7.4. Discussió**

Un dels primers objectius del present treball va ser confirmar que les condicions utilitzades per tractar el blat (120°C durant 15 minuts) eren adequades per inactivar l'activitat fitasa endògena present en el cereal. Ja ho vàrem poder comprovar en altres estudis realitzats pel nostre grup amb cereals amb baixa activitat fitàsica, com el moresc, o en subproductes del blat amb una activitat més elevada, com el segó de blat, tal com es troba reflectit en els assaigs 2 i 3 d'aquesta memòria. Feta l'anàlisi corresponent, comprovarem que el blat tractat presenta una activitat fitàsica nul·la (dades no mostrades), i que, per tant, en fabricar el pinso, l'activitat present haurà disminuït. També ens va permetre comprovar que les condicions emprades (més extremes que en els casos anteriors quant a

temperatura) eren correctes i útils per a següents assaigs. Les altes temperatures produeixen una pèrdua de l'estructura de l'enzim, per tant una desnaturalització com a proteïna que és. Aquest canvi de configuració de l'enzim pot veure's amplificat per la humitat en el procés d'escalfament (Ward, 2002). A mida que augmenta la humitat del sistema, la temperatura a la qual l'enzim es desnaturalitza disminueix, i per tant pot ser inactivat amb més facilitat.

L'addició de l'enzim fitasa en les dietes de blat amb baix nivell de fòsfor no fític produí canvis en els paràmetres productius dels pollastres. Malgrat que en cap cas s'assoliren els valors obtinguts en la dieta control positiu, l'addició de fitasa microbiana provocà variacions en els resultats de tal manera que en presència de l'enzim els valors són més elevats que no pas quan no hi és (control negatiu). Amb la incorporació de 5000 U de fitasa per quilo es van obtenir pollastres una mica més grossos, però no diferents dels que menjaren dietes amb 500 U/kg (ús habitual avui en dia en la fabricació de pinso). Els millors valors de l'índex de transformació en les dietes baixes de fòsfor també s'obtingueren en aquelles que s'afegí fitasa. És ben conegut, i està ben documentat en la bibliografia que l'addició de fitasa microbiana en dietes deficientes de fòsfor produeix millores en els paràmetres productius (guany de pes i índex de transformació) ja sigui en dietes de blat o en altres tipus de dietes (Boling i col., 2000; Keshavarz, 2003; Ribeiro i col., 2003).

La viscositat intestinal de les dietes no es veié afectada per l'addició de fitasa microbiana. La baixa influència de la fitasa en la viscositat intestinal ja està especificada en l'assaig 5 descrit en aquesta memòria. La viscositat dona valors baixos ja que totes les dietes inclogueren des de bon començament xilanasa i amb el mateix nivell d'inclusió, realitzant-se d'aquesta manera ja que, en assaigs anteriors, es va observar que la xilanasa reduï a la viscositat millorant els paràmetres productius i que, en general, no es van obtenir interaccions negatives entre xilanasa i fitasa, tal com està descrit en l'assaig 5 d'aquesta memòria. Pel fet de posar en totes les dietes la mateixa concentració de xilanasa (40 ppm) ens vàrem assegurar que les possibles interaccions d'ambdós enzims es trobarien en tots les dietes.

En aquest assaig, la inclusió de la fitasa microbiana exògena als pinsos no produí variacions en els valors energètics de les dietes (Taula 7.6), només observant una diferència significativa en contrastar la dosi de 500 enfront la de 5000 U/kg. Amb la dosi superior de fitasa exògena, s'obtenen els valors més elevats, propiciat per una major contribució proteica, tal com pot concloure d'observar els valors de la digestibilitat ileal de proteïna. Podria dir-se que la fitasa ha fet la seva funció correctament, facilitant que hagi més proteïnes disponibles, i que aquestes siguin més utilitzades. Però, els resultats no concorden massa amb els de creixement, ja que els pollastres van ser igual de grossos menjant les dosis de 500 i 5000 U/kg. Aquesta manca de correlació entre els resultats energètics i els productius també es produeix en la resta de contrastos lineal estudiats, en què ni l'eliminació de la fitasa endògena o la disminució de la concentració de fòsfor no fític produeixen canvis estadístics en l'energia de les dietes, però sí que repercuteixen disminuint el creixement dels animals. En altres assaigs d'aquesta memòria, s'ha descrit que una de les causes de l'augment energètic estaria relacionat amb el contingut de greix de les dietes; en aquest estudi, se subministrà la mateixa quantitat de llard en tots els tractaments i els valors esperats en els pinsos haurien de ser semblants.

La inclusió de fitasa exògena en les dietes no produí una gran variació de la concentració de minerals en sang. L'únic paràmetre modificat fou la concentració de FNF, que assolí els valors més alts en presència de 5000 U/kg de fitasa, essent diferents dels del control negatiu. A més, en avaluar la inclusió de 500 i 5000 U/kg, obtinguérem una concentració major per 5000 U/kg. Aquest increment era d'esperar, per l'acció de la fitasa (Sebastian i col., 1996; Viveros i col., 2002), tal com ja s'havia vist en l'assaig 2. En canvi, la concentració de calci en sang, normalment lligat a la concentració de FNF, no va variar de la mateixa manera. És més, en afegir fitasa, la seva concentració no es veu modificada sent exactament igual sigui quina sigui la quantitat afegida de fitasa. Si, a més, realitzant el càlcul de la relació Ca:FNF plasmàtic es veu que, augmentant la dosi de fitasa, la relació va disminuint, ja que sense enzim era bastant elevada (1.79:1) per assolir el valor més baix amb 5000 U de fitasa per quilo (1.37:1), i que és inferior al valor de la dieta control

positiu (1.46:1). Aquestes dades ens permetria pensar que quan disminuïm la concentració de fòsfor en la dieta es produeix un desequilibri en la relació d'aquests minerals en el plasma, que es compensa parcialment amb les 500 U/kg de fitasa, i totalment en afegir les 5000 U/kg. Shirley i Edwards (2003) van avaluar la relació entre les retencions de calci i fòsfor en dietes de morenc-soja i addició exponencial de fitasa fins a 12000 U/kg. Els valors obtinguts van des de 1.72:1 per la dieta base fins a 1.28:1 per l'addició de la dosi superior de fitasa, valors semblants als nostres. Aquests autors associen els valors del creixement amb les concentracions plasmàtiques dels minerals, i descriuen que les concentracions fisiològiques de Ca dins el pollastre poden ser més fermament regulades que les de P.

Referent als altres dos minerals en sang estudiats, l'addició de l'enzim fitasa, en les condicions emprades en el nostre experiment, no comportaren diferències significatives en les concentracions plasmàtiques, possiblement degut a la gran variació dels resultats obtinguts. Els nivells obtinguts no són diferents dels nivells habituals en pollastres per al ferro (Morris, 1987) i pel zinc (Richards i Augustine, 1988; Mohanna i Nys, 1999) per la qual cosa podem pensar que la fitasa no va tenir influència sobre aquests minerals, ja que amb la quantitat que conté el corrector mineral afegit a la dieta fa que l'animal tingui una concentració en excés d'aquests dos minerals.

En aquest assaig experimental, l'addició de fitasa microbiana no produí millores significatives en la retenció aparent de fòsfor, però sí en la de calci (Taula 7.8) i en el percentatge de cendres del dit (Taula 7.7). Tal com és observat sovint en la bibliografia (Ravindran i col, 2000; Wu i col, 2003) la disminució la concentració de fòsfor en la dieta implica un augment en la retenció aparent de fòsfor total. En el nostre estudi, sembla no existir una relació directa entre l'augment de la retenció de fòsfor i la inclusió de fitasa microbiana; aparentment, té més pes la disminució del fòsfor de la dieta. Per altra banda, en aquest treball, en presència de fitasa hi ha una disminució en la retenció de calci; així les retencions per les dietes control negatiu són més elevades. Aquestes dades estan en desacord en allò trobat fins al moment, ja sigui en altres treballs del nostre grup (assaigs 1 i 5), com en altres estudis que es poden trobar en la bibliografia, tant en dietes de blat o de morenc (Sebastian

i col., 1996; Ahmad i col., 2000). Una causa que pot justificar aquesta diversitat de resultat comparat amb assaigs anteriors podria ser la menor relació Ca:FNF d'aquest assaig. En aquest assaig es va establir una relació 2:1, a partir d'estudis realitzats per altres investigadors (Dieckmann i col., 2002), els quals diuen que els millors resultats tant en paràmetres productius com en retenció s'obtenen en quan la relació es troba entre 1:1 i 2:1, produint-se grans variacions negatives en augmentar-la. En la resta d'assaigs es va treballar en relacions de 3:1, que era un valor més proper a la relació més habitual en estudis realitzats fins el moment (Cabahug i col., 1999; Ravindran i col., 2000). Malgrat això, amb els valors experimentals obtinguts no serà fàcil discernir quina quantitat de fòsfor no fític s'allibera per la fitasa microbiana, i com afectarà numèricament en la relació entre els dos minerals. Pot trobar-se una valoració quantitativa del fòsfor no fític lliure després de l'efecte de la fitasa en l'apartat d'aquesta memòria referent a la determinació per RMN.

L'augment del percentatge de cendres en dits amb la inclusió de fitasa ve donat per una millor mineralització, i conseqüentment, unes millores significatives de la disponibilitat de minerals per l'animal i íntimament relacionat al guany del pes dels animals (Ahmad i col, 2000). Aquests autors observaren que el pes final i el percentatge de cendres en els dits els pollastres que menjaren dietes amb nivells recomanats de fòsfor va ser comparable al dels pollastres que menjaren dietes que contenien un 20% menys de FNF però amb fitasa afegida, i, per tant, que la inclusió de fitasa incrementa la utilització de FNF en dietes baixes de fòsfor.

L'addició de fitasa microbiana produí variacions en la ingestió dels minerals en funció de la quantitat afegida (Taula 7.9). Així en presència de fitasa el consum de fòsfor total és un 10% més elevat, segurament degut a l'activitat que està realitzant l'enzim del pinso, abans d'arribar a l'intestí de l'animal. Per la resta de minerals no se segueix un patró similar, havent-hi una disminució de calci com major sigui la dosi de l'enzim (arribant a ser d'un 12%), un manteniment de la concentració del zinc, i pel ferro primer una disminució en afegir 500 U de fitasa per quilo per després tornar a augmentar amb les 5000 U/kg de fitasa a nivells comparables al control negatiu. La disminució trobada degut a la dosi baixa de fitasa fou del 15%.

El tractament de calor realitzat en el blat afectà el pes final de l'animal i l'índex de transformació (Taula 7.4). En ambdós casos la variació fou d'aproximadament del 5%, disminuint el pes final i augmentant-ne l'índex. El procés d'autoclau dut a terme influeix sobre la fitasa endògena, tal com s'ha descrit anteriorment, però, segurament, que també deu influenciar sobre altres propietats del blat, com les concentracions de metalls, relacionada també, en part, per la disminució de la quantitat de fitasa. Aquestes altres propietats que poden veure's modificades podrien ser la fracció soluble dels pentosans o els xilans del blat, que podria comprovar-se si existissin diferències en la viscositat intestinal. Observant els valors de la viscositat intestinal que es presenten en la Taula 7.5, es pot veure com el tractament del blat influeix negativament, augmentant-la un 13%, cosa que ja s'havia vist anteriorment en la bibliografia (Stewart i col., 1998; Juanpere i col., 2004)

La concentració de minerals en sang i les cendres dels dits no es veieren modificades pel tractament de temperatura donat al blat. Aquesta manca de canvis en les cendres dels dits ens podria fer pensar que existeix una no modificació de les retencions aparents dels dos minerals estudiats; però no és així, observant-se canvis en les retencions de calci degut al procés tèrmic. La retenció de calci disminuï amb el tractament del blat en valors corresponents en mitjana del 6%. Jongbloed i Kemme (1990) ja observaren, en un treball amb porcs, una disminució de la digestibilitat de Ca, tot i que també n'observaren pel P, amb pinsos granulats a 80°C. Aquests autors postulen que la disminució en la retenció de Ca tindrà repercussions en l'aportació de Ca a l'animal. Es coneix que l'àcid fític té una gran afinitat pels cations bi- i trivalents. Com que la fitasa es destrueix amb l'autoclau, l'àcid fític serà menys hidrolitzat, per la qual cosa el Ca té més possibilitats d'unir-se a l'àcid fític.

Relacionat amb la retenció, hi ha la ingesta dels diferents minerals. El tractament del blat no produeix uns efectes iguals pels minerals estudiats. Els animals que menjaren les dietes amb blat autoclavat consumiren més fòsfor total i zinc que els que menjaren dietes amb blat sense tractar, però també consumiren menys calci, mentre que tots consumiren nivells similars de ferro. La ingesta de minerals està directament lligat amb el consum del pinso. Segons les dades presentades en la Taula 7.4, totes els animals van menjar la quantitat diària de pinso igual, per tant, seria

d'esperar que tots ells mengessin la mateixa quantitat de minerals, ja que les dietes deficientes de fòsfor tenen la mateixa concentració de minerals. Si els resultats de la ingesta mineral van donar diferents pot ser degut, amb molta probabilitat, a la precisió de les anàlisis realitzades, i, consegüentment, aquestes dades estiguin sotmeses a l'error metodològic.

Segons les dades obtingudes en aquest assaig experimental es pot concloure que l'addició de fitasa exògena en dietes deficitàries en fòsfor i amb una elevada activitat fitàsica endògena produeix unes millores en el creixement dels animals sense tenir una incidència sobre la retenció de minerals. Per altra banda, la eliminació de fitasa endògena produeix unes lleugeres reduccions en el creixement sense influir en la retenció de minerals.

La presència de la fitasa endògena del blat va produir un creixement major dels pollastres i un major consum de pinso i minerals, sense repercutir en l'EMA de la dieta ni en la retenció aparent de fòsfor. L'addició d'una dosi superior a la d'ús habitual de fitasa no va influenciar el creixement dels pollastres. En canvi, sí que va tenir efectes en l'energia de les dietes i en una major concentració en plasma de fòsfor no fític. Amb les dades que s'extreuen de l'estudi es pot concloure, que la dosi de fitasa exògena emprada habitualment en pinsos de broilers podria ser augmentada sense provocar perjudicis a l'animal, malgrat que calen més estudis per confirmar aquestes dades.

Taula 7.1. Tractaments experimental emprats.

Tractaments	Blat	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa <sup>1</sup> (FTU/kg)
T-1	No tractat	4.5	-
T-2	No tractat	2.7	-
T-3	No tractat	2.7	500
T-4	No tractat	2.7	5000
T-5	Autoclavat	4.5	-
T-6	Autoclavat	2.7	-
T-7	Autoclavat	2.7	500
T-8	Autoclavat	2.7	5000

<sup>1</sup> Enzim usat: Phytase SP 1002 CT batch PPQ 6883 en forma de pols (Activitat fitàsica: 3295 U/g) (subministrat per Roche Vitamins Ltd, Basilea)

Taula 7.2. Composició de les dietes experimentals.

<b>INGREDIENT (g/kg)</b>	<b>P Normal</b>	<b>P Baix</b>
Blat	606.1	636.1
Farina de soja 48%	273.3	297.2
Soja Full fat	41.4	0.9
Llard	40.0	40.0
DL-metionina	2.4	2.4
L-lisina HCl	1.3	1.4
Carbonat càlcic	10.2	7.1
Fosfat bicàlcic	17.0	6.5
Sal	4.3	4.4
Minerals i vitamines <sup>1</sup>	4.0	4.0
Composició estimada de nutrients (g/kg)		
Energia metabolizable (MJ/kg)	12.48	12.48
Protèina bruta	215.0	215.0
Fibra bruta	28.0	28.1
Extracte eteri	64.2	57.7
Cendres	57.9	44.2
Lisina	12.0	12.0
Met + Cys	9.2	9.2
Calci	9.0	5.4
Fòsfor total	6.8	5.0
Fòsfor no fític	4.5	2.7
Fòsfor fitat	2.2	2.3
Fitasa endògena (U/kg)	353	371

<sup>1</sup> Un kg de pinso conté: Vitamina A, 12000 IU; Vitamina D<sub>3</sub>, 2400 IU; Vitamina E, 30 mg; Vitamina K<sub>3</sub>, 3 mg; Vitamina B<sub>1</sub>, 2.2 mg; Vitamina B<sub>2</sub>, 8.0 mg; Vitamina B<sub>6</sub>, 5.0 mg; Vitamina B<sub>12</sub>, 11.0 g; Àcid fòlic, 1.5 mg; Biotina, 150 g; Pantotenat càlcic, 25 mg; Àcid Nicotínic, 65 mg; Etoxiquina, 150 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; Zn, 40 mg, Mn, 60 mg, Se, 0.15 mg, I, 0.33 mg.

Taula 7.3. Activitat fitàsica trobada en les dietes experimentals.

Tractaments	Blat	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (U/g)	Enzim fitasa analitzat (U/g)
T-1	No tractat	4.5	-	345
T-2	No tractat	2.7	-	357
T-3	No tractat	2.7	500	814
T-4	No tractat	2.7	5000	4836
T-5	Autoclavat	4.5	-	103
T-6	Autoclavat	2.7	-	-
T-7	Autoclavat	2.7	500	418
T-8	Autoclavat	2.7	5000	4636

Taula 7.4. Paràmetres productius al final de la prova.

Blat	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (U/g)	Pes final (g)	GMD (g/d)	CMD (g/d)	IT (g/g)
No tractat	4.5	-	791 <sup>a</sup>	36 <sup>a</sup>	49	1.35 <sup>e</sup>
No tractat	2.7	-	717 <sup>b</sup>	32 <sup>b</sup>	47	1.46 <sup>c</sup>
No tractat	2.7	500	743 <sup>b</sup>	33 <sup>b</sup>	48	1.43 <sup>c</sup>
No tractat	2.7	5000	750 <sup>b</sup>	34 <sup>b</sup>	48	1.44 <sup>c</sup>
Autoclavat	4.5	-	794 <sup>a</sup>	36 <sup>a</sup>	50	1.39 <sup>d</sup>
Autoclavat	2.7	-	668 <sup>c</sup>	30 <sup>c</sup>	46	1.54 <sup>a</sup>
Autoclavat	2.7	500	709 <sup>b</sup>	32 <sup>b</sup>	49	1.53 <sup>ab</sup>
Autoclavat	2.7	5000	729 <sup>b</sup>	33 <sup>b</sup>	49	1.50 <sup>b</sup>
<i>Error estàndard</i>			17.0	0.7	1.0	0.012
<i>Pr &gt; F</i>			***	***	NS	***
<b>Contrasts (Pr&gt;T)</b>						
No enzim / Enzim			**	**	*	*
No tractat / Autoclavat			*	**	NS	***
500 U/kg / 5000 U/kg			NS	NS	NS	NS
4.5 g FNF/kg / 2.7 g FNF/kg			***	***	*	***

NS: no significatiu, \* P 0.05, \*\* P 0.01, \*\*\* P 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 7.5. Consum d'aigua i pinso entre els dies 15 i 19, i viscositat intestinal al final de la prova.

Blat	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	Consum aigua (g)	Consum pinso (g)	Relació aigua/ pinso (g/g)	Viscositat Intestinal (mPa.s)
No tractat	4.5	-	164	73	2.3	3.4
No tractat	2.7	-	130	70	1.9	2.6
No tractat	2.7	500	126	69	1.8	2.7
No tractat	2.7	5000	134	71	1.9	2.7
Autoclavat	4.5	-	137	72	1.9	3.4
Autoclavat	2.7	-	127	66	2.0	3.3
Autoclavat	2.7	500	126	71	1.8	3.2
Autoclavat	2.7	5000	125	70	1.8	2.6
<i>Error estàndard.</i>			9.7	2.3	0.14	0.28
<i>Pr &gt; F</i>			NS	NS	NS	NS
Contrasts (Pr>T)						
Fitasa microbiana / Sense fitasa microbiana			NS	NS	NS	NS
No tractat / Autoclavat			NS	NS	NS	*
500 U/kg / 5000 U/kg			NS	NS	NS	NS
4.5 g FNF/kg / 2.7 g FNF/kg			*	*	NS	NS

NS: no significatiu, \* P 0.05.

Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 7.6. Valors energètics de les dietes experimentals, i digestibilitat ileal de protè nes.

Blat	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	EMA (kcal/kg)	EMAn (kcal/kg)	Digestibilitat ileal de Protè na (%)
No tractat	4.5	-	15.1 <sup>ab</sup>	14.3 <sup>abc</sup>	82.5 <sup>b</sup>
No tractat	2.7	-	14.9 <sup>b</sup>	14.2 <sup>bc</sup>	82.0 <sup>b</sup>
No tractat	2.7	500	14.9 <sup>b</sup>	14.1 <sup>c</sup>	82.0 <sup>b</sup>
No tractat	2.7	5000	15.3 <sup>a</sup>	14.5 <sup>a</sup>	84.6 <sup>a</sup>
Autoclavat	4.5	-	15.1 <sup>ab</sup>	14.3 <sup>abc</sup>	83.0 <sup>ab</sup>
Autoclavat	2.7	-	15.1 <sup>ab</sup>	14.4 <sup>abc</sup>	82.7 <sup>b</sup>
Autoclavat	2.7	500	15.1 <sup>ab</sup>	14.4 <sup>ab</sup>	82.6 <sup>b</sup>
Autoclavat	2.7	5000	15.3 <sup>a</sup>	14.5 <sup>a</sup>	83.7 <sup>ab</sup>
<i>Error estàndard</i>			0.10	0.10	0.61
<i>Pr &gt; F</i>			*	*	*
Contrasts (Pr>T)					
Fitasa microbiana / Sense fitasa microbiana			NS	NS	NS
No tractat / Autoclavat			NS	*	NS
500 U/kg / 5000 U/kg			**	*	**
4.5 g FNF/kg / 2.7 g FNF/kg			NS	NS	NS

NS: no significatiu, \* P 0.05, \*\* P 0.01.

Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 7.7. Composició mineral del plasma i composició dels dits dels animals.

Blat	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (U/kg)	Calci en plasma (mg/dl)	Fòsfor no fític en plasma (mg/dl)	Relació Ca:FNF	Ferro en plasma (µg/dl)	Zinc en plasma (µg/dl)	Matèria seca dits (%)	Cendres dits (%)
No tractat	4.5	-	11.3 <sup>ab</sup>	7.8 <sup>ab</sup>	1.46 <sup>bc</sup>	116	162	33.8	12.7 <sup>a</sup>
No tractat	2.7	-	11.3 <sup>ab</sup>	6.6 <sup>c</sup>	1.75 <sup>a</sup>	118	159	33.0	11.3 <sup>bc</sup>
No tractat	2.7	500	10.9 <sup>b</sup>	7.4 <sup>abc</sup>	1.49 <sup>bc</sup>	104	166	33.7	11.9 <sup>ab</sup>
No tractat	2.7	5000	11.0 <sup>b</sup>	8.2 <sup>a</sup>	1.35 <sup>c</sup>	128	144	34.4	11.9 <sup>ab</sup>
Autoclavat	4.5	-	11.7 <sup>a</sup>	7.3 <sup>abc</sup>	1.62 <sup>ab</sup>	116	163	34.3	12.1 <sup>ab</sup>
Autoclavat	2.7	-	10.9 <sup>b</sup>	6.4 <sup>c</sup>	1.83 <sup>a</sup>	114	156	33.3	10.7 <sup>c</sup>
Autoclavat	2.7	500	11.1 <sup>b</sup>	6.9 <sup>bc</sup>	1.62 <sup>ab</sup>	110	169	33.8	11.4 <sup>bc</sup>
Autoclavat	2.7	5000	11.0 <sup>b</sup>	7.9 <sup>ab</sup>	1.40 <sup>bc</sup>	113	13	33.3	11.7 <sup>b</sup>
<i>Error estàndard</i>									
<i>Pr &gt; F</i>									
<b>Contrasts (Pr &gt; T)</b>									
Fitasa microbiana / Sense fitasa microbiana			NS	**	***	NS	NS	NS	**
No tractat / Autoclavat			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
500 U/kg / 5000 U/kg			NS	***	*	NS	*	NS	NS
4.5 g FNF/kg / 2.7 g FNF/kg			*	**	**	NS	NS	*	***

NS: no significatiu, \* P 0.05, \*\* P 0.01, \*\*\*P 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 7.8. Excreció mineral i retenció aparent de fòsfor total i calci de les dietes experimentals.

Blat	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (U/kg)	Fòsfor total en excreta (%/MS)	Retenció aparent fòsfor total (%)	Calci en excreta (%/MS)	Retenció calci (%)	Zinc en excreta (ppm)	Ferro en excreta (ppm)
No tractat	4.5	-	0.99 <sup>a</sup>	55.2 <sup>c</sup>	2.24 <sup>a</sup>	32.7 <sup>d</sup>	245	748 <sup>a</sup>
No tractat	2.7	-	0.48 <sup>b</sup>	66.2 <sup>b</sup>	1.02 <sup>c</sup>	56.8 <sup>a</sup>	218	697 <sup>abc</sup>
No tractat	2.7	500	0.46 <sup>b</sup>	71.0 <sup>ab</sup>	1.02 <sup>c</sup>	51.6 <sup>b</sup>	227	648 <sup>c</sup>
No tractat	2.7	5000	0.41 <sup>b</sup>	75.5 <sup>a</sup>	1.01 <sup>c</sup>	52.5 <sup>ab</sup>	232	659 <sup>c</sup>
Autoclavat	4.5	-	0.95 <sup>a</sup>	60.1 <sup>c</sup>	2.14 <sup>b</sup>	41.4 <sup>c</sup>	219	739 <sup>ab</sup>
Autoclavat	2.7	-	0.49 <sup>b</sup>	70.2 <sup>ab</sup>	1.05 <sup>c</sup>	52.8 <sup>ab</sup>	234	677 <sup>bc</sup>
Autoclavat	2.7	500	0.49 <sup>b</sup>	70.6 <sup>ab</sup>	1.03 <sup>c</sup>	49.1 <sup>b</sup>	223	740 <sup>ab</sup>
Autoclavat	2.7	5000	0.48 <sup>b</sup>	71.3 <sup>ab</sup>	0.97 <sup>c</sup>	49.2 <sup>b</sup>	233	731 <sup>ab</sup>
<i>Error estàndard</i>								
			0.03	1.84	0.04	1.76	7.6	24.8
			***	***	***	***	NS	**
<b>Contrasts (Pr &gt; T)</b>								
Fitasa microbiana / Sense fitasa microbiana			NS	NS	NS	**	NS	NS
No tractat / Autoclavat			NS	NS	NS	**	NS	*
500 U/kg / 5000 U/kg			NS	NS	NS	NS	NS	NS
4.5 g FNF/kg / 2.7 g FNF/kg			***	***	***	***	NS	NS

NS: no significatiu, \* P 0.05, \*\* P 0.01, \*\*\*P 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 7.9. Ingesta mineral diària.

Blat	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	Fòsfor Total (mg/anim/d)	Calci (mg/anim/d)	Zinc (mg/anim/d)	Ferro (mg/anim/d)
No tractat	4.5	-	300 <sup>b</sup>	441 <sup>b</sup>	3.01 <sup>b</sup>	8.48 <sup>bc</sup>
No tractat	2.7	-	183 <sup>f</sup>	305 <sup>c</sup>	2.77 <sup>c</sup>	9.15 <sup>a</sup>
No tractat	2.7	500	210 <sup>cde</sup>	276 <sup>d</sup>	2.82 <sup>c</sup>	7.36 <sup>d</sup>
No tractat	2.7	5000	205 <sup>de</sup>	259 <sup>de</sup>	2.59 <sup>d</sup>	8.82 <sup>ab</sup>
Autoclavat	4.5	-	320 <sup>a</sup>	485 <sup>a</sup>	3.66 <sup>a</sup>	8.38 <sup>bc</sup>
Autoclavat	2.7	-	202 <sup>e</sup>	269 <sup>d</sup>	2.95 <sup>bc</sup>	8.64 <sup>b</sup>
Autoclavat	2.7	500	220 <sup>c</sup>	267 <sup>d</sup>	2.79 <sup>c</sup>	8.07 <sup>c</sup>
Autoclavat	2.7	5000	218 <sup>cd</sup>	249 <sup>e</sup>	3.04 <sup>b</sup>	8.55 <sup>bc</sup>
<i>Error estàndard</i>			4.8	6.1	0.06	0.18
<i>Pr &gt; F</i>			***	***	***	***
Contrasts (Pr>T)						
Fitasa microbiana / Sense fitasa microbiana			***	***	NS	**
No tractat / Autoclavat			**	**	**	NS
500 U/kg / 5000 U/kg			NS	*	NS	***
4.5 g FNF/kg / 2.7 g FNF/kg			***	***	**	**

NS: no significatiu, \* P 0.05, \*\* P 0.01, \*\*\* P 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament (P 0.05).

## 7.5. Referències bibliogràfiques

Ahmad, T., S. Rasool, M. Sarwar, A. Haq i Z. Hasan. 2000. Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chickens. Anim. Feed Sci. Tech. 83, 103-114.

Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official methods of analysis. 15th ed., Assoc. Anal. Chem., Washington D. C.

Baidoo, K. K., Q. M. Yang i R. D. Walker. 2003. Effects of phytase on apparent digestibility of organic phosphorus and nutrient in maize-soya bean meal based diets for sows. Anim. Feed Sci. Tech. 104, 133-141.

- Barrier-Guillot, B., P. Casado, P. Maupetit, C. Jondreville, F. Gatel i M. Larbier.** 1996. Wheat phosphorus availability: 2-in vivo study in broilers and pigs; relationship with endogenous phytase activity and phytic phosphorus content in wheat. *J. Sci. Food Agric.* 70, 69-74.
- Boling, S. D., M. W. Douglas, R. B. Shirley, C. M. Parsons i K. W. Koelkebeck.** 2000. The effects of various dietary levels of phytase and available phosphorus on performance of laying hens. *Poult. Sci.* 79, 535-538.
- Cabahug, S., V. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 1999. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus contents. I. Effects on bird performance and toe ash. *Brit. Poultry Sci.* 40, 660-666.
- Carlson, C. W. i H. D. Poulsen.** 2003. Phytate degradation in soaked and fermented liquid feed-effect of diet, time of soaking, heat treatment, phytase activity, pH and temperature. *Anim. Feed Sci. Tech.* 103, 141-154.
- Dieckmann, A., R. Timmler i M. Rodehutsord.** 2002. Investigation on the optimal Ca:P ration in studies on P availability in broiler chicken. 11th European Poultry Conference. 1-4.
- DIN 51900.** 1977. Determination of the gross calorific value by the bomb calorimeter and calculation of the net calorific value. Deutsches Institut für Normung e. V., Berlin, Germany.
- Edwards Jr, H. M., A. B. Carlos, A. B. Kasim i R. T. Toledo.** 1999. Effects of steam pelleting and extrusion of feed on phytate phosphorus utilization in broiler chickens. *Poult. Sci.* 78, 96-101.
- Engelen, A. J., F. C. van der Heeft, P. H. G. Randsdorp i E. L. C. Smit.** 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.* 77(3), 760-764.
- Jongbloed, A. W. i P. A. Kemme.** 1990. Effect of pelleting mixed feeds on phytase activity and the apparent absorbability of phosphorus and calcium in pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 28, 233-242.
- Juanpere, J., A. M. Pérez-Vendrell i J. Brufau.** 2002. Effect of microbial phytase on mineral bioavailability of broilers fed nsp-rich diets (barley) in the presence or not of endogenous phytase. En: 11th European Poultry Conference, Bremen, Alemanya (Pòster).

- Juanpere, J., A. M. Pérez-Vendrell i J. Brufau.** 2004. Effect of microbial phytase on broilers fed barley based diets in the presence or not of endogenous phytase. *Anim. Feed Sci. Tech.* 115 (3-4), 265-279.
- Keshavarz, K.** 2003. The effect of different levels of non phytate phosphorus with and without phytase on the performance of four strains of laying hens. *Poult. Sci.* 82, 71-91.
- Kornegay, E. T.** 1999. A review of phosphorus digestion and excretion as influenced by microbial phytase in poultry. En: BASF Technical Symposium. Use of Natuphos phytase in broiler nutrition and waste management, 69-81.
- Lima, F. R., C. X. Mendonça Jr, J. C. Alvarez, J. M. F. Garzillo, E. Ghion i P. M. Leal.** 1997. Biological evaluations of commercial dicalcium phosphates as sources of available phosphorus for broiler chicks. *Poult. Sci.* 76, 1707-1713.
- Mohanna, C. i Y. Nys.** 1999. Changes in zinc and manganese availability in broiler chicks induced by vegetal and microbial phytases. *Anim. Feed Sci. Tech.* 77, 241-253.
- Morris, E. R.** 1987. Iron. En: Trace elements in human and animal nutrition. Ed: W. Mertz Vol I, pp 79-142. Academic Press INC, San Diego, USA.
- Ravindran, V., W. L. Bryden i E. T. Kornegay.** 1995. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Biol. Rev.* 6 (2), 125-143.
- Ravindran, V., S. Cabahug, G. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 2000. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus levels. II. Effects on apparent metabolisable energy, nutrient digestibility and nutrient retention. *Brit. Poultry Sci.* 41, 193-200.
- Ravindran, V., P. H. Selle, G. Ravindran, P. C. H. Morel, A. K. Kies i W. L. Bryden.** 2001. Microbial phytase improves performance, apparent metabolizable energy, and ileal amino acid digestibility of broilers fed a lysine-deficient diet. *Poult. Sci.* 80, 338-344.
- Reddy, N.K., M. D. Pierson, S. K. Sathe i D.K. Salunkhe.** 1989. Phytates in cereals and legumes. CRC Press, Boca Raton, USA.

- Ribeiro, A. M. L., A. J. Mireles i K. C. Klasing.** 2003. Interactions between dietary phosphorus level, phytase supplementation and pelleting on performance and bone parameters of broilers fed high levels of rice bran. *Anim. Feed Sci. Tech.* 103, 155-161.
- Richards, M. P. i P. C. Augustine.** 1988. Serum and liver zinc, copper, and iron in chicks infected with *Eimeria acervulina* or *Eimeria tenella*. *Biol Trace Elem Res.* 17, 207 - 219.
- Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague.** 1996. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and utilization of dietary calcium, phosphorus, copper, and zinc in broiler chickens fed corn-soybean diets. *Poult. Sci.* 75, 729-736.
- Shirley, R. B. i H. M. Edwards Jr.** 2003. Graded levels of phytase past industry standards improves broiler performance. *Poult. Sci.* 82, 671-680.
- Short, F. J., P. Gorton, J. Wiseman i K. N. Boorman.** 1996. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Anim. Feed Sci. Tech.* 59, 215-221.
- Statistical Analysis System Institute Inc.** 1985. *SAS User's Guide: Statistics, Ver. 5.* SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Stewart, R. A., A. McAllister i K. J. McCracken.** 1998. Effects of wheat source, heat treatment and enzyme inclusion on diet metabolisability and broiler performance. *Br Poult Sci.* 39 (Suppl), S42-3.
- Viveros, A., A. Brenes, I. Arija i C. Centeno.** 2002. Effects of microbial phytase supplementation on mineral utilization and serum enzyme activities in broilers chicks fed different levels of phosphorus. *Poult. Sci.* 81, 1172-1183.
- Ward, N. E.** 2002. Phytase stability may be improved by new technology. *Feedstuffs.* March, 4, 11-12.
- Wodzinsky, R. J. i A. H. J. Ullah.** 1996. Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 263-302.
- Wu, Y. B., V. Ravindran i W. H. Hendriks.** 2003. Effects of microbial phytase, produced by solid-state fermentation, on the performance and nutrient utilisation of broilers fed maize- and wheat-based diets. *Brit. Poultry Sci.* 44 (5), 710-718.

**AVALUACIÓ DE LES POSSIBLES INTERACCIONS ENTRE L'ADDICIÓ  
DE FITASA MICROBIANA I D'ENZIMS CARBOHIDRASA SOBRE LA  
DIGESTIBILITAT DE NUTRIENTS EN BROILERS**

J. JUANPERE<sup>1</sup>, A. M. PÉREZ-VENDRELL<sup>1</sup>, E. ANGULO<sup>2</sup> i J. BRUFAU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament de Nutrició Animal, IRTA, Centre Mas Bové, Apartat 415, 43280 Reus, Espanya.

<sup>2</sup>Departament de Producció Animal, UDL, Alcalde Rovira Roure, 177, 25198, Lleida, Espanya.

**Poultry Science (enviat)**



## **8.1. Introducció**

Degut a la baixa disponibilitat del fòsfor en els ingredients vegetals dels pinsos, s'afegeix fòsfor no fític a les dietes, normalment en excés, per tal de satisfer els requeriments dels animals. Aquest excés s'excreta parcialment a l'ambient, així com encareix els pinsos. Alguns estudis descriuen l'addició de fitasa (3-fitasa, EC 3.1.3.8) a dietes de monogàstrics per tal de contrarestar la presència d'àcid fític i augmentar la biodisponibilitat de fòsfor (Hatten i col., 2001). Les millores en la disponibilitat de fòsfor per la 3-fitasa van ser inicialment descrites per Simons i col. (1990), mentre que varis autors descrigueren millores en la disponibilitat d'altres minerals com calci, zinc, coure i ferro (Schöner i col., 1991; Broz i col., 1994; Roberson i Edwards, 1994; Yi i col., 1996; Sebastian i col., 1996a, b). Tanmateix, s'han descrit algunes interaccions relacionades amb la concentració de calci i de la vitamina D3 i amb la font de fibra per Edwards (1993), Lei i col. (1994), Ravindran i col. (1995) i Qian i col. (1996, 1997). La majoria d'aquests estudis es van dur a terme en dietes de morenc-soja (Yi i col., 1996). Per tant, no es coneix molt dels efectes de la 3-fitasa en disponibilitat mineral, energia i digestibilitat de nutrients quan s'usen dietes amb altres cereals, com el blat i l'ordi. Aquestes dietes estan caracteritzades pel seu important contingut en PNA i una elevada fitasa endògena (Eeckhout i De Paepe, 1994). Avui en dia són molt emprats en dietes d'animals monogàstrics els enzims carbohidrasa específics per a dietes amb una elevada concentració de PNA. Els enzims carbohidrasa ajuden al trencament de les parets cel·lulars dels grans del cereal en l'intestí, per després alliberar tant els carbohidrats de la paret cel·lular com els nutrients que estan atrapats dins les cèl·lules per tal de facilitar la digestió pels enzims endògens de l'animal. Es necessita un trencament total, no només pels enzims capaços d'atacar els components insolubles de les parets cel·lulars, però també per a un segon grup de carbohidrases capaces de reduir els oligosacàrids solubles en aigua a components monomèrics (Chesson, 1993; Sørensen i Nielsen, 1998). Llavors els enzims carbohidrasa milloren el creixement i disminueixen la viscositat intestinal (Brufau i col., 1991; Almirall i Esteve-García, 1995; Steinfeldt i col., 1998b; Zanella i col., 1999; Dänicke i col.,

2000), així com millorar el valor energètic de les dietes i la biodisponibilitat de nutrients (Salobir, 1998; Steinfeldt i col., 1998a; Choct i col., 1999).

L'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar els efectes de suplementar 3-fitasa i enzims carbohidrasa específics en la dieta i les interaccions entre aquests enzims en els valors energètics i la digestibilitat de nutrients en dietes riques en PNA.

## **8.2. Materials i mètodes**

### ***8.2.1. Maneig dels animals***

Es van utilitzar cent noranta-dos pollastres broilers d'un dia d'edat de la raça Ross 308. Els pollastres van créixer durant els deu primers dies (període pre-experimental) en gàbies al terra i menjaren una dieta de morenc i soja amb 4.5 g de fòsfor no fític (FNF) per quilo de pinso. En el desè dia, els pollastres es van traslladar a una sala de bateries equipada amb 96 gàbies de metall amb un menjador, un abeurador i una safata de plàstic per a la recollida d'excretes. Les gàbies estaven situades en una sala sense finestres amb calefacció elèctrica i ventilació forçada. Els pollastres es pesaren individualment i es distribuïren en vuit blocs homogenis pel pes viu. Es distribuïren els dotze tractaments de la dieta a l'atzar (vuit rèpliques de dos pollastres per tractament). Durant tot l'experiment l'aigua i el pinso en forma de farina se subministraren *ad libitum*.

### ***8.2.2. Tractaments i disseny experimental***

L'estudi es va concebre en un arranjament factorial de tractaments 2x2 per avaluar els efectes de dues concentracions de fitasa i dues dels enzims carbohidrasa quan s'incloueren en tres dietes diferents, de morenc, blat o ordi, respectivament (Taula 8.1). Es va utilitzar una única dosi de cada enzim depenent de l'activitat prèviament analitzada en els productes i les recomanacions dels fabricants.

### ***8.2.3. Fabricació del pinso i composició nutritiva de les dietes***

es va oferir una única dieta durant tot l'experiment. Les dietes base estaven formulades per tal de ser isonutritives, cada una contenint 2.7 g de FNF/kg a la mateixa concentració de proteïna i energia (Taula 8.2). El blat i l'ordi eren de les varietats Cartaya i Baraka, respectivament, de la collita de 1999. Els enzims en pols van ser mesclats amb una petita quantitat del cereal i afegits a la resta de la dieta durant la mescla final, estant descrits en la Taula 8.1.

#### **8.2.4. Anàlisis químiques**

Abans de les anàlisis, totes les mostres de matèries primeres i de les dietes experimentals es van moldre amb un sedàs de 0.5 mm. Les mostres es van analitzar, seguint mètodes estàndards (AOAC, 1990), per matèria seca (codi 934.01), proteïna bruta (976.05), extracte eteri (920.39), cendres (942.05) i fibra bruta (978.10). La concentració de fòsfor total es va analitzar colorimètricament pel mètode del molibdo-vanadat (965.17). La concentració de calci s'analitzà per espectrofotometria d'absorció atòmica de flama. L'activitat fitàsica present en les matèries primeres i en els pinsos finals s'analitzà segons Engelen i col. (1994). L'activitat xilanàsica en les dietes de blat i l'activitat  $\beta$ -glucanàsica en les dietes d'ordi es van avaluar amb un mètode colorimètric, emprant Azo-xilà o Azo-glucà com a substrats, respectivament (Cosson i col., 1999). Les corbes estàndard es construïren incloent l'enzim a diferents concentracions en pinsos control (sense enzim afegit); el contingut de  $\beta$ -glucans s'analitzà segons McCleary i Glennie-Holmes (1985). El fòsfor fític de les matèries primeres es determinà segons el mètode descrit per Haug i Lantzsch (1983).

#### **8.2.5. Assaig de balanç**

El balanç es va dur a terme pel procediment de recollida total i d'alimentació *ad libitum* (mètode de referència europeu amb alguna modificació, Bourdillon i col., 1990) per tal de determinar l'energia metabolitzable aparent (EMA) de les dietes. L'assaig de balanç començà el setzè dia després d'un període d'adaptació de 6 dies (10-16d). En el vint-i-unè dia, després de divuit hores de dejú, els pollastres menjaren les dietes experimentals durant quatre dies, i seguidament divuit hores més de dejú. Les excretes es recolliren diàriament una vegada, emmagatzemades a  $-20^{\circ}\text{C}$  i finalment liofilitzades. Més tard, les mostres de l'excreta es molgueren i guardades per a l'anàlisi. S'analitzà

l'energia bruta de les mostres de pinsos i excretes amb una bomba adiabàtica IKA, C-4000 (DIN 51900, 1977), proteïna (976.05; AOAC, 1990), lípids (extracció amb èter de petroli després d'un tractament amb HCl) i midó (McCleary i col., 1997). També s'analitzà el contingut de  $\beta$ -glucans en les excretes dels animals que consumiren dietes d'ordi. Els valors de l'EMA de la dieta es calcularen per diferència entre l'energia ingerida i l'excretada. Els pollastres es pesaren al començament i al final del període de balanç, i l'EMAn es va avaluar assumint que el pes està compost de 200 g de proteïna per quilo guanyat, que la proteïna és igual a 6.25 vegades el nitrogen Kjeldahl i que l'energia és equivalent a 8.22 kcal/kg de nitrogen retingut (Blum i col., 1977).

La mortalitat es va registrar diàriament, incloent la causa probable de la mort. Al final del període, se sacrificaren tots els pollastres per injecció intravenosa de pentobarbital sòdic, segons el procediment N° 689 aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de l'IRTA. Es prengueren mostres del tub digestiu des del diverticle de Meckel fins a 15 cm abans de la unió ili-cecal i es guardaren en gel per mesurar la viscositat de la digesta fresca. Les mostres se centrifugaren a 12000 rpm durant 5 minuts a 15°C; s'agafà el sobrenadant i es guardà en gel. La viscositat va ser determinada en un viscosímetre digital Brookfield mantingut a 30°C i llegit després d'un minut.

### 8.2.6. Càlculs

Els valors d'EMA de les dietes es calcularen mitjançant la fórmula següent. Es feren les correccions adequades per les diferències en el contingut d'humitat.

$$EMA_{dieta} = [(Pinso\ consumit \times EB_{dieta}) - (Quantitat\ excreta \times EB_{exc})] / Pinso\ consumit$$

On  $EB_{dieta}$  és l'energia bruta de l'aliment i  $EB_{exc}$  l'energia bruta de l'excreta.

Els valors de l'energia metabolitzable aparent corregida a valor zero de nitrogen (EMAn) de les dietes es van calcular segons la següent fórmula:

$$EMAn_{dieta} = EMA - [ (Guany\ de\ pes \times 200 \times 8.22) / (Pinso\ consumit \times 6.25) ]$$

Els coeficients de digestibilitat aparent fecal de nutrients es van calcular usant el mètode de recollida total i amb la fórmula següent:

$$dig\ X = [ (Pinso\ consumit \times X_{dieta}) - (Quantitat\ excreta \times X_{exc}) ] / (Pinso\ consumit \times X_{dieta})$$

on  $X_{\text{dieta}}$  és el percentatge del nutrient en la dieta i  $X_{\text{exc}}$  és el percentatge del nutrient en l'excreta.

### 8.2.7. Anàlisi estadística

Les dades s'analitzaren amb una anàlisi de varianza ANOVA com dissenys de bloc a l'atzar, emprant els procediments del General Linear Models (GLM) del SAS (1985). L'anàlisi ANOVA es va fer seguint el model:  $X_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ij}$  on  $\mu$  = mitjana total,  $\alpha_i$  = efecte del primer factor,  $\beta_j$  = efecte del segon factor,  $(\alpha\beta)_{ij}$  = interacció entre factors,  $e_{ij}$  = contribució de l'error amb mitjana 0 i varianza  $\sigma^2$ ,  $i=1\dots a$ ,  $j=1\dots b$ . Les mitjanes dels tractaments es van comparar pel test Duncan de rangs múltiples. La significància estadística es va considerar a  $P < 0.05$ .

Quan es van trobar interaccions entre enzims, es va calcular la importància biològica dels coeficients, segons Little (1981), i expressat com el percentatge de la suma de quadrats del factor interacció respecte la suma total de quadrats de l'error del model.

## 8.3. Resultats

### 8.3.1. Paràmetres productius

Els paràmetres productius dels broilers (guany de pes corporal, consum de pinso i índex de transformació) va ser mesurat entre el 16è i el 21è dia de vida de l'animal. Les dades d'aquests paràmetres es presenten en les Taules 3, 4 i 5 per les dietes de morenc, blat i ordi, respectivament. En tots els casos, no s'observaren diferències significativament estadístiques degut a l'addició enzimàtica en qualsevol dels paràmetres, encara que la majoria d'ells es veieren millorats lleugerament per la presència d'enzims. No s'esperaven diferències significants entre tractaments degut al curt període de temps utilitzat. Només es va observar una interacció significativa ( $P < 0.01$ ) en els pollastres que menjaren dietes de morenc. Els que menjaren fitasa i  $\alpha$ -galactosidasa tingueren un menor índex de transformació que els que menjaren dieta amb fitasa sola. Els millors índexs de transformació s'obtingueren amb la inclusió de fitasa en dietes de morenc i blat, i amb la inclusió de  $\beta$ -glucanasa en dietes d'ordi. Els valors de la relació pinso consumit/excreta

augmentaren significativament per l'addició de xilanasa i  $\beta$ -glucanasa en dietes de blat i ordi, respectivament; igualment, suplementar les dietes de moresc amb fitasa va augmentar també aquest paràmetre encara que no significativament. No es van trobar diferències significatives entre tractaments en la concentració de matèria seca de l'excreta, excepte quan s'afegí fitasa a dietes de blat ( $P < 0.05$ ).

### **8.3.2. Viscositat intestinal**

Tal com era d'esperar, la viscositat intestinal va disminuir significativament per l'addició de tots els enzims carbohidrasa provats ( $P < 0.05$ , Taules 3, 4 i 5). La reducció va ser del 17% en dietes de moresc ( $P < 0.05$ ), 56% en dietes de blat ( $P < 0.001$ ) i 69% per les dietes d'ordi ( $P < 0.001$ ). S'observà un augment en la viscositat intestinal en afegir fitasa a les dietes de moresc ( $P < 0.01$ ). No es detectaren efectes similars en els altres dos tipus de dietes. No s'obtingueren interaccions significatives entre els enzims.

### **8.3.3. Valors energètics**

Els valors energètics obtinguts per a les dietes de moresc, blat i ordi es presenten en les Taules 6, 7 i 8, respectivament. L'addició de fitasa millorà significativament l'EMA de les dietes de moresc en un 2% aproximadament ( $P < 0.05$ ) però no es trobaren efectes en les dietes de blat i ordi.

Tots els enzims carbohidrasa usats van incrementar l'energia metabolitzable de les dietes experimentals, però només es trobaren increments estadísticament significatius quan la  $\beta$ -glucanasa va ser inclosa en dietes d'ordi, augmentant els valors d'EMA i EMAn en 70 i 57 kcal/kg, respectivament. No s'obtingueren interaccions significatives entre la fitasa i els enzims carbohidrasa en cap de les dietes.

### **8.3.4. Digestibilitat de nutrients**

Els valors de les digestibilitats de matèria seca, lípids i midó de les dietes experimentals estan ressenyats en les Taules 6, 7 i 8. Els efectes de la fitasa van ser només significatius en el cas de la digestibilitat de matèria seca de dietes de moresc ( $P < 0.05$ ) i digestibilitat de midó de dietes d'ordi ( $P < 0.05$ ). Els enzims carbohidrasa provats sempre van millorar les digestibilitats de nutrients,

encara que en diferents maneres. Malgrat que les millores en les digestibilitats de nutrients degudes a l'addició de  $\alpha$ -galactosidasa en les dietes de moresc no van ser estadísticament significatives, l'addició de xilanasa a dietes de blat millorà la digestibilitat de matèria seca ( $P < 0.05$ ) i midó ( $P < 0.001$ ). En el cas de les dietes d'ordi, la inclusió de  $\beta$ -glucanasa millorà significativament ( $P < 0.05$ ) tots els coeficients de digestibilitats estudiats: matèria seca (de 0.65 a 0.67), lípid (de 0.76 a 0.81), midó (0.97 a 0.98) i també els  $\beta$ -glucans totals (de 0.45 a 0.57).

### **8.3.5. Retenció de minerals**

Els resultats de les retencions aparents de fòsfor total i de calci es presenten en la Taula 8.9 (dietes de moresc), Taula 8.10 (dietes de blat) i Taula 8.11 (dietes d'ordi). L'addició de fitasa incrementà significativament la retenció aparent de fòsfor total en totes les dietes, i els enzims carbohidrasa no afectaren aquest paràmetre. L'addició de fitasa va produir increments en els coeficients de retenció de fòsfor del 26% en les dietes de moresc, 6% en les dietes de blat i 10% en les dietes d'ordi, reflectit en una reducció de l'excreció de P total en 40 mg/d per animal en dietes de moresc, 19 mg/d per animal en dietes d'ordi ( $P < 0.01$ ) i 11 mg/d per animal en dietes de blat ( $P < 0.05$ ). Es va observar una interacció significativa entre la fitasa i els enzims carbohidrasa en la retenció de P total de dietes de blat i ordi. Els enzims carbohidrasa no afectaren significativament la retenció aparent i l'excreció de fòsfor, excepte en el cas de les dietes de moresc, on l'excreció de P va augmentar amb la inclusió de  $\beta$ -glucanasa (14 mg P/d per animal).

En el present estudi, l'addició de fitasa millorà la retenció de calci en totes les dietes, encara que aquest efecte només va ser significatiu en les dietes de moresc ( $P < 0.01$ ). L'addició de carbohidrases a les dietes presentà efectes diferents: l'addició de  $\alpha$ -galactosidasa no afectà la retenció de calci en les dietes de moresc, i en dietes de blat, la inclusió de xilanasa disminuï la retenció en un 8%, mentre que suplementar  $\beta$ -glucanasa a dietes d'ordi millorà la retenció de calci en un 17%; a més, es va observar una interacció positiva entre la fitasa i la  $\beta$ -glucanasa ( $P < 0.01$ ). No va haver diferències estadísticament significatives en l'excreció de calci quan la fitasa va ser afegida a dietes de blat i ordi, però en dietes de moresc l'excreció de Ca disminuï significativament

( $p < 0.01$ ) en un 24% aproximadament, equivalent a 80 mg/d per animal. L'addició de  $\beta$ -glucanasa a dietes d'ordi disminuï significativament l'excreció de calci en 21mg/d per animal. La xilanasa i l' $\alpha$ -galactosidasa afegides a dietes de blat i moresc, respectivament, no afectaren significativament la concentració de calci excretat.

### **8.3.6. Avaluació de les interaccions entre enzims**

Es van detectar poques interaccions entre els enzims provats. En el cas de les dietes de moresc hi va haver una interacció significativa negativa entre la fitasa i l' $\alpha$ -galactosidasa ( $P < 0.01$ ) en l'índex de transformació, però en el cas del coeficient de digestibilitat de lípids hi va haver una interacció positiva entre aquests enzims ( $P < 0.05$ ). La importància biològica d'aquestes interaccions va ser avaluada segons Little (1981). Les interaccions en l'índex de transformació i la digestibilitat de lípids varen ser importants, ja que la suma de quadrats de les interaccions representaren el 67 i el 43% del model total, respectivament.

En el cas de les dietes de blat, s'observà una interacció positiva entre la fitasa i la xilanasa en la retenció aparent de P total amb una relació de importància biològica (Little, 1981) del 68%. Finalment, en les dietes d'ordi, es trobaren interaccions significatives entre la fitasa i la  $\beta$ -glucanasa en les retencions aparents de fòsfor total i calci i en l'excreció de calci, essent els seus valors de importància biològica iguals a 39, 54 i 60%, respectivament.

## **8.4. Discussió**

En aquest experiment, la inclusió de fitasa microbiana a dietes riques en PNA millorà el creixement lleugerament però no significativament. Això era esperat, donar el curt període temps avaluat i perquè aquesta prova no va ser dissenyada per a aquest propòsit. Tanmateix, es van observar algunes tendències cap a la millora del creixement en els tres tipus de dietes emprades, amb les millores més grans en creixement i índex de transformació observat per als pollastres que menjaren les dietes d'ordi.

En la literatura s'han descrit millores significatives en els paràmetres productius degut a l'addició de fitasa a dietes de moresc, blat o ordi, això si en proves de 21 o més dies de duració. Broz i col. (1994) estudiaren l'addició de fitasa en dietes deficientes de P de moresc i descriueren increments significatius en el creixement de l'animal i el consum de pinso, encara que les millores en l'índex de transformació no foren significatives. Huyghebaert (1996), estudiant l'eficàcia de la fitasa microbiana en el creixement i mineralització d'ossos de broilers que consumiren dietes amb concentracions variables de Ca i P, trobà millores en el creixement animal, consum de pinso i índex de transformació quan la fitasa era inclosa en la dieta, però que els resultats eren dependents de la relació Ca:P. Cabahug i col. (1999), emprant dietes amb fitasa i xilanasa, mantingueren que el factor principal que influeix el creixement animal és la concentració de FNF, que és més important que altres factors, com la viscositat intestinal.

La viscositat intestinal podria ser útil per a la predicció de la digestibilitat de nutrients, a partir que la viscositat modula la velocitat de trànsit de la digesta pel intestí, la secreció de enzims digestius endògens i la microflora bacteriana, ja sigui de manera quantitativa o qualitativa. Està ben documentat que viscositats intestinals baixes produeixen un millor accés als nutrients de l'aliment tant pels enzims endògens com per la microflora intestinal, facilitant la digestió de nutrients (Almirall i col., 1995). L'addició de fitasa en el nostre estudi no millorà la viscositat intestinal en cap de les dietes provades, i s'arribà a registrar una pujada significativa en les dietes de moresc. Tampoc no es trobaren millores en els coeficients de digestibilitat de matèria seca, lípids i midó degut a la fitasa (Taules 8.6, 8.7 i 8.8).

La inclusió de fitasa produí algunes millores en l'energia de dietes baixes en FNF. El mecanisme pel qual la fitasa millora la utilització de l'energia no està massa clar. Pot estar relacionat amb una millor utilització de la proteïna i aminoàcids, però podria ser degut a l'eliminació dels efectes adversos en la digestió del midó (Ravindran, 1999). La fitasa exògena produí un important increment en el valor energètic només en la dieta de moresc, on l'activitat fitàsica endògena és molt baixa (Taula 8.2). Els valors d'energia més alts es trobaren en les dietes d'ordi, resultats que són

coherents amb els paràmetres productius observats, i estan possiblement relacionats amb una major concentració de greix afegit en la dieta per tal de mantenir els pinsos isoenergètics. És possible que la contribució proteica a l'energia sigui millorada per la fitasa, ja que l'enzim pot alliberar proteïnes que estan fortament unides al fitat. Alguns autors han descrit millores degut a l'addició de fitasa en valors d'energia encara que no significatius en dietes de blat (Ravindran i col., 1999). Aquests autors, utilitzant concentracions de fòsfor no fític recomanades pel NRC (1994), obtingueren millores en l'energia properes al 5% en dietes amb blat normal o amb una EMA baixa. Malgrat això, els mateixos autors (Ravindran i col., 2000), utilitzant dietes de blat amb nivells adequats o baixos de P no fític (2.3 g/kg) i diferents concentracions d'àcid fític, van trobar que, en el cas de l'EMA, les millores degudes a la fitasa afegida van ser més grans en dietes amb FNF adequat que en les dietes deficientes de P, però en ambdós casos les diferències van ser significatives.

Suplementar les dietes experimentals amb fitasa va permetre millorar la retenció aparent de fòsfor total, així com reduir l'excreció de fòsfor total, encara que en el cas dels broilers que menjaren dietes de blat, la reducció de l'excreció de fòsfor total no va ser estadísticament significativa. Les millores en la retenció de fòsfor per l'addició de fitasa eren d'esperar, i estan descrites en la literatura (Broz i col., 1994; Sebastian i col., 1996 a, b; Ibrahim i col., 1999; Ravindran i col., 2000). Les dietes experimentals deficientes de P presentaven un alt coeficient de retenció, i amb l'addició de la fitasa, s'enregistraren encara més pujades en aquest paràmetre (0.68-0.70), també per a les dietes de blat que ja presenten un coeficient molt gran en dietes sense suplementar (0.66). Com que millorà la retenció de fòsfor total, també es produí una reducció en la seva excreció. Encara que tots aquests resultats estan relacionats amb el fòsfor total, poden ser atribuïts al fòsfor fític, ja que el FNF produït per l'acció de la fitasa pot ser destinat a diverses rutes metabòliques de l'animal. Tots aquests resultats indiquen que la fitasa actua específicament en el trencament de les unions fòsfor-fitat, produint grups  $\text{PO}_4^{3-}$ , que són molt disponibles per l'animal, i finalment mio-inositol quan s'han trencat tots els sis enllaços. Les dietes de morenc tenen una activitat fitàsica endògena molt més baixa en comparació amb les de blat i ordi, i per això s'enregistren unes diferències tan grans

entre les dietes amb i sense fitasa exògena tant en la retenció aparent i l'excreció de fòsfor total. El petit increment en el coeficient de retenció aparent de fòsfor total pels animals que menjaren dietes de blat podria ser atribuït a l'elevada activitat endògena avaluada (459 U/kg, Taula 8.2). La magnitud de la resposta a la fitasa de la retenció aparent de fòsfor total en les dietes d'ordi va ser intermedi entre els trobats per les dietes de morenc i blat, de manera similar al seu nivell de fitasa endògena (275 U/kg).

Era d'esperar unes millores en la retenció aparent i l'excreció de calci en les dietes experimentals per l'addició de fitasa (Huyghebaert, 1996; Zanini i Sazzad, 1999; Ahmad i col., 2000). En les dietes de blat i ordi (amb una considerable activitat fitàsica endògena) les millores observades en la retenció de calci degudes a la fitasa exògena foren menors que les trobades en les dietes de morenc. Les millores són produïdes perquè, al pH en què la fitasa trenca la molècula de fitat a P i mio-inositol, el calci que es troba quelat i unit al fitat és alliberat en forma iònica, la qual pot ser millor assimilada per l'animal. És per això que la fitasa pot millorar la retenció de fòsfor i calci. Les concentracions de P i Ca en les dietes experimentals usades estaven per sota dels requeriments de l'animal, llavors s'estimula la retenció de Ca i P fins a uns nivells superiors per l'acció de la fitasa. En aquesta situació, els animals poden retenir i usar major proporció de la concentració dels minerals provenint de la dieta, reduint la seva excreció al medi ambient (Zanini i Sazzad, 1999; Ahmad i col., 2000).

En el present experiment, l'addició d'enzims carbohidrasa a les dietes experimentals produí algunes millores significants en els paràmetres productius. Les millores en el creixement de broilers degudes a enzims  $\beta$ -glucanasa en dietes d'ordi està ben documentat (Viveros i col., 1994; Azain i col., 2002). Viveros i col. (1994) van descriure que la  $\beta$ -glucanasa en pinsos millorava el creixement d'animals de 28 dies de vida. El creixement, el consum de pinso i l'índex de transformació milloraven en 27%, 3.7% i 18%, respectivament.

Tot i el curt període experimental descrit en aquest treball, les reduccions més grans en viscositat intestinal s'obtingueren amb els enzims carbohidrasa provats. El valor de viscositat intestinal més

gran el trobem en els animals que menjaren dietes d'ordi sense enzims (14.5 mPa.s), mentre que amb la inclusió de  $\beta$ -glucanasa, amb el trencament dels  $\beta$ -glucans, el valor va disminuir fins a 4.5 mPa.s, una reducció propera al 70%, que malgrat tot no és tan baixa com la viscositat obtinguda en les dietes de morenc o blat, amb  $\alpha$ -galactosidasa o xilanasa afegida, respectivament. Salobir (1998) i Steinfeldt (1998b) van trobar reduccions estadísticament significatives en viscositat ileal degut a la xilanasa en broilers que menjaren dietes de blat amb la concentració recomanada de P. Zyla i col. (1999) avaluaren els efectes de l'aplicació simultània de fitasa i xilanasa a dietes de blat, i trobaren que la viscositat intestinal era aproximadament un 40% menor quan s'inclou a la xilanasa. En dietes amb només fitasa afegida però a una concentració elevada (1000 U/kg) van obtenir un marcat increment en la viscositat intestinal, que estan en concordància amb els trobats en aquest experiment.

La inclusió de l' $\alpha$ -galactosidasa i la xilanasa en dietes de morenc i blat, respectivament, produï petites però no estadísticament significatives millores en l'EMA i l'EMAn, mentre que l'addició de  $\beta$ -glucanasa en dietes d'ordi produï ren millores significatives en l'EMA i l'EMAn. L'addició dels enzims carbohidrasa a les dietes riques en PNA van produir increments en la digestibilitat de nutrients de manera conseqüent, de tal manera que cada enzim actuà sobre un PNA específic i característic per a cada dieta ( $\alpha$ -galactosidasa/ $\alpha$ -galactòsids, xilanasa/xilans i  $\beta$ -glucanasa/ $\beta$ -glucans). Aquests resultats estan ben descrits pels diferents autors en relació a les dietes de blat o ordi (Viveros i col., 1994; Almirall i col., 1995; Steinfeldt i col., 1998a; Francesch i col., 1999). En aquest experiment, les millores en les dietes de morenc degut a la inclusió d' $\alpha$ -galactosidasa no van ser significants, l'addició de xilanasa a dietes de blat produï ren millores no significants en el coeficient de digestibilitat de lípids però la inclusió de  $\beta$ -glucanasa en dietes d'ordi augmentà els coeficients de digestibilitat de matèria seca, lípids, midó i  $\beta$ -glucans ( $P < 0.05$ ).

L'avaluació de les interaccions observades entre la fitasa i els enzims carbohidrasa mostraren uns efectes positius en la disponibilitat mineral, en la digestió i en la retenció. Es van observar interaccions positives en la retenció aparent de fòsfor total en els pollastres que menjaren dietes de

blat i ordi i en la retenció i excreció de calci en pollastres que menjaren dietes d'ordi. Sembla que la inclusió d'ambdós enzims simultàniament millora la resposta, donant millors resultats que els obtinguts quan els enzims estan afegits sols (Taules 10 i 11). Aquests resultats foren confirmats amb el càlcul de la importància biològica de la interacció. En el cas del coeficient de digestibilitat de lípids en pollastres que menjaren dietes de moresc, la significància de la interacció no és clara. Encara que la interacció estadística fos significativa, els coeficients obtinguts quan els enzims eren provats individualment van ser millors que la dieta control sense enzims, però van ser molt similars quan s'afegiren els dos enzims alhora (Taula 8.6). La interacció entre la fitasa i l' $\alpha$ -galactosidasa va ser negativa per l'estudi de l'índex de transformació. En aquest cas, la inclusió dels dos enzims conjuntament produïren pitjors resultats que la inclusió de cada enzim per separat, resultant en un índex de transformació similar al de la dieta sense enzims (Taula 8.3). Aquesta interacció negativa, amb un coeficient de importància biològica del 67%, podria estar relacionada amb el fet que l'índex de transformació és la relació entre altres dos paràmetres (guany de pes i consum de pinso). Aquests dos paràmetres mostraren resultats numèricament millors però en proporció diferents quan els enzims van ser usats en combinació que no pas quan es van usar per separat. Els pollastres que menjaren dietes de moresc amb els dos enzims afegits menjaren i cresqueren més que els que menjaren els pinsos amb un sol enzim afegit, però la resposta en consum i creixement va ser d'una magnitud diferent, i això va fer que l'índex de transformació fos desigual. Els efectes per l'ús d'una fitasa i un enzim carbohidrasa en combinació podrien descriure's com que un enzim permet augmentar l'activitat de l'altra. Així hi ha una reducció en les propietats antinutritives del fitat i dels polisacàrids no amilacis (Ravindran i col., 1999).

Els presents resultats confirmen que la fitasa i els enzims carbohidrasa actuen independentment i que poden ser combinats en dietes riques en PNA sense interaccions negatives remarcables. L'addició de fitasa millorà la retenció de fòsfor i calci sense afectar el creixement en el curt període de temps avaluat, mentre que els enzims glucosidasa reduïren la viscositat intestinal i milloraren les digestibilitats de nutrients.

Taula 8.1. Tractaments experimentals.

Tractament	Dieta	Enzim fitasa afegida <sup>1</sup> (U/kg)	Activitat total fitasa analitzada <sup>2</sup>	Enzims glicosidasa <sup>3</sup>
T-1	Moresc	-	31	-
T-2	Moresc	500	571	-
T-3	Moresc	-	25	á-Galactosidasa <sup>4</sup> : 18
T-4	Moresc	500	689	á-Galactosidasa: 18
T-5	Blat	-	281	-
T-6	Blat	500	1089	-
T-7	Blat	-	416	Xilanasa <sup>5</sup> : 3540 (3600)
T-8	blat	500	1113	Xilanasa: 3540 (4250)
T-9	Ordi	-	235	-
T-10	Ordi	500	863	-
T-11	Ordi	-	205	â-Glucanasa <sup>6</sup> : 3150 (3210)
T-12	Ordi	500	700	â-Glucanasa: 3150 (3230)

<sup>1</sup> Fitasa microbiana (E.C. 3.1.3.8) (Natuphos®, BASF Española, 6,900 U phytase/g). Una unitat de fitasa es defineix com la quantitat d'enzim que allibera 1 ìmol de fòsfor no fític/min provenint de fitat sòdic 5 mM a pH 5.5 i 37°C.

<sup>2</sup> L'activitat fitàsica total analitzada és la suma de la fitasa endògena i de l'afegida.

<sup>3</sup> Valors de l'activitat: Estimats (Analitzats).

<sup>4</sup> á-Galactosidasa (EC 3.2.1.22) (á-Galactosidase I, Industrial Técnica Pecuaria, S.A., 35 unitats á-galactosidase/g). Una unitat á-galactosidasa es defineix com la quantitat d'enzim que hidrolitza 1 ìmol de p-nitrofenil-á-galactòsid a p-nitrofenil i D-galactosa a pH 6.5 i 25°C.

<sup>5</sup> Xilanasa (EC 3.2.1.8) (Safizym XP-20®, Lesaffre Developpement, 59,000 U xylanase/g). Una unitat de xilanasa es defineix com la quantitat d'enzim que allibera 1 ìmol de sucre reductor provenint de xilà de civada en 1 min a pH 4.5 i 30°C.

<sup>6</sup> â-Glucanasa (EC 3.2.1.6) (Roxazyme® G2, Hoffman La Roche, 21,000 U â-glucanase /g). Una unitat â-glucanasa es defineix com la quantitat d'enzim que allibera 1 ìmol de sucres reductors expressat en forma de glucosa provenint del â-glucà de l'ordi en 1 min a pH 4.5 i 30°C.

Taula 8.2. Composició de les dietes base.

Ingredient (g/kg)	Dieta Pre-experimental	Dieta moresc-soja	Dieta blat-soja	Dieta ordi-soja
	P-Normal		P-deficient	
Moresc	573.3	634.9	-	-
Blat	-	-	695.4	
ordi	-	-	-	644.7
Farina de soja 48%	342.1	295.4	213.3	228.5
Llard	39.0	4.1	24.0	60.0
Farina de peix LT999	-	37.0	37.0	37.7
DL-metionina	2.8	2.2	2.2	2.8
L-lisina HCl	0.9	-	1.9	1.4
L-treonina	-	-	0.2	0.3
Carbonat càlcic	15.6	14.2	13.2	15.2
Fosfat bicàlcic	17.4	4.1	5.6	1.8
Sal	4.7	4.1	3.3	4.4
Clorur de colina 50%	0.2	0.1	-	-
Minerals i vitamines <sup>1</sup>	4.0	4.0	4.0	4.0
Contingut estimat de nutrients (g/kg)				
Energia metabolitzable (MJ/kg)	12.9	12.5	12.5	12.5
Protèina bruta	210.0	216.1	220.0	223.5
Lisina	12.0	12.0	12.0	12.0
Met + Cys	9.2	9.2	9.2	9.2
Ca	11.0	8.1	8.1	8.1
Fòsfor total	6.4	4.4	5.0	4.4
Fòsfor No fític	4.5	2.7	2.7	2.7
Fòsfor fític	2.8	1.7	2.3	1.7
Fitasa endògena (U/kg)	6	6	459	276

<sup>1</sup> Aportació per quilo de pinso: Vitamina A, 12,000 IU; Vitamina D<sub>3</sub>, 2,400 IU; Vitamina E, 30 mg; Vitamina K<sub>3</sub>, 3 mg; Vitamina B<sub>1</sub>, 2.2 mg, Vitamina B<sub>2</sub>, 8.0 mg; Vitamina B<sub>6</sub>, 5.0 mg; Vitamina B<sub>12</sub>, 11.0 ìg; Àcid fòlic, 1.5 mg; Biotina, 150 ìg; Pantotenat càlcic, 25 mg; Àcid Nicotínic, 65 mg; Etoxiquina, 150 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; Zn, 40 mg; Mn, 60 mg; Se, 0.15 mg; I, 0.33 mg.

Taula 8.3. Paràmetres productius dels broilers que menjaren dietes de moresc.

Fòsfor no fític	Enzim fitasa afegit (U/kg)	$\alpha$ -Galactosidasa (mg/kg)	Guany de pes (g)	Consum de pinso (g)	Índex de transformació (g/g)	Relació pinso excreta consumit: excreta (g/g)	Matèria seca excreta (g/kg)	Viscositat intestinal (mPa.s)
0.27%	-	-	306	539	1.77	3.19	266	1.9
0.27%	500	-	324	537	1.66	3.44	282	2.6
0.27%	-	500	314	561	1.73	3.44	261	1.8
0.27%	500	500	324	568	1.76	3.37	276	1.9
Fitasa (U/kg)								
		0	310	550	1.75	3.31	263	1.8 <sup>b</sup>
		500	324	555	1.72	3.41	279	2.3 <sup>a</sup>
		<i>Error estàndard</i>	7.8	12.9	0.015	0.058	8.6	0.10
		<i>Pr &gt; F</i>	NS	NS	NS	NS	NS	**
$\alpha$ -Galactosidasa (mg/kg)								
		0	314	538	1.72	3.31	274	2.2 <sup>a</sup>
		500	319	565	1.74	3.40	269	1.9 <sup>b</sup>
		<i>Error estàndard</i>	7.8	12.9	0.015	0.058	8.6	0.10
		<i>Pr &gt; F</i>	NS	NS	NS	NS	NS	*
Interacció fitasa * $\alpha$ -Galactosidasa								
			NS	NS	**	NS	NS	NS

NS: no significatiu, \* P 0.05, \*\* P 0.01.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 8.4. Paràmetres productius dels broilers que menjaren dietes de blat.

Fòsfor no fític	Enzim fitasa afegit (U/kg)	Xilanasa (mg/kg)	Guany de pes (g)	Consum de pinso (g)	Índex de transformació (g/g)	Relació pinso excreta (g/g)	Matèria seca excreta (g/kg)	Viscositat intestinal (mPa.s)
0.27%	-	-	306	579	1.78	3.47	274	5.1
0.27%	500	-	344	594	1.69	3.42	245	4.6
0.27%	-	60	326	573	1.76	3.68	287	1.9
0.27%	500	60	345	586	1.71	3.71	265	2.4
Fitasa (U/kg)		0	316	576	1.77	3.57	281 <sup>a</sup>	3.5
		500	344	590	1.70	3.56	255 <sup>b</sup>	3.5
		<i>Error estàndard</i>	11.0	8.9	0.030	0.079	7.45	0.48
		<i>Pr &gt; F</i>	NS	NS	NS	NS	*	NS
Xilanasa (mg/kg)		0	325	587	1.74	3.45 <sup>b</sup>	259	4.9 <sup>a</sup>
		60	335	579	1.74	3.69 <sup>a</sup>	276	2.1 <sup>b</sup>
		<i>Error estàndard</i>	11.0	8.9	0.030	0.079	7.45	0.48
		<i>Pr &gt; F</i>	NS	NS	NS	*	NS	***
Interacció fitasa * Xilanasa			NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS: no significatiu, \* P 0.05, \*\*\* P 0.001.  
 Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 8.5. Paràmetres productius dels broilers que menjaren dietes d'ordi.

Fòsfor no fític	Enzim fitasa afegit (U/kg)	$\beta$ -Glucanasa (mg/kg)	Guany de pes (g)	Consum de pinso (g)	Índex de transformació (g/g)	Relació pinso excreta (g/g)	Màteria seca excreta (g/kg)	Viscositat intestinal (mPa.s)
0.27%	-	-	327	588	1.71	2.97	306	13.7
0.27%	500	-	350	607	1.65	2.82	291	15.2
0.27%	-	150	345	583	1.67	3.10	307	4.1
0.27%	500	150	362	622	1.68	3.11	302	4.8
Fitasa (U/kg)								
		0	3336	585	1.69	3.04	306	8.9
		500	356	615	1.67	2.96	296	10.0
		<i>Error estàndard</i>	8.6	15.1	0.021	0.061	7.05	1.63
		<i>Pr &gt; F</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS
$\beta$ -Glucanasa (mg/kg)								
		0	338	597	1.67	2.90 <sup>b</sup>	299	14.5 <sup>a</sup>
		150	353	601	1.68	3.11 <sup>a</sup>	305	4.5 <sup>b</sup>
		<i>Error estàndard</i>	8.6	8.9	0.021	0.061	7.05	1.63
		<i>Pr &gt; F</i>	NS	NS	NS	*	NS	***
Interacció fitasa * $\beta$ -glucanasa								
			NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS: no significatiu, \* P 0.05, \*\*\* P 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 8.6. EMA, EMAn, coeficients de digestibilitat de matèria seca, lípids i midó en broilers que menjaren dietes de morenc.

Fòsfor no fític	Enzim fitasa afegit (U/kg)	$\alpha$ -Galactosidasa (mg/kg)	EMA (MJ/kg)	EMAn (MJ/kg)	Digestibilitat matèria seca	Digestibilitat lípid	Digestibilitat midó
0.27%	-	-	12.4	11.7	0.68	0.67	0.95
0.27%	500	-	12.7	11.9	0.69	0.72	0.97
0.27%	-	500	12.5	12.1	0.69	0.72	0.96
0.27%	500	500	12.7	12.0	0.70	0.71	0.97
Fitasa (U/kg)		0	12.4 <sup>b</sup>	11.8	0.68 <sup>b</sup>	0.70	0.96
		500	12.7 <sup>a</sup>	12.0	0.70 <sup>a</sup>	0.72	0.97
		<i>Error estàndard</i>	0.07	0.08	0.004	0.001	0.004
$\alpha$ -Galactosidasa (mg/kg)		0	12.5	11.8	0.68	0.70	0.96
		500	12.6	12.0	0.70	0.72	0.97
		<i>Error estàndard</i>	0.07	0.08	0.004	0.001	0.004
Interacció fitasa * $\alpha$ -Galactosidasa		<i>Pr &gt; F</i>	NS	NS	NS	NS	NS
			NS	NS	NS	*	NS

NS: no significatiu, \* P 0.05.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 8.7. EMA, EMAn, coeficients de digestibilitat de matèria seca, lípids i midó en broilers que menjaren dietes de blat.

Fòsfor no fític	Enzim fitasa afegit (U/kg)	Xilanasa (mg/kg)	EMA (MJ/kg)	EMAn (MJ/kg)	Digestibilitat matèria seca	Digestibilitat lípid	Digestibilitat midó
0.27%	-	-	12.8	12.2	0.70	0.75	0.95
0.27%	500	-	12.9	12.3	0.70	0.78	0.96
0.27%	-	60	13.2	12.6	0.73	0.78	0.98
0.27%	500	60	12.9	12.2	0.71	0.79	0.98
Fitasa (U/kg)		0	13.0	12.4	0.72	0.76	0.96
		500	12.9	12.2	0.71	0.79	0.97
	<i>Error estàndard</i>		0.11	0.11	0.005	0.017	0.003
		<i>Pr &gt; F</i>	NS	NS	NS	NS	NS
Xilanasa (mg/kg)		0	12.9	12.2	0.70 <sup>b</sup>	0.76	0.95 <sup>b</sup>
		500	13.0	12.4	0.72a	0.79	0.98 <sup>a</sup>
	<i>Error estàndard</i>		0.11	0.11	0.006	0.015	0.003
		<i>Pr &gt; F</i>	NS	NS	*	NS	***
Interacció fitasa * Xilanasa			NS	NS	NS	NS	NS

NS: no significatiu, \* P 0.05, \*\*\* P 0.001

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 8.8. EMA, EMAn, coeficients de digestibilitat de matèria seca, lípids i midó en broilers que menjaren dietes d'ordi.

Fòsfor no fític	Enzim fitasa afegit (U/kg)	$\beta$ -Glucanasa (mg/kg)	EMA (MJ/kg)	EMAn (MJ/kg)	Digestibilitat matèria seca	Digestibilitat lípid	Digestibilitat midó	Digestibilitat $\beta$ -glucans
0.27%	-	-	12.8	12.2	0.65	0.77	0.972	0.48
0.27%	500	-	12.8	12.1	0.65	0.76	0.970	0.42
0.27%	-	150	13.1	12.5	0.67	0.83	0.989	0.58
0.27%	500	150	13.0	12.3	0.67	0.79	0.980	0.56
Fitasa (U/kg)	0	0	13.0	12.3	0.67	0.80	0.980 <sup>a</sup>	0.53
	500	500	12.9	12.3	0.66	0.78	0.975 <sup>b</sup>	0.50
	<i>Error estàndard</i>		8.6	0.07	0.021	0.016	0.0016	0.013
	<i>Pr &gt; F</i>		NS	NS	NS	NS	*	NS
$\beta$ -Glucanasa (mg/kg)	0	0	12.8 <sup>b</sup>	12.2 <sup>b</sup>	0.65 <sup>b</sup>	0.76 <sup>b</sup>	0.971 <sup>b</sup>	0.45 <sup>b</sup>
	150	150	13.0 <sup>a</sup>	12.4 <sup>a</sup>	0.67 <sup>a</sup>	0.81 <sup>a</sup>	0.984 <sup>a</sup>	0.57 <sup>a</sup>
	<i>Error estàndard</i>		0.07	0.07	0.003	0.016	0.0016	0.013
	<i>Pr &gt; F</i>		**	**	***	*	***	***
Interacció fitasa * $\beta$ -glucanasa			NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS: no significatiu, \* P 0.05, \*\* P 0.01, \*\*\* P 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 8.9. Coeficients de retenció i excrecions de fòsfor total i calci en broilers que menjaren dietes de morenc.

Fòsfor no fític	Enzim fitasa afegit (U/kg)	$\alpha$ -Galactosidasa (mg/kg)	Retenció aparent fòsfor total	Retenció calci	Excreció fòsfor total (mg/d/anim)	Excreció calci (mg/d/anim)
0.27%	-	-	0.55	0.47	115	327
0.27%	500	-	0.68	0.64	77	240
0.27%	-	500	0.54	0.50	130	252
0.27%	500	500	0.68	0.63	86	255
Fitasa (U/kg)						
		0	0.54 <sup>b</sup>	0.48 <sup>b</sup>	121 <sup>a</sup>	326 <sup>a</sup>
		500	0.68 <sup>a</sup>	0.63 <sup>a</sup>	81 <sup>b</sup>	246 <sup>b</sup>
		<i>Error estàndard</i>	0.014	0.013	4.0	11.3
		<i>Pr &gt; F</i>	***	**	**	**
$\alpha$ -Galactosidasa (mg/kg)						
		0	0.61	0.55	94 <sup>b</sup>	279
		500	0.61	0.56	108 <sup>a</sup>	298
		<i>Error estàndard</i>	0.014	0.013	3.8	11.3
		<i>Pr &gt; F</i>	NS	NS	**	NS
Interacció fitasa * $\alpha$ -Galactosidasa			NS	NS	NS	*

NS: no significatiu, \* P 0.05, \*\* P 0.01, \*\*\* P 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 8.10. Coeficients de retenció i excrecions de fòsfor total i calci en broilers que menjaren dietes de blat.

Fòsfor no fític	Enzim fitasa afegit (U/kg)	Xilanasa (mg/kg)	Retenció aparent fòsfor total	Retenció calci	Excreció fòsfor total (mg/d/anim)	Excreció calci (mg/d/anim)
0.27%	-	-	0.69	0.62	100	259
0.27%	500	-	0.67	0.61	111	257
0.27%	-	60	0.62	0.55	121	267
0.27%	500	60	0.74	0.59	91	248
Fitasa (U/kg)		0	0.66 <sup>b</sup>	0.58	107	262
		500	0.70 <sup>a</sup>	0.60	96	250
		<i>Error estàndard</i>	0.016	0.012	7.7	10.7
		<i>Pr &gt; F</i>	*	NS	NS	NS
Xilanasa (mg/kg)		0	0.68	0.62 <sup>a</sup>	103	258
		60	0.68	0.57 <sup>b</sup>	99	253
		<i>Error estàndard</i>	0.016	0.012	7.5	10.7
		<i>Pr &gt; F</i>	NS	*	NS	NS
Interacció fitasa * Xilanasa			**	NS	NS	NS

NS: no significatiu, \* P 0.05, \*\* P 0.01.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 8.11. Coeficients de retenció i excrecions de fòsfor total i calci en broilers que menjaren dietes d'ordi.

Fòsfor no fític	Enzim fitasa afegit (U/kg)	$\beta$ -Glucanasa (mg/kg)	Retenció aparent fòsfor total	Retenció calci	Excreció fòsfor total (mg/d/anim)	Excreció calci (mg/d/anim)
0.27%	-	-	0.61	0.45	115	303
0.27%	500	-	0.62	0.38	110	316
0.27%	-	150	0.59	0.44	124	314
0.27%	500	150	0.70	0.52	90	263
Fitasa (U/kg)						
		0	0.60 <sup>b</sup>	0.44	120 <sup>a</sup>	308
		500	0.66 <sup>a</sup>	0.45	101 <sup>b</sup>	291
		<i>Error estàndard</i>	0.016	0.016	4.4	6.4
		<i>Pr &gt; F</i>	*	NS	**	NS
$\beta$ -Glucanasa (mg/kg)						
		0	0.61	0.41 <sup>a</sup>	113	309 <sup>a</sup>
		500	0.65	0.48 <sup>b</sup>	108	288 <sup>b</sup>
		<i>Error estàndard</i>	0.016	0.016	4.4	8.2
		<i>Pr &gt; F</i>	NS	**	NS	*
Interacció fitasa * $\beta$ -Glucanasa			*	**	NS	**

NS: no significatiu, \* P 0.05, \*\* P 0.01.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P 0.05).

### **8.5. Referències bibliogràfiques**

**Ahmad, T., S. Rasool, M. Sarwar, A. Haq i Z. Hasan.** 2000. Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 83, 103-114.

**Almirall, M. i E. Esteve-García.** 1995. In vitro stability of a  $\alpha$ -glucanase preparation from *Trichoderma longibrachiatum* and its effect in a barley based diet fed to broiler chicks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 54, 149-158.

**Almirall, M., M. Francesch, A. M. Pérez-Vendrell, J. Brufau i E. Esteve-Garcia.** 1995. The differences in intestinal viscosity produced by barley and  $\alpha$ -glucanase alter digesta enzyme activities and ileal nutrient digestibilities more in broiler chicks than in cocks. *J. Nutr.* 125, 947-955.

**Association of Official Analytical Chemists.** 1990. "Official methods of analysis". 15<sup>th</sup> ed., Assoc. Anal. Chem., Washington, D.C.

**Azain, M. J., X. L. Li, A. K. Shah i T. E. Davies.** 2002. Separation of the effects of xylanase and  $\alpha$ -glucanase addition on performance of broilers chicks fed barley based diets. *Poult. Sci.* 81(Suppl. 1), 121.

**Blum, J. C., M. Plouzeau i P. Stevans.** 1977. Influence des conditions d'élevage et de préparation sur la qualité des viandes de volaille et sur les oeufs. *Rev. Fr. Diét.* 82, 7-32.

**Bourdillon, A., B. Carré, L. Conan, M. Francesch, M. Fuentes, G. Huyghebaert, W. M. M. A. Janssen, B. Leclercq, M. Lessire, J. McNab, M. Rigoni, M. i J. Wiseman.** 1990. European reference method of in vivo determination of metabolizable energy in poultry: reproductibility, effect of age, comparison with predicted values. *Brit. Poultry Sci.* 31, 567-576.

**Broz, J., P. Oldale, A. H. Perrin-Voltz, G. Rychen, J. Schulze i C. Simoes-Nunes.** 1994. Effects of supplemental phytase on performance and phosphorus utilisation in broiler chickens fed a low phosphorus diet without of inorganic phosphates. *Brit. Poultry Sci.* 35, 273-280.

- Brufau, J., C. Nogareda, A. M. Pérez-Vendrell, M. Francesch i E. Esteve-Garcia.** 1991. Effect of *Trichoderma viride* enzymes in pelleted broiler diets based on barley. *Anim. Feed Sci. Technol.* 34, 193-202.
- Cabahug, S., V. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 1999. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate contents. I. Effects on bird performance and toe ash. *Brit. Poultry Sci.* 40, 660-666.
- Chesson, A.** 1993. Feed enzymes. *Anim. Feed Sci. Tech.* 45, 65-79.
- Choct, M., R. J. Hughes i M. R. Bedford.** 1999. Effects of a xylanase on individual bird variation, starch digestion throughout the intestine, and ileal and caecal volatile fatty acid production in chickens fed wheat. *Brit. Poultry Sci.* 40, 419-422.
- Cosson, T., A. M. Pérez-Vendrell, B. González-Teresa, D. Reñé, P. Taillade i J. Brufau.** 1999. Enzymatic assays for xylanase and  $\alpha$ -glucanase feed enzymes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 77, 345-353.
- Dänicke, S., H. Jeroch, W. Böttcher i O. Simon.** 2000. Interactions between dietary fat type and enzyme supplementation in broiler diets with high pentosan contents: effects on procaecal and total tract digestibility of fatty acids, metabolizability of gross energy, digesta viscosity and weights of small intestine. *Anim. Feed Sci. Technol.* 84, 279-294.
- DIN 51900.** 1977. Determination of the gross calorific value by the bomb calorimeter and calculation of the net calorific value. Deutsches Institut für Normung e. V., Berlin, Germany.
- Edwards Jr, H. M.** 1993. Dietary 1,25-dihydroxycholecalciferol supplementation increases natural phytate phosphorus utilization in chickens. *J Nutr.* 123, 567-577.
- Eeckhout, W. i M. De Paepe.** 1994. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 47, 19-29.
- Engelen, A. J., F. C. Van der Heeft, P. H. G. Randsdorp i E. L. C. Smit.** 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC* 77, 760-764.

- Francesch, M., S. Pérez-Moya, I. Badiola i J. Brufau.** 1999. Effects of cereal and feed enzyme on water consumption, dietary metabolizable energy and nutrient digestibility in broiler chickens. Page 258 in Proceedings of the 12<sup>th</sup> European Conference on Poultry Nutrition. WPSA, Veldhoven, The Netherlands.
- Hatten, III, L.F., D. R. Ingram i S. T. Pittman, 2001.** Effect of phytase on production parameters and nutrient availability in broilers and laying hens: a review. *J. Appl. Poult. Res.* 10, 274-278.
- Haug, W. i H. J. Lantzsch.** 1983. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *J. Sci. Food Agr.* 34, 1423-1426.
- Huyghebaert, G.** 1996. Effects of dietary calcium, phosphorus, Ca/P ratio and phytase on zootechnical performances and mineralisation in broiler chicks. *Arch. Geflugelkd.* 61(2), 53-61.
- Ibrahim, S., J. P. Jacob i Blair.** 1999. Phytase supplementation to reduce phosphorus excretion of broilers. *J. Appl. Poult. Res.* 8, 414-425.
- Lei, X. G., P. K. Ku, E. R. Miller, M. T. Yokoyama i D. E. Ullrey.** 1994. Calcium level affects the efficacy of supplemental microbial phytase in corn-soybean meal diets of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 72, 139-143.
- Little, T. M.** 1981. Interpretation and presentation of results. *Hortscience*, 16(5), 637-640.
- McCleary, B.V. i H. Glennie-Holmes.** 1985. Enzymic quantification of (1-3), (1-4)- $\alpha$ -D-glucan in barley and malt. *J. Inst. Brew.* 91, 285-295.
- McCleary, B.V., T. S. Gibson i D. C. Mugford.** 1997. Measurement of total starch in cereal products by amyloglucosidase- $\alpha$ -amylase method: Collaborative study. *J. AOAC* 80, 571-579.
- NRC.** 1994. Nutrients requirements of domestic animals. Nutrient requirements of poultry (9<sup>th</sup> rev. ed.). National Research Council, National Academy Press, Washington, DC.
- Qian, H., E. T. Kornegay i D. M. Denbow.** 1996. Phosphorus equivalence of microbial phytase in turkey diets as influenced by calcium to phosphorus ratios and phosphorus levels. *Poult. Sci* 75, 69-81.

- Qian, H, E. T. Kornegay i D. M. Denbow.** 1997. Utilization of phytate phosphorus and calcium as influenced by microbial phytase, cholecalciferol, and the calcium:total phosphorus ratio in broiler diets. *Poult. Sci.* 76, 37-46.
- Ravindran, V.** 1999. Protein and energy effects of microbial phytase in poultry diets. Pages 1-21 in *Proceedings of BASF Technical Symposium, Atlanta, GE.*
- Ravindran, V., W. L. Bryden i E. T. Kornegay.** 1995. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Biol. Rev.* 6(2), 125-143.
- Ravindran, V., P.H. Selle i W.L. Bryden.** 1999. Effects of phytase supplementation, individually and in combination, with glycanase, on the nutritive value of wheat and barley. *Poult. Sci.* 78, 1588-1595.
- Ravindran, V., S. Cabahug, G. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 2000. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate levels. II. Effects on apparent metabolism energy, nutrient digestibility and nutrient retention. *Brit. Poultry Sci.* 41, 193-200.
- Roberson, K. D. i H. M. Edwards Jr.** 1994. Effects of 1,25-dihydroxicholecalciferol and phytase on zinc utilization in broiler diets. *Poult. Sci* 73, 1312-1326.
- Salobir, J.** 1998. Effect of xylanase alone and in combination with  $\alpha$ -glucanase on energy utilisation, nutrient utilisation and intestinal viscosity of broilers fed diets based on two wheat samples. *Arch. Geflugelkd.* 5, 209-213.
- Schöner, F. J., P. P. Hoppe i G. Swarchz.** 1991. Comparative effects of microbial phytase and inorganic phosphorus as performance and retentions of phosphorus, calcium and crude ash in broilers. *J. Anim. Physiol. An. N.* 66,248.
- Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague.** 1996a. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and utilization of dietary calcium, phosphorus, copper, and zinc in broiler chicken fed corn-soybean diets. *Poult. Sci* 75, 729-736.

- Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague.** 1996b. Efficacy of supplemental phytase at different calcium levels on growth performance and mineral utilization of broiler chicks. *Poult. Sci.* 75, 1516-1523.
- Simons, P. C. H., H. A. J. Versteegh, A. W. Jongbloed, P. A. Kemme, P. Slump, K. A. Bos, M. G. E. Wolters, R. F. Beudeker i G. J. Verschoor.** 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broiler and pigs. *Brit. J. Nutr.* 64, 525-540.
- Steenfeldt, S., M. Hammershøj, A. Müllertz i J. Fris Jensen.** 1998a. Enzyme supplementation of wheat-based diets for broilers. 2. Effect on apparent metabolisable energy content and nutrient digestibility. *Anim. Feed Sci. Technol.* 75, 45-64.
- Steenfeldt, S., A. Mullertz i J. Fris Jensen.** 1998b. Enzyme supplementation of wheat-based diets for broilers. 1. Effects on growth performance and intestinal viscosity. *Anim. Feed Sci. Technol.* 75, 27-43.
- Viveros, A., A. Brenes, M. Pizarro i M. Castaño.** 1994. Effect of enzyme supplementation of a diet based on barley, and autoclave treatment, on apparent digestibility, growth performance and gut morphology of broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 237-251.
- Yi, Z., E. T. Kornegay i D. M. Denbow.** 1996. Supplemental microbial phytase improves zinc utilization in broilers. *Poult. Sci.* 75, 540-546.
- Zanella, I., N. K. Sakomura, F. G. Silversides, A. Figueiredo i M. Pack.** 1999. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. *Poult. Sci.* 78, 561-568.
- Zanini, S. F. i M. H. Sazzad.** 1999. Effects of microbial phytase on growth and mineral utilisation in broilers fed on maize soyabean-based diets. *Brit. Poultry Sci.* 40, 348-352.
- Zyla, K., D. Gogol, J. Koreleski, S. Swiatkiewicz i D. R. Ledoux.** 1999. Simultaneous application of phytase and xylanase to broilers feeds based on wheat: feeding experiment with growing broilers. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1841-1848.



**DETERMINACIÓ DELS FOSFATS D'INOSITOL MITJANÇANT  
ESPECTROSCÒPIA DE RESONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR DE P<sup>31</sup>.  
RETENCIÓ DE FITAT EN EL TRACTE GASTROINTESTINAL DE  
BROILERS**



## **9.1. Introducció**

El fitat (1,2,3,4,5,6-hexakisfosfat de mio-inositol) és l'anàleg superior d'una àmplia sèrie de fosfats d'inositol que es troben en la natura (Oberleas, 1971), especialment en llavors de plantes i en algunes arrels i tubercles. Degut a la seva forta càrrega quelant, el fitat actua com a transportador o lloc d'emmagatzematge per a minerals traça i fosfats durant el creixement de la planta (Reddy i col., 1989). El fosfat esdevé disponible durant la germinació per la hidròlisi catalitzada per l'enzim fitasa que també es troba present en la llavor. Alguns processos com la cocció, la fermentació i la germinació poden facilitar la hidròlisi del fitat (O'Neill i col., 1980).

Common (1940) va descriure un mètode per a l'anàlisi del fòsfor fític, essent un dels més utilitzats en els setanta i vuitanta. Aquest mètode comprèn una extracció àcida seguida d'una precipitació àcida per un complex de ferro a pH baix. Un dels desavantatges dels mètodes amb precipitació de ferro és que no només el fític precipita, ja que també poden precipitar altres compostos que continguin fòsfor (Sandberg i Ahderinne, 1986). de Boland i col. (1975) van trobar que els fosfats d'inositol, des del di- fins a l'hexa-, formen complexos insolubles de ferro. No obstant, els mono-, di- i trifosfats eren solubles de manera bastant apreciable i no precipitaven quantitativament.

Per això, alguns autors han utilitzat altres tècniques per a la determinació de fitat, com per exemple els de cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) (Graf i Dintzis, 1982, Sandberg i Ahderinne, 1986; Lehrfeld, 1989). La cromatografia pot presentar problemes en la identificació dels fosfats d'inositol i el fòsfor no fític en el mateix cromatograma.

Una tècnica que està sent utilitzada en els darrers anys és la ressonància magnètica nuclear de l'isòtop  $P^{31}$  (RMN  $P^{31}$ ) (O'Neill i col., 1980; Ersöz i col., 1990). Aquesta tècnica té com a principal avantatge que no necessita estàndards molt cars (Kempe i col., 1999) i que permet estudiar el fòsfor orgànic, podent-se fer anàlisis quantitatives i comparatives de diverses formes de fòsfor (Cade-Menun i col., 2002).

L'objectiu d'aquest estudi va ser confirmar la determinació de fosfats d'inositol segons antecedents trobats en la bibliografia, per després aplicar-la en les mostres de pinsos i continguts obtingudes

dels assaigs efectuats, ja que un dels objectius principals del segon assaig fou analitzar l'evolució dels fosfats d'inositol en quatre trams diferents del tub digestiu.

## **9.2. Material i mètodes**

### ***9.2.1 Materials***

L'àcid 2-aminoetilfosfònic es va obtenir de Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). L'aigua deuterada es va obtenir del Servei de Recursos Científics de la Universitat Rovira i Virgili (Tarragona). L'aigua ultrapura es va preparar utilitzant un sistema d'osmosi inversa MilliQ, obtenint aigua amb resistència específica de 9 M $\Omega$ cm o superior i una conductivitat específica de 91  $\mu$ S o inferior. Es van emprar dues classes de fitases, Natuphos i SP1002, les quals estan descrites en els assaigs anteriors.

### ***9.2.2 Preparació de les mostres***

Les mostres es van preparar segons el mètode descrit per Kemme i col. (1999), exceptuant algunes petites modificacions. 3.0 g de mostres de pinsos i continguts intestinals liofilitzats i mòlts es van extreure en 15.0 ml d'HCl 0.75M durant 2h a temperatura ambient, sota agitació. Els extractes es van centrifugar i es van agafar 3.0 ml del sobrenadant per escalfar-los durant 15 minuts a 100°C, sota agitació. Després de deixar refredar, les solucions se centrifugaren. Posteriorment, es van afegir 4.0 ml d'àcid etilendiaminatetraacètic (EDTA, 30 mg/ml) a 2.0 ml del sobrenadant. El pH de la solució es va ajustar a 6.0, utilitzant NaOH 2 M, i llavors es liofilitzà. Les mostres liofilitzades es van dissoldre en 5.0 ml d'aigua bidestil lada, es filtraren (0.45 $\mu$ m) i el pH s'ajustà a 12.6 utilitzant la mateixa solució de NaOH. Finalment, les mostres es van tornar a liofilitzar.

### ***9.2.3 Anàlisi de les mostres***

Els espectres de RMN de P<sup>31</sup> desacoblat de H<sup>1</sup> es van enregistrar a 121.47 MHz K en un aparell Varian Gemini 2000 300MHz utilitzant tubs de 10 mm per a totes les mostres. Les condicions de l'espectròmetre van ser: 8 segons de temps de relaxació; 19 microsegons de pols de 90° pel P<sup>31</sup>; 32

“scans” (repeticions de la inducció per cada experiment). Les dades del RMN es van processar mitjançant multiplicació exponencial (2 Hz d'amplada de línia). Els desplaçaments químics per l'espectre de  $P^{31}$  es van mesurar en parts per milió (ppm) en un camp descendent, usant  $H_3PO_4$  com a referència externa. L'àcid 2-aminoetilfosfònic (15 mg/ml) es va emprar com a referència interna per la quantificació dels senyals de  $P^{31}$ .

El contingut de fòsfor total dels pinsos també es determinà colorimètricament pel mètode de molibdo-vanadat (codi 965.17 AOAC, 1990). Les concentracions dels diferents fosfats d'inositol no van ser analitzats per altres mètodes.

#### 9.2.4 Origen de les mostres de pinsos i continguts intestinals

Els pinsos i els continguts del tub digestiu emprats en aquestes proves són els que s'han utilitzat en els assaigs descrits en aquesta memòria, indicats segons l'ordre establert. Només es va utilitzar una rèplica de cada mostra, degut a la poca quantitat de mostra que es tenia, ajuntant-se els continguts de tots els animal en una sola rèplica.

#### 9.2.5 Càlculs

Els resultats obtinguts en els assaigs dels fosfats d'inositol determinats per RMN de  $P^{31}$ , estan expressats com a percentatge de fòsfor i calculats segons les respectives relacions molars, de la següent manera:

$$\% X = \frac{\text{\AA}rea \text{ pic } X \times \text{Pes patró (mg)} \times 100}{\text{\AA}rea \text{ pic patró} \times \text{Pes mostra (g)} \times 1000}$$

En el cas dels pinsos, la suma dels concentracions de fòsfor, procedent dels fosfats d'inositol i el fòsfor no fític, es va relacionar amb el contingut de fòsfor total mesurat colorimètricament. Aquesta relació es considera una estimació de la recuperació de P total. No es determinà la recuperació de l'hexafosfat d'inositol ja que el mètode colorimètric emprat en l'anàlisi (Haug i Lantzsch, 1983) presentà dificultats en la determinació d'algunes mostres.

$$\% \text{ Recuperació} = \frac{(\text{compostos amb f \AA sfor}) \times 100}{[\text{F\AA sfor total}]_{\text{colorim\AA tric}}}$$

### **9.3. Resultats i Discussió**

La identificació dels diferents pics observats en els espectres es va fer per comparació a la informació obtinguda de Kemme i col. (1999). El pic corresponent al patró apareix a un desplaçament químic de quasi 17 ppm. Fixant aquest pic ja quedaran fixats els següents. La determinació de RMN de  $P^{31}$  presenta un avantatge respecte a la de  $H^1$ . En aquesta última, cada protó té un pic característic i influenciat pel seu entorn. Així, la forma del pic serà diferent en cas d'haver-hi un o varis protons equivalents propers, formant doblets, triplets, o més pics. En el cas del  $P^{31}$ , cada pic representa una classe de fòsfor, malgrat que un tipus de fòsfor pugui presentar més d'un pic.

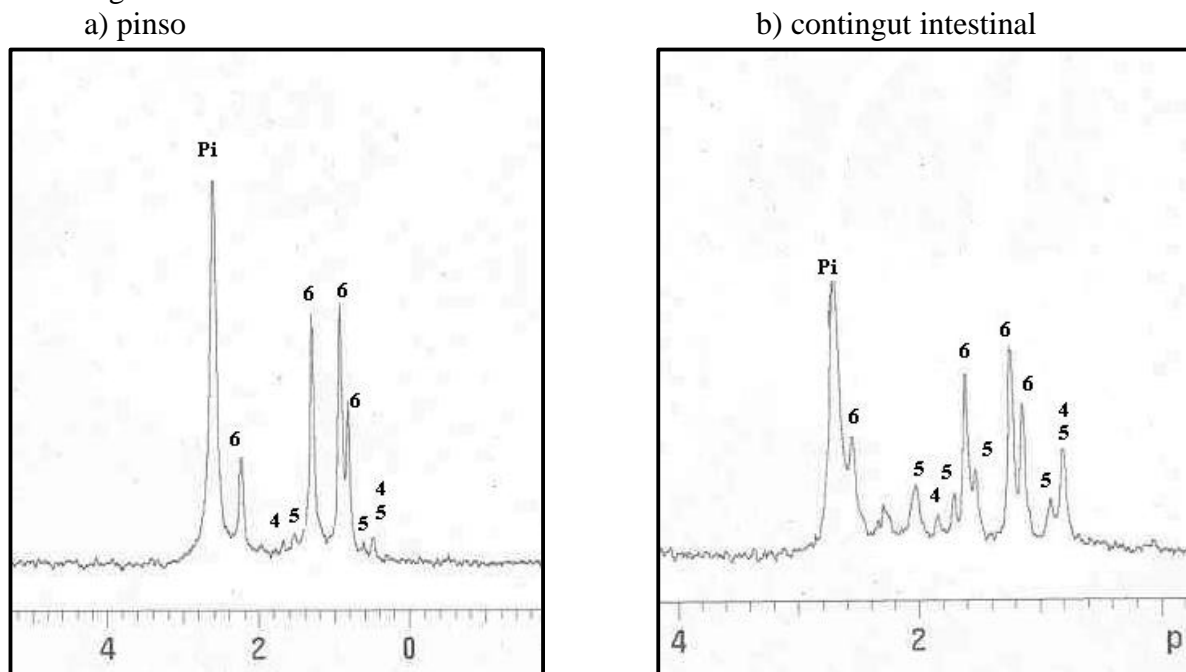
El fòsfor no fític va donar el pic amb el desplaçament més gran, amb un valor d'aproximadament 6.0 ppm. L'IP<sub>6</sub> presenta quatre pics característics i d'una àrea important a 5.7, 4.5, 4.0 i 3.7 ppm de desplaçaments químics. L'IP<sub>5</sub> mostra una major quantitat de pics, però d'àrea molt inferiors, a 5.0, 4.6, 4.4, 3.5 i 3.3 ppm. Aquest últim pic se solapa amb un corresponent a l'IP<sub>4</sub>, que també presenta un pic a 4.7. En la determinació realitzada en pinsos es veieren clarament els pics corresponents al fosfat no fític, i als dos fosfats d'inositol més grans, mentre que la resta es poden intuir, però sense diferenciar-se molt de la línia base. En els espectres corresponents als continguts s'obtingueren pics corresponents al tetrafosfat d'inositol i en menor quantitat algun pic que podria ser del trifosfat, tot i que només va ser en alguna mostra. Aquesta trobada d'una quantitat limitada de fosfats d'inositol més baixos està d'acord amb les dades trobades per Sandberg i Ahderinne (1986) i Skoglund i col (1997) en estudis en humans i Schlemmer i col. (1997) i Skoglund i col. (1997b) en estudis amb porcs i broilers. Kemme i col. (1999) tampoc van observar presència de IP<sub>3</sub>, IP<sub>2</sub> i IP<sub>1</sub> en continguts digestius ileals de porcs. La no presència d'aquests fosfats d'inositol més baixos podria ser deguda a una manca d'aquests compostos en la digesta. Una altra explicació proposada pels autors es la que la fitasa d'*Aspergillus niger* (emprada també en el nostre cas) no seria capaç de trencar l'IP<sub>1</sub> mentre no hagués una acumulació d'aquesta espècie. Una conclusió a la que es pot arribar és que la no formació dels fosfats d'inositol més baixos (mono-, di- i tri-) és perquè es necessita un temps major

per a arribar-se a ells mitjançant la hidròlisi dels fosfats més grans, i el temps de residència del contingut en el tracte gastrointestinal dels pollastres no és suficient.

Les anàlisis es van realitzar a pH 12.6, ja que els fosfats d'inositol són estables a aquestes condicions. Amb altres condicions de pH, poden presentar-se problemes de desplaçament per ressonàncies. L'EDTA, en incloure's abans del primer ajustament de pH, no té cap efecte sobre l'equilibri àcid-base, actuant com a agent quelant dels cations, competint amb el fitat, permetent uns senyals amb una millor resolució en el RMN (O'Neill, 1980).

En la Figura 9.1 a) es pot observar un espectre corresponent a una mostra de pinso. Pels pinsos la quantitat de mostra pesada i posada en cada tub era entre 0.10 i 0.12 g, ja que es va veure que era l'òptima per obtenir bons espectres, i es va posar uns 0.10 ml de solució de patró intern de tal manera que al final hi hagués entre 0.75 i 0.80 mg de P, excepte en el quart assaig, en què el pes de fòsfor va ser propera als 0.4 mg, ja que la solució de patró era el doble de concentrada.

Figura 9.1. Espectres obtinguts en l'anàlisi per RMN de  $P^{31}$  desacoblat de  $H^1$ . a) pinso; b) contingut del tub digestiu.



En la Figura 9.1 b) es pot observar un espectre de continguts del tub digestiu d'una mostra. Pels continguts la quantitat de mostra pesada era inferior a la dels pinsos, pesant-se entre 0.6 i 0.9,

segons els assaigs, i la quantitat de mostra disponible. La diferència principal respecte als pinsos es troba en la quantitat posada de patró, ja que el pes final obtingut es trobava entre els 0.36 i 0.39 mg de P, excepte en el quart assaig en què els valors es trobaven entre 0.4 i 0.5 mg de P. La principal raó de la diferència de pes del fòsfor del patró va ser deguda a l'ús de diferents concentracions de la solució de patró. Es va fer així per facilitar l'espectre, ja que d'aquesta manera el pic corresponent al patró i als pics de les mostres analitzades sortien en proporcions adequades per poder calcular les concentracions dels diferents fosfats.

Des de la Taula 9.1 fins a la Taula 9.5 es presenten els resultats de les concentracions dels compostos fosfats d'inositol dels pinsos i dels continguts intestinals corresponent a cada assaig, amb la correspondència del nombre de taula amb l'assaig. La Taula 9.2 s'ha dividit en 3 parts, podent-se trobar en la Taula 9.2a els valors corresponents als pinsos, en la Taula 9.2b els valors dels continguts del pap i del pedrer, i en la Taula 9.2c els valors dels continguts ileals i de la cloaca. Els valors de les Taules 2b i 2c són els que s'han utilitzat per avaluar l'evolució del fitat en el tracte gastrointestinal dels pollastres.

Referent als resultats, primer de tot s'ha de comentar que les diferències entre tractaments no s'han pogut analitzar estadísticament, degut a que només es tenia una rèplica per a cada mostra. Per tant, els resultats que es presenten s'han de considerar com a tendències, però a més s'ha de tenir en compte que aquesta tècnica té com a principal inconvenient una relativa baixa sensibilitat (Kemmerer i col., 1999), el que fa que potser si s'haguessin pogut fer més rèpliques, s'haurien pogut observar comportaments diferenciats en els diferents assaigs.

**Pinsos.** Observant els valors de recuperació de P total obtinguts en els diferents assaigs, es pot comprovar com en l'assaig 1 estan per sobre de 100% però no massa superiors, i en l'assaig 2 estan la majoria per sota, arribant-se fins al cas del T-2 amb una recuperació del 51%. En la resta d'assaigs, els valors es troben bastant per damunt de 100%, ja que si es calcula la mitjana per a cada assaig, aquestes donen 112, 136 i 123 pels assaigs 3, 4 i 5, respectivament. Destacar que en el quart assaig s'obtingué un 218% de recuperació pel T-2.

Malgrat això, s'ha observat que la concentració de fòsfor no fític en tots els pinsos analitzats manté una correlació amb els valors teòrics. És a dir, en aquells assaigs en què la dieta control positiu té un 0.45% de fòsfor no fític i les altres dietes tenen 0.27% FNF, els resultats extrets de RMN també les mantenen, encara que numèricament hagin diferències. Per exemple, en les dietes de moresc de l'assaig 1 el valor teòric per a T-1 és 0.45% i l'experimental és 0.37%, mentre que per a T-2 i T-3 els analitzats són 0.20 i 0.21%, respectivament, quan el valor teòric fou 0.27%.

La determinació dels fosfats d'inositol ha demostrat que la majoria de fòsfor fític present en el pinso es troba en forma de IP<sub>6</sub>, havent-se trobat una quantitat molt baixa de IP<sub>5</sub>, igual o inferior al 0.05% en bona part de les mostres, excepte en les corresponents al quart assaig en què els valors es troben entre 0.08 i 0.10%. En tot cas, no es detectà presència de fosfats més baixos en les mostres de pinso analitzades. En tots les anàlisis realitzades, es veu que la quantitat de IP<sub>6</sub> es manté constant en totes les mostres, mentre que el que és més variable és el fòsfor no fític, depenent de la concentració afegit.

Les variacions en les recuperacions de fòsfor total, amb valors superiors al 100%, poden ser explicats en l'error del mètode, o en la desviació possible de resultats. Kemme i col. (1999) comenten que l'error fet en l'estimació seria del 5% en els compostos més concentrats (IP<sub>6</sub> i fòsfor no fític) i del 10% (generalment pel IP<sub>5</sub> i IP<sub>4</sub>).

**Continguts intestinals (assaigs 1, 3, 4 i 5).** En les dietes de moresc de l'assaig 1 es pot comprovar perfectament com ha actuat l'enzim fitasa (Taula 9.1). Així en afegir l'enzim en la dieta deficient de fòsfor es produeix una reducció en la quantitat de fòsfor total, degut principalment per la reducció en la quantitat de IP<sub>6</sub> (0.46% en T-2 i 0.20% en T-3). En aquest mateix assaig, les dietes de blat presenten un comportament diferent. La reducció de fòsfor total ja es produeix en reduir el fòsfor no fític de la dieta, tot i així la quantitat de fòsfor total dels continguts dels animals alimentats amb fitasa exògena es manté dins d'uns mateixos valors 0.45-0.50%, observant-se lleugers increments en les concentracions tant de IP<sub>5</sub> com dels fosfats amb menor nombre de fòsfor. Tal com ja s'ha vist anteriorment en el capítol dedicat a l'assaig 1, podem parlar d'una influència important de la fitasa

endògena del blat, superior a la del morenc. Finalment, es pot dir que no hi ha efecte de la dosi sobre el fòsfor total present en els diferents tractaments de blat. Les dietes amb 200, 400 i 600 U de fitasa/kg tingueren concentracions molt similars, que ens permeten pensar que no hi hauria millores significatives.

Els continguts intestinals dels animals emprats en l'assaig 3 (Taula 9.3) presentaren concentracions elevades de  $IP_6$ , tenint una mínima quantitat de fòsfor no fític, amb valors des de 0.02 a 0.13%. Hem de considerar diferent el T-6, doncs encara que tingui fitasa exògena en la dieta, els valors tan inferiors obtinguts dels diferents compostos fosfats han de ser deguts a problemes en la preparació de la mostra. Sembla observar-se una tendència a funcionar millor la fitasa en les dietes amb un 10% de segó, ja que tenen els valors més baixos de fòsfor total, directament relacionat amb una menor concentració de fòsfor no fític, encara que haurien de ser tots iguals d'acord amb els valors dels pinsos, ja que les concentracions dels fosfats d'inositol es mantenen iguals. Observant amb deteniment les concentracions de  $IP_6$ , es pot veure com la fitasa exògena a la dieta ha actuat disminuint-lo, amb quantitats menors per les dietes amb fitasa (T-4, T-6 i T-8) respecte les dietes sense fitasa (T-1, T-5 i T-7, respectivament). Excepte en els casos de les dietes sense segó, aquesta disminució de l'hexafosfat d'inositol repercuteix en una disminució en la concentració de fòsfor total.

Amb la primera observació a les dades de les anàlisis dels continguts intestinals de l'assaig 4 (Taula 9.4), es pot destacar la bona actuació de la dosi més gran de fitasa exògena (5000 U de fitasa per quilo de pinso) tant si el blat estava passat per autoclau com no. La reducció es basa en uns valors molt baixos de  $IP_6$  (0.12 i 0.10% per T-4 i T-8, respectivament). Gràcies aquests resultats, es pot pensar que en les dietes de blat es pot augmentar més la dosi per tal de disminuir la presència de fòsfor en el contingut i en les excretes. En les dietes amb blat no tractat, pot veure's la disminució en la concentració de P total a mida que reduïm el nivell de fòsfor no fític de la dieta primer, i per l'addició de fitasa microbiana després.

En les dietes amb blat autoclavat, tot i trobar una tendència similar es pot dir que les dietes deficient de fòsfor sense i amb 500 U de fitasa/kg tenen la mateixa quantitat de fòsfor total. En tot cas, es pot contemplar que en totes les dietes deficientes de fòsfor la concentració de IP<sub>6</sub> és menor que les dietes amb una concentració recomanada de fòsfor, i sembla intuir-se una pujada en la concentracions dels fosfats més baixos.

Les concentracions obtingudes en els continguts ileals en l'assaig 5 (Taula 9.5) estan força relacionades amb el cereal inclòs en la formulació de les dietes, sent molt variables depenent si es tracta del morenc, el blat o l'ordi. Pot ser que pel fet que els valors de fòsfor no fític utilitzats en la formulació dels pinsos estigui extret de taules, i no per anàlisi de les mostres. Recordar que el fòsfor no fític varia entre els diferents cereals, però que també pot variar segons la varietat del cereal o l'any de collita (Ravindran, i col., 1995). En el cas de les dietes de morenc es trobà menys fòsfor total en les dietes que tenien fitasa microbiana exògena, essent la dieta amb els dos enzims alhora la de menor concentració. La disminució en el fòsfor total es deu a la reducció en la concentració de l'IP<sub>6</sub>, ja que en els quatre casos les concentracions de la resta de fosfats és manté constant. En aquests resultats sembla confirmar-se la interacció positiva que s'havia trobat en la retenció de fòsfor total, i que es descriu en el capítol corresponent.

En tot l'assaig 5, les dades de productivitat i de retenció de minerals de les dietes de blat diferiren de les obtingudes en la resta de les dietes. També es pot notar aquesta tendència en els resultats aquí mostrats. La presència dels dos enzims afegits a la dieta fa que la concentració de fòsfor total sigui molt alta (1.0%), igual que la de la dieta que només té xilanasa, mentre que la dieta amb fitasa exògena té el valor més baix (0.81%). Es corrobora que sembla haver una interacció negativa, com la que es pot trobar en la retenció total de fòsfor total analitzada en el capítol anterior. L'aplicació de l'enzim fitasa sol produeix una reducció interessant en la quantitat de IP<sub>6</sub>, passant de 0.57 a 0.39%.

Els valors de P total dels continguts d'animals alimentats amb dietes d'ordi foren molt propers. Les dietes d'ordi sense cap enzim presentaren la menor quantitat de fòsfor total de totes les quatre

dietes. La dieta amb només fitasa té menys  $IP_6$ , però el fòsfor no fític és una mica superior. La dieta amb  $\beta$ -glucanasa és la que té més  $IP_6$  i  $IP_5$  i una quantitat important de fosfats més baixos. La dieta amb els dos enzims va tenir una major presència de fosfats més baixos i una presència quasi nul la de fòsfor no fític. En tot cas, i provocat per la manca de rèpliques i si assumim l'error del mètode, especialment en el moment de la quantificació, amb tota seguretat es pot considerar que la única dieta diferent a les altres és la dieta amb la  $\beta$ -glucanasa. És de remarcar que la dieta amb els dos enzims aplicats alhora és la que presenta una menor concentració de fòsfor no fític i una major dels inositols més baixos, que ens pot fer pensar en una interacció positiva de la fitasa i la  $\beta$ -glucanasa, reforçant l'acció enzimàtica de la fitasa sobre el fòsfor.

***Evolució del fitat en els continguts de les diferents seccions del tracte gastrointestinal (Assaig 2).***

En la Figura 9.2 hi ha representat la progressió de la concentració dels diferents compostos fosfats (eix Y) per les seccions del tracte gastrointestinal (eix X), representant cada línia un tractament diferent. Les seccions del tracte (pap, pedrer, intestí prim i cloaca) van ser escollides perquè són les més representatives i en les que l'enzim fitasa pot tenir més influència, i basant-se en l'estudi de Sooncharernying i Edwards (1993), que van realitzar l'estudi de la retenció del fitat ( $IP_6$ ), essent determinat per HPLC.

En el nostre estudi, s'observà una disminució del fòsfor no fític entre el pap i el pedrer, excepte en el cas del T-1 que donà un valor de 0.01% de P no fític en el pap i 0.11% en el pedrer. La composició del contingut en el pap i la del pinso no hauria de ser molt diferent, doncs els pollastres amb el bec només agafen el menjar, i que era en forma de farina. L'observació dels valors de les concentracions en el pinso i en el pap (Taules 2a i 2b, respectivament) ens pot permetre observar que no és així, havent-hi variacions importants en les concentracions, com per exemple pel T-4 amb 0.76% de P no fític en el pap i només 0.33% en el pinso. En el pas del pedrer a l'intestí prim es pot notar com quan les concentracions eren més elevades en el pedrer disminuïen en el l'intestí, i a l'inrevés. Tanmateix, la concentracions de fòsfor no fític en l'intestí és igual en tots els tractaments. En el darrer tram, els valors de les dietes amb nivells recomanats de fòsfor (T-1 i T-4) són les que

presenten major quantitat de fòsfor no fític. Aquest augment, que és generalitzat per tot els tractaments, pot deure's a la digestió del fitat per les fitases endògenes del pollastre en la darrera part de l'intestí. En produir-se al final de l'intestí, aquest fòsfor no fític no podria ser aprofitat i seria excretat per l'animal.

La concentració de IP<sub>6</sub> en tots els tractaments roman gairebé constant en el tram entre el pap i el pedrer, encara que la corresponent a T-2 augmenta des de 0.04 a 0.16%. Es produeix un augment en la concentració en avançar en el tracte, a partir del pedrer, amb increments en la majoria dels casos, assolint el valor màxim en la cloaca, excepte pel T-5 en què el valor màxim s'esdevé en l'intestí. En la cloaca, els valors més grans de IP<sub>6</sub> s'obtingueren en el cas de les dues dietes amb nivells recomanats de 0.45% de FNF, i el valor més baix pel cas de la dieta deficient de fòsfor amb ordi passat per l'autoclau i amb 500 U de fitasa microbiana/kg. Una possible explicació de la més baixa concentració de IP<sub>6</sub> en el pap i el pedrer que en les altres seccions la donen Sooncharernying i Edwards (1993), en un estudi amb pollastres que menjaren dietes de moresc i soja. Aquests autors indiquen que la soja (que té un elevat nivell de IP<sub>6</sub>) seria expulsada constantment i regular del pap i el pedrer, mentre que el moresc (baix nivell de IP<sub>6</sub>) encara hi romandria més temps. En el nostre estudi pot passar una cosa similar, ja que l'ordi encara que tingui una activitat fitàsica major, té menys fòsfor fític que el moresc (0.17% l'ordi i 0.19% el moresc, Eeckhout i De Paepe, 1994), però aquesta afirmació cal estudiar-la mes concretament en posteriors assaigs.

La tendència general en la concentració de IP<sub>5</sub> és la de disminuir en passar del pap al pedrer, per després augmentar a l'intestí, i finalment mantenir-se amb una concentració quasi bé igual a la cloaca. Donat que en la cloaca els valors es mouen dins un marge d'entre 0.04 i 0.08%, es pot dir que no hi haurien diferències entre els diferents tractaments. L'interval de les concentracions no és molt gran per la qual cosa, qualsevol petita errada en la quantificació o en la preparació de la mostra podria fer canviar bastant tant en sentit negatiu com en positiu els valors. A simple vista, un exemple podria ser el valor de T-6. Mirant bé les dades de la Taula 9.2, es pot observar com la concentració de IP<sub>6</sub> i dels fosfats més baixos en el pedrer és més baixa que les altres. Cal tenir

present que el T-6 és una dieta deficient i amb presència de fitasa microbiana, i per tant, es pot creure que la fitasa ha actuat com era d'esperar. En aquest cas, seria una mica més lògic pensar que aquest valor seria producte d'alguna imprecisió en l'anàlisi.

Les dades referents a la concentració de fosfats menors que el pentafofat són molt dispars, no observant-se cap comportament generalitzat. Un motiu pot ser que en l'espectre aquests pics no presentaven una molt bona resolució, i per tant, no era fàcil realitzar-ne la quantificació. Per això és comprensible observar comportaments com el del T-4 que és molt alt en el pap, sofreix una gran reducció en el pedrer i finalment ser molt gran en la cloaca. Vist que en els pinsos la quantitat d'aquest tipus de fosfats era nul la, seria d'esperar que a mesura que la bola digestiva passa pel tracte la concentració anés augmentant, ja sigui per l'acció de la fitasa microbiana o per l'endògena de la dieta o de l'animal. En la majoria dels tractaments, la concentració es redueix del pap al pedrer, torna a augmentar una mica del pedrer a l'intestí, havent la més gran variació en el pas de l'intestí a la cloaca.

Finalment, la concentració de fòsfor total reflecteix una mica tot el descrit anteriorment, assumint que es tracta del sumatori de la concentració de tots els compostos fosfats. Així, la tendència general és reduir-se entre el pap i el pedrer (amb dos casos particulars: T-4, que passa de 1.18% a 0.22%, i T-1, que augmenta des de 0.24 fins a 0.31%). Del pedrer a l'intestí la tendència és d'augmentar o mantenir-se igual, per posteriorment augmentar una mica més en la cloaca. Els valors obtinguts en la cloaca, no haurien de ser molts diferents dels obtinguts en l'excreta. En aquest estudi no s'ha realitzat aquesta determinació, que podria quedar per a estudis posteriors. Dels resultats obtinguts en la cloaca, es pot derivar que la concentració menor correspon a les dietes deficient de fòsfor amb o sense enzim incorporat a la dieta, mentre que les dues dietes amb nivell recomanat de fòsfor no fític presenten major quantitat de fòsfor total, tal com passa en el cas de les excretes, i es pot observar en les dades mostrades en els capítols corresponent a cada assaig.

Tal com descriuen Sooncharernying i Edwards (1993), el mètode de l'ús de marcador, en el seu cas l'òxid cròmic, no és massa de confiança per avaluar la retenció de l'IP<sub>6</sub>, segurament per la

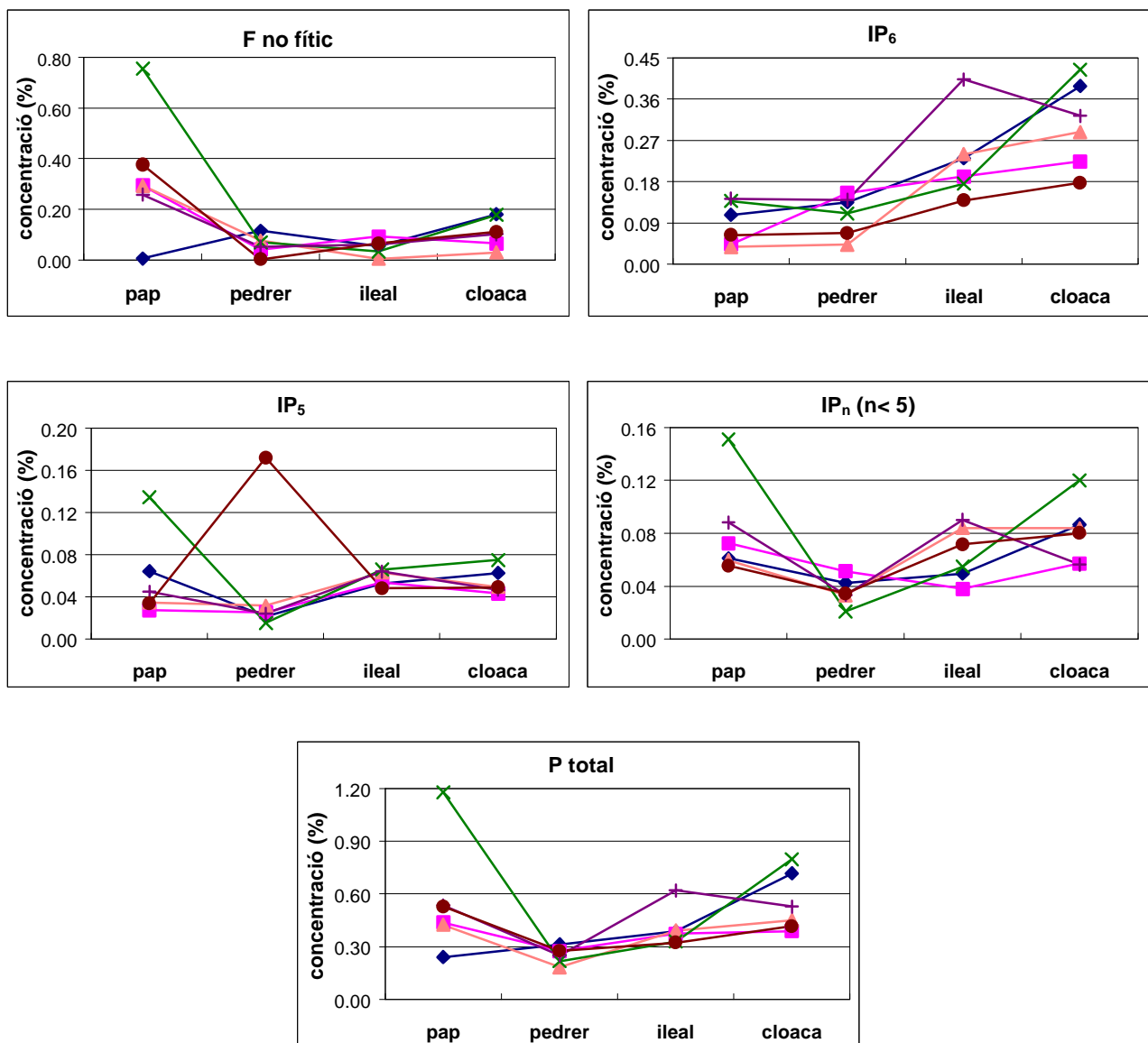
diferència de velocitat de trànsit, tot i que si que podria ser-ho per estudis de digestibilitat d'altres nutrients. Caldria comprovar si amb les dades obtingues en la determinació per RMN dels fosfats d'inositol poden aconseguir-se resultats fiables de retenció aparent. En els assaigs realitzats en aquesta memòria, les dietes contenien diòxid de titani com a marcador, que té una velocitat de trànsit diferent a l'òxid cròmic. S'ha realitzat el càlcul de les retencions aparents de fòsfor total, fòsfor no fític i de l'hexafosfat d'inositol en els assaigs 2, 3 i 4, resultats que es mostren en les Taules 9.6, 9.7 i 9.8, respectivament. Els resultats obtinguts són aproximacions dels que poden realment ser, ja que, tal com es descriu anteriorment, no es van poder analitzar estadísticament les diferències entre tractaments perquè no hi ha rèpliques, essent cada tractament un pool de tots els lots, i perquè els valors de diòxid de titani dels continguts ileals utilitzats en cada cas és la mitjana dels valors analitzats del diòxid de cada lot. Es pot veure com la fitasa microbiana afegida millora els valors de les retencions de fòsfor total, gràcies, en bona part, a l'increment en la retenció de IP<sub>6</sub>, ja que els resultats són anàlegs. En l'assaig 2 (Taula 9.6), pot veure's com la fitasa microbiana augmenta la retenció de fòsfor total i de IP<sub>6</sub> tant en les dietes d'ordi no tractat o passat per l'autoclau, igual que en l'assaig 4, en què, en dietes de blat sense tractar, l'addició de 5000 U de fitasa/kg s'obté el millor valor de la retenció de fòsfor total i de IP<sub>6</sub>, mentre que en les dietes de blat passat per l'autoclau no es veieren modificades. En l'assaig 3, i desglossant els resultats segons el nivell de inclusió de segó en la dieta de morenc-soja, la presència de fitasa microbiana millorà les retencions de fòsfor total i IP<sub>6</sub>, essent els increments superiors en el cas de l'IP<sub>6</sub>; per la retenció de fòsfor total, els augments més grans s'obtingueren pels nivells de 5 i 10%.

Segons els resultats que es desprenen d'aquest treball, i que són similars a altres trobats en la bibliografia (Kempe i col., 1999), pot dir-se que la ressonància magnètica nuclear de P<sup>31</sup> és una bona tècnica per quantificar els fosfats d'inositol, tenint present que en la mateixa mesura també es pot determinar el fòsfor no fític concurrent en la mostra. Totes les mesures es realitzen amb una bona precisió, i la resolució en l'espectre vindrà determinat en gran part per la preparació de la mostra més que no pas per problemes metodològics amb l'espectròmetre.

La tècnica ha permès observar la hidròlisi progressiva en el tracte de l'IP<sub>6</sub> a fosfats d'inositol més baixos (malgrat no s'hagin trobat fosfats d'inositol inferiors a IP<sub>4</sub>). S'han observat els efectes de la fitasa exògena, en el pedrer i en la cloaca, per contra no s'han vist efectes del tractament amb autoclau.

Figura 9.2. Representació de la concentració dels compostos fosfats en cada tram del tracte gastrointestinal avaluat dels animals emprats en l'assaig 2. a) P no fític; b) IP<sub>6</sub>; c) IP<sub>5</sub>; d) IP<sub>n</sub> (n<5); e) P total

T-1: ◆ T-2: ■ T-3: ▲ T-4: ✕ T-5: + T-6: ●



Taula 9.1. Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de P<sup>31</sup> en pinsos i continguts intestinals de l'Assaig 1 i recuperació de fòsfor total en els pinsos.

TRT	cereal	% FNF	Fitasa afegida (U/kg)	PINSO					CONTINGUTS INTESTINALS					
				FNF (%)	IP <sub>6</sub> (%)	IP <sub>5</sub> (%)	P <sub>total</sub> (%)	RMN colorimètric <sup>*</sup>	Recuperació P <sub>total</sub> (%)	FNF (%)	IP <sub>6</sub> (%)	IP <sub>5</sub> (%)	IP <sub>n</sub> (n<5) (%)	P <sub>total</sub> (%)
T-1	morenc	0.45	-	0.37	0.26	0.03	<b>0.66</b>	0.68	<b>96</b>	0.02	0.49	0.09	0.08	<b>0.68</b>
T-2	morenc	0.27	-	0.20	0.28	0.03	<b>0.51</b>	0.49	<b>104</b>	0.07	0.46	0.10	0.09	<b>0.72</b>
T-3	morenc	0.27	500	0.21	0.29	0.02	<b>0.52</b>	0.49	<b>107</b>	0	0.20	0.06	0.08	<b>0.34</b>
T-4	blat	0.45	-	0.41	0.30	0.05	<b>0.76</b>	0.66	<b>115</b>	0.18	0.31	0.09	0.12	<b>0.70</b>
T-5	blat	0.27	-	0.14	0.24	0.05	<b>0.43</b>	0.49	<b>88</b>	0.01	0.30	0.06	0.05	<b>0.41</b>
T-6	blat	0.27	200	0.18	0.22	0.05	<b>0.45</b>	0.51	<b>88</b>	0	0.27	0.09	0.10	<b>0.46</b>
T-7	blat	0.27	400	0.19	0.30	0.04	<b>0.52</b>	0.47	<b>111</b>	0.01	0.28	0.10	0.13	<b>0.51</b>
T-8	blat	0.27	600	0.20	0.31	0.03	<b>0.54</b>	0.49	<b>110</b>	0.01	0.31	0.07	0.07	<b>0.46</b>

\* Determinació realitzada colorimètricament pel mètode de molibdo-vanadat (codi 965.17 AOAC, 1990).

Taula 9.2a. Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de P<sup>31</sup> i recuperació de fòsfor total en els pinsos de l'Assaig 2.

Trt	Ordi	% FNF	Fitasa afegida (U/kg)	FNF (%)	IP <sub>6</sub> (%)	IP <sub>5</sub> (%)	PINSO		Recuperació P total (%)
							P <sub>total</sub> (%)		
							RMN	colorimètric *	
T-1	No tractat	0.45	-	0.39	0.25	0	<b>0.63</b>	0.73	<b>86</b>
T-2	No tractat	0.27	-	0.10	0.13	0.02	<b>0.25</b>	0.49	<b>51</b>
T-3	No tractat	0.27	500	0.13	0.18	0.01	<b>0.32</b>	0.49	<b>64</b>
T-4	Autoclau	0.45	-	0.33	0.20	0.06	<b>0.59</b>	0.66	<b>89</b>
T-5	Autoclau	0.27	-	0.19	0.29	0.03	<b>0.51</b>	0.49	<b>104</b>
T-6	Autoclau	0.27	500	0.16	0.27	0	<b>0.43</b>	0.49	<b>88</b>

\* Determinació realitzada colorimètricament pel mètode de molibdo-vanadat (codi 965.17 AOAC, 1990).

Taula 9.2b. Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de P<sup>31</sup> en continguts de pap i pedrer de l'Assaig 2.

Trt	PAP					PEDRER				
	FNF (%)	IP <sub>6</sub> (%)	IP <sub>5</sub> (%)	IP <sub>n</sub> (n<5) (%)	P <sub>total</sub> (%)	FNF (%)	IP <sub>6</sub> (%)	IP <sub>5</sub> (%)	IP <sub>n</sub> (n<5) (%)	P <sub>total</sub> (%)
T-1	0.01	0.11	0.06	0.06	<b>0.24</b>	0.11	0.14	0.02	0.04	<b>0.31</b>
T-2	0.30	0.04	0.03	0.07	<b>0.44</b>	0.04	0.16	0.03	0.05	<b>0.27</b>
T-3	0.29	0.04	0.03	0.06	<b>0.43</b>	0.08	0.04	0.03	0.03	<b>0.18</b>
T-4	0.76	0.14	0.13	0.15	<b>1.18</b>	0.07	0.11	0.01	0.02	<b>0.22</b>
T-5	0.26	0.14	0.04	0.09	<b>0.53</b>	0.05	0.14	0.02	0.03	<b>0.25</b>
T-6	0.38	0.06	0.03	0.06	<b>0.53</b>	0	0.07	0.17	0.03	<b>0.28</b>

Taula 9.2c. Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de P<sup>31</sup> en continguts ileal i cloaca de l'Assaig 2.

Trt	ILEAL					CLOACA				
	FNF (%)	IP <sub>6</sub> (%)	IP <sub>5</sub> (%)	IP <sub>n</sub> (n<5) (%)	P <sub>total</sub> (%)	FNF (%)	IP <sub>6</sub> (%)	IP <sub>5</sub> (%)	IP <sub>n</sub> (n<5) (%)	P <sub>total</sub> (%)
T-1	0.05	0.23	0.05	0.05	<b>0.39</b>	0.18	0.39	0.06	0.09	<b>0.72</b>
T-2	0.09	0.19	0.05	0.04	<b>0.37</b>	0.06	0.22	0.04	0.06	<b>0.39</b>
T-3	0	0.24	0.06	0.08	<b>0.39</b>	0.03	0.29	0.05	0.08	<b>0.45</b>
T-4	0.03	0.18	0.07	0.05	<b>0.33</b>	0.18	0.42	0.07	0.12	<b>0.80</b>
T-5	0.06	0.40	0.06	0.09	<b>0.62</b>	0.10	0.32	0.05	0.06	<b>0.53</b>
T-6	0.06	0.14	0.05	0.07	<b>0.32</b>	0.11	0.18	0.05	0.08	<b>0.42</b>

Taula 9.3. Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de P<sup>31</sup> en pinsos i continguts intestinals de l'Assaig 3 i recuperació de fòsfor total en els pinsos.

TRT	segó	% FNF	Fitasa afegida (U/kg)	PINSO					CONTINGUTS INTESTINALS					
				FNF (%)	IP <sub>6</sub> (%)	IP <sub>5</sub> (%)	P total (%) RMN	P total (%) colorimètric*	Recuperació Pt (%)	FNF (%)	IP <sub>6</sub> (%)	IP <sub>5</sub> (%)	IP <sub>n</sub> (n<5) (%)	P total (%)
T-1	0%	0.27	-	0.23	0.25	0.05	<b>0.53</b>	0.48	<b>110</b>	0.02	0.52	0.09	0.09	<b>0.71</b>
T-2	5% NT	0.27	-	0.26	0.31	0.05	<b>0.62</b>	0.53	<b>115</b>	0.10	0.47	0.10	0.08	<b>0.76</b>
T-3	10% NT	0.27	-	0.25	0.27	0.07	<b>0.59</b>	0.48	<b>122</b>	0.09	0.41	0.12	0.08	<b>0.70</b>
T-4	0%	0.27	500	0.19	0.32	0.04	<b>0.56</b>	0.49	<b>113</b>	0.13	0.42	0.14	0.08	<b>0.77</b>
T-5	5% AU	0.27	-	0.22	0.29	0.04	<b>0.59</b>	0.48	<b>116</b>	0.07	0.44	0.11	0.11	<b>0.73</b>
T-6	5% AU	0.27	500	0.25	0.28	0.06	<b>0.59</b>	0.50	<b>119</b>	0.03	0.14	0.04	0.04	<b>0.24</b>
T-7	10% AU	0.27	-	0.18	0.26	0.04	<b>0.49</b>	0.50	<b>96</b>	0.07	0.45	0.09	0.08	<b>0.69</b>
T-8	10% AU	0.27	500	0.21	0.28	0.07	<b>0.56</b>	0.53	<b>105</b>	0.08	0.32	0.09	0.08	<b>0.57</b>

NT: no tractat; AU: autoclau

\* Determinació realitzada colorimètricament pel mètode de molibdo-vanadat (codi 965.17 AOAC, 1990).

Taula 9.4. Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de P<sup>31</sup> en pinsos i continguts intestinals de l' Assaig 4 i recuperació de fòsfor total en els pinsos.

TRT	blat	% FNF	Fitasa afegida (U/kg)	PINSO					CONTINGUTS INTESTINALS					
				FNF (%)	IP <sub>6</sub> (%)	IP <sub>5</sub> (%)	P total (%) RMN	Recuperació Pt (%) colorimètric*	FNF (%)	IP <sub>6</sub> (%)	IP <sub>5</sub> (%)	IP <sub>n</sub> (n<5) (%)	P total (%)	
T-1	no tractat	0.45	-	0.42	0.50	0.10	<b>1.08</b>	0.62	<b>171</b>	0.15	0.41	0.05	0.02	<b>0.63</b>
T-2	no tractat	0.27	-	0.24	0.51	0.10	<b>0.86</b>	0.39	<b>218</b>	0.06	0.41	0.07	0.02	<b>0.55</b>
T-3	no tractat	0.27	500	0.16	0.33	0.07	<b>0.57</b>	0.44	<b>127</b>	0.06	0.29	0.05	0.01	<b>0.41</b>
T-4	no tractat	0.27	5000	0.16	0.30	0.08	<b>0.56</b>	0.44	<b>126</b>	0.07	0.12	0.06	0.03	<b>0.28</b>
T-5	autoclau	0.45	-	0.38	0.41	0.09	<b>0.89</b>	0.65	<b>136</b>	0.16	0.42	0.05	0.01	<b>0.64</b>
T-6	autoclau	0.27	-	0.15	0.26	0.07	<b>0.49</b>	0.44	<b>110</b>	0.02	0.33	0.03	0.02	<b>0.40</b>
T-7	autoclau	0.27	500	0.14	0.32	0.08	<b>0.54</b>	0.45	<b>117</b>	0.06	0.33	0.07	0.02	<b>0.47</b>
T-8	autoclau	0.27	5000	0.13	0.19	0.04	<b>0.38</b>	0.44	<b>84</b>	0.08	0.10	0.06	0.02	<b>0.27</b>

\* Determinació realitzada colorimètricament pel mètode de molibdovanadat (codi 965.17 AOAC, 1990).

Taula 9.5. Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de P<sup>31</sup> en pinsos i continguts intestinals de l'Assaig 5 i recuperació de fòsfor total en els pinsos.

TRT <sup>1</sup>	Fitasa cereal	Enzim afegida (U/kg)	Enzim carbohidrasa (ppm)	PINSO					CONTINGUTS INTESTINALS					
				FNF (%)	IP <sub>6</sub> (%)	IP <sub>5</sub> (%)	P total (%) RMN	Recuperació Pt (%)	FNF (%)	IP <sub>6</sub> (%)	IP <sub>5</sub> (%)	IP <sub>n</sub> (n<5) (%)	P total (%)	
T-1	morenc	-	-	0.22	0.28	0.06	<b>0.55</b>	0.38	<b>146</b>	0.07	0.68	0.09	0.09	<b>0.92</b>
T-2	morenc	500	-	0.17	0.22	0.02	<b>0.40</b>	0.38	<b>106</b>	0.12	0.51	0.08	0.09	<b>0.82</b>
T-3	morenc	-	500	0.21	0.28	0.05	<b>0.54</b>	0.39	<b>137</b>	0.20	0.59	0.09	0.10	<b>0.97</b>
T-4	morenc	500	500	0.22	0.28	0.06	<b>0.56</b>	0.41	<b>135</b>	0.09	0.43	0.09	0.13	<b>0.74</b>
T-5	blat	-	-	0.24	0.27	0.04	<b>0.55</b>	0.47	<b>117</b>	0.13	0.57	0.10	0.10	<b>0.90</b>
T-6	blat	500	-	0.27	0.31	0.04	<b>0.62</b>	0.45	<b>139</b>	0.16	0.39	0.10	0.16	<b>0.81</b>
T-7	blat	-	60	0.24	0.27	0.04	<b>0.55</b>	0.41	<b>134</b>	0.10	0.71	0.08	0.10	<b>0.99</b>
T-8	blat	500	60	0.23	0.23	0.06	<b>0.51</b>	0.45	<b>114</b>	0.15	0.61	0.11	0.13	<b>1.00</b>
T-9	ordi	-	-	0.18	0.22	0.07	<b>0.47</b>	0.43	<b>110</b>	0.07	0.39	0.05	0.07	<b>0.57</b>
T-10	ordi	500	-	0.14	0.22	0.07	<b>0.43</b>	0.43	<b>99</b>	0.09	0.36	0.07	0.07	<b>0.59</b>
T-11	ordi	-	150	0.17	0.28	0.05	<b>0.49</b>	0.42	<b>118</b>	0.07	0.45	0.11	0.09	<b>0.73</b>
T-12	ordi	500	150	0.17	0.27	0.05	<b>0.48</b>	0.42	<b>115</b>	0.01	0.38	0.10	0.13	<b>0.63</b>

<sup>1</sup>Tots els tractaments tenen 0.27% de FNF

\* Determinació realitzada colorimètricament pel mètode de molibdo-vanadat (codi 965.17 AOAC, 1990).

Taula 9.6. Retenció aparent ileal de fòsfor total, fòsfor no fític i IP<sub>6</sub> dels animals emprats en l'assaig 2.

Trt	Ordi	Retenció aparent				
		% FNF	Fitasa afegida (U/kg)	P <sub>total</sub> (%)	FNF (%)	IP <sub>6</sub> (%)
T-1	No tractat	0.45	-	73	94	59
T-2	No tractat	0.27	-	39	62	42
T-3	No tractat	0.27	500	54	99	48
T-4	Autoclau	0.45	-	78	96	66
T-5	Autoclau	0.27	-	51	87	43
T-6	Autoclau	0.27	500	70	84	80

 Taula 9.7. Retenció aparent ileal de fòsfor total, fòsfor no fític i IP<sub>6</sub> dels animals emprats en l'assaig 3.

Trt	Segó*	Retenció aparent				
		% FNF	Fitasa afegida (U/kg)	P <sub>total</sub> (%)	FNF (%)	IP <sub>6</sub> (%)
T-1	0%	0.27	-	57	98	31
T-2	5% NT	0.27	-	60	87	49
T-3	10% NT	0.27	-	69	90	58
T-4	0%	0.27	500	60	80	61
T-5	5% AU	0.27	-	62	90	55
T-6	5% AU	0.27	500	88	96	85
T-7	10% AU	0.27	-	53	87	40
T-8	10% AU	0.27	500	66	86	61

\* NT: No tractat; AU: autoclau

 Taula 9.8. Retenció aparent ileal de fòsfor total, fòsfor no fític i IP<sub>6</sub> dels animals emprats en l'assaig 4.

Trt	Blat	Retenció aparent				
		% FNF	Fitasa afegida (U/kg)	P <sub>total</sub> (%)	FNF (%)	IP <sub>6</sub> (%)
T-1	No tractat	0.45	-	82	90	75
T-2	No tractat	0.27	-	80	92	75
T-3	No tractat	0.27	500	78	89	74
T-4	No tractat	0.27	5000	86	87	89
T-5	Autoclau	0.45	-	80	88	71
T-6	Autoclau	0.27	-	78	97	66
T-7	Autoclau	0.27	500	76	89	72
T-8	Autoclau	0.27	5000	78	81	84

#### **9.4. Referències bibliogràfiques**

- Association of Official Analytical Chemists.** 1990. Official methods of analysis. 15th ed., Assoc. Anal. Chem., Washington D. C.
- de Boland, A. R., G. B. Garner i B. L. O'Dell.** 1975. Identification and properties of "phytate" in cereal grains and oilseed products. *J. Agric. Food Chem.* 23, 1186-1189.
- Cade-Menun, B. J., C. W. Liu, R. Nunlist i J. G. McColl.** 2002. Soil and litter phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy: extractants, metals, and phosphorus relaxation times. *J. Environ. Qual.* 31, 457-465.
- Common, R. H.** 1940. The phytic acid content of some poultry feeding stuffs. *The analyst.* 65, 767, 79-83.
- Eeckhout, W. i M. De Paepe.** 1994. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 47, 19-29.
- Ersöz, A., H. Akgün i N. K. Aras.** 1990. Determination of phytate in turkish diet by phosphorus-31 fourier transform nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 38, 733-735.
- Graf, E. i F. R. Dintzis.** 1982. High-performance liquid chromatographic method for the determination of phytate. *Anal. Biochem.* 199, 413-417.
- Kemme, P. A., A. Lommen, L. H. De Jonge, J. D. Van der Klis, A. W. Jongbloed, Z. Mroz i A. C. Beynen.** 1999. Quantification of inositol phosphates using  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy in animal nutrition. *J. Agric. Food Chem.* 47, 5116-5121.
- Lehrfeld, J.** 1989. High-performance liquid chromatography analysis of phytic acid on a pH-stable, macroporous polymer column. *Cereal Chem.* 66, 510.
- Oberleas, D.** 1971. The determination of phytate and inositol phosphates. *Methods Biochem. Anal.* 20, 87-101.
- O'Neill, I. K., M. Sargent i M. L. Trimble.** 1980. Determination of phytate in foods by phosphorus-31 Fourier transform nuclear magnetic resonance spectrometry. *Anal. Chem.* 52, 1288-1291.

- Reddy, N.K., M. D. Pierson, S.K. Sathe i D.K. Salunkhe.** 1989. Phytates in cereals and legumes. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Sandberg, A. S. i R. Ahderinne.** 1986. HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates in foods and intestinal contents. *J. Food Sci.* 51 (3), 547-550.
- Schlemmer, U, Kl. D. Jany, E. Schulz, C. Wecke i G. Rechkemmer.** 1997. Degradation of phytic acid during gastrointestinal passage in pigs and broilers. En: *Book of Abstracts of Bioavailability'97*. Wageningen, Holanda. pp.123.
- Skoglund, E., N. G. Carlsson i A. S. Sandberg.** 1997a. Determination of isomers of inositol mono- to hexaphosphates in selected foods and intestinal contents using high-performance ion chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 45, 431-436.
- Skoglund, E., T. Larsen i A. S. Sandberg.** 1997b. Comparison between steeping and pelleting a mixed diet at different calcium levels on phytate degradation in pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 77, 471-477.
- Soonchanrernying, S. i H. M. Edwards jr.** 1993. Phytate content of excreta and phytate retention in the gastrointestinal tract of young chickens. *Poult. Sci.* 72, 1906-1916.
- Ravindran, V., W. L. Bryden i E. T. Kornegay.** 1995. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Biol. Rev.* 6 (2), 125-143.

## **DISCUSSIÓ GENERAL**



Tal com s'ha descrit en el principi d'aquesta memòria, s'han realitzat cinc assaigs per tal d'establir l'acció de l'enzim fitasa sobre la molècula d'àcid fític en pollastres d'engreix o broilers. Els assaigs realitzats s'han efectuat amb diferents cereals, però intentant mantenir el màxim possible les mateixes condicions, per poder comparar els resultats obtinguts de manera global. Seguint els resultats obtinguts en el primer assaig, es va modificar la quantitat d'ús habitual de l'enzim fitasa microbiana afegit a les dietes, que fins al moment era de 600 U per quilo de pinso, per passar a utilitzar-ne 500 U/kg, ja que semblava ser la quantitat idònia a subministrar sense haver una disminució del creixement animal, tal com es descriu en l'apartat 4.4 de l'assaig 1. Habitualment, s'utilitzaven 600 unitats de fitasa per quilo de pinso ja que era tal com estava definit per a dietes de morenc i soja (recomanada per fabricant). En el primer estudi es va realitzar l'avaluació amb dietes de blat ja que calia estudiar la dosi més apropiada en aquest tipus de dietes.

També es va realitzar un assaig metodològic, la determinació dels fosfats d'inositol per RMN, per comprovar els resultats obtinguts en els diferents experiments, i fer un anàlisi de la degradació del fosfat d'inositol en el tracte digestiu.

La inclusió de fitasa a les dietes de broilers deficients de fòsfor no fític va produir millores en el creixement animal, aconseguint-se animals amb un pes superior i un consum no massa més elevat, per la qual cosa, i en general en tots els cereals emprats, no hi hagué canvis importants en l'índex de transformació. En la Figura 10.1, es mostra una gràfica on es pot apreciar la diferència de pes final entre els animals utilitzats en l'assaig 2 i l'assaig 4. Les diferències en tot moment es troben per sobre dels 100 grams, essent majors per les dietes de blat. Encara que això ens pogués indicar que aquestes dietes podrien donar millors resultats que les d'ordi, molt segurament la diferència vindrà donada per la genètica dels pollastres emprats. L'assaig 2 es va dur a terme a principis de l'any 2001, mentre que l'assaig 4 es realitzà a començaments de 2003. Tot i utilitzar en ambdós casos pollastres d'engreix Ross 308, les millores en la genètica de l'animal realitzats en l'interval de

temps comprès entre les dues proves, ha fet que els animals siguin millors, i puguin aprofitar d'una manera més òptima el pinso que se'ls dona.

El cinquè experiment efectuat ens permet comparar el creixement animal en els diferents cereals emprats en tot aquest estudi, malgrat que aquest experiment estava dissenyat per l'estudi de les interaccions entre els enzims sobre l'energia de les dietes. Les dades obtingudes fan pensar que les dietes amb ordi eren les millors, ja que permetien obtenir animals amb paràmetres productius superiors.

A part del tipus de dieta, hi ha un altre factor que influeix en aquest experiment. Per tal de que els tres tipus de dietes fossin iguals en termes energètics, les dietes de blat i ordi tenien major quantitat de greix afegit, especialment en el cas de la dieta d'ordi, que en el cas del morenc era quasi despreciable. Tal com s'ha anat dient en la memòria, aquest greix és més disponible, cosa que facilita el creixement animal.

Si es comparen la resta dels quatre assaigs, que són més semblants i estan dissenyats similarment, es pot dir que les millores més grans en el pes es van produir pels animals que menjaren dietes de morenc (assaig 1, assaig 3) i ordi (assaig 2). Les proves fetes amb les dietes que contenien blat no donaren resultats significatius (assaig 1) o ho feren de tal manera que no s'assoliren els resultats dels controls positius (assaig 4), cosa que sí passà amb els altres casos.

En la bibliografia, s'han descrit millores en el creixement gràcies a l'addició de fitasa a dietes deficientes de fòsfor, independentment del cereal utilitzat, tant en porcs (Peter i col., 2001; Shelton i col., 2003; Torrallardona i col., 2003) com en pollastres (Gheisari i col., 2003; Shirley i Edwards, 2003; Onyango i col., 2004; Wu i col., 2004). Alguns autors, com Sebastian i col. (1996), han tractat d'explicar les millores observades en pollastres que menjaren fitasa. Aquests autors creuen que poden haver algunes explicacions a aquest fet: 1) l'alliberament de minerals del complex fitat-mineral i 2) la utilització de l'inositol pels animals, tal com suggereixen Simons i col (1990) o 3) un increment en la digestibilitat de midó, tal com comenten Knuckles i Betschart (1987) o 4) un augment en la disponibilitat de les proteïnes (Cowieson i col., 2003).

Un paràmetre relacionat amb el creixement és el corresponent a l'energia. L'EMA va augmentar per efecte de la fitasa en bona part de les proves realitzades, amb independència del cereal emprat, ja sigui ordi (assaig 2, però no en el 5) i morenc (assaig 3 i 5, però no en l'1). L'únic cereal en què la fitasa no produí valors d'energia més elevats va ser el blat, doncs no es produïren en cap dels tres experiments en què va ser emprat. La major activitat fitàsica endògena del blat, que és la més gran dels tres cereals emprats, podria ser una explicació d'aquest fet. Com s'ha anat dient en els diferents assaigs, la fitasa permet una millor utilització no només de minerals, si no d'altres nutrients com la proteïna o el midó, nutrients amb una contribució energètica important. Un nutrient important implicat en l'energia de les dietes és el greix. En el nostre estudi, per mantenir les dietes isoenergètiques, va afegir-s'hi més o menys greix en la formulació del pinso. En haver més greix, podria ser utilitzat per la seva digestibilitat, i consegüentment pot ser usat per l'energia, però una part, que estaria en excés, podria constituir complexos insolubles ja que els àcids grassos poden intervenir en la formació de complexos amb el fitat i el calci. (Ravindran i col., 2000).

Al moment de comparar entre les diferents proves, s'ha de tenir en compte que no totes estan formulades per a tenir la mateixa energia, ja que les dietes de morenc de l'assaig 1 estan formulades a 12.9 MJ/kg i la resta a 12.5 MJ/kg. Es pot observar en la Figura 10.1 la gràfica corresponent a l'EMA, on les dietes de blat emprades en la prova 4 van donar valors més alts que les dietes d'ordi de la prova 2, i que en ser tan elevades no presenten diferències per l'addició de la fitasa.

Els mecanismes pels quals s'aconsegueixen millores en l'energia no estan clars, ja que no depenen només dels guanys que puguin observar-se en les digestibilitats de proteïna i aminoàcids (Ravindran, 1999), si no que també hi ha té gran influència el fòsfor disponible, en ser un mineral molt lligat a que hi hagi un major o menor consum de pinso.

Per tal d'estudiar la millor mineralització dels ossos dels pollastres d'engreix degut a l'addició de la fitasa microbiana en dietes deficientes de fòsfor es va mesurar el percentatge de cendres en els dits. Altres autors (Adrizal i Sell, 1996; Applegate i col., 2003; Gheisari, 2003; Payne i Southern, 2003;

Onyango i col., 2004) usen la mesura de les cendres de la tibia, però en els nostres treballs hem pogut comprovar que la utilització dels dits com a mesura de la biodisponibilitat de fòsfor és una bona eina, que corroborarien els resultats trobats en la bibliografia (Cabahug i col., 1999; Rama Rao i Ramasubba Reddy, 2003; Wu i col., 2003; Zyla i col., 2003). Ja Fritz i Roberts (1968) comenten que la mesura de la calcificació en pollastres es pot fer tant per les cendres dels dits com per les de la tibia, i que l'avantatge que presenta el càlcul amb els dits és que és molt més ràpid i fàcil de fer.

En la gràfica comparativa dels resultats de cendres dels dits dels animals utilitzats en l'assaig 2 i 4 (Figura 10.1), pot veure's com l'addició de la fitasa microbiana augmenta la concentració, malgrat que en cap dels dos casos s'arriba als valors que es tenien pels animals que menjaren dietes que complien els requeriments de fòsfor. L'addició d'una dosi molt elevada (5000 U/kg) en l'assaig 4 va fer que la concentració augmentés d'una manera poc important. En els assaigs 1 i 3, en què també s'estudià aquest paràmetre, es van obtenir resultats en el mateix sentit. Aquest augment de la concentració de cendres gràcies a la fitasa microbiana afegida ens indicarà que els animals presentaran una millor mineralització, com a conseqüència d'una millor retenció i utilització dels minerals. Així la fitasa afegida pot evitar problemes de malformació o deformació, com la discondroplasia tibial (Yalçin i col., 2000), que es produeixen pel fet de disminuir el nivell de fòsfor disponible. Aquests problemes es veuen especialment en aus que mengen dietes deficientes de fòsfor i de més dies de vida, tot i que als 21 dies d'edat (temps de finalització de totes les nostres proves) ja comencen a aparèixer.

La concentració de fòsfor no fític en el plasma dels animals estudiats en els experiments 2, 3 i 4 va augmentar després de l'addició de fitasa microbiana a les dietes. Com a contrapartida, la concentració de calci va disminuir, encara que en l'experiment 4 el resultat no va ser significatiu. La disminució de la concentració plasmàtica de calci en augmentar la de fòsfor no fític de la sang està ben demostrada (Orban i col., 1999; Landsman i col., 2001) i està àmpliament relacionada amb el metabolisme dels dos minerals i la seva relació amb la concentració de vitamina D3, el seu vitàmer 1,25-dihidroxicolecalciferol i l'hormona paratiroidea (Bondi, 1988). Nivells baixos de fòsfor en la

dieta augmenta la circulació de 1,25-dihidroxicolecalciferol i, si també hi ha nivells baixos de calci en la dieta, fan augmentar la utilització del fòsfor fític (Orban i col., 1999). Sebastian i col. (1996) també relacionen l'increment de calci en plasma quan disminueix el fòsfor de la dieta a un augment en la concentració de Ca ionitzat en el plasma, que redueix l'alliberament de l'hormona paratiròida; llavors, disminueix la inhibició de l'hormona sobre la reabsorció de fosfat i permet l'excreció urinària del Ca addicional absorbit de l'intestí durant el consum de dietes deficientes de fòsfor (Taylor i Dacke, 1984). A banda d'això, l'augment s'esdevé també per la major quantitat de fòsfor no fític que circula en el metabolisme després de l'acció de la fitasa, tal com ja s'ha descrit anteriorment en aquesta memòria.

En l'assaig 4, també es va avaluar la concentració plasmàtica de ferro i zinc, no obtenint-se diferències en cap dels tractaments avaluats, la qual cosa estaria d'acord amb altres autors (Roberson i Edwards, 1994; Sebastian i col., 1996). Roberson i Edwards suggereixen que un nivell adequat de Zn en les dietes seria responsable del fet de no observar-se efectes significatius en el Zn del plasma.

La retenció aparent de fòsfor total ha estat millorada en tots els casos estudiats. Un dels objectius d'aquest treball consistia en confirmar els efectes de l'enzim sobre aquest paràmetre, que ja se sabia que eren beneficiosos, augmentant la retenció i disminuint l'excreció del fòsfor (Jongbloed i col., 1990; Ravindran i col., 1995; Kornegay, 1999; Ravindran i col., 2001; Applegate i Angel, 2003). Els nostres resultats confirmarien els obtinguts fins al moment per altres autors, inclús poden ajudar a comprendre'ls, ja que en utilitzar diferents cereals permet veure com varien depenent de l'utilitzat en cada moment. En l'assaig 5, on s'utilitzaren cereals amb diferent quantitat de fitasa endògena, pot observar-se com l'enzim afegit permet millorar molt la retenció de fòsfor total en dietes amb *moresc*, que té una activitat fitàsica quasi nul·la, mentre que l'increment en els altres casos és lleugerament inferior, doncs per si sols ja presenten una bona retenció. Aquests resultats queden corroborats en els assaigs 2 i 4, on amb l'ús de fitasa microbiana en dietes d'ordi i blat es mostren

petits increments en la retenció, malgrat que el canvi més important es troba degut a la reducció de la concentració de fòsfor no fític de la dieta. En disminuir el fòsfor no fític present en la dieta, s'augmenta la retenció, resultats que s'obtenen encara que no s'afegeixi fitasa exògena. Aquesta és una qüestió descrita per molts autors (Cabahug i col., 1999; Punna i Roland, 1999; Wu i col., 2003; Rutherford i col., 2004), no tenint una explicació molt clara. Teòricament, en haver menys fòsfor no fític en la dieta, la quantitat que s'utilitza és major, i, la quantitat que s'excreta menor. Però, el que pot passar és que s'utilitza una quantitat similar en tots els casos, quantitat que en valor relatiu serà major quan hi ha menys fòsfor no fític en la dieta. En la part dedicada a la determinació dels fosfats d'inositol per RMN, en les taules 9.6, 9.7 i 9.8, es calculen les retencions ileals de fòsfor no fític dels assaigs 2, 3 i 4, respectivament. En les taules esmentades pot veure's com, en la major part dels casos estudiats, la retenció del fòsfor no fític és molt similar, i quan el valor és més baix es deu segurament a errors de la metodologia i a la manca de rèpliques. Com ja s'ha dit abans en l'apartat 9.3, la retenció de fòsfor total està més íntimament lligada amb la retenció del fòsfor fític que no pas amb la del fòsfor no fític, ja que les variacions observades en el fòsfor fític es veuen reflectides en el fòsfor total.

La disminució de fòsfor no fític de la dieta queda més remarcada pel que fa a la ingesta i l'excreció de fòsfor. En global, hem pogut observar com no hi ha grans diferències per l'addició de fitasa microbiana en la ingesta, només observant-se alguna excepció en el tercer assaig. Aquest assaig que consistia en dietes de morenc i soja amb addició de segó de blat tractat o no amb l'autoclau i amb tots els pinsos contenint la mateixa concentració de fòsfor no fític, ja mostra variacions en el consum de pinso. Per tant, és de suposar que les variacions trobades seran degudes a la major quantitat de pinso ingerida que no al fet de tenir més o menys fòsfor. Com era d'esperar els tractaments dels assaigs amb menor quantitat de fòsfor no fític, i per extensió de fòsfor total, presenten una menor excreció d'aquest mineral. La fitasa microbiana que s'ha afegit a la dieta no ha influït o ho ha fet poc en aquest paràmetre.

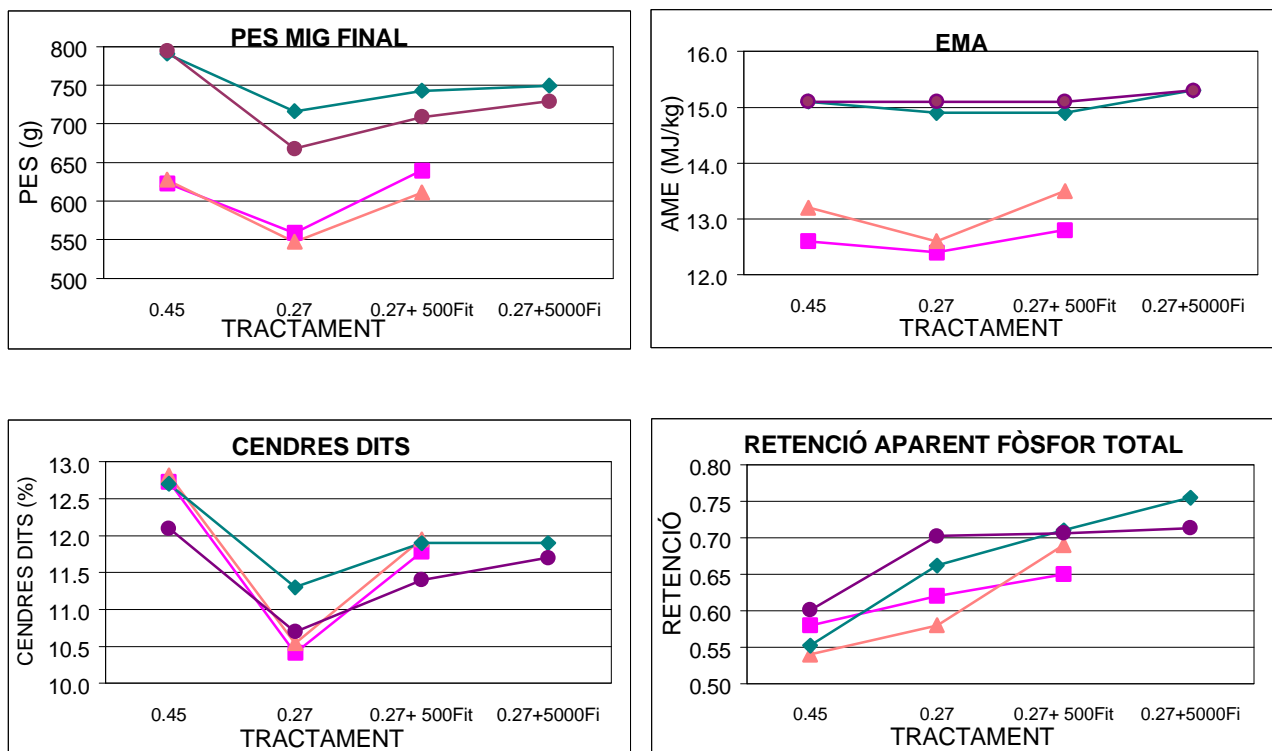
Pel que fa a la resta de minerals, l'acció de la fitasa dona resultats divergents. Pel calci, l'addició de l'enzim permet que hi hagi una major retenció sense que s'hagi observat grans variacions en les ingestes. L'excreció d'aquest mineral ha donat resultats molt diferents, ja que en algun assaig disminuïa (assaig 2 i dietes de moresc de l'assaig 5) i en d'altres no variava. Aquesta variabilitat de resultats està directament lligada a la relació entre el calci i el fòsfor. Alguns autors descriuen aquesta relació respecte al fòsfor total (Qian i col., 1997) mentre que altres ho fan respecte a l'no fític (Huyghebaert, 1996a, b; Rama Rao i col., 2003). Sigui quin sigui, el tipus de fòsfor emprat sembla ser que la relació Ca:P més adequada es troba entre 1:1 i 2:1 (Dieckmann i col., 2002), observant-se resultats contraris al que serien d'esperar quan s'usa valors inferiors o superiors a aquesta relació. La relació Ca:P a part de tenir influència en la mineralització també en tindrà en el creixement. En el nostre estudi hem utilitzat diferents relacions Ca:P no fític, 2:1 (assaig 4) i 3:1 en la resta d'assaigs en les dietes deficientes, i de 2.4:1 en les dietes amb un nivell recomanat de fòsfor no fític. El fet que l'assaig 4 tingués una relació menor comparada a la resta, podria haver contribuït als resultats millors en termes de creixement i energia, tal com es pot veure en la Figura 10.1, a banda de l'explicació ja donada de la millora genètica dels animals.

Una explicació de la no diferència en la retenció de calci, observada en alguns dels assaigs efectuats, podria ser que el major contingut de calci respecte al fòsfor en les dietes baixes en fòsfor causaria un augment en el pH intestinal i reduiria la fracció soluble dels minerals (Shafey, 1993) o que està relacionat amb una mobilització de l'os per mantenir el P del sèrum i excretar l'excés de Ca, Mg i Zn (Viveros i col., 2002).

S'estan realitzant estudis amb mètodes alternatius per a millorar la utilització de P i altres minerals. Un d'aquests mètodes és l'aplicació conjunta de fitasa i d'àcids orgànics, en alguns treballs que s'estan realitzant en el nostre grup o en treballs publicats per altres autors (Porres i col., 2001; Valencia i Chavez, 2002; Brenes i col., 2003; Omogbenigun i col., 2003). Amb l'acció combinada de la fitasa i els àcids orgànics (cítric, acètic) hi ha una disminució del pH gàstric i una estimulació de l'activitat pepsina i proteases pancreàtiques (Valencia i Chavez, 2002). Jongbloed i col. (2000)

van descriure en porcs un efecte sinèrgic dels àcids orgànics i la fitasa microbiana per a cendres i la digestibilitat aparent de P i Mg. Brenes i col. (2003) van observar que l'addició de fitasa i àcid cítric en pollastres millorava la utilització mineral, encara que la presència sola d'àcid cítric reduï a el creixement. Aquests estudis han de servir per aprofundir més en el coneixement de la utilització de minerals, entre ells el fòsfor, per a poder acabar d'establir el mecanisme d'acció de la fitasa i poder concretar encara més el lloc d'acció de l'enzim, i així intentar optimitzar els resultats productius.

Figura 10.1. Gràfiques comparatives del pes mig final, energia metabolitzable aparent, percentatge de cendres dels dits i retenció aparent de fòsfor total entre els resultats obtinguts en l'assaig 2 (ordi sense tractar —■—; ordi autoclau —▲—) i l'assaig 4 (blat sense tractar —◆—; blat autoclau —●—).



Amb l'addició de fitasa microbiana s'han produït resultats disperss i sorprenents per la retenció d'altres minerals estudiats. En alguns treballs (Sebastian i col., 1996; Mohanna i Nys, 1999) s'han descrit valors negatius de la retenció de minerals com el zinc. En els nostres assaigs 1 i 4, es va realitzar paral lelament a aquest treball, una avaluació de la retenció d'aquest mineral. Els resultats que s'obtingueren estan d'acord amb el que deien els de la bibliografia, amb valors negatius de la

retenció, valors que milloraven, sense deixar de ser negatius en algun cas, després de l'addició de la fitasa microbiana. Des d'un punt de vista de l'animal, no és fàcil d'entendre aquests resultats. Una retenció negativa significa que l'animal excreta més mineral que no pas ingereix, el qual ja acostuma a estar en excés, degut a què s'afegeix amb el corrector mineral que es posa al pinso. És de pensar que hi han pèrdues endògenes del mineral, pèrdues que no són el suficientment importants per produir malalties greus per l'animal degut a la seva deficiència. En aquests tipus de proves, hem utilitzat el  $\text{TiO}_2$  com a marcador de digestibilitats. Podria passar que el marcador i el mineral estudiat (el zinc) tinguin una diferent velocitat de trànsit intestinal, i que, en el moment de recollir l'excreta, el zinc no hagi acabat de passar pel tub digestiu.

Un altre aspecte important de l'estudi desenvolupat ha estat l'avaluació dels efectes de la fitasa endògena de les matèries primeres emprades en la formulació dels pinsos. Aquesta valoració s'ha fet mitjançant l'eliminació de la fitasa endògena per tractament tèrmic en cereals com ordi i blat, i amb un subproducte de farinera del blat com és el segó de blat, amb una elevada activitat fitàsica. En els tres casos en què s'ha efectuat aquest tractament per autoclau, primerament es va fer un estudi de les condicions i de l'efectivitat del processament. Cal dir que encara que les condicions emprades en cada cas fossin diferents, aquestes no depenien del tipus de matèria primera, ja que sempre es van fer servir temperatures superiors als valors establerts com a òptims de l'enzim fitasa (60-90°) (Reddy i col., 1989; Jongbloed i Kemme, 1990; Viveros i col., 2000), i superiors a 100°C, si no que depenien de l'aparell utilitzat. Els temps utilitzats sempre van ser propers als 10-15 minuts, per assegurar-se l'eliminació total de l'enzim.

El procés tèrmic d'eliminació de la fitasa endògena va tenir efectes nuls o negatius sobre el creixement dels animals. Els animals de l'assaig 2, que menjaren dietes d'ordi, no van veure modificat el seu pes ni el consum, i, a més, van presentar un índex de transformació significativament més elevat. Els animals que menjaren les dietes de moresc, soja i segó de blat (assaig 3) i de blat (assaig 4) amb el cereal passat per autoclau van tenir creixements inferiors respecte als animals que menjaren pinso amb cereal sense tractar. En la Figura 10.1 es pot veure

clarament la diferència de pesos entre els animals que menjaren blat no tractat i blat tractat, pel cas de l'assaig 4, i que arribà a ser fins de 50 grams per les dietes amb 0.27% de FNF i sense fitasa exògena afegida.

Les viscositats intestinals dels animals d'aquests assaigs van presentar uns resultats completament inversos als del creixement. Els valors dels experiments 3 i 4 no variaren i els de l'experiment 2 van augmentar de manera molt dràstica. Cal dir que en l'experiment 4 era d'esperar que no variessin, doncs es va posar xilanasa en la dieta i aquest enzim contraresta els efectes negatius de la presència de PNA en el blat, sense que hi hagi interaccions amb la fitasa (assaig 5).

Es pot dir que la resta de paràmetres analitzats i estudiats (energia, mineralització i retenció) no van canviar per l'eliminació de la fitasa endògena de les diferents matèries primeres. L'únic paràmetre que sí que va canviar, i ho féu amb una lleugera reducció, va ser la concentració de fòsfor no fític en el plasma dels animals de la prova 3. Amb l'eliminació de la fitasa endògena del segó de blat, les dietes que eren deficientes de fòsfor van quedar amb una activitat fitàsica quasi bé nul·la, per la qual cosa no és possible d'aprofitar millor el fòsfor, però també tal com s'ha dit en el capítol 6 (assaig 3) el tractament tèrmic del segó de blat ha fet que l'estructura del fitat es veïés modificada sense arribar-se a trencar, i dificultant l'absorció del fòsfor en la sang.

Hem pogut veure, gràcies a l'estudi realitzat per RMN dels continguts de diferents seccions del tub digestiu dels animals de l'assaig 2, com l'acció de la fitasa es realitza en el tracte alimentari de l'animal. Aquests resultats estan d'acord amb els que van obtenir Nelson i col. (1971), qui per confirmar-ho diuen que la fitasa no actua en l'aliment abans de ser ingerit, independentment de l'activitat fitàsica que presentin les matèries primeres usades. L'activitat fitàsica pot variar segons les condicions d'emmagatzematge de la matèria primera (Eeckhout i De Paepe, 1994; Centeno i col., 2001). Les condicions de temperatura i de humitat a què estan conservades les matèries primeres són factors que poden influir. A més, és ben conegut que la concentració de fòsfor de les matèries primeres es diferent en funció si són cereals, subproductes o llegums (Kirby i Nelson, 1988; Viveros i col., 2000). La diferent localització del fitat i de la fitasa dins del gra també en pot

ser una causa. El fitat és sintetitzat i dipositat durant el desenvolupament de la llavor en regions dites globòides (o també partícules de l'aleurona), mentre que la fitasa es troba localitzada en varis llocs dins del gra dependent de quin es tracti. Així, en el blat no germinat la fitasa es troba associada en un 34% en l'endosperma i un 40% en el teixit de l'aleurona; mentre que en l'ordi es troben en fines estructures al voltant de la capa de l'aleurona (Reddy i col., 1989).

D'aquí es pot extreure que l'eliminació de la fitasa endògena no ha repercutit en el creixement dels animals o en la digestibilitat i retenció de nutrients pels pollastres d'engreix que menjaren dietes deficientes de fòsfor. El procés es va dur a terme per comparar-lo amb els varis processos que impliquen una temperatura elevada i que pot sofrir un pinso en la seva fabricació, com per exemple la granulació. Sembla ser que és indiferent la quantitat de fitasa endògena de la matèria primera, ja que sembla tenir poca activitat dins l'animal. Cal recordar que la fitasa dels vegetals és la 6-fitasa, per la qual cosa sembla que es pot dir que aquesta forma de l'enzim és poc activa dins el tub digestiu de l'animal, essent més activa per tal de millorar tots els paràmetres estudiats la forma 3-fitasa, procedent dels microorganismes i que és la que afegim en la dieta. A més, la fitasa comercial presenta una protecció especial que li permet aguantar les altes temperatures de la granulació i els medis àcids de la primera part del sistema digestiu (López Álvarez, 2002).

Zimmermann i col. (2002) en un estudi amb porcs alimentats amb dietes deficientes de fòsfor de blat i de sègol en les qual tenien fitasa endògena inactivada i/o s'afegia fitasa microbiana, van comprovar com l'eficàcia de la fitasa del cereal era del 40% vers la fitasa microbiana provada i que, per tant, que es necessitaria 2.5 U de fitasa cereal de blat o sègol per reemplaçar 1 U de fitasa microbiana.

La determinació dels fosfats d'inositol per RMN pot aportar una molt bona ajuda quant a l'anàlisi d'aquests compostos, podent realitzar-se en qualsevol mostra, ja siguin pinsos, continguts del tub digestiu o excretes. Una de les principals causes que podrien fer d'aquesta una tècnica molt útil seria la de poder determinar el fòsfor no fític al mateix temps que el fòsfor en forma de fitat. A més,

els patrons, tant intern com extern, són productes fàcilment assequibles, per la qual cosa tampoc encareix o dificulta la utilització de RMN. La tècnica de RMN de  $P^{31}$  és més selectiva que el mètode HPLC emprat per a la determinació dels fosfats d'inositol, ja que aquesta utilitza un detector d'índex de refracció, que es un dels mes universals.

Un desavantatge d'aquesta tècnica és que no és fàcil de tenir un aparell de RMN per a realitzar la mesura, tant pel seu cost econòmic, com per l'espai que ocupa i les condicions d'al·liment que requereix. A un laboratori pot no compensar-li fer una gran despesa com aquesta per la realització de poca quantitat de mesures. Un altre inconvenient per la utilització d'aquesta metodologia pel que fa a avaluar les retencions dels fosfats o l'excreció és la quantitat de mostra que es requereix. Segons el mètode descrit per Kemme i col. (1999) s'extreuen 3 grams de mostra en HCl. Però, per exemple en el nostre cas per obtenir 3 grams de continguts intestinals hem hagut d'ajuntar les mostres de tots els lots, perdent la possibilitat de fer rèpliques i, d'aquesta manera, reproduir els resultats o poder analitzar-los estadísticament.

Deixant de banda aquestes qüestions, s'ha pogut comprovar que la tècnica de RMN de  $P^{31}$  és una bona eina, permetent-nos, en alguns casos, donar informació complementària respecte a l'aportada per les dades obtingudes directament per la digestibilitat. Abans, però, és també important realitzar una bona extracció, separació i eliminació de metalls quelats, ja que ions com el Fe i el Mn, ions paramagnètics, poden incrementar l'ample de línia i escurçar el temps de relaxació degut al fort camp magnètic dels seus electrons desaparellats (Cade-Menun i col., 2002), amb una saturació de pics, solapant-se i no fent-los visibles.

En el cinquè assaig, es va avaluar les possibles interaccions entre la fitasa i enzims que s'afegeixen de manera habitual en les dietes per tal de contrarestar alguns factors antinutritius. En el nostre cas, es va estudiar les relacions entre la fitasa i els enzims carbohidrasa degradadors dels polisacàrids no amilacis. Aquests tipus de polisacàrids poden augmentar la viscositat de la bola alimentària, fent reduir el contacte entre el menjar i els enzims digestius i alenteix la presa en l'intestí dels sucres,

aminoàcids i lípids que provenen de la digestibilitat dels nutrients majors (Chesson, 2001). També sembla que incrementar la viscositat de la digesta provoca una proliferació bacteriana (Pérez-Moya i col., 2000) que va en detriment tant de l'eficiència digestiva com de la salut de l'animal (Choct i col., 1996). Ambdós tipus d'enzims, malgrat ser específics (pel fòsfor la fitasa, pels PNA les carbohidrases), produeixen millores en la digestibilitat de nutrients, i per això, se'n va avaluar els efectes de l'aplicació conjunta.

En general, no s'ha vist que aquest enzims tinguin interaccions negatives. Les interaccions trobades són de caràcter positiu, i es donen especialment en la retenció i excreció de minerals. Com ja s'ha dit en els apartats 8.3 i 8.4, l'únic paràmetre productiu afectat per una interacció negativa és l'índex de transformació pels animals que menjaren dietes de moresc. Molt probablement, la significància en la interacció és com a conseqüència que aquest paràmetre és la relació entre el consum de pinso i el pes de l'animal, i, per tant, pot estar relacionat amb l'acumulació dels errors dels paràmetres relacionats. Els resultats obtinguts per les dietes de blat, en què no s'observen millores substancials per l'addició de la fitasa i la xilanasa, no estarien totalment d'acord amb els obtinguts per Wu i col. (2004). Aquests autors afegint els dos enzims en dietes amb nivells adequats de fòsfor, no van trobar millores respecte a l'addició individual de cada enzim, encara que els resultats fossin millors que el control sense enzim. Els nostres resultats serien més similars als de Ravindran i col. (1999) i Zyla i col. (1999), que amb la combinació de fitasa i xilanasa no van obtenir efectes beneficiosos en el creixement del broiler. Wu i col (2004) addueixen que el fet que ells obtinguin resultats diferents sigui degut al procés d'obtenció de la fitasa, obtinguda per fermentació en estat sòlid, i que implica que tenen un contingut relativament alt de xilanasa i  $\beta$ -glucanasa.

Bona part de les interaccions entre els enzims es van trobar en avaluar la relació entre la fitasa i la  $\beta$ -glucanasa en les dietes d'ordi, produint-se en la retenció de fòsfor total i calci i en l'excreció de calci. Seguint el càlcul realitzat per Little (1981), es va obtenir la importància biològica de la interacció, que ens permet tenir una idea de la magnitud que pot tenir la presència dels dos enzims conjuntament per sobre de cada enzim per individual. Els valors obtinguts, entre el 39 i el 60%, són

molt elevats, fent-nos pensar que la interacció és molt forta. L'addició dels dos enzims conjuntament va fer augmentar la retenció dels dos minerals i disminuir l'excreció, tal com es pot veure en la Taula 8.11, en canvi, l'aplicació individual de cada enzim va tenir efectes ben diferents. No és prou clara la forma actuació conjunta dels dos enzims, ni com pot afectar la presència d'un respecte a l'altre, però sembla clar que la presència d'ambdós enzims influeix positivament en la productivitat i la digestibilitat en broilers que menjaren dietes deficientes de fòsfor.

La inclusió de 500 U de fitasa per quilo de pinso de dietes deficitàries de fòsfor aportarà avantatges respecte la utilització energètica i mineral sense repercussió en el creixement de l'animal respecte a les dietes control. S'ha vist que incloure una dosi més alta (5000 U/kg) pot permetre una optimització en els resultats referents a la retenció de minerals i a una major energia, tal com descriu Rosen (2003), qui diu que l'eficiència d'un enzim s'ha de fer amb estudis amb increments logarítmics de la dosi aplicada. En estudis posteriors, s'hauria d'acabar de concretar quina és la millor dosi de fitasa a afegir en les dietes deficientes de fòsfor, per tal de obtenir resultats òptims a nivell de recerca, amb independència dels aspectes econòmics (com el cost de la inclusió de l'enzim en la dieta); i també buscar els valors d'equivalència entre la fitasa i el fòsfor no fític per diferents matèries primeres, en funció de l'activitat fitàsica endògena que presenten. Seria recomanable seguir estudiant els efectes de la fitasa endògena de les matèries primeres, especialment en aquelles que presenten una major activitat, buscant l'eficàcia d'aquest enzim respecte la microbiana.

**Referències bibliogràfiques.**

- Adrizal, P. E. P. i J. L. Sell.** 1996. Utilization of defatted rice bran by broiler chickens. *Poult. Sci.* 75, 1012-1016.
- Applegate, T. J. i R. Angel.** 2003. Issues related to phytase and soluble phosphorus. *Poultry Digest Online.* 3, (10) 1-11.
- Applegate, T. J., R. Angel i H. L. Classen.** 2003. Effect of dietary calcium, 25-hydroxycholecalciferol, or bird strain on small intestinal phytase activity in broiler chickens. *Poult. Sci.* 82, 1140-1148.
- Bondi, A. A.** 1988. *Nutrición Animal.* Ed. Acribia, S.A. Saragossa, Espanya.
- Brenes, A., A. Viveros, I. Arija, C. Centeno, M. Pizarro i C. Bravo.** 2003. The effect of citric acid and microbial phytase on mineral utilization in broiler chicks. *Anim. Feed Sci. Tech.* 110, 201-219.
- Cabahug, S., V. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 1999. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus contents. I. Effects on bird performance and toe ash. *Brit. Poultry Sci.* 40, 660-666.
- Cade-Menun, B. J., C. W. Liu, R. Nunlist i J. G. McColl.** 2002. Soil and litter phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy: extractants, metals, and phosphorus relaxation times. *J. Environ. Qual.* 31, 457-465.
- Centeno, C., A. Viveros, A. Brenes, R. Canales, A. Lozano i C. De la Cuadra.** 2001. Effect of several germination conditions on total P, phytate P, phytase, and acid phosphatase activities and inositol phosphate ester in rye and barley. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3208-3215.
- Chesson, A.** 2001. Non-starch polysaccharide degrading enzymes in poultry diets: influence of ingredients on the selection of activities. *World's Poultry Science Journal.* 57, 251-263.
- Choct, M., R. J. Hughes, J. Wang, M. R. Bedford, A. J. Morgan i G. Annison.** 1996. Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. *Brit. Poultry Sci.* 37, 609-321.

- Cowieson, A. J., T. Acamovic i M. R. Bedford.** 2003. Phytic acid and the implications for protein utilisation by poultry. *Brit. Poultry Sci.* 44, (Suppl. 1) S36-S37.
- Dieckmann, A., R. Timmler i M. Rodehutsord.** 2002. Investigation on the optimal Ca:P ration in studies on P availability in broiler chicken. 11th European Poultry Conference. 1-4.
- Eeckhout, W. i M. De Paepe.** 1994. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 47, 19-29.
- Fritz, J. C. i T. Roberts.** 1968. Use of toe ash as a measure of calcification in the chick. *J. AOAC Int.* 51, (3) 591-594.
- Gheisari, A., R. Bahadorani i J. Pourreza.** 2003. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and phytate phosphorus availability of corn-wheat-soybean meal diet in broiler chicks. 14th European Symposium of Poultry Nutrition. 42-44.
- Huyghebaert, G.** 1996a. Effects of dietary calcium, phosphorus, Ca/P-ratio and phytase on zootechnical performances and mineralisation in broiler chicks. *Arch. Geflügelkd.* 61, (2) 53-61.
- Huyghebaert, G.** 1996b. The response of broiler chicks to phase feeding for P, Ca and phytase. *Arch. Geflügelkd.* 60, (3) 132-141.
- Jongbloed, A. W. i P. A. Kemme.** 1990. Effect of pelleting mixed feeds on phytase activity and the apparent absorbability of phosphorus and calcium in pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 28, 233-242.
- Jongbloed, A. W., P. A. Kemme i Z. Mroz.** 1990. The effect of *Aspergillus niger* phytase in diets for pigs on concentration and apparent digestibility of dry matter, total phosphorus and inositol phosphates in different sections of the alimentary tract. Rapport IVVO n° 221.
- Jongbloed, A. W., Z. Mroz, R. van der weij-Jongbloed i P. A. Kemme.** 2000. The effects of microbial phytase, organic acids and their interaction in diets for growing pigs. *Livestock Prod. Sci.* 67, 113-122.
- Kemme, P. A., A. Lommen, L. H. De Jonge, J. D. Van der Klis, A. W. Jongbloed, Z. Mroz i A. C. Beynen.** 1999. Quantification of inositol phosphates using  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy in animal nutrition. *J. Agric. Food Chem.* 47, 5116-5121.

- Kirby, L. K. i T. S. Nelson.** 1988. Total and phytate phosphorus content of some feed ingredients derived from grains. *Nutrition Reports International*. 37 (2), 277-280.
- Knuckles, B. E. i A. A. Betschart.** 1987. Effect of phytate and other myo-inositol phosphate esters on alpha-amylase digestion of starch. *J. Food Sci.* 52, 719-721.
- Kornegay, E. T.** 1999. A review of phosphorus digestion and excretion as influenced by microbial phytase in poultry. En: BASF Technical Symposium. Use of Natuphos phytase in broiler nutrition and waste management, 69-81.
- Landsman, A., D. Lichstein, M. Bacaner i A. Ilani.** 2001. Dietary phosphate-dependent growth is not mediated by changes in plasma phosphate concentration. *Br. J. Nutr.* 86, 217-223.
- Little, T. M.** 1981. Interpretation and presentation of results. *Hortscience*, 16(5):637-640.
- López Álvarez, J. A.** 2002. Estabilidad de la fitasa de la *Peniophora Lycii* frente a los tratamientos térmicos de los piensos. *Anaporc.* 218, 80-85.
- Mohanna, C. i Y. Nys.** 1999. Changes in zinc and manganese availability in broiler chicks induced by vegetal and microbial phytases. *Anim. Feed Sci. Tech.* 77, 241-253.
- Omogbenigun, F. O., C. M. Nyachoti i B. A. Slominski.** 2003. The effect of supplementing microbial phytase and organic acids to a corn-soybean based diet fed to early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 81, 1806-1813.
- Onyango, E. M., M. R. Bedford i O. Adeola.** 2004. The yeast production system in which *Escherichia coli* phytase is expressed may affect growth performance, bone ash, and nutrient use in broiler chicks. *Poult. Sci.* 83, 421-427.
- Orban, J. I., O. Adeola i R. Strohline.** 1999. Microbial phytase in finisher diets of white pekin ducks: effect on growth performance, plasma phosphorus concentration, and leg bone characteristics. *Poult. Sci.* 78, 366-377.
- Payne, R. L. i L. L. Southern.** 2003. A comparison of two sources of phytase on growth performance and bone ash in commercial broilers. 14th European Symposium of Poultry Nutrition. 25-26.

- Pérez-Moya, S., M. Francesch, I. Badiola i J. Brufau.** 2000. Influence of enzyme, antibiotic growth promoter and type of cereal on intestinal microflora of broilers. En: XXI World's Poultry Congress, Montreal, Canada (Pòster).
- Peter, C. M., T. M. Parr, E. N. Parr, D. M. Webel i D. H. Baker.** 2001. The effects of phytase on growth performance, carcass characteristics, and bone mineralization of late-finishing pigs fed maize-soyabean meal diets containing no supplemental phosphorus, zinc, copper and manganese. *Anim. Feed Sci. Tech.* 94, 199-205.
- Porres, J. M., P. Etcheverry, D. D. Miller i X. G. Lei.** 2001. Phytase and citric acid supplementation in whole-wheat bread improves phytate-phosphorus release and iron dialyzability. *J. Food Sci.* 66 (4), 614-619.
- Punna, S. i D. A. Roland, Sr.** 1999. Influence of supplemental microbial phytase on first cycle hens fed phosphorus-deficient diets from day one of age. *Poult. Sci.* 78, 1407-1411.
- Rama Rao, S. V. i V. Ramasubba Reddy.** 2003. Relative bio-availability and utilisation of phosphatic fertilisers as sources of phosphorus in broilers and layers. *Brit. Poultry Sci.* 44, 96-103.
- Rama Rao, S. V., A. K. Panda, M. V. L. N. Raju, G. Shyam Sunder i N. K. Praharaj.** 2003. Requirement of calcium for commercial broilers and white leghorn layers at low dietary phosphorus levels. *Anim. Feed Sci. Tech.* 106, 199-208.
- Ravindran, V.** 1999. Protein and Energy effects of microbial phytase in poultry diets. BASF Technical Symposium. Use of Natuphos phytase in layer nutrition and management, 1-21.
- Ravindran, V., P. H. Selle i W. L. Bryden.** 1999. Effects of phytase supplementation, individually and in combination, with glycanase, on the nutritive value of wheat and barley. *Poult. Sci.* 78, 1588-1595.
- Ravindran, V., P. H. Selle, G. Ravindran, P. C. H. Morel, A. K. Kies i W. L. Bryden.** 2001. Microbial phytase improves performance, apparent metabolizable energy, and ileal amino acid digestibility of broilers fed a lysine-deficient diet. *Poult. Sci.* 80, 338-344.

- Ravindran, V., S. Cabahug, G. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 2000. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus levels. II. Effects on apparent metabolisable energy, nutrient digestibility and nutrient retention. *Brit. Poultry Sci.* 41, 193-200.
- Ravindran, V., W. L. Bryden i E. T. Kornegay.** 1995. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Biol. Rev.* 6, (2) 125-143.
- Reddy, N.R., M. D. Pierson, S. K. Sathe i D. K. Salunkhe.** 1989. Phytates in cereals and legumes. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Roberson, K. D. i H. M. Edwards, Jr.** 1994. Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and phytase on zinc utilization in broiler chicks. *Poult. Sci.* 73, 1312-1326.
- Rosen, G. D. 2003. Effects of genetic, management and dietary factors on the efficacy of exogenous microbial phytase in broiler nutrition. *Brit. Poultry Sci.* 44, (Suppl. 1) S25-S26.
- Rutherford, S. M., T. K. Chung, P. C. H. Morel i P. J. Moughan.** 2004. Effect of microbial phytase on ileal digestibility of phytate phosphorus, total phosphorus and amino acids in a low-phosphorus diet for broilers. *Poult. Sci.* 83, 61-68.
- Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague.** 1996. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and utilization of dietary calcium, phosphorus, copper, and zinc in broiler chickens fed corn-soybean diets. *Poult. Sci.* 75, 729-736.
- Shafey, T. M.** 1993. Calcium tolerance of growing chickens: effect of ratio of dietary calcium to available phosphorus. *World's Poult. Sci. J.* 49, 5-18.
- Shelton, J. L., L. L. Southern, T. D. Bidner, M. A. Persica, J. Braun, B. Cousins i W. F. McKnight.** 2003. Effect of microbial phytase on energy availability, and lipid and protein deposition in growing swine. *J. Anim. Sci.* 81, 2053-2062.
- Shirley, R. B. i H. M. Edwards, Jr.** 2003. Graded levels of phytase past industry standards improves broiler performance. *Poult. Sci.* 82, 671-680.

- Simons, P. C. M., H. A. J. Versteegh, A. W. Jongbloed, P. A. Kemme, P. Slump, K. D. Bos, M. G. E. Wolters, R. F. Beudeker i G. J. Verschoor.** 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *Br. J. Nutr.* 64, 525-540.
- Taylor, T. G. i C. G. Dacke.** 1984. Calcium metabolism and its regulation. En: *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. Editor: B. M. Freeman. Academic Press, Londres, Regne Unit. pp. 126-170.
- Torrallardona, D., D. Solà-Oriol, J. Broz i J. Brufau.** 2003. Effects of dicalcium phosphate level and of phytase on performance and P excretion in growing pigs. En: *9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*. Banff, Canadà. Vol.2, 323-325.
- Valencia, Z. i E. R. Chavez.** 2002. Phytase and acetic acid supplementation in the diet of early weaned piglets: effect on performance and apparent nutrient digestibility. *Nutr. Res.* 22, 623-632.
- Viveros, A., A. Brenes, I. Arija i C. Centeno.** 2002. Effects of microbial phytase supplementation on mineral utilization and serum enzyme activities in broilers chicks fed different levels of phosphorus. *Poult. Sci.* 81, 1172-1183.
- Viveros, A., C. Centeno, A. Brenes, R. Canales i A. Lozano.** 2000. Phytase and acid phosphatase activities in plant feedstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4009-4013.
- Wu, Y. B., V. Ravindran i W. H. Hendriks.** 2003. Effects of microbial phytase, produced by solid-state fermentation, on the performance and nutrient utilisation of broilers fed maize- and wheat-based diets. *Brit. Poultry Sci.* 44, (5) 710-718.
- Wu, Y. B., V. Ravindran, D. G. Thomas, M. J. Birtles i W. H. Hendriks.** 2004. Influence of phytase and xylanase, individually or in combination, on performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology in broilers fed wheat-based diets containing adequate level of phosphorus. *Brit. Poultry Sci.* 45, (1) 76-84.
- Yalçın, S., X. Zhang, L. M. Christa, G. R. McDaniel i D. L. Kuhlert.** 2000. Effects of divergent selection for incidence of tibial dyschondroplasia (TD) on purebred and crossbred performance. 1. TD incidence and calcium and phosphorus plasma concentrations. *Brit. Poultry Sci.* 41, 562-565.

- Zimmerman, B., H. J. Lantzsch, R. Mosenthin, F. J. Schöner, H. K. Biesalski i W. Drochner.** 2002. Comparative evaluation of the efficacy of cereal and microbial phytases in growing pigs fed diets with marginal phosphorus supply. *J. Sci. Food Agric.* 82, 1298-1304.
- Zyla, K., D. Gogol, J. Koreleski, S. Swiatkiewicz i D. R. Ledoux.** 1999. Simultaneous application of phytase and xylanase to broiler feeds based on wheat: feeding experiment with growing broilers. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1841-1848.
- Zyla, K., J. Koreleski, M. Mika, B. Stodolak, S. Swiatkiewicz i A. Wikiera.** 2003. Complete dephosphorylation and total conversion of phytates in maize-soybean feeds fed to broilers. 14th European Symposium of Poultry Nutrition. 16-17.



## **CONCLUSIONS**



1. No s'han observat efectes en els paràmetres estudiats degut a la dosi de fitasa exògena afegida en intervals petits a dietes deficientes de fòsfor i elevada activitat fitàsica endògena. Per tant, es pot reduir la dosi habitual de 600 U/kg a 500 U/kg sense haver repercutit en la productivitat del pollastre.

2. La disminució de la concentració de fòsfor de la dieta ha provocat un menor consum de pinso, que implica un menor creixement. S'obtenen les mateixes productivitats alimentant els pollastres amb dietes amb nivell adequat de fòsfor o amb dietes deficitàries en fòsfor suplementades amb 500 U/kg de fitasa microbiana.

3. S'han obtinguts majors retencions de fòsfor en dietes deficitàries de fòsfor respecte a les dietes amb nivells recomanats, disminuint-ne l'excreció. L'addició de 500 U/kg de fitasa microbiana a dietes de broilers deficientes de fòsfor va permetre augmentar la retenció de minerals.

4. La magnitud dels efectes de l'addició de la fitasa exògena és funció de la fitasa endògena dels ingredients de les dietes. L'increment en la retenció de fòsfor és superior en les dietes de baixa activitat fitàsica endògena, com el morenc, i inferior en les dietes de blat, d'alta activitat fitasa endògena.

5. S'ha vist que el pes final del pollastre, la concentració de les cendres dels dits i la concentració de fòsfor inorgànic en el plasma són bons indicadors de la disponibilitat de fòsfor. Basant-se en els dos primers paràmetres, s'ha obtingut que 605 U/kg de fitasa microbiana poden reemplaçar 1 g de P per quilo en dietes de blat i soja deficientes de fòsfor.

6. La utilització d'una dosi elevada (5000 U/kg) de fitasa microbiana ha produït millors resultats d'energia i digestibilitat de nutrients que les dietes amb 500 U/kg de fitasa microbiana, no mostrant cap efecte advers de tolerància a aquest enzim.

7. L'activitat fitasa endògena de les matèries primeres pot eliminar-se totalment per tractament tèrmic per autoclau, amb temperatures superiors a 100° C i en un període de temps comprès entre 10 i 15 minuts.

8. L'eliminació de la fitasa endògena de matèries primeres produeix una disminució en el creixement dels animals que menjaren dietes deficientes de fòsfor, influint especialment en l'índex de transformació i la viscositat intestinal. Els valors energètics de les dietes no s'han modificat.

9. L'eliminació de la fitasa endògena de les matèries primeres no va tenir influència en la retenció de fòsfor total ni en la seva excreció. La retenció de calci es veié afectada per l'eliminació de la fitasa endògena, disminuint els seus valors; l'excreció de calci de les dietes amb ingredients tractats augmentà només en alguns dels casos estudiats.

10. La inclusió d'enzims carbohidrasa en dietes de broilers riques en PNA no va variar la retenció de fòsfor total, augmentant l'excreció d'aquest mineral per les dietes de morenc suplementades amb  $\alpha$ -galactosidasa.

La presència de xilanasa en dietes de blat i de  $\beta$ -glucanasa en dietes d'ordi van fer augmentar la retenció de calci, malgrat que només en les dietes d'ordi hi hagués una reducció en l'excreció.

11. No s'han observat interaccions negatives remarcables entre la fitasa i els enzims carbohidrasa en les dietes riques en PNA i deficient de fòsfor, per la qual cosa aquest tipus d'enzims poden ser combinats en les dietes, doncs sembla que actuen independentment sobre els seus respectius substrats.

12. La tècnica de RMN de  $P^{31}$  pot ser una bona eina per a determinar els fosfats d'inositol, podent-se identificar alhora el fòsfor no fític, tant en mostres de pinsos com de continguts del tub digestiu o excretes.

13. La tècnica de RMN ha permès comprovar la hidròlisi en el tracte digestiu de l'àcid fític fins a fosfats amb un nombre igual o menor que 5. Es pot dir que els llocs d'acció de la fitasa són el pedrer i la cloaca, ja que és on s'han observat els efectes més grans.

No s'han observat diferències en la hidròlisi de l'àcid per l'eliminació de l'activitat fitàsica dels ingredients de les dietes.



## **ANNEXES**



## **12.1. DETERMINACIÓ DE FÒSFOR TOTAL (MÈTODE ESPECTROFOTOMÈTRIC)**

### ***12.1.1. Introducció.***

Determinació del fòsfor de la mostra mineralitzada mitjançant colorimetria a 430 nm del complex format amb el reactiu nitromolibdic-vanadat.

### ***12.1.2. Reactius i solucions.***

*Reactiu:* HCl 37.5%; HNO<sub>3</sub> al 60% i al 10%; amoníac concentrat (NH<sub>4</sub>OH); molibdat amònic 4-hidrat [(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O]; metavanadat amònic (NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>); fosfat monopotàssic (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

*Solucions:* - Dissolució de molibdat amònic: Dissoldre 100 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O en H<sub>2</sub>O calenta. Afegir 10 ml d'amoníac i, un cop fred, passar-ho a un aforat de 1000 ml i enrassar.

- Dissolució de metavanadat amònic: Dissoldre 2,35 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>VO<sub>3</sub> en un vas de 600 ml d'H<sub>2</sub>O destil·lada calenta. Afegir lentament i agitant 20 ml d'una dissolució que conté 7 ml d'àcid nítric 60% i 13 ml d'aigua. Un cop fred, aforar-ho a 1000 ml amb aigua.

- Dissolució de nitro-molibdo-vanadat: En un aforat de 1000 ml afegir 200 ml de la solució de metavanadat amònic, 200 ml de la solució de molibdat amònic i 134 ml de nítric concentrat. Enrassar amb aigua.

- Dissolució patró de fòsfor de 1000 ppm: Dissoldre 4,394 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, prèviament dessecat en estufa a 100° C fins a pes constant, en aigua i aforar-ho a 1000 ml.

### ***12.1.3. Procediment analític.***

Preparació de la mostra: Pesar entre 2 i 4 g de mostra molguda a 0,5 Ø en gresols de porcellana, calcinar la mostra a la placa calefactora. Després, posar el gresol a la mufla a 550°C fins obtenir cendres blanques o grises (3-4 hores). Passar les cendres a un erlenmeier de 150 ml, netejant el gresol amb 10 ml d'H<sub>2</sub>O. Afegir 20 ml de HCl 37% i evaporar-ho totalment a la placa calefactora (procurant que no esquitxi). Refredar i dissoldre el residu amb HNO<sub>3</sub> 10% (10 ml). Fer bullir durant 5 minuts (sense que arribi a secar-se totalment) i filtrar sobre un matrau aforat de 500 ml netejant el vas amb H<sub>2</sub>O i enrassar.

A 10 ml de la solució mostra s'afegeix el reactiu de color (10 ml de solució de nitro-molibdo-vanadat), agitar, deixar en repòs durant 10 minuts i llegir a 430 nm front a aire (després s'hauran de restar els blancs). El blanc mostra es prepara afegint 10 ml del reactiu de color a 10 ml de la solució de blanc de la corba patró.

**Preparació de la corba patró:** Preparar en aforat de 100 ml solucions que continguin 5, 10, 20, 30 i 40 ppm de fòsfor partint del patró de fòsfor (1000 ppm). De cada punt de la corba agafar 10 ml i afegir 10 ml de solució nitro-molibdo-vanadat. El blanc de la corba patró es prepara amb 10 ml de H<sub>2</sub>O més el reactiu de color.

#### 12.1.4. Càlculs.

$\% \text{ P total} = \text{ppm P} * \frac{500}{\text{pes mostra (g)}} * \frac{1}{1000} * \frac{1}{1000} * 100$
$\text{ppm P} = \frac{\text{Abs - blanc} * \text{ordenada}}{\text{pendent}}$

#### 12.1.5. Exactitud i precisió.

La diferència entre el resultat de dues determinacions successives no pot passar de 3 % en valor relatiu, en continguts de fòsfor inferiors al 5% i del 0.15 % en valor absolut, en continguts de fòsfor igual o superior a 5.

#### 12.1.6. Aspectes de seguretat i higiene.

S'ha de treballar sempre sota la campana extractora i guants.

Tot el que contingui solució nitro-molibdo-vanadato s'ha de llençar en l'envàs de residus n° 4.

## **12.2. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT FITASA EN PRODUCTES ENZIMÀTICS I EN PINSOS**

Aquest mètode serveix per a determinar l'activitat fitasa present en productes enzimàtics comercials, en matèries primeres i en pinsos acabats.

### ***12.2.1. Introducció.***

La fitasa s'extreu dels pinsos o dels productes, i es determina la seva activitat deixant que l'enzim reaccioni sobre fitat sòdic (mio-inositol-hexakisfosfat) en condicions definides: 37° C de temperatura, pH 5.5, 60 minuts de temps de reacció i concentració inicial d'àcid fític 5 mM. El fòsfor inorgànic alliberat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) es determina espectrofotomètricament (415 nm) després de la formació d'un complex amb molibdovanadat. Una unitat fitasa (FTU) es defineix com la quantitat d'enzim que en condicions estàndard (37° C, pH 5.5, temps de reacció de 60 minuts i concentració d'àcid fític 5 mM) allibera 1  $\mu\text{mol}$  de fosfat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) per minut.

El mètode no distingeix entre activitat fitasa endògena o exògena.

### ***12.2.2. Reactius i solucions.***

*Reactius:* àcid acètic glacial, hidròxid amònic al 30%; àcid nítric 60%; heptamolibdat amònic 4-hidrat  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ ; metavanadat amònic ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ); clorur càlcic 2-hidrat ( $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ); dihidrògenfosfat potàsic ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); acetat sòdic 3-hidrat; fitat sòdic (mio-inositol-hexakisfosfat) d'arròs Sigma P-3168

*Solucions:* - Solució d'àcid nítric: Diluir 500 ml d'àcid nítric (60%) a 1000 ml amb aigua. Guardar la solució a temperatura ambient. Caducitat: 3 mesos.

- Reactiu de molibdat: Dissoldre 100 grams de  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$  en aproximadament 800 ml d'aigua destil lades. Afegir 10 ml d'hidròxid amònic (30%), i diluir-lo a 1000 ml amb aigua destil lada. Aquest reactiu es conserva a les fosques. Caducitat: 8 setmanes.

- Reactiu de metavanadat: Diluir 2.35 grams de  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  amb aprox. 400 ml d'aigua destil lada i escalfar-ho a 50-60°C fins que es dissolgui. Afegir 20 ml de la solució d'àcid nítric i portar-ho a

1000 ml amb aigua destil·lada. Aquest reactiu es conserva a les fosques a temperatura ambient.  
Caducitat: 8 setmanes.

- Reactiu de “stop” de molibdovanadat: Barrejar 50 ml de la solució de molibdat amb 50 ml de la solució de vanadat i afegir 100 ml de la solució d'àcid nítric, amb agitació continua. El reactiu es conserva a temperatura ambient, però cal preparar-lo de nou cada dia, just abans de ser utilitzat.

- Tampó d'acetat 0.1 M pH 5.5: Dissoldre 1.76 grams d'àcid acètic glacial, 30.02 grams d'acetat sòdic 3-hidrat i 0.147 grams de clorur càlcic 2-hidrat en 900 ml d'aigua, ajustar el pH a 5.5 amb àcid acètic glacial i diluir a 1000 ml. Aquest tampó es conserva a temperatura ambient. Caducitat: 1 setmana.

- Solució de clorur càlcic 10%: Dissoldre 100 grams de clorur càlcic 2-hidrat en aprox. 800 ml d'aigua destil·lada i portar a 1000 ml. Aquesta solució es conserva a temperatura ambient. Caducitat 3 mesos.

- Solució de fitat sòdic (substrat): Dissoldre 8.40 grams de fitat sòdic en 900 ml de la solució tampó d'acetat, ajustar el pH a 5.5 amb àcid acètic (4M) i diluir a 1000 ml. La solució de substrat es guarda a temperatura ambient, però cal preparar-la cada dia just abans de ser emprada.

- Solució patró de fosfat 50 mM: Dissoldre 0.7 grams de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sec en 100 ml de solució tampó d'acetat. Aquesta solució mare es conserva en la nevera a 2-5°C. Caducitat: 1 setmana.

- Preparació solució estàndard de fosfat 10mM: Diluir 1 ml de la solució patró de fosfat amb 4 ml de tampó acetat. Aquesta solució es conserva a temperatura ambient però cal preparar-la cada dia.

### ***12.2.3. Procediment analític.***

Extracció de l'enzim del pinso: Pesar per duplicat 40 grams de pinso i afegir a cadascuna 800 ml d'aigua destil·lada i 16 ml de solució de clorur càlcic (Si l'absorbència final a 415 nm és superior a 0.8 unitats d'absorbència, la mostra cal diluir-la en aquesta etapa). Agitar magnèticament la solució de pinso durant 60 minuts. Després, passar uns 5 ml aproximadament de cada solució a tubs de centrífuga, i centrifugar a 3000 rpm durant 5 minuts.

Extracció de l'enzim de productes: Pesar 1 g de mostra en aforat de 100 ml, posar 90 ml d'H<sub>2</sub>O més 2 ml de solució clorur càlcic i posar-ho en bany d'ultrasons durant 5 minuts. Enrasar amb H<sub>2</sub>O i agitar durant 60 minuts a temperatura ambient. Agafar 1 ml, posar-lo en un aforat de 100 ml i afegir 2 ml de solució clorur de calci i enrasar amb H<sub>2</sub>O. A partir d'aquest punt, seguir amb el mètode de pinsos.

Anàlisi de l'activitat fitasa: Cal fer l'anàlisi abans de 90 minuts de l'inici de l'extracció de l'enzim. De cadascun dels anteriors tubs de centrífuga, prendre 4 vegades 100 µlitres de sobrenadant i posar-los en 4 tubs d'assaig, que després es puguin centrifugar (tres d'aquests tubs s'utilitzaran per a la determinació de fitasa de la mostra i el quart tub s'utilitzarà com a blanc de reacció (BR)). A més, en cada tanda d'anàlisi cal posar: 4 tubs amb 100 µlitres de solució estàndard de fosfat 10 mM i 4 tubs amb 100 µlitres de tampó d'acetat. Tractar tots els tubs, excepte els marcats com (BR) (blanc de reacció: 2 tubs per mostra), de la següent forma: a t=0 s'afegeixen 3 ml de solució de substrat de fitat, s'agiten els tubs amb el vòrtex mixer, i es posen els tubs en el bany termostàtic a 37°C; a t=60 minuts, s'afegeixen 2 ml de la solució stop de molibdovanadat, s'agiten els tubs en el vòrtex mixer i es posen a temperatura ambient.

Un cop ha començat la reacció de l'enzim tal com es descriu prèviament, tractar els tubs marcats com blanc de reacció (BR) de la següent forma: afegir 2 ml de la solució stop de molibdovanadat i immediatament els 3 ml de la solució substrat de fitat sòdic. Agitar els tubs amb el vòrtex mixer i deixar-los a temperatura ambient.

A t=90-120 minuts, centrifugar tots els tubs a 3000 rpm durant 5 minuts; i a t=120-180 minuts, llegir l'absorbència a 415 nm de tots els tubs front H<sub>2</sub>O.

#### **12.2.4. Càlculs.**

Per a cada mostra, calcular l'increment d'absorbència:

$$D_{\text{Abs},415} = \text{Abs}_{415, \text{mostra}} - \text{Abs}_{415, \text{BR}}$$

essent: mostra = mitjana d'absorbència dels tres tubs amb mostra i enzim.

Calcular l'Abs<sub>fosfat</sub>, restant-li l'absorbència del tampó.

Calcular l'activitat fitasa com  $\mu\text{mols}$  de fosfat alliberat per minut per gram de pinso, emprant la següent formula:

$$\text{FTU / g} = \frac{\mathbf{B \times P}}{\mathbf{A \times E \times T}}$$

essent:

$B = D_{\text{Abs},415}$                        $P =$  Concentració de fosfat de l'estàndard en la reacció (normalment 1 mM)

$A = D_{\text{Abs},415,\text{fosfat}}$                $E =$  pes de la mostra de pinso en grams en reacció     $T =$  temps de reacció.

### **12.2.5. Exactitud i precisió.**

Precisió: En productes, el coeficient de variació estimat és de 2.5 %. En pinsos, el coeficient de variació estimat és entre 5-10 %. El límit de detecció està establert és de 0.004 FTU. La recuperació de fitasa hauria d'estar al voltant de  $\pm 10\%$

L'absorbència a 415 nm d'una solució estàndard de fosfat 10 mM és aprox. 0.37. La resposta a la concentració de fosfat és lineal fins a una absorbència de 1.5

### **12.2.6. Aspectes de seguretat i higiene.**

Treballar amb guants i ulleres de seguretat quan es manipuli l'àcid acètic glacial, l'àcid nítric i l'hidròxid amònic.

### **12.2.7. Bibliografia.**

Engelen, A.J., Van der Heeft, F.C., Randsdorp, P.H.G. and Smit, E.L.C. (1994). Simple and rapid determination of phytase activity. J. AOAC, 77: 760-764.

Off. J.Eur.Comm. (1971), L279/7, 994-995

**Títol:** “Efectes de l’ús de fonts exògenes de fitasa sobre els rendiments productius i valor nutricional de les dietes riques en polisacàrids no midó (NSP) en pollastres broilers. Repercussió mediambiental.”

**Resum:** La fitasa és un enzim que facilita l’absorció del fòsfor dins de l’organisme animal, especialment quan es troba lligat a la molècula d’àcid fític. Aquesta molècula es compon d’un sucre (inositol) unit a sis grups fosfats.

L’acció de la fitasa és trencar els grups fosfats units a l’inositol, i formar grups fosfats inorgànics, que és la forma en què s’absorbeix el fòsfor.

Una de les funcions de l’àcid fític, entre altres, és la d’emmagatzematge d’aquest mineral en matèries primeres vegetals, com els cereals, que representen un dels components més importants en la dieta dels animals.

L’activitat endògena de fitasa dins dels animals, com el pollastre, és molt baixa, incloent la produïda per la flora bacteriana, per la qual cosa no se absorbeix molt de fòsfor. Fins no fa massa temps, per contrarestar aquesta manca de P, s’afegia fòsfor inorgànic (en forma de fosfat bicàlcic, monofosfat càlcic o fosfat de roca) en excés durant la fabricació del pinso, amb quantitats per sobre dels nivells recomanats per a cada espècie. Aquest excés provoca, en primera instància, un encariment del pinso; però, a la llarga, es produeix un problema de contaminació del sòl, ja que tot el fòsfor inorgànic afegit en excés i que no s’utilitza s’expulsa en les excretes i es va dipositant en el sòl.

Si es té en compte el cicle del fòsfor, aquest excés s’aniria filtrant, fins a poder provocar problemes com la contaminació de les aigües del subsòl.

Per això en els darrers anys ha augmentat l’ús de la fitasa, per tal de millorar el problema econòmic que representa l’excés de fosfats i pel problema ambiental i reduir-ne la contaminació.

Aquest treball ha seguit aquesta línia, realitzant-se cinc treballs en granja, tenint com a objectiu avaluar els efectes d’afegir fitasa microbiana en diferents dietes de pollastres, i estudiar els paràmetres de creixement, energètics i de digestibilitat de nutrients.

En el primer assaig va consistir en confirmar els resultats observats en la bibliografia amb la dosi habitual fins el moment en dietes de moresc, i buscar-ne la dosi per a dietes de blat, observant-se que es poden treballar amb dosi una mica inferior sense repercutir en el creixement animal.

A continuació, s’ha anat treballant amb cereals (blat i ordi) o afegint subproductes de farinera (segó de blat), als quals se’ls ha eliminat l’enzim fitasa endogen mitjançant procés tèrmic, per tal de comprovar l’eficàcia d’aquest tipus de fitasa i comparar-la respecte a l’afegida d’origen microbià. En un d’aquests assaigs, es va utilitzar una dosi deu vegades més elevada de fitasa de l’habitual, per avaluar la tolerància dels pollastres a l’enzim. Els resultats mostren que l’enzim fitasa permet una millor utilització del fòsfor de la dieta, per la qual cosa es poden disminuir els nivells d’inclusió, sense influenciar el creixement, i

disminuint també l'excreció d'aquest mineral. Les proves amb la dosi elevada van donar uns millors resultats quant a retenció de fòsfor.

El darrer assaig experimental consisteix en l'avaluació de les possibles interaccions de la fitasa amb altres enzims habituals de la dieta (carbohidrases), per tal de comprovar l'ús beneficiós d'ambdós tipus d'enzims sense produir efectes negatius en els pollastres. S'ha observat que aquestes dues classes d'enzims es poden continuar sent utilitzats, ja que quan s'han trobat interaccions la majoria són positives. S'ha realitzat un estudi metodològic, com és la determinació dels fosfats d'inositol, és a dir, les molècules formades per la hidròlisi de l'àcid fític. Aquesta determinació s'ha realitzat per la tècnica de RMN (ressonància magnètica nuclear) de fòsfor ( $^{31}\text{P}$ ). Gràcies a aquesta tècnica, també s'ha intentat avaluar el trencament de l'àcid fític dins el tracte digestiu de l'animal, observant-se que sembla ser que l'acció de la fitasa exògena es produeix en el pedrer del pollastre.