



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

ANÀLISI COMPARATIU DEL RENDIMENT DE FITASES NO RECOMBINANTS I RECOMBINANTS

Sara Borrell Domínguez

TREBALL DE FI DE GRAU DE BIOTECNOLOGIA

Tutor acadèmic: Ricardo Roman Cordero Otero, Departament de Bioquímica i
Biotecnologia, ricardo.cordero@urv.cat

Data de la convocatòria: Juny 2021

Jo, Sara Borrell Domínguez, amb DNI 39894827-Q , soc coneixedora de la guia de prevenció del plagi a la URV “Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants” (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 7 de Juny de 2021

(signatura)

Índex

1. Resum	4
2. Introducció	5
2.1. Justificació del tema	5
2.2. El fòsfor	6
2.3. Els fitats	7
2.4. Les fitases	9
2.5. Mètodes d'avaluació de l'eficàcia de les fitases en aus	10
3. Objectius	13
4. Metodologia	14
5. Resultats	16
5.1. Resultats de fitases no recombinants	16
5.2. Resultats de fitases recombinants	21
6. Discussió	30
7. Conclusions	37
8. Autoavaluació	38
9. Bibliografia	39
Glossari d'unitat d'activitat enzimàtica	41
Annex 1: formulari de sol·licitud del treball de fi de grau	42
Annex 2: fitxa de seguiment del tutor	43

1. Resum

El món de la nutrició animal és un camp molt exigent que requereix innovacions científiques constants. En l'actualitat, per exemple, es fa créixer un pollet fins al pes comercial en tan sols 42 dies, en un procés que de forma silvestre requeriria mesos. Això requereix un esforç fisiològic enorme, que no es pot abastar només amb la selecció genètica de les races, sinó que es requereixen altres tècniques. Aquestes tècniques incloïen fins fa pocs anys l'ús d'antibiòtics promotors de creixement, que actualment estan prohibits a l'Unió Europea i que seguiran el mateix camí a la resta del món de forma paulatina. Així doncs, es necessari explorar altres possibilitats com l'ús dels additius i les premescles per afegir a les dietes dels animals de producció, que permetin l'optimització dels nutrients per la millora dels paràmetres productius de les explotacions.

Una d'aquestes possibilitats és l'ús dels enzims per millorar la digestibilitat i absorció dels nutrients. La digestibilitat del fòsfor és de vital importància, pel paper d'aquest mineral en processos biològics de màxima importància així com per problemes secundaris que ocasiona la seva quelació. Per millorar l'absorció d'aquest mineral. I per tant tots els processos fisiològics en els que està implicat, s'ha estès l'ús de les fitases.

La base de la fórmula dels pinsos són els cereals. El fòsfor està present en els vegetals, inclosos els cereals en forma de fitats. Els animals monogàstrics no els poden assimilar de manera autònoma ja que no produeixen fitases de forma endògena, i per això és necessari subministrar-los-hi de forma exògena.

Les fitases es van començar a investigar a finals dels anys 60 i el seu ús es va estendre a partir de meitats dels anys 90. Existeixen fitases de diversos orígens. Els utilitzats en la indústria zootecnològica solen ser microbiològics.

Des de l'axioma que l'aplicació de la biotecnologia ha millorat l'eficàcia de les fitases, es desenvolupa un estudi comparatiu d'algunes dades experimentals en la millora de la disponibilitat per les aus del fòsfor administrat a les dietes. Per fer-ho es compararan els resultats obtinguts en estudis de camp realitzats des dels anys 90 en aus, a través de paràmetres universalitzats com la retenció de fòsfor o cendres en la tibia.

2. Introducció

2.1. Justificació del tema

La prohibició a la Comunitat Europea de l'administració d'antibiòtics per a l'ús en alimentació animal, obliga a la indústria agropecuària a buscar noves formes de promoure el creixement dels animals, mitjançant la millora de l'índex de conversió dels aliments, de manera que per aconseguir un quilo de pes viu de l'animal, la ingesta alimentària sigui menor. Una de les maneres d'aconseguir això és afegint additius als pinsos perquè l'aprofitament dels nutrients sigui més elevat.

El Reglament 1831/2003¹⁹ de la Unió Europea regula quins additius estan permesos per alimentació animal i en quines condicions d'ús. La Comissió Europea, aprova o descarta els additius proposats sota el dictamen científic de l'EFSA (Autoritat europea en seguretat alimentària.)

Els additius aprovats per al seu ús a la Comunitat Europea estan dividits en 4 categories segons l'annex I del Reglament 1831/2003¹⁹. Les categories alhora es subdivideixen en grups funcionals. La primera categoria recull els additius tecnològics, la segona els additius sensorials, la tercera els additius nutricionals i la quarta categoria són els additius zootecnològics. Dins de la quarta categoria es troben, en el grup funcional a, els potenciadors de la digestibilitat, que es defineixen com a aquelles substàncies que, quan s'administren als animals, augmenten la digestibilitat de les dietes mitjançant la seva acció sobre algun element de la mateixa. Aquest grup funcional inclou els enzims.

Els aliments per ús animals estan compostats principalment per proteïnes, hidrats de carboni i greixos, que són fàcilment digeribles pels animals. Aquests nutrients provenen d'ingredients d'origen molt divers però generalment de cereals. La situació ideal seria comptar amb matèries primeres d'elevada qualitat i digestibilitat, però la realitat de la indústria agropecuària mundial és molt diferent. Els cereals que es produeixen a nivell mundial són venuts pels productors a aquells que els hi ofereixin major preu i això porta a que els millors cereals es destinin, evidentment, a consum humà directament o a usos més lucratiu, com és el cas del morenc en la fabricació de biodièsel. Aquest panorama fa que els cereals destinats a alimentació animal siguin, generalment, els de menor qualitat i per tant amb merma de la qualitat nutricional o fins i tot subproductes de les indústries anteriorment mencionades. A més dels components més bàsics, als aliments també hi trobem d'altres components com la fibra i els fitats de difícil digestió, ja que els animals no són capaços de produir enzims necessaris per la seva hidròlisi de manera endògena. Tant en el cas dels aliments de més fàcil digestió però pobre en nutrients com el cas de nutrients d'escassa digestibilitat o absorció és recorre a l'ús d'enzims administrats de manera exògena en aliments i pinsos per animals.

Aquest treball focalitza la seva atenció en la millora de la digestibilitat dels fitats per part dels animals monogàstrics, i per tant en els enzims que els hidrolitzen, les fitases. El mercat mundial de les fitases es calcula entorn els 500 milions de USD anuals.

2.2. El fòsfor

El fòsfor participa en tots els processos energètics ja que està involucrat en el metabolisme i en concret en els processos d'intercanvi d'energia en forma d'ATP. En els cereals estimula el desenvolupament de les arrels, afavoreix la floració i la maduració del gra i en la fotosíntesi de la planta.

Segons Donayre, J.C³, el fòsfor compleix una sèrie de funcions de vital importància dins l'organisme animal, per la qual cosa se'l podria considerar com un dels elements més importants. En els animals intervé en la mineralització de la matriu orgànica dels ossos formant part dels esquelets, té un paper important en les funcions neurològica i muscular, forma part d'alguns coenzims, regula la pressió osmòtica i l'equilibri àcid-base en l'organisme, manté la integritat de les membranes ja que forma part dels fosfolípids i també és part important de l'estructura dels àcids nucleics i per tant també de l'ADN i de l'ARN entre d'altres.

Com a fosfat contribueix a mantenir l'equilibri osmòtic. Intervé en el metabolisme dels glúcids, àcids grassos, síntesis d'aminoàcids i proteïnes a través de AMP, ADP i ATP. Per totes les funcions anteriorment exposades és necessari que els nutricionistes que formulen els pinsos, assegurin no tan sols l'aportació de fòsfor a la dieta sinó també que la seva biodisponibilitat estigui garantida.

Ara bé, el principal problema que existeix és que l'aportació de fòsfor vegetal a través de les matèries primeres vegetals en els pinsos és insuficient per cobrir les necessitats dels animals de producció, ja que 2/3 (60-85 %) del fòsfor aportat està lligat a l'àcid fític, en forma de fitats, la disponibilitat de la qual és gairebé nul·la en porcs i aus. Per tant, per cobrir aquestes necessitats de fòsfor, és necessari suplementar les dietes amb una aportació extra de fòsfor mineral, principalment en forma de fosfat bicàlcic o monocàlcic. Això planteja un problema, al marge dels costos econòmics que això representa, com l'eliminació excessiva del fòsfor en les femtes. Cal recordar que el 90 % del fòsfor introduït al medi ambient prové de les excrecions animals. Aquest fòsfor ambiental provoca greus problemes ecològics.

2.3. Els fitats

L' àcid fític (fig 1) és una molècula de mio-inositol, unida a 6 grups fosfat (hexafosfat de inositol) de fórmula $C_6H_{18}O_{24}P_6$, amb un pes molecular de 660 g/mol) que constitueix la principal forma d' emmagatzematge de fòsfor en cereals i lleguminoses.

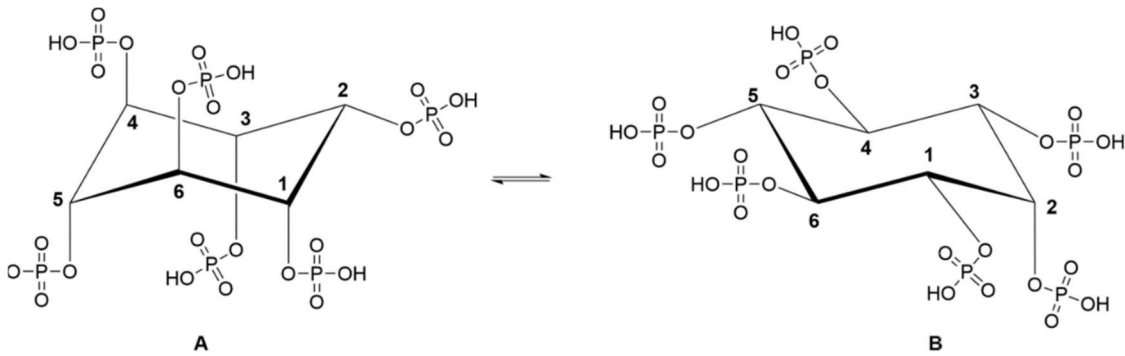


Fig 2: estructura molecular de l'àcid fític (Franco,2007)¹⁰

No obstant aquesta forma de fòsfor no és assimilable ni per l' home ni per als animals monogàstrics, degut a que aquests no estan provistos de suficient activitat de fosfatasa endògena (fitases) que sigui capaç d' alliberar el grup fosfat de l' estructura del fitat tal i com es representa a la Fig 2.

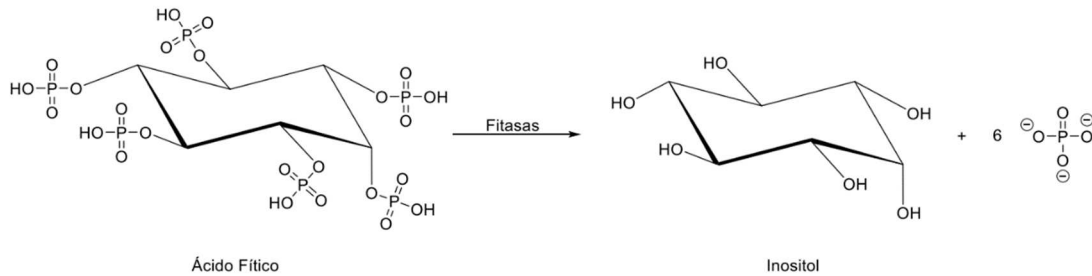


Fig 3. Hidròlisi de l' àcid fític mediada per fitases. (Franco, 2007)¹⁰

Aquesta hidròlisi és seqüencial i pot arribar a hidrolitzar els 6 enllaços, alliberant fins a 6 fòsfors inorgànics, tal i com es veu a la Fig 3.

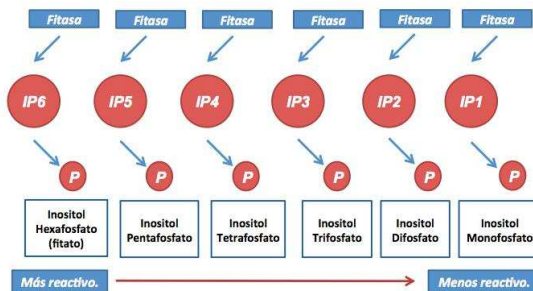


Fig 4. Hidròlisi seqüencial de l' àcid fític mediada per fitases fins alliberar 6 fòsfor

La molècula d' àcid fític té 6 radicals fosfat que a pH fisiològic s' ionitzen parcialment amb càrregues negatives i que per tant té una elevada capacitat de quelar cations, la qual cosa li confereix una activitat antinutritiva. S' entén per substància antinutritiva aquella que és capaç de disminuir o inclús impedir, l' absorció i utilització per un organisme de determinats nutrients. Aquesta activitat antinutritiva, segons Selle et al (2012)²², s' explica per les següents interaccions:

1.- Interacció entre els fitats i les proteïnes que es produeix generalment per sota del punt isoelèctric de les proteïnes amb elevat contingut en aminoàcids bàsics com la lisina, histidina o arginina. La interacció dona lloc a l' empaquetament de la proteïna al voltant del fitat, la qual cosa la fa menys soluble i per tant més resistent a la proteòlisi.

Aquesta interacció amb proteïnes inclou proteïnes amb funcions enzimàtiques com amilases o tripsina que veuen la seva funció disminuïda o anul·lada.

2.- Interacció dels fitats amb lípids i midó. Quan els polifenols s' uneixen a l' àcid fític, la digestibilitat del midó es veu afectada a través de la interacció amb l' enzim amilasa.

3.- Les unions dels fitats amb minerals com el calci, potassi, magnesi o el zinc que donen lloc a unions de tipus ternari amb les proteïnes de l' intestí prim i per tant eviten la seva absorció.

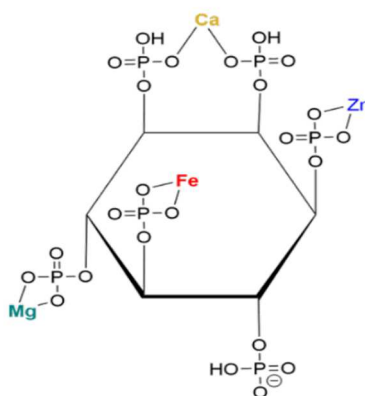


Fig 5: àcid fític unit a diversos metalls (Fernández, 2005)⁹

Els grups fosfats en posicions 1,2 i 3 (axial, equatorial-axial, conformació A de la fig 4) és exclusiu de l' àcid fític i és el responsable de les interaccions amb el ferro, la qual cosa impedeix, per exemple la formació de radicals hidroxil, coneguda com a reacció de Fenton. L'àcid fític presenta gran afinitat pels cations, que va en el següent ordre d' estabilitat decreixent: Coure (Cu^{2+}) > Zinc (Zn^{2+}) > Níquel (Ni^{2+}) > Cobalt (Co^{2+}) > Manganès (Mn^{2+}) > Ferro (Fe^{3+}) > Calci (Ca^{2+})

El percentatge de quelació dependrà de diversos factors com la proporció de fitat, pH i quantitat de metall, segons Silva i Bracarense, (2016)²³

Els processos tèrmics de tractament dels pinsos augmenten el contingut percentual d'àcid fític respecte dels cereals d'origen en cru. Els pinsos de porcs contenen una mitja de 10 g/kg de fitats.

2.4. Les fitases

Les fitases són enzims monomèrics descoberts el 1907 per Suzuki, que tenen un pes molecular entre 40 i 700kDA. Depenent del seu origen, la seva temperatura i pH òptim de funcionament es troba entre 45-60°C i 4.5- 6.0 respectivament.

Les fitases estan classificades com a part de la família de les histidina àcid fosfatases, que catalitzen la hidròlisi dels grups fosfat de l'àcid fític i derivats del mio-inositol fosfat fins a fosfat inorgànic. Això prevé la formació dels complexos mencionats a la secció 2.2, permetent millora de la biodisponibilitat de metalls i proteïnes perquè siguin digerits pels animals pel seu millor creixement i per tant per la millora de l'índex de conversió.

Les fitases van ser classificades el 1976 per el Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) en dues categories, en funció de la posició d'inici de la hidròlisi: EC 3.1.3.8. i EC 3.1.3.26

- Classe 3: Hidrolases (catalitzen reaccions hidrolítiques)
- Subclasse 1: hidrolitzen enllaços èster carboxílics
- Subsubclasse 3: monofosfòrics
- Ordre dins de la subclasse 8 i 26: trencament enllaç en posició 3 (3-fitasa), trencament enllaç en la posició 6 (6-fitasa) respectivament.

Els beneficis de l'ús de la fitasa en alimentació animal:

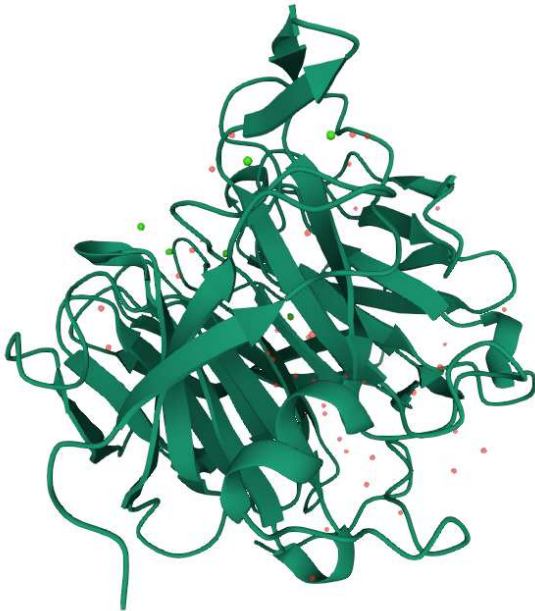
- 1.- Hidrolitza àcid fític, elimina factors antinutricionals i allibera els fòsfor de l'aliment.
- 2.- Deslliga el fitat, alliberant minerals i proteïnes, incrementant el rati de conversió dels aliments.
- 3.- Promou el consum de l'aliment, millorant la conversió productiva.
- 4.- Elimina l'utilització i el cost de l'addició de fòsfor inorgànic al pinso.
- 5.- Redueix la quantitat de fòsfor a les femtes i la pol·lució ambiental.

Existeixen tres tipus de fitases, les vegetals, les animals i les de microorganismes, encara que només aquests últims poden ser considerats per la seva producció amb finalitat comercials.

Les fitases vegetals es troben principalment en grans de cereals i oleaginoses i l'activitat fitàsica es troba majoritàriament a la capa d'aleurona (39.5%) i en l'endosperm (34.1 %) Cabaña (2001)².

Les primeres fitases eren fitases que es van utilitzar en alimentació animal eren obtingudes amb molt poca intervenció pel que té a veure amb la producció i purificació de les mateixes i per tant amb nul·la aplicació tecnològica sobre el procés. Es va passar a implementar l'ús de coneixements de biotecnologia microbiana per modificar les condicions de cultiu i millorar així els rendiments en les produccions de manera que es cultivaven, extreïen i purificaven fitases amb millor rendiment. Les fitases més modernes inclouen ja tècniques d'enginyeria genètica i recombinació genètica.

En el cas de microorganismes productors de fitases la majoria de les bacteries productores de fitases ho fan de forma intracel·lular, excepte *Bacillus subtilis*,



Lactobacillus amylovorus i *Enterobacter spp.* En el cas de les fitases d'origen fúngic, hi ha evidències de que més de 200 soques pertanyents als gèneres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* i *Rhizopus* produeixen fitases. D'aquestes, la d'*Aspergillus niger* és la identificada com la que produeix fitasa de major activitat enzimàtica. També existeixen treballs referents a la producció de fitases de llevats en *Schwanniomyces castellii*, *Pichia spartinae* i *Pichia rhodanensis*. Vohra, A et Satyanarayana, T (2003)²⁸

Fig 6: 3- fitasa de *Bacillus subtilis* (PDB)

2.5. Mètodes d'avaluació de l'eficàcia de fitasa

Existeixen en zootècnia molts paràmetres a través dels quals es pot fer la valoració de l'eficàcia d'un producte mitjançant diversos tipus de mesures per fer valoracions de l'eficàcia d'un producte. Es poden fer valoracions més generals on es mesuren paràmetres com ingesta d'aliments, pes final dels animals, rati de conversió (relació entre aliment ingerit i per guanyat pels animals), pes de la carcassa, etc... També es poden fer valoracions més concretes quan ens interessa avaluar l'efecte del producte sobre un òrgan diana o un sistema. Per exemple si apliquem un producte que millora la fisiologia

del fetge es fan anàlisis de sang per estudiar la seva bioquímica com per exemple nivells d'enzims hepàtics o es poden fer anàlisis més invasius com histologia d'hepatòcits.

Pel que fa als primers estudis sobre l'eficàcia de les fitases, la majoria dels estudis mesuraven guany de pes, índex de conversió i % fòsfor i calci. Posteriorment es van a anar afegint a més a més, paràmetres com el % de retenció del fòsfor i calci i el % del fòsfor a l'os. Actualment s'utilitzen alguns dels paràmetres anteriors i d'altres més sofisticats com la digestibilitat ileal del fòsfor.

Com que l'objectiu del treball és verificar que la introducció de mètodes de recombinació per l'obtenció de les fitases ha millorat la seva eficàcia, ens centrarem en els paràmetres l'estudi que s'ha mantingut al llarg del temps per a poder fer una comparativa que ens confirmi la hipòtesis del treball i intentar quantificar aquesta millora. Així doncs, els paràmetres que s'han recopilat i utilitzat són % de retenció de fòsfor i calci (mesurat a partir de l'anàlisi de les excrecions) i % de cendres, fòsfor i calci en l'os (mesurat a partir de l'anàlisi de la tibia).

ANÀLISI DE CENDRES DE LA TÍBIA

La cendra correspon al residu format pels minerals d'un producte incinerat Valenzuela, G.G (2011)²⁶. S'aplica en productes sòlids i semisòlids, segons mètode AOAC 2000. L'anàlisi de les cendres, requereix el sacrifici de l'animal. Després se'ls hi extreu la tibia. Un cop s'ha netejat de qualsevol teixit adherit, es separen les dues porcions (caps i eix) i es congelen en sec per separat. Es col·loca la mostra en un cressol de porcellana i es posen a mufla durant 3 hores a 550°C.

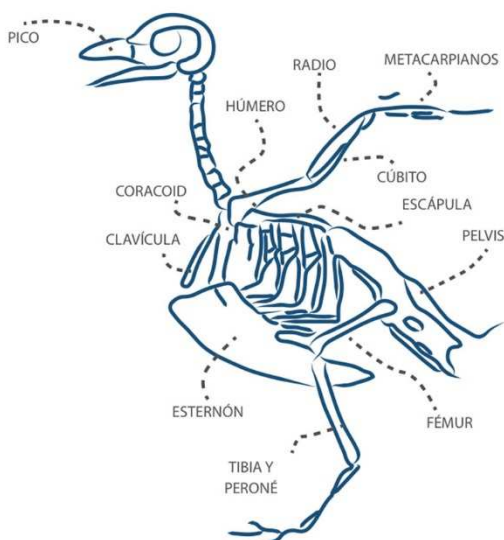


Fig 8: Tall tibiometarsal (Valenzuela, 2011)²⁶



Fig 7: esquelet de les aus (Tondeur, 2015)²⁵

$$\% \text{ de cendra} = \frac{\text{pes del residu}}{\text{pes inicial de la mostra}} \times 100$$



Fig 9: Cendres de tibia (Valenzuela,2011)²⁶

MÈTODE D' ANÀLISI DE MINERALS DE LES EXCRECIIONS:

Les femtes constitueixen el producte final de la digestió dels aliments i estan conformades principalment per 75 % d'aigua i el 25% de material sòlid, que alhora està compost per matèria orgànica i inorgànica, en % variables segons al dieta. L'estudi de la part inorgànica de la femta proporcionarà la informació relativa a la quantitat de fòsfor que l'ús de les fitases ha aconseguit hidrolitzar del fitats.

Es fa la recollida de les excretes, que inclouen tant excrecions sòlides com líquides i es congelen en sec. El calci s'analitza per espectrofotometria d'absorció atòmica de flama després d'assecar les cendres amb HNO₃. El fòsfor es determina pel mètode AOAC, 1990, per alcalimetria de molibdat amoníac i lectura de la intensitat de color amb espectrofotometria UV/ VIS 400 nm.

La retenció dels minerals es calcula com la resta entre el contingut del mineral a l'aliment i el contingut del mineral a la femta i orina.

MÈTODE D' ANÀLISI DE FÒSFOR A LES CENDRES:

Partint de les cendres obtingudes segons mètode breument explicat anteriorment a "Anàlisi de cendres a la tibia" es realitza l'anàlisi de fòsfor. El fòsfor es determina pel mètode AOAC, 1990, per alcalimetria de molibdat amoníac i lectura de la intensitat de color amb espectrofotometria UV/ VIS 400 nm.

3. Objectius

La hipòtesi principal d' aquest treball de revisió bibliogràfica consisteix en verificar la millora de l' eficàcia de les fitases. Existeixen molts paràmetres que permeten fer aquesta quantificació però ens centrarem en:

- Retenció de fòsfor
- Mineralització de la tibia en aus

La selecció d' aquests paràmetres respon a que han estat llargament utilitzats en el temps i per tant ens permetran fer comparatives de l' evolució de l' eficàcia de les fitases dels últims 20 anys.

A la unió Europea apareixen les primeres fitases recombinants l' any 2005, per tant, per verificar o descartar la hipòtesis d' aquest treball (les fitases recombinats són més eficients que las no modificades per a la nutrició animal) farem un estudi comparatiu de fitases anteriors i les posteriors a aquesta data.

Taula 1: Característiques dels articles inclosos a la revisió bibliogràfica incloses als resultats

Autor/s	Tipus fitasa	Dieta	Espècie
Sebastian, S et al (May 1996) ²⁰	<i>Aspergillus niger</i>	Moresc-soja	Pollets
Sebastian, S et al (Dec 1996) ²¹	<i>Aspergillus niger</i>	Moresc-soja	Pollets
Leeson, S et al (2000) ¹³	<i>A. niger</i> vs <i>E. coli</i>	Moresc-soja	Pollets
Viveros, A. et al (2002) ²⁷	<i>Aspergillus niger</i>	Pinso comercial	Pollets
Shirley, Rb; Edwards, H.M (2003) ²⁴	Fitasa comercial	Moresc-soja	Pollets
Webel, D.M, (2012) ²⁹	<i>Pichia pastoris</i> recombinant	Moresc-soja	Pollets
Gebert, M. Et al (2012) ¹¹ EFSA Journal 2016; 14 (11):4622-5 EFSA Journal 2016; 14 (11):4625 ⁶	<i>Trichoderma reesei</i> recombinant	Moresc-soja Soja i blat	Pollets Gallines ponedores
Altares-Real, S et al (2014) ¹ EFSA Journal 2017; 15 (11):5024 ⁷	<i>Serratia odorífera</i> recombinant	Moresc-blats- soja	Pollets
Haefner, S. (2017) ¹² EFSA Journal 2015; 13 (11):4275 ⁴	<i>Aspergillus niger</i> recombinant	Moresc-soja	Pollets i gall dindi
EFSA Journal 2019; 17 (5):5692 ⁸ .	<i>Komagataella phaffii</i> recombinant	Moresc-soja	Pollets

4. Metodologia

La recerca realitzada per l'elaboració d'aquest estudi comparatiu entre fitases per alimentació animal autoritzades a la Comunitat Europea, s'ha iniciat al gener del 2021 i ha finalitzat el maig del 2021.

La fonts d'informació bibliogràfica utilitzada inicialment ha estat el Reglament Europeu d'Additius per alimentació animal¹⁹, com base per saber sobre quines fitases calia fer recerca.

A partir de les dades obtingudes en aquesta recerca inicial s'ha utilitzat la pàgina web de l'EFSA per a disposar dels informes científics que van donar lloc a l'aprovació d'aquests enzims per part de la Comissió Europea. Aquests informes científics, contenen els informes d'eficàcia utilitzats en l'apartat de resultats per a poder comparar l'eficàcia de les diferents fitases. Les dades publicades de les opinions científiques de l'EFSA més antigues són de l'any 2004 i l'any 2005 ja comencen a aparèixer les fitases recombinants, per tant s'han utilitzat les dades de l'EFSA per obtenir dades d'eficàcia per les fitases recombinants.

Per obtenir dades anteriors, i per tant de fitases de primera i segona generació s'ha utilitzat la Web of Science.

PARAULES CLAU: phytase, phosphorus, poultry, ash

CRITERIS INCLUSIÓ:

S'han inclòs articles científics que compleixin els següents requisits:

- Descriguin resultats pràctics d'absorció de fòsfor
- Descriguin exactament l'origen microbiològic de la fitasa
- Idioma: anglès o espanyol
- Any de publicació: per fitases no recombinants 1969-2003 i per fitases recombinants 2005- 2021
- Accés obert

CRITERIS D'EXCLUSIÓ:

No s'han inclòs articles que :

- No tinguessin probes amb grups control
- Fossin experiments in vitro
- No incloguin resultats numèrics dels paràmetres.
- Utilitzin fitasa per continguts de fòsfor no-fitat

L'ús de les paraules claus a la Web of Science , filtrant per anys (1963-2003) i amb accés obert, genera 63 resultats. La inclusió o exclusió dels mateixos en aquesta revisió bibliogràfica han estat fruit de l'estudi de cadascun d'ells en base als criteris d'inclusió i exclusió anteriorment detallats.

5. Resultats

Des de la seva introducció en el món de la formulació de les dietes per nutrició animal, la forma d'obtenir les fitases per a ús comercial ha anat variant i partim de la hipòtesi que aquest millora es centra en millorar la seva eficiència.

Actualment a la comunitat europea hi ha 3-fitases i 6-fitases aprovades per al seu ús en alimentació animal. L'aprovació d'aquest tipus d'additiu és concedeix per deu anys, essent necessària una revisió i la presentació de noves dades i es vol allargar el període de comercialització concedit.

En aquest apartat es presenten, de forma cronològica, els resultats d'avaluació de l'eficàcia de les fitases en dos grups principals: fitases sense recombinació i fitases amb recombinació (utilitzarem les aprovades a la Unió Europea). A partir dels resultats exposats, l'apartat de discussió desenvolupa una comparació entre els paràmetres per poder treure unes conclusions objectives i raonades.

5.1. Fitases no recombinants

✓ Sebastian, S et al (May 1996)²⁰ estudien l'eficàcia d'una fitasa microbiana sense cap més especificació. En aquesta prova (taules 2 i 3), es van estudiar també l'evolució de la retenció i del contingut en tibia de fòsfor, calci, coure i zinc. Actualment es dona més importància a minerals com el magnesi i no s'estudien, en canvi aquest dos, per això els obviem i no els tindrem en compte en les discussions.

Tipus animal: Pollets d'un dia de vida (50% mascles i 50% femelles) Ross x Indian River
Quantitat: 180

Edat: 1 dies- 21 dies

Ambient: en ambient termocontrolat en 12 gàbies (6 de mascles i 6 de femelles), 15 pollets per gàbia.

Dieta *ad libitum*: Dieta basal de soja i moresc. Dieta control 0.7 % P i 1.4 % Ca, i dieta baixa en fòsfor té 0.5 % P i 1.3 % Ca. La fitasa s'afegeix a dosis de 600 U/kg aliment.

Anàlisi estadístic: SAS model lineal general. Les diferències significatives es separen amb test Duncan.

Taula 2: Resultats estudi in vivo de l'eficàcia de fitases en 3 grups de pollets segons sexe. Adaptació de Sebastian, S et al (1996)

Dieta	Sexe	% retenció fòsfor		% retenció calci	
		Dia 10	Dia 17	Dia 10	Dia 17
Control	Mascles	48.5 ^b	51.0 ^b	34.2	40.7 ^a
Baixa fòsfor		51.3 ^{ab}	51.0 ^b	36.5	31.7 ^b
Baixa fòsfor + fitasa		57.6 ^a	63.5 ^a	36.7	43.9 ^a
Control	Femelles	48.7	48.7	33.9	39.8
Baixa fòsfor		53.8	52.7	41.5	36.5
Baixa fòsfor + fitasa		54.7	59.2	32.2	36.7

Control	Mascles	48.6 ^b	49.8 ^b	34.1	40.2
Baixa fòsfor	i	52.6 ^a	51.9 ^b	39.0	34.1
Baixa fòsfor + fitasa	femelles	56.2 ^a	61.3 ^a	34.4	40.3

^{ab} : valors en una columna amb diferents superíndexs són significativament diferents p≤0.05

Els efectes de la suplementació amb fitasa són significants (p≤0.05) a partir del dia 17, encara que la relació del sexe dels animals amb la retenció dels minerals no és significativament, és a dir no l'afecta. La dieta baixa en fòsfor no varia la retenció de fòsfor. A la dieta baixa en P i suplementada amb fitasa la retenció del fòsfor ha augmentat un 12.4 % en mascles i només un 6.5 % en femelles (que no es considera significatiu). El mateix passa amb la retenció de calci. A partir del dia 17, en els mascles augmenta 12.2 % que l'anàlisi estadístic considera significativament mentre que en les femelles no.

Taula 3: Resultats estudi in vivo de l'eficàcia de fitases en 3 grups de pollets segons sexe. Adaptació de Sebastian, S et al (1996)

Dieta	Sexe	Cendra tibia		% retenció fòsfor		% retenció calci	
		Cap	Eix	Cap	Eix	Cap	Eix
Control	Mascles	34.4 ^a	57.3 ^a	13.8	16.4	30.9 ^b	36.9
Baixa fòsfor		25.5 ^b	51.4 ^b	13.9	15.2	34.2 ^a	36.8
Baixa fòsfor + fitasa		30.9 ^{ab}	54.4 ^{ab}	13.5	14.8	32.6 ^{ab}	35.6
Control	Femelles	33.7 ^a	57.4 ^a	14.5	15.4	38.7	41.9
Baixa fòsfor		23.5 ^b	52.0 ^b	14.2	14.3	38.8	38.4
Baixa fòsfor + fitasa		30.3 ^a	55.8 ^{ab}	13.9	14.6	34.4	35.3
Control	Mascles i femelles	34.1 ^a	57.4 ^a	14.2	15.9	34.8	39.4
Baixa fòsfor		24.5 ^c	51.7 ^b	14.1	14.8	36.5	37.6
Baixa fòsfor + fitasa		30.6 ^b	55.1 ^a	13.7	14.7	33.5	35.4

^{ab} : valors en una columna amb diferents superíndexs són significativament diferents p≤0.05

L'efecte de la fitasa en les concentracions de cendres de la tibia tan a les porcions de cap com de l'eix són significatives (p≤0.05), en canvi l'efecte del sexe i la interacció entre l'administració de fitases i el sexe dels animals, no ho són.

La dieta baixa en P ha reduït significativament el contingut de cendra en les dues porcions de la tibia en ambdós sexes., encara que és més significativa la reducció de cendres a al cap que a l'eix. Les concentracions de minerals a l'eix de la tibia és relativament constant i no és significativament diferent entre la dieta baixa en P i la suplementada en P, encara que és cert que sí hi ha una significança important en el baix contingut de calci al cap de la tibia en els animals de la dieta baixa en fòsfor respecte de les altres dues dietes.

✓ Sebastian, S et al (Dec 1996)²¹ estudien l'eficàcia d'una fitasa microbiana sense cap més especificació. En aquesta prova, es van estudiar també l'evolució de la retenció i del contingut en tibia de fòsfor i calci i d'altres minerals que obviarem en aquesta revisió a efectes comparatius. Es vol veure si l'addició de calci afecta la funció de la fitasa (taules 4 i 5).

Tipus animal: Pollets d'un dia de vida

Quantitat: 240

Edat: 1 dies- 21 dies

Ambient: en ambient termocontrolat en 24 gàbies, 10 pollets per gàbia. Exposició contínua a llum de fluorescent

Dieta *ad libitum*: Dieta basal de soja i moresc. Totes dels dietes tenen 0.54 % P. Tres lots amb dietes amb 0.6 % (baix), 1 % (recomanat) i 1.25 % (alt) de calci. Cadascuna d'aquestes dietes es divideixen en dos. Una d'elles no es suplementa amb fitasa i a l'altra s'afegeix a dosis de 600 U fitasa/kg aliment.

Anàlisi estadístic: ANOVA, matriu de 3 x 2

Taula 4: Resultats estudi *in vivo* de l'eficàcia de fitases segons l'aporta calci a la dieta de pollets.
Adaptació de Sebastian, S et al (1996)

Dieta		% retenció		Cap de la tibia		
Calci (%)	Fitasa	Fòsfor	Calci	Cendres	Fòsfor (% de cendra)	Calci (% de cendra)
0.60	0	54.7	64.1	25.1	15.3	31.5
0.60	600	57.6	67.6	26.5	14.5	30.3
1.0	0	57.5	51.1	26.2	14.5	32.3
1.0	600	61.2	46.9	29.5	14.7	32.9
1.25	0	53.2	43.2	24.0	14.1	32.2
1.25	600	59.0	43.6	28.8	13.4	30.2

Taula 5: Resultats estudi *in vivo* de l'eficàcia de fitases segons l'aporta calci a la dieta dels pollets.
Adaptació de Sebastian, S et al (1996)

Dieta		Eix de la tibia		
Calci (%)	Fitasa	Cendres	Fòsfor (% de cendra)	Calci (% de cendra)
0.60	0	43.6	17.7	38.8
0.60	600	48.7	15.7	34.6
1.0	0	46.3	15.4	34.4
1.0	600	48.2	15.5	35.9
1.25	0	44.2	14.2	34.6
1.25	600	49.4	14.4	33.9

Malgrat que no existeixen diferències significatives d'interacció entre la quantitat de calci i la fitasa en la retenció ni en el percentatge de calci i fòsfor, considerem aquest estudi perquè sí ens permetrà tenir dades per comparar amb les fitases de més nova generació.

✓ Leeson, S et al (2000)¹³ fan un estudi comparatiu entre una fitasa de *E.coli* AppA (és a dir, de recombinació) i una fitasa de *Aspergillus niger*. Veure resultats a la taula 6.

Tipus animal: Pollets d' un dia de vida

Quantitat: 252

Edat: 1 dies- 21 dies

Ambient: 6 pollets per gàbies, 3 repeticions per dieta.

Dieta *ad libitum*: Dieta basal de soja i moresc. Totes les dietes tenen 0.95 % calci i hi ha tres concentracions de fòsfor que es veuen a la taula.

Anàlisi estadístic: Rectes de regressió.

Taula 6: Resultats de una comparativa in vivo de l'eficàcia fitasa comercial i una nova fitasa en pollets
Adaptació de Leeson, S et al. (2002)

Dieta	% Fòsfor dieta	Fitasa (U/kg)	Origen fitasa	Cendra tibia (%)	P (%) tibia
1	0.45	-	-	37.5 ^a	5.8 ^a
2	0.35	-	-	36.4 ^a	5.2 ^{bc}
3	0.25	-	-	30.8 ^c	2.6 ^f
4	0.35	600	<i>A.niger</i>	37.1 ^a	5.5 ^b
5	0.45	600	<i>A.niger</i>	33.3 ^b	3.8 ^e
6	0.35	600	<i>E.coli</i> AppA	32.4 ^{bc}	5.1 ^c
7	0.45	600	<i>E.coli</i> AppA	33.9 ^b	4.6 ^d

^{abcdcef} mitjanes d'una columna amb lletres diferents tenen diferències significatives p<0.01

✓ Viveros, A. et al (2002)²⁷, estudien l'efecte de l'administració d'una fitasa comercial en pollets amb dietes amb diferents concentracions de calci i fòsfor.

Aquesta prova va ser duta a terme amb 240 broilers mascles obtinguts d'una granja comercial i es van tenir en ambient controlat de llum i temperatura, alimentats amb pinso formulat segons coneixements del moment amb la finalitat d'obtenir una resposta maximitzada a la fitasa. Taules 7 i 8 mostren els resultats d'aquest estudi que són apropiats per aquest treball.

Taula 7: Resultats de l'estudi in vivo de l'eficàcia a diferents dosis de fitasa al pinso en retenció de diferents minerals en pollets.
Adaptació de Viveros, A et al. (2002)

nPP (%)		Fitasa (U/kg diet)	% retenció de mineral			
Setmanes			3 setmanes		6 Setmanes	
0-3	3-6		Ca	P	Ca	P
0.35	0.27		44.38 ^a	54.58 ^b	43.73	53.81 ^b
0.22	0.14		40.65 ^b	61.48 ^a	44.23	59.36 ^a
0.35	0.27	500	38.29 ^b	56.64 ^b	40.91 ^b	53.86 ^b
0.22	0.14	500	46.75 ^a	59.48 ^a	47.05 ^a	59.31 ^a

^{ab} són valors mitjanes de la mateixa fila amb diferències significatives p<0.05

S' observa una interacció significativa ($p < 0.001$) entre els nivells de fòsfor no fitat (nPP) i la fitasa en les retencions de P, Mg i Zn a la setmana 3 i en el cas del Ca i Zn a la setmana 6. Aquesta interacció indica que la retenció per al P i Mg van ser majors (12.1 i 41.3 % respectivament) quan la fitasa es va afegir a les dietes amb un contingut de 0.35 - 0.27 % nPP que en les de menys contingut de nPP. Ans al contrari, la retenció de Ca (25%) i Zn (564%) són majors en les dietes suplementades amb fitasa per les de contingut menor de nPP.

Taula 8: Resultats de l' estudi in vivo de l' eficàcia a diferents dosis de fitasa al pinso en retenció de diferents minerals en pollets.
Adaptació de Viveros, A et al. (2002)

Tractaments en setmanes		Mineral a la tibia					
nPP (%)	Fitasa (U/kg diet)	Cendra tibia (%)	Ca (%)	P (%)	Mg (%)	Zn (µg/g)	
0-3	3-6						
0.35	0.27	45.92 ^a	38.38 ^b	18.77	0.84 ^a	337 ^b	
0.22	0.14	43.66 ^b	39.16 ^a	18.70	0.77 ^b	368 ^a	
0.35	0.27	500	43.67 ^b	38.83	18.73	0.79 ^b	339 ^b
0.22	0.14	500	45.90 ^a	38.70	18.75	0.82 ^a	366 ^a

^{ab} són valors mitjanes de la mateixa fila amb diferències significatives $p < 0.05$

La suplementació de fitasa en dietes amb suplementació baixa en fòsfor, augmenta un 5.1 % la cendra de la tibia, la qual cosa és un indicatiu de la bona mineralització dels ossos que s' associa a la presència de P, Ca, Mg i Zn

✓ Shirley, Rb; Edwards, H.M (2003)²⁴ estudien l' efecte de diferents concentracions d' una fitasa comercial. L' esquema de la prova i els resultats obtinguts es detallen a continuació (taula 9).

Tipus animal: Pollets d' un dia de vida Cobb x Cobb, sexes barrejats aleatòriament

Quantitat: 300

Edat: 1 dies- 21 dies

Ambient: en ambient termocontrolat a 22 °C en 10 pollets per gàbies, 3 repeticions per dieta. Exposició contínua a llum de fluorescent sense possibilitat de rebre UV per no facilitar la síntesis de Vitamina D que pugui millorar el metabolisme del fòsfor.

Dieta *ad libitum*: Dieta basal de soja i moresc. Totes les dietes tenen 0.56 % calci i 0.46 % P. Dieta control conté 0.70 % P

Anàlisi estadístic: Rectes de regressió.

Taula 9: Resultats de l' estudi in vivo de l' eficàcia a diferents dosis de fitasa al pinso en pollets.
Adaptació de Shirley, R.B.; Edwards, H.M. (2003)

Fitasa (U/kg diet)	Cendra tibia (%)	Retenció Ca (%)	Retenció P (%)
0	26.0*	45.6*	51.0
93.7	25.4*	40.8*	50.2
187.5	26.5*	42.4*	54.7
378	28.9*	42.3*	53.8
750	29.7*	44.1*	60.8*
1500	34.3*	42.3*	65.4*
3000	34.4*	45.1*	69.0*
6000	38.6	49.5	77.7*
12000	40.7	53.4	79.9*
control	39.9	51.3	47.2
R ²	0.98	0.78	0.93
* significança p<0.05			

5.2. Fitases recombinants

✓ Fitasa recombinant de *Pichia pastoris* (DSM 23036). La tècnica de síntesis, segons Webel, D.M, (2012)²⁹ suposa la introducció a *Pichia pastoris* de gens heteròlegs clonats de *AppA* i *AppA2* i mutants dirigits als llocs de *AppA* i *AppA2*.

El gen *AppA* Es va aïllar a partir de *E.coli*. El gen *AppA2* es va aïllar d' una colònia bacteriana que presentava activitat fitasa especialment elevada, obtinguda d' un cultiu de colon de porc. Els gens s' han introduït a *Pichia pastoris* amb un vector que té lloc d' inserció per endonucleases de restricció per la inserció de fragments de ADN i marcadors genètics per la selecció dels transformants. El promotor pot ser un promotor constitutiu (3-fosfoglicerat cinasa o el promotor del factor α) o un d' induïble (ADH2, GAL1-10,GAL7, PHO T7 o metalotionina)

S' utilitza un sistema d' expressió en llevats per produir quantitat suficient de fitasa que s' està secretant, de manera que la fitasa pugui aïllar-se i purificar-se des del medi de cultiu. La secreció al medi de cultiu es controla mitjançant un pèptid senyal (*phyA*) o el pèptid senyal de factor α del llevat que dirigeix la fitasa sintetitzada a l' exterior de la cèl·lula.

Aquesta fitasa va ser aprovada per la Comissió Europea (2002)¹⁴ , sota informació favorable de EFSA. La prova de camp (taula 10) següent està extreta de la patent de Webel, D.M.(2002)²⁹. Es resumeixen trets generals de la mateixa i taula de resultats.

Tipus animal: Pollets de pes inicial 97 grams

Quantitat: 200

Edat: 7 dies- 21 dies

Ambient: en gàbia, grups de 4 pollets per gàbia, 5 gàbies per dieta. Aquí s'expressen les mitjanes de les 5 gàbies per cada dieta

Dieta *ad libitum*: Dieta basal de soja i moresc (0.10% P, Ca 0.75%), 9 grups suplementats segons la taula.

Anàlisi estadístic: Rectes de regressió (per calcular fòsfor biodisponible a partir contingut P de KH₂PO₄). Càlcul biodisponibilitat el P en les altres dietes i ANOVA per veure la significança estadística

Taula 10: Resultats de una comparativa in vivo de l'eficàcia de fitases comercials i una nova fitasa en pollastres .
Adaptació patent ES 2597503. Fitasa aprovada per la UE (2012)

DIETES	% fòsfor	% contingut en tibia
	Biodisponibilitat	Cendra
Basal		33.95 ^g
Basal + 0.05% P de KH ₂ PO ₄		39.59 ^f
Basal + 0.10% P de KH ₂ PO ₄		46.40 ^e
Basal + 0.15% P de KH ₂ PO ₄		50.70 ^c
Basal + 500 U/kg <i>AppA</i> en <i>Pichia</i>	0.116 ^c	49.02 ^d
Basal + 500 U/kg <i>AppA</i> en <i>E.coli</i>	0.093 ^d	45.96 ^e
Basal + 500 U/kg <i>AppA2</i> en <i>Pichia</i>	0.125 ^c	49.13 ^{cd}
Basal + 1000 U/kg <i>AppA2</i> en <i>Pichia</i>	0.183 ^b	54.37 ^b
Basal + 1500 U/kg <i>AppA 2</i> en <i>Pichia</i>	0.211 ^a	56.15 ^a
Basal +500 U/kg de fitasa comercial	0.037 ^c	38.81 ^f
abcde : valors en una columna amb diferents superíndexs són significativament diferents		

✓ Fitasa de *Trichoderma reesei* ATCC SD-6528, segons autors de la patents Gebert, M. Et al (2012)¹¹, comprèn la deleció del gen d' endo-N-acetilglucosaminidasa. Aquest gen codifica per l'enzim endo-N-acetilglucosaminidasa augmenta la glicosilació de les fitases. Aquesta fitasa ha estat autoritzada durant un període de 10 anys per la Comissió Europea (2015)¹⁵. Sota informe favorable de la EFSA(2015)⁵ i (2016)⁶, d'on s'extreuen les 4 següents taules (taules de la 11 a la 14) on es mostren els resultats d'aquesta fitasa amb una breu introducció amb les dades de l'estudi.

Test 1 :

Tipus animal: pollastre engreix raça Ross 308

Quantitat: 288 mascles

Edat: 5 dies- 21 dies

Ambient: en 18 gàbies, grups de 16

Dieta *ad libitum*: Dieta basal de soja i blat (0.43% P, Ca 0.70%). Tres grups: un grup control positiu té dieta enriquida (0.61% P, Ca 0.80%), un grup control negatiu sense fitasa i tercer grup amb 250 FTU/kg

Anàlisi estadístic: ANOVA comparades amb test de Tukey

Taula 11: Resultats de una comparativa in vivo de l'eficàcia de fitasa recombinant a diferents concentracions en pollastres. Adaptació opinió científica EFSA. EFSA Journal 2017.5024.Fitasa aprovada per la UE (2016)

Tractament	Retenció		% contingut fòsfor en tibia g/ kg matèria seca lliure de greix
	% fòsfor	% calci	
Control negatiu	56.7 ^b	44.9 ^b	380 ^c
250 FTU/kg pinso	64.0 ^a	46.7 ^b	419 ^b
Control positiu	53.0 ^b	52.4 ^a	465 ^a
abcde : valors en una columna amb diferents superíndexs són significativament diferents			

Test 2 :

Tipus animal: pollastre engreix raça Ross 308

Quantitat: 160 mascles

Edat: 1 dies- 21 dies

Ambient: en 18 gàbies, grups de 16

Dieta *ad libitum* :Dieta basal de soja i moresc (0.49% P, Ca 0.95%). Cinc grups: un grup control positiu té dieta enriquida (0.65% P, Ca 0.92%), un grup control negatiu sense fitasa i tres grups amb 250 FTU/kg, 500 FTU/kg i 1000 FTU/kg respectivament

Anàlisi estadístic: ANOVA comparades amb test de Tukey

Taula 12: Resultats de una comparativa in vivo de l'eficàcia de fitasa recombinant a diferents concentracions en pollastres. Adaptació opinió científica EFSA. EFSA Journal 2015.4275.Fitasa aprovada per la UE (2016)

Tractament	Retenció	
	% fòsfor	% calci
Control negatiu	46.8 ^b	47.5 ^b
250 FTU/kg pinso	61.5 ^a	62.1 ^{ab}
500 FTU/kg pinso	60.2 ^a	63.8 ^a
1000 FTU/kg pinso	64.5 ^a	62.5 ^{ab}
Control positiu	53.7 ^b	63.4 ^a
abcde : valors en una columna amb diferents superíndexs són significativament diferents		

Test 3 :

Tipus animal: Gall dindi engreix raça BUT Big6

Quantitat: 450 mascles

Edat: 1 dies- 29 dies

Ambient: en 45 gàbies, grups de 10

Dieta *ad libitum*: en forma de pellet: Dieta del dia 1 al 7 amb 0.86 % fòsfor. Del dia 7 al 21 dieta basal de soja i morenc (0.63% P, Ca 0.99%). Cinc grups: un grup control positiu té dieta enriquida (0.78% P, Ca 1.15%), un grup control negatiu sense fitasa i tres grups amb 250 FTU/kg, 1000 FTU/kg i 2000 FTU/kg respectivament
Anàlisi estadístic: ANOVA comparades amb test de Tukey

Taula 13: Resultats de una comparativa in vivo de l'eficàcia de fitasa recombinant a diferents concentracions en gall dindi. Adaptació opinió científica EFSA. EFSA Journal 2015.4275.Fitasa aprovada per la UE (2016)

Tractament	Retenció		Contingut tibia (g/kg os)	
	% fòsfor	% calci	Cendra	Fòsfor
Control negatiu	47.8 ^c	40.9 ^c	333 ^c	59 ^c
250 FTU/kg pinso	58.4 ^b	50.5 ^b	389 ^b	69 ^b
1000 FTU/kg pinso	68.7 ^a	61.6 ^a	443 ^a	81 ^a
2000 FTU/kg pinso	66.5 ^a	59.4 ^a	447 ^a	80 ^a
Control positiu	47.6 ^c	43.1 ^c	401 ^b	71 ^b

^{abc} : valors en una columna amb diferents superíndexs són significativament diferents p<0.05

Test 4:

Tipus animal: Gallines ponedores de 21 setmanes d'edat de raça Hy-line

Quantitat: 72

Edat: 21-27 setmanes

Ambient: 3 dietes, 12 gallines per grup i dos grups per dieta

Dieta basal de soja i blat (0.34% P, Ca 3.4%). Cinc grups: un grup control positiu té dieta enriquida (0.65% P, Ca 3.6%), un grup control negatiu sense fitasa i un grup amb aliment suplementat amb 250 FTU/kg de fitasa.

Anàlisi estadístic: ANOVA comparades amb test de Tukey

Taula 14: Resultats de una comparativa in vivo de l'eficàcia de fitasa recombinant a diferents concentracions en gallines ponedores. Adaptació opinió científica EFSA. EFSA Journal 2015.4275.Fitasa aprovada per la UE (2016)

Tractament	Retenció		Contingut fòsfor os %	Contingut tibia (%)	
	% fòsfor	% calci		Cendra	Fòsfor
Control negatiu	30.5 ^b	63.9 ^b	0.131	22.8 ^b	3.9 ^b
250 FTU/kg pinso	46.2 ^a	70.7 ^a	0.133	24.2 ^a	4.2 ^a

^{ab} : valors en una columna amb diferents superíndexs són significativament diferents p<0.05

Hi ha diferències significatives en la retenció de fòsfor i els continguts de cendres i fòsfor a la tibia. La quantitat de fòsfor a l'os no es considera afectada.

✓ Aquesta fitasa s'obté aïllant una proteïna de *Serratia odorifera* que té un 86 % de similitud amb la seqüència de fitasa, segons Altares-Real, S et al (2014)¹. Posteriorment a aquesta seqüència se li apliquen 50 millores d'optimització codònica amb respecte a l'organisme hospedador *Pichia pastoris* en referència al seu metabolisme metilotròfic i tenint en compte el codó preferit per cada aminoàcid per *Pichia*. La inserció del fragment es fa mitjançant un cassette d'expressió dissenyat i optimitzat per aquest procés.

La seva aprovació d'ús per la Comunitat europea sota el dictamen recollit a Official Journal (2015)¹⁶ sota informe positiu de l'EFSA⁷.

Es recullen a continuació en les taules 15 i 16 els resultats recollits dins l'informe d'EFSA⁵. En cap dels tests que s'han fet amb aquesta 3-fitasa es veuen diferències significatives estadísticament entre els paràmetres extrets per aquest treball. Com que la finalitat del mateix es comparar l'eficàcia de les fitases amb altres fitases més antigues, les dades s'han inclòs en aquest treballs igualment.

Test 1 :

Tipus animal: pollastres engreix raça Ross de 21 dies

Quantitat: 96 mascles

Edat: 15 dies- 17 dies d'estudi fins 36-38 dies de vida dels pollastres

Ambient: en 48 gàbies, grups de 2

Dieta *ad libitum*: Dieta basal de soja, moresc i blat (0.50% P, Ca 0.68%). Sis grups: un grup control positiu té dieta enriquida (0.60% P, Ca 0.91%), un grup control negatiu sense fitasa i quatre grups amb suplementació de 3-fitasa 250, 500, 1000 i 10.000 FTU/kg respectivament.

Anàlisi estadístic: ANOVA comparades amb test de Dunnett

Taula 15: Resultats de una comparativa in vivo de l'eficàcia de fitasa recombinant a diferents concentracions en pollastres d'engreix. Adaptació opinió científica EFSA. EFSA Journal 2016.4622.Fitasa aprovada per la UE (2019)

Tractament	Retenció	% contingut fòsfor en tibia
	% fòsfor	g/ kg matèria seca lliure de greix
Control negatiu	42.1	9.5
250 FTU/kg pinso	40.1	9.7
500 FTU/kg pinso	46.9	9.7
1000 FTU/kg pinso	45.7	9.7
10000 FTU/kg pinso	41.6	9.7
Control positiu	36.2	9.7

Test 2:

Tipus animal: pollets d' 1 dia Cobb

Quantitat: 160 mascles

Edat: 42 dies de vida dels pollastres

Ambient: en 48 gàbies, grups de 2

Dieta *ad libitum*: Dieta basal de soja, moresc i blat (0.63% P, Ca 0.77%). Sis grups: un grup control positiu té dieta enriquida (0.80% P, Ca 1.03%), un grup control negatiu sense fitasa i quatre grups amb suplementació de 3-fitasa 250, 500, 1000 i 10.000 FTU/kg respectivament.

Anàlisi estadístic: ANOVA comparades amb mètode LDS

Taula 16: Resultats de una comparativa in vivo de l'eficàcia de fitasa recombinant a diferents concentracions en pollastres. Adaptació opinió científica EFSA. EFSA Journal 2016.4622.Fitasa aprovada per la UE (2019)

Tractament	% cendra matèria seca lliure
Control negatiu	51.5
250 FTU/kg pinso	51.4
500 FTU/kg pinso	51.5
1000 FTU/kg pinso	51.6
Control positiu	52.2

✓ Fitasa d' *Aspergillus niger* ISO-502 derivat de la soca d' *A. niger* GAM-53 per modificació genètica consistent en reemplaçar els 7 loci *glaA* amb seqüències truncades no funcionals $\Delta glaA$, segons la patent de Haefner, S. (2017)¹². La modificació també inclou inactivació del gen codificant per proteasa extracel·lular (*pepA*). La soca receptora està lliure de gens resistents a antibiòtic o altres gens marcadors. El gen sintètic codificant per la 6-fitasa (anomenat HF586) s' han construït basat en el gen de l' enterobacteria *Hafnia sp*, *Yersinia mollaretii* i *Buttiauxella gaviniae*. Aquest gen se li ha optimitzat el codó per millorar la resistència a altes temperatures, acidesa del pH i augmentar l' activitat específica per la proteïna codificada.

Aquesta fitasa va estar aprovada per la Comissió Europea (2017)¹⁷ sota informe positiu de l'EFSA (2017)⁷, del que a més, s'extreuen les següents proves in vivo, les característiques de les quals es poden veure a continuació i els resultats es troben tabulats en les taules 17 i 18.

Test 1 :

Tipus animal: Pollets d' un dia Ross 308

Quantitat: 384

Edat: 7 dies- 21 dies

Ambient: en gàbia, grups de 4 (4x 12 replicues de cada grup x 8 dietes).

Dieta *ad libitum*: Dieta basal de soja i moresc (0.39% P, Ca 0.48%), grup control positiu té dieta enriquida (0.74% P, Ca 0.90%). Un grup control sense fitasa i la resta amb quantitats de fitasa segons taula

Anàlisi estadístic: ANOVA comparades amb test de Duncan

Taula 17: Resultats de una comparativa in vivo de l'eficàcia de fitasa recombinant a diferents concentracions gall dindi. Adaptació opinió científica EFSA. EFSA Journal 2017.5024.Fitasa aprovada per la UE (2018)

FTU/kg pinso	% fòsfor	% contingut en tibia	
	Retenció	Cendra	Fòsfor
Control	81.2 ^{bc}	38.2 ^e	5.7 ^d
125	80.4 ^c	40.8 ^d	6.1 ^{cd}
250	82.4 ^{bc}	41.4 ^{cd}	6.4 ^{bc}
375	81.6 ^{bc}	41.1 ^{cd}	6.2 ^c
500	81.3 ^{bc}	42.9 ^{bc}	6.7 ^{ab}
625	86.4 ^{ab}	49.9 ^{bc}	6.7 ^{ab}
750	88.0 ^a	44.5 ^b	6.9 ^a
Control positiu	57.7 ^d	47.8 ^a	7.0 ^a

^{abcde} : valors en una columna amb diferents superíndexs són significativament diferents

Test 2 :

Tipus animal: Gall dindi d' un dia de vida

Quantitat: 504

Estat: 1 dies- 42dies

Ambient: en gàbia, grups de 18 (7 repliques de cada grup x 4 dietes).

Dieta *ad libitum*: Dieta basal de soja i moresc (0.70% P, Ca 0.95%), grup control positiu té dieta enriquida (1.0% P, Ca 1.3%). Un grup control sense fitasa i la resta amb quantitats de fitasa segons taula

Anàlisi estadístic: ANOVA comparades amb test de Duncan

Taula 18: Resultats de una comparativa in vivo de l'eficàcia de fitasa recombinant a diferents concentracions en gall dindi. Adaptació opinió científica EFSA. EFSA Journal 2017.5024.Fitasa aprovada per la UE (2018)

FTU/kg pinso	% fòsfor	% contingut en tibia	
	Retenció	Cendra	Fòsfor
Control	55.0 ^c	38.2 ^d	6.3 ^d
125	63.3 ^{ab}	39.1 ^{cd}	6.5 ^{cd}
250	65.5 ^a	39.9 ^{bcd}	6.6 ^{bcd}
500	63.2 ^a	40.6 ^{bc}	6.8 ^{bc}
1000	62.1 ^a	41.1 ^{ab}	6.8 ^b
Control positiu	41.0 ^{ab}	42.7 ^a	7.40 ^a

^{abcde} : valors en una columna amb diferents superíndexs són significativament diferents

✓ 6- fitasa produïda por *Komagataella phaffii* CGMCC12.56. Les dades de quin tipus de modificació s' han produït en aquesta soca de llevat no estan disponibles públicament a l' informe de l' EFSA i la patent encara esta en procés i per tant no és pública. Aquesta és l' última fitasa aprovada per la Comissió Europea (2019)¹⁸, a arrel de l' informe positiu de l'EFSA (2019)⁸. Les dades dels següents estudis (taula 19)s' han extret d' aquest últim informe.

Test 1:

Tipus animal: Pollets per engreix d' un dia de vida. Arbor Acres Plus

Quantitat: 320

Edat: 21-27 setmanes

Ambient: 40 gàbies amb 8 pollets cadascuna. Dieta basal fins dia 20. Dieta amb fitasa del 21 al 28

Dieta basal de soja i moresc (5.7g P /kg, Ca 9 g Ca/ kg). Quatre grups: un grup control i un tres grups amb aliment suplementat amb 250 , 500 i 1000 U/kg de fitasa respectivament.

Anàlisi estadístic: ANOVA comparades amb test de Tukey

Test 2:

Tipus animal: Pollets per engreix d' un dia de vida. Cobb 500

Quantitat: 480

Edat: 21-27 setmanes

Ambient: 24 gàbies amb 20 pollets cadascuna. Dieta basal fins dia 20. Dieta amb fitasa del 21 al 28

Dieta basal de soja i moresc (3.7g P /kg, Ca 8.4 g Ca/ kg). Un grup control, un grup amb complement de minerals(6.7g P /kg, Ca 10 g Ca/ kg) i un dos grups amb aliment suplementat amb 250 i 500 U/kg de fitasa respectivament.

Anàlisi estadístic: ANOVA comparades amb test de Tukey

Taula 19: Resultats de una comparativa in vivo de l' eficàcia de fitasa recombinant a diferents concentracions en pollastres. Adaptació opinió científica EFSA. EFSA Journal 2019;5692.Fitasa aprovada per la UE (2020)

Test	Dietes		% retenció fòsfor	Contingut tibia (%)	
	Fitasa (U/kg)	P- Ca (g/kg aliment)		Cendra	Fòsfor
1	0	5.7-9.0	46.5 ^b	45.4 ^a	-
	250	5.7-9.0	54.0 ^c	51.2 ^b	-
	500	5.7-9.0	55.2 ^c	51.9 ^b	-
	1000	5.7-9.0	59.7 ^c	52.9 ^b	-
2	0	6.7-10.0	37.9 ^a	52.4 ^b	-
	0	3.7- 8.4	37.6 ^a	23.9 ^a	3.9 ^a
	250	3.7- 8.4	47.8 ^b	27.8 ^b	4.9 ^b
	500	3.7- 8.4	52.3 ^c	30.5 ^c	5.5 ^c

Anàlisi comparatiu del rendiment de fitases no recombinants i recombinants

	^{abc} : valors en una columna amb diferents superíndexs són significativament diferents $p < 0.05$
--	---

Hi ha diferències significatives en la retenció de fòsfor i els continguts de cendres i fòsfor a la tibia.

6. Discussió

Es comparen resultats d'eficàcia de les fitases que actualment estan autoritzades a la Comunitat Europea amb l'eficàcia de les primeres fitases de les que s'han trobat publicacions que complien els criteris d'inclusió detallats a l'apartat 4 de metodologia. Això significa que s'han descartat molts estudis i que la comparativa no es fa necessàriament entre les fitases més eficients de cada moment sinó entre aquelles de publicació oberta i sobretot entre aquelles que presenten als estudis publicats algun paràmetre que permeti fer la comparativa amb els paràmetres dels altres estudis.

Es compararen quatre paràmetres relacionats directament amb l'eficàcia de l'ús de les fitases que són el % de retenció de fòsfor i calci en les excretes i els paràmetres minerals (cendra i fòsfor) de la tibia. Existeixen molts altres paràmetres presents en alguns estudis com guany de pes o rati de conversió de l'aliment en pes de l'animal que no s'han considerat en aquest estudi comparatiu perquè no està demostrat que existeixi una relació directa amb l'acció de les fitases, encara que sí podria tenir relació amb l'anul·lació de l'activitat antinutricional dels fitats.

Comparativa de retenció de fòsfor (%)

Taula 20: Recopilació de dades relatives a la retenció dels fòsfor a les excretes (% de fòsfor)

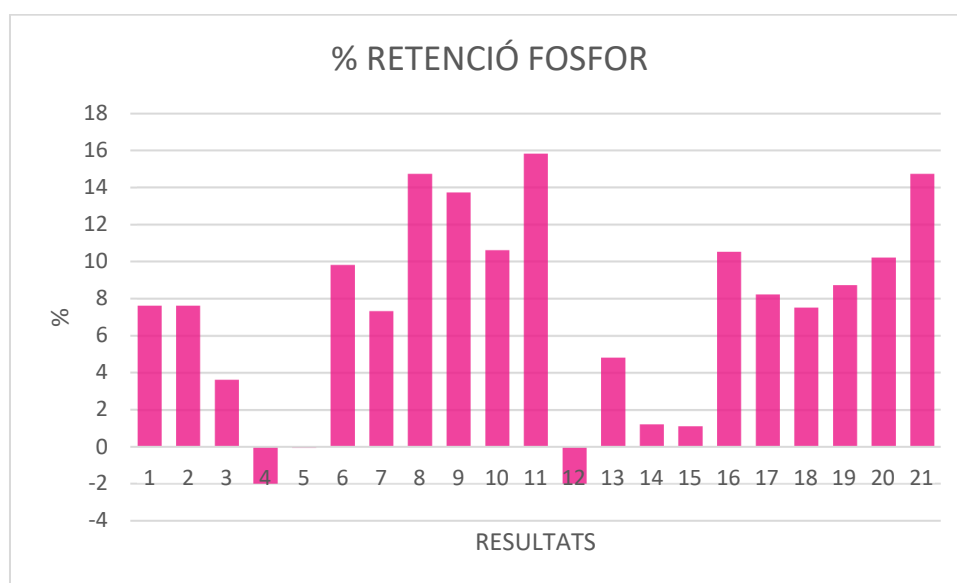
		Dosis fitasa (U/kg aliment)			Variabilitat
		Control	250-300	500-600	
Taula 2 ⁱ	Dia 10	48.6	-	56.2	> 7.6 %
	Dia 17	49.8	-	63.1	> 7.6 %
Taula 4 ⁱⁱ		57.6	-	61.2	> 3.6 %
Taula 6	Dia 21	61.48	-	59.48	< 2%
	Dia 42	59.36	-	59.31	< 0.05%
Taula 9 ⁱⁱⁱ		51.0	-	60.8	> 9.8 %
Taula 11		56.7	64.0		>7.3 %
Taula 12		46.8	61.5	60.2	> 14.7%, >13.4%
Taula 13		47.8	58.4	-	> 10.6 %
Taula 14		30.5	46.2	-	> 15.8 %
Taula 15		42.1	40.1	46.9	< 2% , > 4.8%
Taula 17		81.2	81.6	81.3	> 1.2 % , >1.1 %
Taula 18		55.0	65.5	63.2	>10.5%, >8.2%
Taula 19		46.5	54.0	55.2	>7.5%, >8.7%
		37.6	47.8	52.3	>10.2%, >14.7%

ⁱTaula 2: la prova es fa amb tres grups: un de mascles, un de femelles i un mixt. Es fan servir els valors del mixt, ja que la prova determina que el sexe dels animals no és determinant.

ⁱⁱTaula 4: la prova es fa amb diversos nivells de calci , però com es determina que la diferència de calci en cadascuna de les dietes no és significativa, es prendran els valors de la dieta amb nivell de calci intermig

ⁱⁱⁱTaula 9: donat que no existeix una dosi de comparació, prendrem la de 750 ja que és el primer resultat significatiu

Si representem gràficament els % de retenció de fòsfor obtindrem:



Gràfica 1: % de retenció de fòsfor en excretes de pollastres

Tenint en compte que a partir de la taula 10 es representen els resultats de les fitases recombinants, a la gràfica anterior, les quatre primeres barres representen fitases no recombinants i la resta a les recombinants. Si bé és cert que algunes de les fitases recombinants tenen molt millors resultats que les no recombinants, els resultats són molt heterogenis en els dos grups. La millor fitasa no recombinant presenta una millora de la retenció de fòsfor de 9.8 % i la millor fitasa recombinant presenta un valor de 15.8 % per al mateix paràmetre.

Si tenim en compte els valors de les mitjanes, la mitjana de retenció de fòsfor per les fitases no recombinants és del 3.35%, mentre que per a les fitases recombinants és de 8.55%.

Comparativa de retenció de calci (%)

Taula 21: Recopilació de dades relatives a la retenció dels calci a les excretes (% de calci)

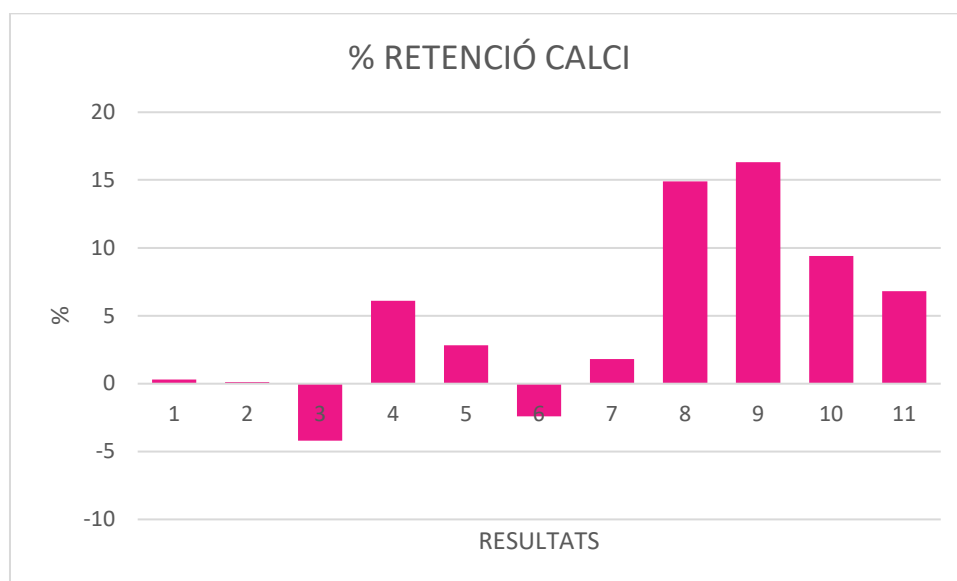
		Dosis fitasa (U/kg aliment)			Variabilitat
		Control	250-300	500-600	
Taula 2 ⁱ	Dia 10	34.1	-	34.4	> 0.3 %
	Dia 17	40.2	-	40.3	> 0.1 %

Taula 4 ⁱⁱ		51.1	-	46.9	< 4.2 %
Taula 7	Dia 21	40.65	-	46.75	> 6.1%
	Dia 42	44.23	-	47.05	> 2.82%
Taula 9 ⁱⁱⁱ		46.5	-	44.1	< 2.4 %
Taula 11		44.9	46.7	-	>1.8 %
Taula 12		47.5	62.1	63.8	> 14.9%, >16.3%
Taula 13		40.9	50.5	-	> 9.4 %
Taula 14		63.9	70.7	-	> 6.8 %

ⁱTaula 2: la prova es fa amb tres grups: un de mascles, un de femelles i un mixt. Farem servir els valors del mixt, ja que la prova determina que el sexe dels animals no es determinant

ⁱⁱTaula 4: la prova es fa amb diversos nivells de calci , però com es determina que la diferència de calci en cadascuna de les dietes no és significativa, es prendran els valors de la dieta amb nivell de calci intermig

ⁱⁱⁱTaula 9: donat que no existeix una dosi de comparació, prendrem la de 750 ja que és el primer resultat significatiu



Gràfica 2: % de retenció de calci en excretes de pollastres

Tenint en compte que a partir de la taula 10 es representen els resultats de les fitases recombinants, a la gràfica anterior, les sis primeres barres representen fitases no recombinants i la resta a les recombinants. En aquest cas, la millora de la retenció del calci amb l'ús de fitases recombinants és molt superior a la retenció de calci de les fitases no recombinants. La millor fitasa no recombinant presenta una millora de la retenció de calci a les excretes de les aus és de 6.1 % i la millor fitasa recombinant presenta un valor de 16.3 % per al mateix paràmetre.

Si tenim en compte els valors de les mitjanes, la mitjana de retenció de calci per les fitases no recombinants és del 0.45%, mentre que per a les fitases recombinants és de 9.84%.

Els dos paràmetres de retenció de minerals, extret de les excretes de les aus presenten els millors resultats per la mateixa fitasa. És la fitasa recombinant de *Trichoderma reesei* ATCC SD-6528, Gebert, M. Et al (2012)¹¹

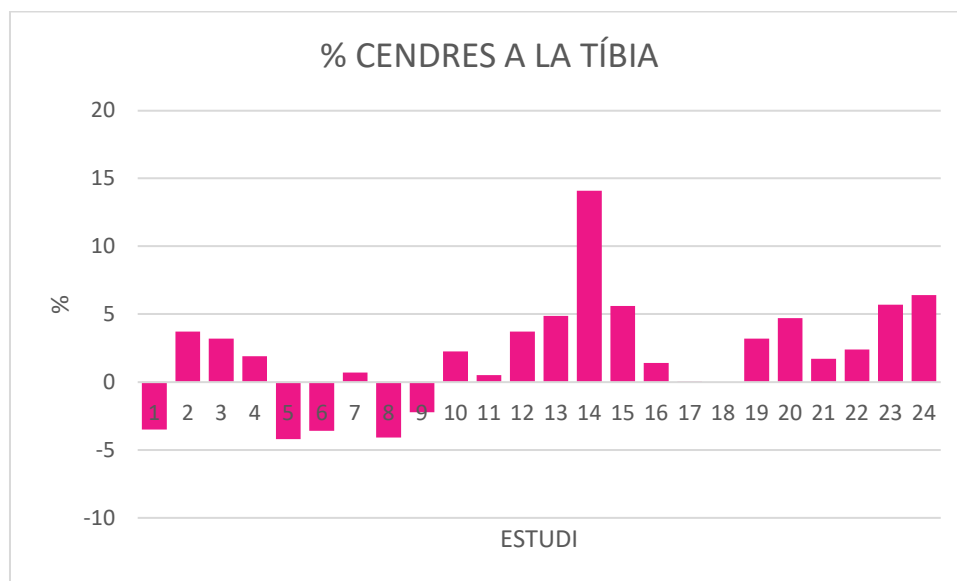
Comparativa de cendres de la tibia

Taula 22: Recopilació de dades relatives al % de cendres a la tibia

		Dosis fitasa (U/kg aliment)			Variabilitat		
		Control	250-300	500-600			
Taula 3	Cap	34.1	-	30.6	< 3.5 %		
	Eix	51.4		55.1			
Taula 4 ⁱ	Cap	26.2	-	29.4	> 3.2 %		
Taula 5 ⁱ	Eix	46.3	-	48.2	> 1.9%		
Taula 6		37.5	-	33.3/33.9	<4.2%, <3.6%		
		36.4	-	37.1/32.4			
Taula 8		45.92	-	43.67	<2.23 %		
		43.66		45.90			
Taula 9		26.0	26.5	29.7	>0.5 %, >3.7 %		
Taula 10		33.95	-	No recomb	Recombinants	No	Recomb
				38.81	49.02/45.96/49.13	>4.86%	>14.09%
Taula 13		33.3	38.9	-	> 5.6 %		
Taula 14		22.8	24.2	-	> 1.4 %		
Taula 16		51.5	51.4	51.5	<0.1%, =		
Taula 17		38.2	41.4	42.9	>3.2%, >4.7%		
Taula 18		38.2	39.9	40.6	>1.7%, 2.4%		
Taula 19		45.4	51.2	51.9	>5.7%, >6.4%		
		52.4	27.8	30.5			

ⁱTaula 4 i 5: la prova es fa amb diversos nivells de calci , però com es determina que la diferència de calci en cadascuna de les dietes no és significativa, es prendran els valors de la dieta amb nivell de calci intermig.

ⁱⁱⁱTaula 9: donat que no existeix una dosi de comparació, prendrem la de 750 ja que és el primer resultat significatiu



Gràfica 3: Quantitat (%) de cendres a la tibia d' aus.

Tenint en compte que a partir de la taula 10 es representen els resultats de les fitases recombinants, a la gràfica anterior, les tretze primeres barres representen fitases no recombinants i la resta a les recombinants. En aquest cas, el % de cendra de la tibia amb l'ús de fitases recombinants és molt superior % de cendres de les fitases no recombinants, la qual cosa significa que a priori la mineralització amb l'ús de fitases recombinants és major. La millor fitasa no recombinant presenta una millora de la retenció de calci a les excretes de les aus és de 4.86 % i la millor fitasa recombinant presenta un valor de 14.09 % per al mateix paràmetre. En aquest cas, els dos paràmetres provenen del mateix estudi Webel, D.M (2012)²⁹ en que es provava l'eficàcia de diverses combinacions de gens heteròlegs en *Pichia pastoris*, front una fitasa comercial no recombinant. El resultat d'aquest estudi es veuria confirmat per la comparativa realitzada en aquest treball.

Si tenim en compte els valors de les mitjanes, la mitjana % de cendres a la tibia per les fitases no recombinants és del 0.24%, mentre que per les fitases recombinants és de 4.11%.

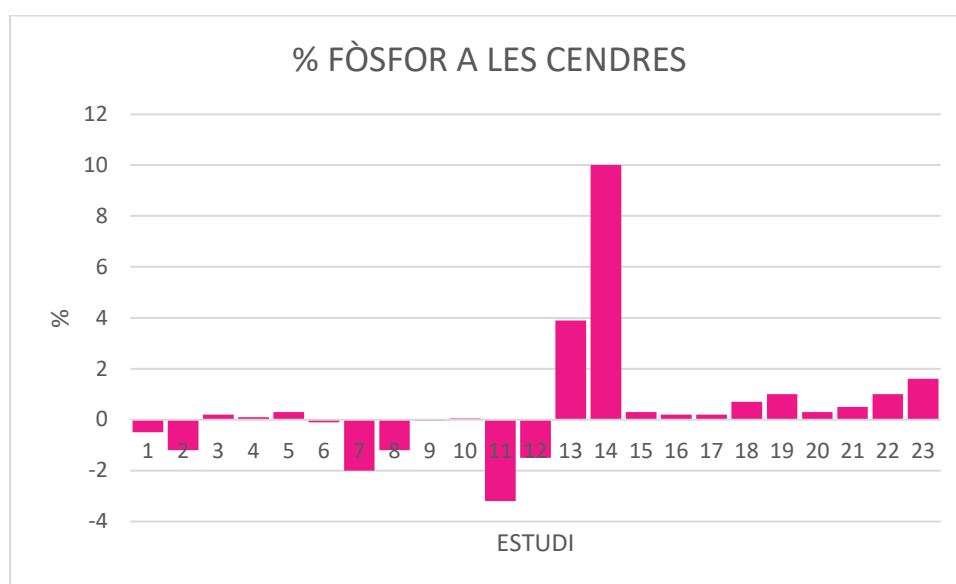
Comparativa de quantitat (%) de fòsfor les cendres de la tibia

Taula 23: Recopilació de dades relatives al % de fòsfor de cendres a la tibia

		Dosis fitasa (U/kg aliment)			Variabilitat
		Control	250-300	500-600	
Taula 3	Cap	14.2	-	13.7	< 0.5 %
	Eix	15.9	-	14.7	< 1.2 %
Taula 4 ⁱ	Cap	14.5	-	14.7	> 0.2 %
Taula 5 ⁱ	Eix	15.4	-	15.5	> 0.1%

Taula 6	5.2	-	5.5/ 5.1	>0.3 %, <0.1%
	5.8	-	3.8/ 4.6	<2%, <1.2%
Taula 8	18.77	-	18.73	<0.04 %
	18.70		18.75	>0.05 %
Taula 9	45.6	42.4	44.1	<3.2 %, <1.5 %
Taula 11	38.0	41.9	-	>3.9%
Taula 13	59	69	-	> 10 %
Taula 14	3.9	4.2	-	> 0.3 %
Taula 15	9.5	9.7	9.7	>0.2%, >0.2%
Taula 17	5.7	6.4	6.7	>0.7%, >1%
Taula 18	6.3	6.6	6.8	>0.3%, >0.5%
Taula 19	3.9	4.9	5.5	>1%, >1.6%

Taula 4 i 5: la prova es fa amb diversos nivells de calci , però com es determina que la diferència de calci en cadascuna de les dietes no és significativa, es prendran els valors de la dieta amb nivell de calci intermig.



Gràfica 4: Quantitat de fòsfor (%) a les cendres a la tibia.

Tenint en compte que a partir de la taula 10 es representen els resultats de les fitases recombinants, a la gràfica anterior, les dotze primeres barres representen fitases no recombinants i la resta a les recombinants. En aquest cas, la quantitat de fòsfor a les cendres de la tibia amb l'ús de fitases recombinants és millor que la de les fitases no recombinants. La millor fitasa no recombinant presenta una millora de 0.3 % i la millor fitasa recombinant presenta un valor de 10 % per al mateix paràmetre.

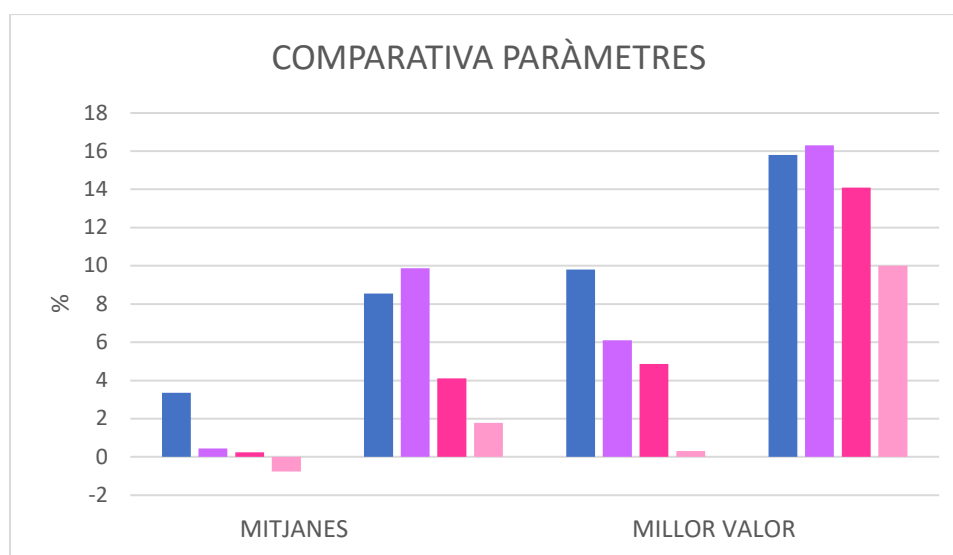
Si tenim en compte els valors de les mitjanes, la mitjana de fòsfor a les cendres per les fitases no recombinants és del -0.76 %, mentre que per a les fitases recombinants és de 1.79%.

La millor fitasa per aquest paràmetre coincidix amb la fitasa de *Trichoderma reesei* ATCC SD-6528, descrita per Gebert, M. et al (2012)¹¹, que també presentava els millors paràmetres de retenció de fòsfor i calci en excretes.

Si es tabulen els valors més indicatius recollits durant aquesta discussió s'obté la taula 24.

Taula 24: Recopilació de dades relatives als paràmetres de la discussió

PARÀMETRE	VALOR MITJANA		MILLOR VALOR	
	NO RECOMBINANT	RECOMBINANT	NO RECOMBINANT	RECOMBINANT
% RETENCIÓ FÒSFOR	3.35%	8.55%	9.8%	15.8%
% RETENCIÓ CALCI	0.45%	9.87%	6.1%	16.3%
% CENDRES	0.24%	4.11%	4.86%	14.09%
% P A CENDRES	-0.76%	1.79%	0.3%	10%



Gràfica 5: Recopilació de dades relatives als paràmetres de la discussió

La millora en tots els aspectes és considerable, tenint en compte que es tracta d'un procés que implica éssers vius els microorganismes productors de fitasa.

La principal limitació per a la recopilació de la informació per a poder realitzar aquest estudi ha estat la dificultat a l'hora de recopilar estudis amb paràmetres comparables, no només en quant als conceptes sinó en metodologia i unitats. És possible que aquesta limitació hagi, d'alguna manera afectat el resultat de la discussió, encara que es pot confirmar la hipòtesi que es plantejava inicialment. Un altra cosa és que la heterogeneïtat dels resultats dins de cada bloc de fitases (recombinant i no recombinants) també és sorprenent.

7. Conclusions

Des de l' inici de l'ús de fitases en alimentació animal, aproximadament al 1995, les fitases han anat evolucionant i millorant la seva activitat, augmentant la seva capacitat d' alliberació del fòsfor fític dels cereals.

A més de millorar l' alliberació del fòsfor fític, també millora la retenció de calci i probablement d' altres minerals.

Tots els paràmetres estudiats han duplicat, com a mínim, els seus valors.

L' us de les fitases en nutrició ambiental sembla viable ja que això augmenta la biodisponibilitat del minerals, disminuint els costos de complementar-les amb fòsfor inorgànic que ocupa el primer lloc en quant a costos d' additius.

L' augment de la biodisponibilitat del fòsfor repercuteix també en una disminució del dany mediambiental.

El fet d' intervenir biotecnològicament en la producció de les fitases ajuda a la indústria a estandarditzar el procediments i per tant els productes i assegurar-ne així un subministrament continu i segur.

8. Autoavaluació

Inicialment TFG era orientat a l' estudi de l' eficàcia de les fitases en monogàstrics. Era un objectiu massa ampli per l' abast del format d' un treball d' aquest tipus. Quan has dedicat moltes hores a una recerca i has de renunciar a una part de la mateixa adquireixes un primer aprenentatge : dimensionament.

Tot i ja haver reduït de monogàstrics a aus, existeixen alguns estudis en ànecs, oques i altres espècies menors a les que també cal renunciar per tal de poder fer una discussió de resultats ben argumentada i consistent. Segon aprenentatge: treballar al voltant de l' objectiu final i no a l' inrevés.

D' altra banda, aquest treball m' ha obligat a aprendre a sistematitzar la selecció les dades que permetessin fer una comparativa de treballs de diferents autors, èpoques i maneres de fer. Calia fer una selecció dels paràmetres més universalitzats al llarg del temps i això com és lògic és un procés molt difícil, donat que l' avanç dels coneixements dirigeix l' enfocament dels treballs de recerca de forma canviant al llarg del temps.

9. Bibliografia

- ¹Atares-Real, S et al (2014) Nueva fitasa, método para obtener la misma y uso de la misma. Patente ES 2 725 705 T3.
- ²Cabaña, N (2001) Eficacia de las fitasas en alimentación animal. Centro de investigación agropecuaria. México. Vol 2. 22-38
- ³Donayre, J.C. (2005) ¿Cómo elegir Fitasa? Un nuevo enfoque dentro de la Formulación de Raciones. Engormix. Recuperado 06 junio, 2021
<https://www.engormix.com/avicultura/articulos/como-elegir-fitasa-nuevo-t26228.htm>)
- ⁴EFSA Journal 2015; 13 (11):4275. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4275
- ⁵EFSA Journal 2016; 14 (11):4622. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4622
- ⁶EFSA Journal 2016; 14 (11):4625. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4625
- ⁷EFSA Journal 2017; 15 (11):5024. doi: 10.2903/j.efsa.2017.5024
- ⁸EFSA Journal 2019; 17 (5):5692. doi: 10.2903/j.efsa.2019.5692
- ⁹Fernández Martínez, Carlos (2005). Aditivos Zootécnicos alternativa a los antibióticos como promotores del crecimiento. Madrid, pág. 7 – 19.
- ¹⁰Franco, C (2007) Optimización de la producción de fitasa por *Aspergillus niger* en fermentación en estado sólido. Unidad Profesional interdisciplinaria de Biotecnología, 22 (4): 238-45
- ¹¹Gebert, M (2012). Método para la mejora de la estabilidad de fitasas con ácido fítico y composiciones que comprenden fitasa y ácido fítico. Patente ES 2 799 500 T3.
- ¹²Haefner, S. et al (2011). Variantes sintéticas de fitasa. Patente ES 2 553 458 T3.
- ¹³Leeson,S., et al (2000) Efficacy of new bacterial phytase in poultry diets. Canadian Journal of animal Science: 527-28.
- ¹⁴Official Journal of the European Union 35, 08.02.2012:6-7
- ¹⁵Official Journal of the European Union 152, 09.06.2016:15-17
- ¹⁶Official Journal of the European Union 138, 25.05.2017:120-122
- ¹⁷Official Journal of the European Union 65, 08.03.2018:17-20
- ¹⁸Official Journal of the European Union 33, 05.02.2019:9-11

- ¹⁹ Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition L268, 18.10.2003, p.29
- ²⁰ Sebastian, S et al. (1996) The effects of supplemental microbial phytase on the performance of dietary calcium, phosphorus, cooper and zinc in broiler chickens fed corn-soybean diets. *Poultry Science* 75: 729-736
- ²¹ Sebastian, S et al. (1996) Efficacy of supplemental microbial phytase at different dietary calcium levels of growth performance and mineral utilization of broiler chicken. *Poultry Science* 75: 1516-1523
- ²² Selle, P.H., et al (2012). Protein-phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. *Nutr Res Rev* 25, 1-17.
- ²³ Silva EO, Bracarense A. (2016). Phytic Acid: From Antinutritional to Multiple Protection Factor of Organic Systems. *J Food Sci.* 2016;81(6):R1357–R1362.
- ²⁴ Shirley, R.B., Edwards Jr. H.R. (2003) Graded levels of phytase past industry standards improves broiler performance. *Poultry Science* 82:671-680
- ²⁵ Tondeur, M.j; Lopez-Brea, P.F. (2015) Principales defectos en canales de broilers en España y Portugal. Recuperado 6 mayo 2021. (<https://agrinews.es/2015/05/19/principales-defectos-en-canales-de-broilers-en-espana-y-portugal>)
- ²⁶ Valenzuela, G.G. (2001) Evaluación in vivo de la actividad enzimática de tres tipos de fitasas de diferentes casas Comerciales para mejorar la disponibilidad del fosforo fítico y nutrientes en pollos broiler machos. Recuperado 6 mayo 2021 (<http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/4977/T-ESPE-033012.pdf?sequence=1&isAllowed=y>)
- ²⁷ Viveros, A. et al (2002) Effects of microbial phytase supplementation on mineral utilization and serum enzyme activities in broiler chicken fed different levels of phosphorus. *Poultry Science* 81:1172-1183
- ²⁸ Vohra, A et Satyanarayana, T. (2003) Phytases: Microbial Sources, Production, Purification and potential biotechnology applications. *Critical reviews in Biotechnology.* 23 (1): 29-60
- ²⁹ Webel, D.M. et al (2012) Alimento para animales que contiene fitasa. Patente ES 2 597 503 T03.

GLOSSARI D' UNITATS D'ACTIVITAT ENZIMÀTICA:

FYT: Quantitat d' enzim necessari per alliberar 1 micromol de fosfat inorgànic de fitat per minut sota condicions de reacció en que la concentració de fitat és 5.0 mM a pH 5.5 i 37°C

FTU: Quantitat d' enzim necessari per alliberar 1 micromol de fosfat inorgànic per minut d' un substrat sòlid que conté fitat a pH 5.5 i 37°C

PPU, U: Quantitat d' enzim necessari per alliberar 1 micromol de fosfat inorgànic per minut d' un substrat de fitat sòdic a pH 5.5 i 37°C

OUT: Quantitat d' enzim necessari per alliberar 1 micromol de fosfat inorgànic per minut d' una solució 5.1 mM de fitat sòdic en un tampó citrat a 37°C, mesurat amb complex blau P-molibdat a 820 nm.

ANNEX 1

FORMULARI SOL·LICITUD DEL TREBALL DE FI DE GRAU

Alumne (Nom/Cognoms):

Correu-e

SARA BORRELL DOMINGUEZ

sara.borrell@estudiants.urv.cat

Títol provisional

ESTUDI COMPARATIU DE L' EFICÀCIA DE FITASES SEGONS EL SEU SISTEMA DE PRODUCCIÓ.

Resum del treball

Les fitases són enzims amb capacitat hidrolítica sobre els enllaços fosfat de l'àcid fític que contenen els pinsos per alimentació animal. L' àcid fític és un compost de reserva del fòsfor en els cereals però que a més presenta activitat antinutricional en els pinsos, ja que és capaç de quelar altres minerals essencials com el calci i també dificulta la absorció de les proteïnes presents en el aliments.

Els animals monogàstrics no són capaços de produir fitasa de forma endògena. Per suplir aquest dèficit, la indústria agropecuària tradicional i també de forma incipient la indústria aqüícola incorporen fitases a les formulacions de pinsos, la qual cosa permet millores tant a nivell de productivitat com a nivell mediambiental en el maneig de les explotacions.

Establert l' ús de les fitases de forma regular cal buscar estratègies, tan per millorar-ne la seva producció com per millorar-ne la seva eficàcia. Les fitases utilitzades a nivell industrial poden ser d' origen bacterià, fúngic o de llevats. Inicialment es duia a terme extracció i purificació de fitases extretes directament del microorganisme escollit. A

Actualment l'extracció i purificació de les fitases es fa majoritàriament a partir de microorganismes recombinants. La hipòtesi principal d' aquest treball de revisió bibliogràfica és confirmar o refutar que l' eficiència de les fitases produïdes per mètodes biotecnològics és major que les produïdes de manera tradicional sense la utilització de tecnologies d' ADN recombinant.

Signatura de l' alumne/a

Tarragona a 22 de Febrer 2021

ANNEX 2.

FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG

Nom i Cognoms de l'Alumne/a: SARA BORRELL DOMINGUEZ

Nom i Cognoms del Tutor/a: DR. RICARDO ROMÁN CORDERO OTERO

Títol del treball: Anàlisi comparatiu del rendiment de fitases de primera, segona i tercera generació en aus

Data de la entrevista amb l'alumne: 30/01/2020, 24/02/2020, 03/03/2020, 21/01/2021

Recomanacions durant el seguiment:

- Iniciar amb una exposició global i anat focalitzant
- Fer taules del màxim de dades per fer més visual els continguts
- Ajust i concreció de la hipòtesis principal del treball
- Bibliografia com més moderna millor i de fonts científiques contrastades
- Format homogeni bibliografia

Observacions: Els objectius del TFG han anat canviant al llarg del temps per ajustar-lo a les condicions de la pandèmia. Inicialment es va plantejar un treball experimental amb una part inicial que consistia en validar un mètode analític per analitzar fitases comercials, per poder-lo utilitzar en una segona fase per quantificar la fitasa obtinguda experimentalment . Aquesta fitasa s' havia d' aconseguir mitjançant recombinació genètica i avaluar-la en dos processos finals, un de purificació clàssica i un segon en que la fitasa endògena i el microorganisme es dessecarien junts.

Donat que la part de laboratori es va descartar per la situació pandèmica, es va decidir restringir el TFG a bibliogràfic i comparar l' eficàcia de les diferents fitases del mercat, posant especial atenció en la comparació entre fitases recombinant i les no modificades per entendre quines millores d' eficiència aporten aquestes i com això justifica el se ús en el sector agropecuari mundial.

Observacions Darrera revisió:

Desgranar més l' apartat d' introducció per tal de enquadrar bé l' objectiu del TFG, i especialment per tractar- se d' un treball de revisió bibliogràfica

Augmentar el nombre d' imatges per facilitar la comprensió del lector de forma més visual sobre el contingut desenvolupat

Restringir el treball a aus per poder fer una discussió més consistent, en lloc de aus i porcs, com inicialment

Signatura del Tutor/a

Signatura de l' alumne/a

Tarragona a 24 de Maig 2021