



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

MÁSTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

Eficacia de una fitasa en dietas de cerdos de engorde: efecto sobre la digestibilidad del calcio y fósforo y la mineralización ósea

Trabajo Fin de Máster

Valencia, Septiembre 2018

Israel Peña Vargas

Directores:

Alba Cerisuelo García

María Cambra López

Juan José Pascual Amorós

Agradecimientos

A los Drs. María Cambra López, Alba Cerisuelo García, Juanjo José Pascual Amorós, gracias por el asesoramiento y apoyo en las diferentes etapas del trabajo de investigación y por darme la oportunidad de ser parte de este proyecto.

Al personal del CITA, especialmente a Jorge; por compartir sus conocimientos y experiencias y además por su dedicación y apoyo.

Al personal de laboratorio de la UPV, Luis y Maricarmen; por compartir sus conocimientos y apoyarme en los análisis de muestras en el laboratorio. A todos ellos muchas gracias por haber contribuido y hecho posible lograr esta meta.

A todos los docentes del Master de Producción Animal de la UPV, por sus enseñanzas y compartir conocimientos y experiencias.

A mis padres; Jorge y Mayra, a mis hermanos; David, Deuris, Darnell, José Miguel y a toda mi familia que influyen para poder realizar mis metas.

A mis amigos, que han sido la mejor familia que he podido conseguir en esta vida; sobre todo a Randoll, Yaritza, Alba y Cristian que me han dado el apoyo en esta travesía.

A Ivan, gracias por apoyarme y prestarme tu usuario de investigación.

Y a todos los que tuve el placer de conocer y compartir momentos gratos, durante mi estadía en España.

¡Gracias!

Resumen

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la eficacia de una nueva fitasa utilizada en las dietas para cerdos, para ver su efecto sobre la digestibilidad del calcio (Ca), fósforo (P) y la mineralización ósea. Se utilizaron tres dietas experimentales que difieren en el nivel de incorporación de la fitasa y en el contenido en P: el control negativo (T1), con niveles bajos de P (3,6 g P total/Kg) sin fitasa; y dos dietas a partir del T1 suplementado con 500 y 1000 unidades de fitasa (FTU)/Kg de pienso, T2 y T3 respectivamente. Se utilizaron 24 cerdos machos ($34,5 \pm 4,27$ Kg peso vivo medio inicial), en 2 tandas, cada tanda conformada por 12 cerdos. El periodo experimental tuvo una duración de 28 días, en los que se realizó el balance de digestibilidad los últimos 4 días. El último día se sacrificaron todos los animales para extraer el III y IV metacarpo. La adición de la nueva fitasa a la dosis de 500 FTU/kg de pienso (T2), aumentó la digestibilidad del P en 5 puntos porcentuales, y aumentó 0,22 g la retención de P por animal y día y 5 puntos el porcentaje de retención respecto al control negativo (T1); aunque estas diferencias no fueron significativas. Los animales alimentados con T2 mostraron una tendencia a un mayor porcentaje de Ca ($P=0,109$) y P ($P=0,097$) en base a materia seca en el metacarpo respecto al control negativo (T1).

Abstract

The objective of this investigation work was to evaluate the efficiency of a new phytase which was used in the pigs' diet to see its effect on the digestibility of calcium (Ca), phosphorus (P) and bone mineralization. Three experimental diets were used which differed in the level of the incorporation of the phytase and the phosphorus content (P): the negative control diet (NC) with low levels of P (3,6 g P total/Kg) without phytase and two diets apart from the NC supplied with 500 and 1000 units of phytase, FTU/Kg of weight. 24 male pigs were used (34,5±4,27 Kg average live weight), in 2 batches, each batch formed by 12 pigs. The experimental period had the duration of 28 days in each batch, with a 4-day fecal collection period. The last day all animals were slaughtered and the III and IV metacarpal bones. The addition of the new phytase at the dose of 500 FTU / kg of feed (T2), increased the digestibility of P by 5 percentage points, and increased 0.22 g the retention of P per animal and day and 5 points the percentage of retention with respect to the negative control (T1); although these differences were not significant. Animals fed with T2 showed a tendency to a higher percentage of Ca (P = 0.109) and P (P = 0.097) based on dry matter in the metacarpus with respect to the negative control (T1).

Resum

El present treball d'investigació va tenir com a objectiu avaluar l'eficàcia d'una nova fitasa utilitzada en les dietes per a porcs, per veure el seu efecte sobre la digestibilitat del calci (Ca), fòsfor (P) i la mineralització òssia. Es van utilitzar tres dietes experimentals que difereixen en el nivell d'incorporació de la fitasa i en el contingut en P: el control negatiu (T1), amb nivells baixos de P (3,6 g P total / kg) sense fitasa; i dues dietes a partir del T1 suplementat amb 500 i 1000 unitats de fitasa (FTU) / kg de pinso, T2 i T3 respectivament. Es van utilitzar 24 porcs mascles ($34,5 \pm 4,27$ Kg pes viu mitjà inicial), en 2 tandes, cada tanda conformada per 12 porcs. El període experimental va tenir una durada de 28 dies, en els quals es va realitzar el balanç de digestibilitat dels últims 4 dies. L'últim dia es van sacrificar tots els animals per extreure el III i IV metacarp. L'addició de la nova fitasa a la dosi de 500 FTU / kg de pinso (T2), va augmentar la digestibilitat del P en 5 punts percentuals, i va augmentar 0,22 g la retenció de P per animal i dia i 5 punts el percentatge de retenció respecte al control negatiu (T1); encara que aquestes diferències no van ser significatives. Els animals alimentats amb T2 van mostrar una tendència a un major percentatge de Ca ($P = 0,109$) i P ($P = 0,097$) basant en matèria seca al metacarp que fa al control negatiu (T1).

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Producción porcina en España y en el contexto mundial	1
1.2. Función del fósforo y calcio	1
1.2.1. Liberación del fósforo	2
1.2.2. Disponibilidad de fósforo y su problemática ambiental	3
1.3. Aditivos	4
1.4. Fitasas	5
1.4.1. Características de las fitasas.....	6
1.4.2. Utilización de fitasas en cerdos y factores de los que depende su eficacia	7
1.4.3. Factores que influyen en la actividad de la fitasa	9
1.4.3.1. Factores relacionados con la fitasa.....	9
1.4.3.2. Factores relacionados con el animal.....	10
1.4.3.3. Factores relacionados con el pienso.....	10
2. OBJETIVO	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS	12
3.1. Ubicación.....	12
3.2. Animales.....	12
3.2.1. Tratamiento experimental	12
3.2.2. Distribución de animales y condiciones de alojamiento	13
3.2.3. Composición de la dieta y origen de la alimentación.....	14
3.2.4. Fabricación de piensos.....	15
3.2.5. Alimentación.....	16
3.2.5.1. Fase de corrales (día 0 al 19 del estudio).....	16
3.2.5.2. Fase de jaulas de digestibilidad (día 19 al 28 del estudio)	17
3.2.6. Descripción de los parámetros registrados.....	17
3.2.6.1. Peso y consumo de pienso.....	17
3.2.6.2. Digestibilidad aparente.....	17
3.2.6.3. Extracción de metacarpos.....	18
3.2.7. Análisis químicos.....	18
3.2.8. Estadística	19
4.1. Resultados y discusión	21
4.1.1. Rendimientos productivos	21
4.1.2. Coeficiente de digestibilidad y retención de nutrientes	22
4.1.3. Mineralización ósea.	23
5. Conclusiones	25
6. Referencias	26

Índice de tablas

Tabla 1. Tipo de fitasa (3 ó 6 fitasa) y características de algunas de las fitasas comerciales. Adaptada de Dersjant-Li et al., (2014).	7
Tabla 2. Detalles del diseño experimental.	14
Tabla 3. Composición de la dieta control negativo (T1) sobre sustancia fresca.	14
Tabla 4. Composición de nutrientes calculado y analizado de la dieta control negativo (T1) sobre materia fresca.	15
Tabla 5. Unidades de fitasa (FTU) por kg de pienso en los piensos experimentales.	16
Tabla 6. Peso vivo al inicio de la adaptación (PI) (día 19) y al final de la digestibilidad (PF) (día 28), ganancia media diaria (GMD), consumo medio diario (CMD) e índice de conversión (IC), durante el periodo de adaptación a jaula y recogida de heces de digestibilidad (día 19 a 28 del estudio) en cerdos en crecimiento alimentados con pienso suplementado con diferentes niveles de una nueva fitasa.	21
Tabla 7. Coeficiente de digestibilidad aparente (%) y retención (en g/animal/día y en % de la ingestión) de los nutrientes en cerdos de crecimiento alimentados con pienso suplementado con diferentes niveles de fitasa.	22
Tabla 8. Variables de mineralización ósea del II y IV metacarpo de cerdos de crecimiento alimentados con pienso suplementado con diferentes niveles de fitasa..	24

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Producción porcina en España y en el contexto mundial

La producción porcina es el sector más importante de la producción pecuaria española, éste ha presentado un aumento significativo desde los años 80. En 2017 consiguió un nuevo récord sacrificando 49,9 millones de animales y una producción de 4,25 millones de toneladas de carne, lo que coloca a este país en la cuarta posición mundial. Este hecho muestra también en el hecho de que el sector porcino español representa el 36,4% de la producción ganadera final y el 12,7% de la producción agrícola final (MAPAMA, 2017).

En términos generales, la producción mundial de carne de cerdo aumentó a una tasa promedio anual de 1,6% durante el periodo 2007-2016. De acuerdo con estimaciones del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), se espera que en 2017 se ubique en un máximo histórico de 111 millones de toneladas, lo que representa un incremento de 2,6% con respecto al año previo. El incremento en la oferta mundial será principalmente resultado del aumento anual en la producción de tres de los principales países productores: 3,7% en China, 3,8% en Estados Unidos, y 3,1% en Brasil. En 2016, estos países aportaron 47,9, 10,4 y 3,4 % de la producción mundial de carne de cerdo. La Unión Europea, que participó con el 21,6% de la oferta mundial en 2016, registraría en 2017 el mismo nivel de producción que el año previo. En conjunto, los cuatro principales países productores (China, EEUU, Brasil y Europa) aportaron el 83,4% de la oferta mundial de carne de cerdo en 2016 (Agroalimentario, 2017).

1.2. Función del fósforo y calcio

El fósforo (P) es el segundo mineral más abundante en el cuerpo después del calcio (Ca). Ambos son minerales que deben ser proporcionados en las dietas de los cerdos (She et al., 2017). El P es esencial para el metabolismo del animal

donde juega un papel muy importante en el desarrollo y mantenimiento de las estructuras óseas. El P se encuentra en un 70-80% en la parte ósea y un 20-30% en los tejidos blandos (Pérez, 2013). Es un componente de la adenosina trifosfato(ATP) y los ácidos nucleicos y forma parte de los fosfolípidos que integran y dan flexibilidad a las membranas celulares (Rebollar, 1999)

El Ca desempeña un papel esencial en el crecimiento y desarrollo de los animales, siendo el mineral más abundante en el cuerpo. El Ca se encuentra concentrado (99%) en el tejido esquelético, por lo tanto, la ingesta adecuada de Ca es crítica para preservar la integridad del esqueleto en los animales (Bai et al., 2017)

1.2.1. Liberación del fósforo

En los ingredientes derivados de plantas, el P se encuentra principalmente en forma de fitato siendo esta la forma en que las plantas almacenan el P en sus semillas. El fitato, en la planta forma complejos de minerales (P y Ca), proteínas y almidón, lo que los hace inaccesibles para la absorción; ya que los cerdos no producen la enzima fitasa necesaria para su degradación(Bedford & Partridge, 2011).

El P contenido en los cereales se encuentra en forma orgánica, principalmente como ortofosfatos (PO_4^{3-}). Al hidrolizarse la molécula de fitato, se libera PO_4^{3-} en el tracto gastrointestinal, siendo esta liberación la que puede ser absorbida por el animal, para poder utilizar el P. En torno a un 60-80% del P total contenido en los granos y sus subproductos se encuentra como parte del ácido fítico y sus sales, generalmente como fitatos de Ca, magnesio (Mg) y potasio (K). Mientras que en los alimentos de origen animal predomina el P inorgánico que se encuentra en forma de PO_4^{3-} en solución en el medio celular y mayoritariamente como fosfatos de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en los tejidos óseos y en la leche. Alrededor del 80-85% del P presente en el organismo animal se localiza en el esqueleto como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, y el 15-20% restante se encuentra como P orgánico en los tejidos muscular y

nervioso y, especialmente en los glóbulos rojos. La sangre contiene entre 35 y 45 mg de P/100 ml localizado en su mayor parte en el interior de las células ya que la fracción plasmática sólo posee entre 4,5 y 6 mg P/100 ml en adultos y entre 6 y 9 mg P/100 ml en animales jóvenes (Rebollar, 1999).

1.2.2. Disponibilidad de fósforo y su problemática ambiental

Para proporcionarle este valioso mineral a los animales que es esencial para su organismo, debemos recurrir a los granos y subproductos de cereales y leguminosas, utilizados en la formulación de raciones para aves y cerdos, a pesar de tener niveles elevados de P, este elemento es pobremente utilizado. Las sales de ácido fítico son compuestos insolubles unidos a proteínas y más fuertemente a cationes como Ca, Mg y K. La disponibilidad del fósforo fítico para estas especies es prácticamente nula, debido a la escasa actividad de las fitasas digestivas del animal (Franseuie et al., 2004). La mayor parte de éste es excretado en las deyecciones ganaderas, siendo esta una de las razones de porqué es tan beneficioso el purín de los monogástricos para ser utilizado como fertilizante natural.

Hasta mediados de los años 80 los purines y el estiércol tenían un valor residual como fertilizante de las tierras de cultivo por su alto aporte de nitrógeno, fósforo y otros nutrientes. Más recientemente, la intensificación de las producciones y la concentración de la ganadería en áreas específicas, junto con las nuevas normas de conservación del medio ambiente, limitó el interés de esta vía de disposición de los purines. La cantidad de estiércol a esparcir en un campo de cultivo está limitada por la capacidad de las plantas para extraer del terreno los minerales aportado por el purín; un exceso de aporte sobre las necesidades resulta en contaminación ambiental.

Por tanto, en situaciones normales el P fítico consumido por el animal aparece en las heces casi por completo. Una vez en el terreno este P es liberado mediante la acción de las fitasas contenidas en los microorganismos del suelo y pasa a ríos y lagos dando lugar a los fenómenos de eutrofización de las corrientes de agua y de los reservorios acuáticos. Bajo estas circunstancias hay

un crecimiento acelerado de las algas y un agotamiento del contenido en oxígeno del agua lo que provoca mortalidad de la fauna acuática. Por tanto, la escasa disponibilidad del P fítico crea dos problemas al ganadero: la necesidad de suplementar las dietas con P inorgánico, con el consiguiente encarecimiento del producto final, y la excreción al medio de altas cantidades de este macro-mineral (Rebollar, 1999)

1.2.3. Deficiencia de fósforo en cerdos

Por otro lado, una deficiencia de este mineral puede llegar a causar enfermedades para los animales. Las osteodistrofias son enfermedades metabólicas que implican una osificación deficiente. El raquitismo es una de ellas y se caracteriza por una mineralización insuficiente del hueso, con acumulación de osteoide y engrosamiento de las placas de crecimiento, por fallo de la osificación endocondral, que afecta a los animales en crecimiento. Las principales causas del raquitismo son la suplementación inadecuada de vitamina D₃ en la dieta, una absorción disminuida de P por aporte inferior al recomendado, una relación Ca:P incorrecta en el pienso y un aporte inadecuado de Ca en el alimento. Las proporciones de Ca:P en la dieta deben seguir las recomendaciones acordes a la edad del animal (Pallarés et al., 2012; FEDNA, 2013).

1.3. Aditivos

El valor nutritivo potencial de las materias primas no suele hacerse realidad en la práctica debido a las limitaciones impuestas por la presencia de una serie de factores anti-nutritivos y la falta o insuficiencia de enzimas digestivas que rompan los enlaces químicos y permitan la liberación de los nutrientes. Existen aditivos en el mercado, por ejemplo, las enzimas que favorecen la digestibilidad de algunos nutrientes importante para su formación.

Los aditivos son productos utilizados en la alimentación animal con el fin de mejorar la calidad de los alimentos, así como el rendimiento y la salud de los animales (Davis et al., 2017). Otra definición sería: sustancias, microorganismos

o preparados distintos de las materias primas y pre-mezclas, que se añaden intencionadamente al alimento o al agua para influir favorablemente(Ravindran, 2010).

Estos pueden clasificarse en cuatro grupos(Castellanos, 2006):

- Aditivos tecnológicos: conservantes, antioxidantes, estabilizantes, aglomerantes...
- Aditivos organolépticos: colorantes, odorizantes, saborizantes...
- Alteradores del metabolismo y otras drogas: antimicrobianos, coccidiostatos...
- Aditivos zootécnicos: estabilizadores de la flora intestinal,enzimas, reguladores de la fermentación ruminal.

Entre los aditivos zootécnicos, destacan las enzimas. La utilización eficiente de los nutrientes es la razón principal para el uso de enzimas en alimentación de monogástricos. Existe una amplia gama de enzimas disponibles para alimentación animal orientadas a diferentes sustratos. El objetivo de la utilización de enzimas para alimentación animal es reducir los efectos anti-nutritivos de los sustratos de destino y mejorar la utilización global de nutrientes. El fin último es mejorar el rendimiento de los animales a través de mejoras en el consumo de alimento, ganancia de peso y eficiencia alimenticia (Ravindran, 2010). Algunos ejemplos son lascarbohidrasas (xilanasas, beta-glucanasas, amilasas, pectinasas...),proteasas, lipasas y fitasas. En este trabajo nos enfocamos en las fitasas como enzimas exógenas.

1.4. Fitasas

Las fitasas permiten la absorción del P rompiendo su unión en el ácido fítico(Labala, 2013), y permitiendo la liberación del P unido al fitato(Bedford & Partridge, 2011). Son enzimas que mejoran la digestibilidad del P de los piensos utilizados en la alimentación animal.Las fitasas (fosfohidrolasas de hexafosfato de mioinositol) son fosfatasaes específicas que hidrolizan los fitatos a inositol y ortofosfato(Viveros et al., 2002)para que puedan ser absorbido por la pared

gastrointestinal de los animales. Éstas pueden ser de origen vegetal (6-fitasa) o microbiano (3-fitasa). Ambas fitasas se diferencian en la desfosforilación del ácido fítico, ya que la 6-fitasa inicia su hidrólisis de forma progresiva en el inositol 6 fosfato (IP6), IP5, IP4, IP3, IP2, IP1 hasta mioinositol libre; mientras que la 3-fitasa empieza en el IP3, pero no libera mioinositol (Quiles, 2002).

Al liberar las fitasas el P presente en el ácido fítico y disminuir los efectos anti-nutricionales del fitato, su uso permite reducir el uso de fuentes inorgánicas de P para cubrir el requerimiento nutricional requerido de cada una de las etapas de producción. La utilización de fitasas tiene dos objetivos principales que son; los beneficios económicos (liberación de P, digestibilidad de aminoácidos y de energía metabolizable), que genera la formulación de una ración con un menor costo, manteniendo el mismo ritmo de crecimiento, y el segundo objetivo serían las mejoras medio ambientales con la reducción en la excreción de P en el medio ambiente (Santos, 2016).

1.4.1. Características de las fitasas

La actividad fitásica se expresa como unidades de fitasa (FTU). Una FTU es la actividad de fitasa requerida para liberar 1 μmol de fósforo inorgánico por minuto a pH 5,5 a partir de un exceso de fitato de sodio 15 M a 37 ° C (Jacela et al., 2010).

Se categorizan en función de su pH óptimo: fitasas ácidas (pH óptimo: 3,0-5,5) y fitasas alcalinas (pH óptimo: 7,0-8,0). Independientemente de su origen (bacteriano, fúngico o vegetal), las fitasas ácidas liberan cinco de los seis grupos fosfato de fitato, y sus productos de degradación final común parecen ser IP1 o incluso mioinositol puro (Humer et al., 2015). Aquella fitasa que pueda realizar una desfosforilación gradual del IP6 es considerada la más eficiente. Las 3-fitasas se caracterizan por su temperatura óptima es de 60°C y su pH óptimo se encuentra entre 2,5 y 5. Mientras que las 6-fitasa tiene un pH óptimo entre 4 y 7,5, y pierde su actividad en pH entre 2,5 y 3. Su temperatura óptima de acción esta entre 45 y 60°C, degradándose rápidamente a temperaturas

superiores. Dersjant-Li et al.(2014) detalla las características de las fitasas utilizadas en el mercado en la Tabla 1.

Tabla 1. Tipo de fitasa (3 ó 6 fitasa) y características de algunas de las fitasas comerciales. Adaptada de Dersjant-Li et al., (2014).

Tipo	Microorganismo de origen	Microorganismo receptor	pH	Temperatura óptima	Nombre comercial
3	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	2,5-5,5	65	Natuphos®
3	<i>A. niger</i>	<i>A. niger, no recombinante</i>	6	-	Allzyme®SSF
3	<i>A. niger</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	2,5	-	Finase®P/I
6	<i>E. coli</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe (ATCC5233)</i>	4,5	55	Phyzyme®XP
6	<i>E. coli</i>	<i>Pichia pastoris</i>	4,5	-	Quantum®
6	<i>E. coli</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	-	-	Quantum Blue®
6	<i>E. coli</i>	<i>Pichia pastoris</i>	3,4-5	58	OptiPhos®
6	<i>E. coli</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	4-4,5	50-55	Ronozyme®
6	<i>E. coli</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	-	-	Ronozyme Hiphos®
6	<i>E. coli</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	3,5-4,5	60	Axtra®PHY

1.4.2. Utilización de fitasas en cerdos y factores de los que depende su eficacia

La utilización de las fitasas en cerdos viene desarrollándose desde el 1991; aunque el grado de utilización es menor que en avicultura, el 70% de los porcicultores a nivel mundial la utiliza esta enzima (Giménez-Rico, 2016). La utilización de fitasa derivadas de *Aspergillus niger* y *Escherichiacoli* mejoran la digestibilidad del P en 33-34% y Ca en 18-20%, en dietas para cerdos a base maíz y soja (Selle & Ravindran, 2008).

La dosis recomendada en ganado porcino está comúnmente entre 500 y 1,000 FTU. A estas dosis, se acepta que las fitasas consiguen liberar entre 0,05 y 0,15% de P digestible (Selle & Ravindran, 2008). Actualmente, existe una tendencia a la sobredosificación (2-2,5 veces la dosis máxima) de las fitasas, para aprovechar al máximo los efectos extrafosfóricos. Algunos autores han descrito efectos positivos colaterales para las fitasas, como un aumento de la

digestibilidad de otros nutrientes (p. ej., aminoácidos, otros minerales y energía) y de los parámetros zootécnicos (p. ej., índice de conversión)(J. Pascual & M. Cambra, 2016)

En un trabajo reciente realizado por Duffy et al.(2018) tenían como objetivo estudiar el efecto de la suplementación con fitasa en cerdos de cebo sobre el rendimiento productivo, la digestibilidad de los nutrientes y los parámetros óseos, entre otros. Los cerdos alimentados con fitasa tenían un coeficiente de digestibilidad aparente de las cenizas, P y Ca mayor ($P < 0,05$) en comparación con los cerdos alimentados sin fitasa. Además, los cerdos alimentados con fitasa aumentaron ($P < 0,05$) la densidad ósea, la ceniza, el Ca, el P ósea en comparación con las dietas sin fitasa.

Gourley et al. (2018) determinaron el efecto de altas dosis de una fitasa en lechones de transición. Utilizando las dosis 500, 1,000, 2,000, 3,000 ó 4,000 FTU/kg de pienso añadidas a un control negativo con niveles de P y Ca por debajo de los requerimientos y un control positivo, durante 42 días. Los cerdos alimentados con fitasa mostraron una mayor ganancia media diaria (GMD), peso vivo (PV) y el índice de conversión (IC) que el control negativo. Además, el porcentaje de ceniza de hueso aumentó de forma lineal ($P < 0,001$) con la adición de fitasa. En definitiva, la concentración creciente de fitasa testada en este trabajo, añadida a dietas deficientes en P, mejoraron el crecimiento y las cenizas en el hueso. Éstas se optimizaron a la dosis de 1,000 FTU/kg de pienso.

Adeola et al. (2006) estudiaron los efectos de las fitasas derivadas de *E.coli* (ECP) y *Peniophora Lycii* (PLP) sobre el rendimiento productivo, digestibilidad de los nutrientes y la mineralización ósea, en cerdos jóvenes, utilizando las dosis 500 y 1,000 FTU/kg de pienso. La GMD y digestibilidad del P aumentó linealmente con la adición de ECP ($P = 0,001$) y PLP ($P = 0,05$). La mineralización ósea, expresada como % de cenizas en el tercer y cuarto hueso metacarpianos, mostró un aumento lineal positivo con ambas fitasas ($P < 0,05$).

También se han realizado estudios de fitasa en combinación con fuentes de proteína alternativas como por ejemplo la harina de camelina en cerdos de 18kg. Adhikari et al.(2016) con una fitasa a dosis de 500 FTU/kg de pienso y con 200g/kg de harina de camelina, obtuvieron una mayor retención y menor excreción de P respecto a los animales alimentados sin fitasa. Estos autores concluyeron que la suplementación de fitasa mejora la utilización de P a partir de harina de camelina en cerdos.

1.4.3. Factores que influyen en la actividad de la fitasa

Una fitasa será más efectiva en la medida que pueda hidrolizar lo más rápidamente posible la molécula de fitato a ésteres menores en la parte anterior del tracto gastrointestinal, fundamentalmente en el estómago. *In vivo* existen muchos factores que tienen influencia sobre la eficacia de una fitasa, incluso factores relacionados con ella misma (pH óptimo, tipo de fitasa o la resistencia a la proteasa). También existen factores externos, y sean aquellos relacionados con el animal (especie, edad y tiempo de alimentación), o aquellos relacionados con el pienso (contenido de fitato, nivel de Ca o la composición de los ingredientes)(Dersjant-Li et al., 2014). Algunos de ellos se detallan a continuación:

1.4.3.1. Factores relacionados con la fitasa

Entre los factores relacionados con la enzima, el pH óptimo de actuación es uno de los más relevantes. El rango del pH óptimo determinará la eficacia de la fitasa en el estómago o en la parte superior del intestino (Dersjant-Li et al., 2014). El pH en el estómago de los cerdos varía; con el tiempo después de la alimentación, el tipo de alimento y la cantidad en el estómago; en promedio se encuentra con un pH 4,0 (Bedford & Partridge, 2011). Por lo tanto, serán más efectivas aquellas enzimas que tengan un rango de pH óptimo de actuación y se activen a pHs bajos.

1.4.3.2. Factores relacionados con el animal

De los factores relacionados con el animal, la edad, sobre todo en cerdos, es el más relevante. La actividad fitásica depende de la capacidad del estómago, las condiciones de vaciado del mismo y su pH, que varía con la edad de los animales. Además, la capacidad de absorción mineral disminuye con la edad de los animales (Kempe et al. 1997) así como las necesidades minerales.

Los lechones recién destetados tienen una baja capacidad para secretar ácido clorhídrico (HCl); por lo tanto, el nivel de pH en el estómago puede ser más alto que en los cerdos en crecimiento. En la primera parte del intestino delgado, el pH varía de 3.5 a 5.5 y es de alrededor de 6 en el duodeno (Dersjant-Li et al., 2014). Por lo tanto, la fitasa que muestre una actividad óptima a pH bajo será más efectiva en los cerdos.

1.4.3.3. Factores relacionados con el pienso

Existen ingredientes necesarios como ácidos o Ca para la nutrición del cerdo que modifican el pH del estómago, esta modificación tiende a disminuir la actividad enzimática. Para contrarrestar este efecto negativo se utilizan ingredientes como la piedra caliza, que estabilizan el pH y así mejoran la actividad enzimática (Bedford & Partridge, 2011). Además, la composición del pienso (ingredientes), la presencia de actividad fitasa endógena, el tipo de procesamiento del alimento y la cantidad de Ca y P son factores que influyen en la eficacia de la enzima.

Por lo tanto, la eficacia de las fitasas puede verse afectada por numerosas variables y es necesario evaluar la eficiencia de las nuevas enzimas que se desarrollan en las especies de destino. En este caso en el ganado porcino.

2. OBJETIVO

El objetivo de esta investigación consistió en evaluar la eficacia de una nueva fitasa utilizada en las dietas para cerdos, para ver su efecto sobre la digestibilidad a nivel fecal del Ca, P y la mineralización ósea.

En esta investigación se utilizó una nueva enzima (FLF1,000) desarrollada por Fertinagro Biotech S.L a partir de un gen aislado de *Serratiaodorifera* (género de bacteria gram negativa, Enterobacteriaceae) expresado en una cepa de la levadura *Komagataella pastoris* (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT 13097). Se trata de una 3-fitasa (EC 3.1.3.8.) que presenta una actividad fitásica con un pH óptimo de 4,75 y temperatura óptima de 55°C. Este enzima está autorizado para aves en Reglamento EU en 2017 y en proceso de autorización para ganado porcino.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

La investigación se realizó en la unidad experimental de porcino del CITA (Centro de Investigación y Tecnología Animal) del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), en Segorbe, Castellón (España). Para este estudio se utilizó la granja de cerdos de cebo y el laboratorio del centro experimental. Parte de los análisis se realizaron en los laboratorios del Departamento de Ciencia Animal de la Universitat Politècnica de València (UPV) y Centro Calidad Avícola de la Comunidad Valenciana (CECAV).

3.2. Animales

La investigación se realizó en los meses de mayo y julio 2018. Se utilizaron 30 cerdos machos Duroc x (Landrace x Large White), en etapa de iniciación de crecimiento, con un peso medio de $34,5 \pm 4,27$ Kg; procedentes de una granja comercial Villalzoza (Teruel).

De los 30 cerdos iniciales se utilizaron 24 en los ensayos de digestibilidad. Estos se dividieron en dos tandas de 12 animales. Los 6 animales sobrantes (3 por lote), se descartaron antes de la subida a jaula en cada lote. Se usaron estos animales adicionales para reemplazar animales muertos o enfermos y para poder hacer una selección para la digestibilidad de animales lo más equilibrada posible en peso entre tratamientos. La prueba finalizó después de 28 días en cada lote y todos los cerdos fueron sacrificados para el muestreo de los huesos.

3.2.1. Tratamiento experimental

Los tratamientos experimentales consistieron en 3 piensos (Tratamiento 1, Tratamiento 2 y Tratamiento 3) que difieren en los niveles de incorporación de fitasa:

- Tratamiento 1 (T1): dieta control negativo (CN) con 3,6 g/kg de P total; por debajo de los requerimientos indicados en (FEDNA, 2013) para cerdos en crecimiento.

- Tratamiento 2 (T2): CN + 500 FTU / kg de pienso
- Tratamiento 3 (T3): CN + 1,000 FTU / kg de pienso

3.2.2. Distribución de animales y condiciones de alojamiento

Al llegar, los cerdos de cada lote se identificaron con uncrotal en la oreja y se distribuyeron por peso (peso similar entre tratamientos) en 3 corrales (5 animales/corral, 1 corral/tratamiento) (fase corral). Durante la fase de corral, los animales se alojaron en una sala de tipo de crecimiento y acabado provista de un sistema de control ambiental durante 18 días.

El día 19 del estudio en cada lote, los animales de cada tanda se alojaron individualmente en 12 jaulas de metabolismo (1 x 1, 2m²; 4 jaulas/tratamiento) durante un período de 10 días (6 días de adaptación + 4 días de recogida de heces; fase jaula). Las jaulas metabólicas estuvieron equipadas con una tolva de engorde convencional con un solo espacio y un solo bebedero de boquilla. En los días 25 a 28 del experimento, la cantidad total de excretas producidas por jaula, así como la cantidad total de alimento consumido se recogieron diariamente para realizar el balance de digestibilidad de los minerales.

Se proporcionó dietas a los cerdos en dos etapas. Una siendo *ad libitum* y la otra restringida. Todas las dietas experimentales se administraron a los cerdos desde el día 0 del estudio. El agua se proporcionó *ad libitum* de los bebedores de pezón. El programa de luz se configuró en 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad durante todo el estudio. Las condiciones ambientales durante el ensayo (temperatura y tasa de ventilación) se controlaron automáticamente y fueron apropiadas para la edad de los cerdos.

Un resumen del diseño experimental y el diseño se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Detalles del diseño experimental.

	Número
Jaulas metabólicas	12
Tratamientos	3
Tandas	2
Total réplicas/tratamiento	8
Total de animales	24

3.2.3. Composición de la dieta y origen de la alimentación

Los piensos se formularon para serisoprotéicos e isoenergéticos (todos elaborados a partir de una dieta básica única) y que cumplieran o superaran los requisitos de nutrientes recomendados para los cerdos para engorde, excepto para P y Ca. La dieta basal común contuvo un marcador externo (dióxido de titanio, TiO₂), aunque éste no fue utilizado para los cálculos de la digestibilidad. Los ingredientes y la composición de los tratamientos experimentales se presentan en la Tabla 3 y Tabla 4.

Tabla 3. Composición de la dieta control negativo (T1) sobre sustancia fresca.

Ingredientes	g/kg
Maíz	686,8
Soja 47% de proteína bruta	230,0
Cascarilla de soja	50,0
Carbonato de calcio	8,7
Biolys 70	4,5
DL-Metionina	1,4
Dióxido de titanio	5,0
L-Treonina	1,8
Bicarbonato sódico	5,0
Fosfato monocálcico	1,2
Sal	1,0
Corrector vitamínico-mineral ¹	5,0

¹Composición del corrector vitamínico-mineral por kg de alimento:
Ca: g/kg 0,32, E5 Manganeso (óxido manganeso): mg/kg 30, E6 Zinc (óxido de zinc): mg/kg 80,0, E4 Cobre (sulfato de cobre, pentahidrato): mg/kg 10,0, E2 Yoduro (yoduro de potasio): mg/kg 0,75, E8 Selenio (selenito de sodio): mg/kg 0,1, E1 Hierro (carbonato ferroso): mg/kg 90,0, E672 Vitamina A: UI/kg 5000, E671 Vitamina D3 : UI/kg 1000, Vitamina B2: mg/kg 3,0, Vitamina B12: mcg/kg 20,0, 3a315 Niacinamida: mg/kg 10,0, Pantotenato de Ca: mg/kg 4,0, Ácido pantoténico: mg/kg 3,68, Betaína: mg/kg 48,0, E562 Sepiolita: g/kg 2,78, E320 Butilhidroxianisol (BHA): mg/kg 0,08, E321 Butilhidroxitolueno (BHT): mg/kg 0,40, Materia seca: g/kg 4,70

Tabla 4. Composición de nutrientes calculado y analizado de la dieta control negativo (T1) sobre materia fresca.

Nutrientescalculados	
Energía metabolizable, kcal/kg	3270
Proteínabruta, g/kg	172
Grasabruta, g/kg	30,3
Sodio, g/kg	1,9
Cloro, g/kg	1,8
Fósforo, g/kg	3,6
Fósforodisponible, g/kg	1,1
Calcio, g/kg	4,9
Calcio : Fósforo	1,36
Nutrientesanalizados	
Energíabruta, kcal/kg	3808
Proteínabruta, g/kg	173
Fósforo, g/kg	3,4
Calcio, g/kg	5,0
Calcio : Fósforodisponible	1,47

3.2.4. Fabricación de piensos

Las dietas experimentales fueron formuladas por la UPV que también proporcionó los ingredientes básicos. Se preparó una dieta basal común (alimento de control) para todos los tratamientos dietéticos. Cada tratamiento se mezcló utilizando un mezclador horizontal de doble hélice durante un período de 6 minutos. El mezclador tiene una capacidad de 30 L. Las dietas experimentales se prepararon agregando la cantidad correspondiente de producto en pasos de mezclado en serie a la dieta de control. Los piensos se presentaron en forma de harina. Los alimentos se empacaron en bolsas de papel, cada una de las cuales estuvieron etiquetada de manera única con el código del estudio y el número de tratamiento (T1, T2, T3). Las dietas se almacenaron en paletas etiquetadas en un lugar seco y fresco listo para ser enviado a la granja.

La enzima fitasa FLF1,000 se mezcló primero con los micro-ingredientes y luego con 15 kg de alimento control, antes de agregarla y mezclarla con la dieta final,

que luego se empaco. Las dietas no contenían coccidiostáticos, promotores del crecimiento ni antibióticos (ver Tabla 3).

La actividad fitásica de los piensos experimentales se confirmó tras su fabricación siguiendo las condiciones experimentales que se describen en la Norma ISO 30024:2009. Previamente, se analizó la actividad fitásica en la mezcla basal siguiendo el mismo ISO 30024:2009, para confirmar la actividad endógena antes de la adición de la fitasa FL1,000. La actividad fitásica analizada de los piensos se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Unidades de fitasa (FTU) por kg de pienso en los piensos experimentales.

	T1	T2	T3
Fitasa (FTU ¹ /kg)	36,7	476,7	997,3

Tratamiento 1 (T1): dieta control negativo (CN) con 3,6 g/kg de P total, por debajo de los requerimientos; Tratamiento 2 (T2): CN + 500 FTU / kg de pienso; Tratamiento 3 (T3): CN + 1000 FTU/ kg de pienso

¹La actividad fitásica de los piensos se determinó mediante las condiciones experimentales que se describen en la ISO 30024:2009 "Alimentos para animales. Determinación de la actividad fitasa".

3.2.5. Alimentación

Las dietas se almacenaron en bolsas cosidas en un lugar fresco y seco hasta que se requirieron para la alimentación. Se colocó una bolsa fuera de cada corral, que se identificó de manera única con el número de tratamiento y de replicación.

3.2.5.1. Fase de corrales (día 0 al 19 del estudio)

La alimentación fue *ad libitum*, todas las dietas experimentales se les proporcionó a los cerdos desde el día 0 del estudio. Cada dos días, se suministró pienso a cada tratamiento. Las tolvas de alimentación se pesaron semanalmente para determinar el consumo de pienso. Éste se calculó como el pienso ofertado menos el pienso rechazado.

3.2.5.2. Fase de jaulas de digestibilidad (día 19 al 28 del estudio)

En las jaulas de digestibilidad, los animales recibieron una restricción alimentaria a razón de 2,5 veces la energía metabolizable de mantenimiento al día. La ración diaria se dividió en dos tomas que se suministraron a las 9:00 y la siguiente a las 14:30. Según la energía del pienso el PV del animal, se calculó el pienso ofertado que fue de 1,6 kg/animal/día como media y varió entre 1,4 y 1,9 kg/animal/día.

3.2.6. Descripción de los parámetros registrados

3.2.6.1. Peso y consumo de pienso

Se registró el peso individual de los animales los días 0 y 7. Además, se pesaron los días 19 y 28 días del estudio, coincidiendo con el día de subida a las jaulas de digestibilidad (día 19) y el día de finalización del balance de digestibilidad (día 28).

Además, durante toda la prueba se midió el pienso consumido como la diferencia de la cantidad de pienso ofertado por corral y el pienso rechazado al mismo tiempo que el registro de los pesos de los animales. Con esta información se calculó la GMD, consumo medio diario (CMD) y el IC (kg de pienso/kg de peso).

3.2.6.2. Digestibilidad aparente

Durante los 4 días de recogida del balance de digestibilidad se recogió el total de heces producidos cada 24 horas. Las heces se pesaron y fueron almacenadas en refrigeración (4°C), hasta el final del periodo de recogida. Tras los 4 días de recogida se realizó un pool de heces por corral y se congeló (-20°C) una muestra representativa de cada pool hasta su análisis.

Paralelamente, durante el periodo de recogida se controló el pienso consumido por jaula al final del periodo de recogida. Al final de los 4 días de recogida se

obtuvo una muestra representativa de pienso de cada corral directamente del comedero y se guardó para determinar la materia seca (MS) real del pienso consumido por tratamiento.

3.2.6.3. Extracción de metacarpos

Todos los animales fueron sacrificados a los 28 días de estudio mediante bala cautiva y posterior desangrado. Se extrajo el II y IV metacarpo de la extremidad anterior izquierda de cada animal. Se eliminaron los tejidos blandos y se almacenó en congelación (-20°C) hasta su posterior análisis.

3.2.7. Análisis químicos

Se analizó la MS, cenizas (Cz), proteína bruta (PB), EB (energía bruta) y minerales (P y Ca) en las muestras de piensos. Los alimentos se analizaron utilizando métodos AOAC (2000) y siguiendo las recomendaciones de EGRAN (2001). La materia seca (MS) se determinó mediante el método oficial AOAC 934.01, proteína bruta (PB) utilizando un analizador Kejltec 2300 (Foss, Suecia) y el método oficial AOAC 976.05, contenido de ceniza siguiendo los protocolos y descritos por los métodos AOAC 920.39 y 942.05, respectivamente, mientras que el contenido de energía bruta (EB) se determinó mediante combustión en una bomba calorimétrica adiabática, de acuerdo con las recomendaciones de EGRAN (2001)(Casado et al., 2011). A partir de las cenizas se analizó el contenido en Ca y P total, mediante espectrofotometría de emisión atómica (ICP-OES) (modelo Varian 720-ES, Varian Inc., EEUU). El P fítico se analizó atendiendo a la metodología de descrita en Haug & Lantzs, (1983). Todos los análisis de laboratorio excepto las determinaciones de Ca y P se realizaron en la UPV. Las determinaciones de Ca y P se llevaron a cabo en el CECAV. Con los resultados obtenidos de los diferentes nutrientes, se utilizaron las siguientes fórmulas para el cálculo del coeficiente de digestibilidad aparente y retención:

Coefficiente de digestibilidad aparente %

$$= \frac{\text{mineral ingerido} - \text{mineral excretado}}{\text{mineral ingerido}} * 100$$

Retención total, g/animal/día

= *mineral ingerido* – *mineral excretado en heces*

Coefficiente de retención (% de la ingesta)

$$= \frac{\text{Retencion total}}{\text{mineral ingerido}} * 100$$

En cuanto a la mineralización ósea, se determinó el contenido de cenizas, P y Ca en los metacarpos. Los huesos se hirvieron, se retiró el resto de tejidos blandos adheridos y se desecaron a 110 °C durante 12 h. Una vez secos, se desengrasaron en una solución con éter durante 48 h. Tras el desengrasado, se pesaron los metacarpos y se volvieron a desecar a 110 °C durante 12 h. Posteriormente se pesaron e incineraron a 550°C en una mufla durante 12 h. El contenido en Ca y P del hueso se expresó como el porcentaje de materia seca del hueso desecado y desengrasado. También se calculó los gramos totales de minerales en el hueso. El peso de los huesos se expresó en relación al peso vivo (PV) del animal. El contenido en minerales (Ca y P) en las cenizas del hueso se analizó mediante espectroscopia de emisión atómica (ICP-OES), al igual que en las heces y el pienso.

3.2.8. Estadística

Se realizó un filtrado y análisis exploratorio de los datos, así como los análisis estadísticos pertinentes utilizando un Software estadístico SAS® (StatisticalAnalysisSystem).

El método estadístico empleado fue el análisis de la varianza. El animal fue la unidad experimental para todas las variables analizadas. En el análisis de la varianza con SAS (Proc GLM), se incluyó la dieta y tanda como efecto principal. Se realizaron contrastes de la media de cada tratamiento contra el control

negativo (dieta basal) mediante la prueba de Dunnett. Las diferencias significativas se declaran a $P \leq 0,05$, mientras que las tendencias cercanas significativas se consideran para $0,05 < P \leq 0,10$.

4.1. Resultados y discusión

4.1.1. Rendimientos productivos

En la Tabla 6 se muestra el PV medio de los animales al inicio de la fase de adaptación a jaulas y al final de la digestibilidad, la GMD, el CMD y el IC de cada tratamiento durante este periodo.

Tabla 6. Peso vivo al inicio de la adaptación a las jaulas (PI) (día 19) y al final de la digestibilidad (PF) (día 28), ganancia media diaria (GMD), consumo medio diario (CMD) e índice de conversión (IC), durante el periodo de adaptación a jaula y recogida de heces de digestibilidad (día 19 a 28 del estudio) en cerdos en crecimiento alimentados con pienso suplementado con diferentes niveles de una nueva fitasa.

	PI (kg)	PF (kg)	GMD (kg/animal)	CMD (kg/animal)	IC (kg pienso:kg crecimiento)
T1	50,8	53,9	0,39	1,64	4,25
T2	47,1	50,2	0,35	1,58	4,26
T3	47,3	50,9	0,39	1,55	3,96
EEM ¹	1,01	1,02	0,053	0,040	0,573
P-valor	0,030	0,041	0,796	0,268	0,908
T1 vs T2 ²	0,031	0,034	0,778	0,447	0,999
T1 vs T3 ²	0,048	0,086	0,999	0,199	0,906

Tratamiento 1 (T1): dieta control negativo (CN) con 3,6 g/kg de P total, por debajo de los requerimientos; Tratamiento 2 (T2): CN + 500 FTU / kg de pienso; Tratamiento 3 (T3): CN + 1000 FTU/ kg de pienso.

¹Error estándar de la media (EEM)

²Contrastes Dunnett

No se observaron diferencias significativas en GMD, CMD e IC entre tratamientos. Los animales T1 (CN) mostraron un peso medio al inicio de la adaptación (día 19 del estudio) mayor respecto al T2 (+3,7 kg; P=0,031) y al T3 (+3,5 kg; P=0,048). Estas diferencias se mantuvieron al final de la digestibilidad, presentando los animales T1 +3,7 kg más que el T2 (P=0,034 y +3,0 kg más que el T3 (P=0,086). Cabe destacar un mejor IC numéricamente del T3 respecto al T1.

Estos resultados están de acuerdo con los rendimientos productivos esperables para cerdos en la primera fase de cebo y sometidos a una restricción alimenticia.

Dado que el objetivo de este estudio fue evaluar la digestibilidad de los nutrientes al añadir la nueva fitasa, el número de animales utilizado por tratamiento y la duración del estudio no están optimizados para obtener resultados determinantes sobre los rendimientos productivos. Por ello, en este trabajo se presentan de manera meramente descriptiva para mostrar que los animales mostraron un consumo y crecimiento adecuado para validar la prueba de digestibilidad.

4.1.2. Coeficiente de digestibilidad y retención de nutrientes

En la Tabla 7 se presentan los resultados medios del coeficiente de digestibilidad aparente de la MS, Ca y P y la retención mineral (Ca y P); para los distintos tratamientos.

Tabla 7. Coeficiente de digestibilidad aparente (%) y retención (en g/animal/día y en % de la ingestión) de los nutrientes en cerdos de crecimiento alimentados con pienso suplementado con diferentes niveles de fitasa.

	Coeficientes de digestibilidad (%)			Retención (g/animal/día)		Retención (% de la ingestión)	
	MS	Ca	P	Ca	P	Ca	P
T1	88,1	59,4	48,9	4,61	2,59	59,4	48,9
T2	87,2	57,3	53,6	4,16	2,81	57,4	53,7
T3	86,6	60,0	50,7	4,40	2,52	60,0	50,8
EEM ¹	0,58	1,77	2,21	0,17	0,14	1,77	2,21
P-valor	0,214	0,535	0,309	0,208	0,322	0,535	0,309
T1 vs T2 ²	0,462	0,617	0,226	0,141	0,437	0,617	0,226
T1 vs T3 ²	0,150	0,952	0,756	0,579	0,900	0,952	0,756

Tratamiento 1 (T1): dieta control negativo (CN) con 3,6 g/kg de P total, por debajo de los requerimientos; Tratamiento 2 (T2): CN + 500 FTU / kg de pienso; Tratamiento 3 (T3): CN + 1000 FTU/ kg de pienso.

Materia seca (MS), Calcio (Ca), Fósforo (P)

¹Error estándar de la media (EEM)

²Contrastes Dunnett

La adición de la nueva fitasa, sobre todo a la dosis de 500 FTU/kg de pienso(T2), permitió obtener valores de digestibilidad y retención del P más elevados, pero sin llegar a ser significativamente diferentes. El coeficiente de digestibilidad aparente del T2 fue +5 puntos mayor comparado con el T1 (CN). Asimismo, la retención de P del T2 fue +0,22 g de P/animal y día y +5 puntos porcentuales respecto al T1. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas. La adición de la nueva fitasa a la dosis de 1,000 FTU/kg no presentó mejoras respecto al T1 en digestibilidad de los minerales, aunque presentó una retención en porcentaje de la ingesta de P, ligeramente superior (+2 puntos porcentuales). No se observaron diferencias significativas en el resto de coeficientes de digestibilidad ni en la retención del Ca entre tratamientos.

Estos resultados indican que la utilización de 500 o 1,000 FTU/kg de la nueva fitasa tiene potencial para mejorar la utilización del P, aunque sería necesario obtener más réplicas para confirmar estas diferencias. De hecho Cerisuelo et al., (2015) con esta misma fitasa, han demostrado mejoras en el aprovechamiento del Ca y P en lechones con dosis de 250 FTU/kg de pienso.

4.1.3. Mineralización ósea.

En la Tabla 8 se presentan los resultados de mineralización ósea para los distintos tratamientos.

Tabla 8. Variables de mineralización ósea del II y IV metacarpo de cerdos de crecimiento alimentados con pienso suplementado con diferentes niveles de fitasa.

	Peso (g)	Peso (g)/ Kg peso vivo	Cenizas (g/g hueso seco)	Calcio (g/g hueso seco)	Fósforo (g/g hueso seco)	Calcio (%MS)	Fósforo (%MS)
T1	17,72	0,329	6,90	2,50	1,17	14,07	6,59
T2	16,83	0,335	6,86	2,47	1,16	14,62	6,86
T3	17,10	0,337	6,92	2,49	1,17	14,52	6,86
EEM ¹	0,44	0,007	0,19	0,06	0,03	0,19	0,09
P-valor	0,366	0,697	0,973	0,946	0,939	0,134	0,091
T1 vs T2 ²	0,287	0,733	0,982	0,927	0,965	0,109	0,097
T1 vs T3 ²	0,521	0,645	0,996	0,994	0,987	0,207	0,107

Tratamiento 1 (T1): dieta control negativo (CN) con 3,6 g/kg de P total, por debajo de los requerimientos; Tratamiento 2 (T2): CN + 500 FTU / kg de pienso; Tratamiento 3 (T3): CN + 1000 FTU/ kg.

Materia seca (MS)

¹Error estándar de la media (EEM)

²Contrastes Dunnett

No se observaron diferencias significativas en la mineralización ósea para el peso de los metacarpos, cenizas, Ca y P entre los tratamientos; aunque hubo una tendencia a un mayor porcentaje de Ca (P=0,109) y P (P=0,097) en base a MS del hueso en el T2 respecto al T1. El T3 también mostró una tendencia a mayor % de P (P=0,107) en base a MS del hueso, respecto al T1.

Estos resultados están de acuerdo con aquellos obtenidos para la digestibilidad y retención, donde la adición de la nueva fitasa a la dosis de 500 FTU/kg de pienso (T2), fue la que maximizó numéricamente la digestibilidad del P y su retención.

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta investigación nos permiten concluir sobre la eficacia de esta fitasa microbiana en dietas de cerdos en crecimiento:

1. La adición de la nueva fitasa a la dosis de 500 FTU/kg de pienso (T2), aumentó la digestibilidad del P en 5 puntos porcentuales y aumentó 0,22 g la retención de P por animal y día y 5 puntos el porcentaje de retención respecto al control negativo (T1); aunque estas diferencias no fueron significativas.
2. Los animales alimentados con 500 FTU/kg de pienso (T2) mostraron una tendencia a un mayor porcentaje de Ca ($P=0,109$) y P ($P=0,097$) en base a materia seca del hueso respecto al control negativo (T1).
3. Estos resultados indican que la utilización de la nueva fitasa tiene potencial para mejorar la utilización del P, aunque sería necesario obtener más réplicas para confirmar estas diferencias.

6. Referencias

- Adeola, O., Olukosi, O. A., Jendza, J. A., Dilger, R. N., & Bedford, M. R. (2006). Response of growing pigs to *Peniophora lycii*- and *Escherichia coli*-derived phytases or varying ratios of calcium to total phosphorus. *Animal Science*, *82*(05), 637. <https://doi.org/10.1079/ASC200676>
- Adhikari, P. . (2016). Standardized total tract digestibility of phosphorus in flaxseed meal fed to growing and finishing pigs without or with phytase supplementation. *Journal of Animal Science*, *95*(2), 799–805. <https://doi.org/10.2527/jas2016.1045>
- Agroalimentario, P. (2017). Carne de cerdo 2017 0, 28. Retrieved from [http://www.ugrpg.org.mx/pdfs/Panorama Agroalimentario Carne de%0A cerdo 2017.pdf %0A](http://www.ugrpg.org.mx/pdfs/Panorama%20Agroalimentario%20Carne%20de%20cerdo%202017.pdf)
- AOAC. (2000). Official methods of analysis. *Assoc. Anal. Chem., Arlington, VA., 17th.*
- Bai, L. L., Wu, F., Liu, H., Zhang, L., Zhang, S., Liu, L., ... Wang, F. L. (2017). Effects of dietary calcium levels on growth performance and bone characteristics in pigs in grower-finisher-transitional phase. *Animal Feed Science and Technology*, *224*, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.12.014>
- Bedford, M., & Partridge, G. (2011). *Xylanases and Cellulases as Feed Additives. Enzymes in Farm Animal Nutrition, 2nd edition.* <https://doi.org/10.1079/9781845936747.0012>
- Casado, Moya, Pascual, Blas, Cervero. (2011). World Rabbit Science.
- Castellanos, F. (2006). FORTALECIMIENTO DEL SISTEMA PRODUCTO OVINOS. *Tecnologías para Ovinocultores.*, 47–52. Retrieved from https://www.mendeley.com/research-papers/fortalecimiento-del-sistema-producto-ovinos-tecnologías-para-ovincultores/?utm_source=desktop&utm_medium=1.19.2&utm_campaign

=open_catalog&userDocumentId=%7Bc31c410c-edcc-43a4-a1fe-c544fff3dea9%7D

- Cerisuelo, A., M. Cambra-López, E.A. Gomez, L. Ródenas, P. Ferrer, B. Farinós, P. Añó, R. Marqués, I. Salaet, R. Aligue, J. . P. (2015). Impact of a new bacterial phytase on protein, energy and mineral utilization in broilers and piglets. *Congreso: EAAP – 66th Annual Meeting. Varsovia, Polonia.*
- Davis, U. C., Metz, D., & Wooten-swanson, P. (2017). Evaluation Roadmap. *Journal of Nutrition Education and Behavior, 39*(4, Supplement), S88. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jneb.2007.04.250>
- Dersjant-Li, Y., Awati, A., Schulze, H., & Partridge, G. (2014). Phytase in non-ruminant animal nutrition: A critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 95*(5), 878–896. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6998>
- Duffy, S. K., Kelly, A. K., Rajauria, G., Clarke, L. C., Gath, V., Monahan, F. J., & O'Doherty, J. V. (2018). The effect of 25-hydroxyvitamin D₃ and phytase inclusion on pig performance, bone parameters and pork quality in finisher pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, (February)*, 1–10. <https://doi.org/10.1111/jpn.12939>
- FEDNA. (2013). NECESIDADES NUTRICIONALES PARA GANADO PORCINO C . de Blas , J . Gasa y G . G . Mateos UP Madrid y UA Barcelona.
- Franseuie, D., Chicco, C. F., Godoy, S., & Garmendia, J. (2004). Phosphorus sources in swine feeding. 1. Growth and bone mineralization. *Revista Científica-Facultad De Ciencias Veterinarias, 14*(2), 107–114. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/242715871_FUENTES_DE_FOSFORO_EN_LA_ALIMENTACION_DE_CERDOS_1_CRECIMIENTO_Y_MINERALIZACION_OSEA_Phosphorus_Sources_in_Swine_Feeding_1_Growth_and_Bone_Mineralization

- Giménez-Rico, R. D. (2016). Utilización de fitasas en cerdos: una herramienta real de rentabilidad. *Nutrinews*. Retrieved from <https://nutricionanimal.info/utilizacion-fitasas-cerdos-una-herramienta-real-rentabilidad/>
- Haug, W., & Lantzsch, H.-J. (1983). Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *34*(12), 1423–1426. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740341217>
- Humer, E., Schwarz, C., & Schedle, K. (2015). Phytate in pig and poultry nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *99*(4), 605–625. <https://doi.org/10.1111/jpn.12258>
- Jacela, J. Y., Derouche, J. M., Tokach, M. D., Goodband, R. D., Nelssen, J. L., Renter, G., & Dritz, S. S. (2010). Feed additives for swine : Fact sheets – high dietary levels of copper and zinc for young pigs, and phytase. *Journal of Swine Health and Production*, *18*(2), 87–91. <https://doi.org/10.4148/2378-5977.7068>
- Kemme, P. A., Jongbloed, A. W., Mroz, Z., & Beynen, A. C. (1997). The Efficacy of *Aspergillus niger* Phytase in Rendering Phytate Phosphorus Available for Absorption in Pigs Is Influenced by Pig Physiological Status. *Journal of Animal Science*, *75*(8), 2129–2138. <https://doi.org/10.2527/1997.7582129x>
- Labala, J. (2013). Aditivos en alimentación porcina. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 23–26. Retrieved from http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/invernada_promotores_crecimiento/56-Aditivos_Alimentacion_Porcina.pdf
- Mapama. (2017). EL SECTOR DE LA CARNE DE CERDO EN CIFRAS. Retrieved from https://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/indicadoreseconomicoscarnecerdo2017comentarios_tcm30-379728.pdf

- Pallarés, F. J., Gómez, S., Sánchez, P., & López, M. (2012). Raquitismo En Cerdos En Crecimiento, *28*(2012), 111–116. Retrieved from file:///C:/Users/ISPE1/Downloads/188771-Texto del artículo-681691-1-10-20131217.pdf
- Pascual, J. & Cambra, M. . (2016). Enzimas en alimentacion animal. *Revista Tecnica Ganaderia*.
- Perez, J. F. (2013). Fisiología digestiva y utilización de aditivos y nutrientes. XXIX Curso Especialización FEDNA, 33–58. Retrieved from http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/invernada_prootores_crecimiento/63-13CAP_III.pdf
- Quiles, A. (2002). Papel de las Fitasas en la Alimentación Porcina. *Departamento de Producción Animal- Universidad de Murcia*. Retrieved from <http://www.ciap.org.ar/ciap/Sitio/Archivos/Papel de las fitasas en la alimentacion porcina.pdf>
- Ravindran, V. (2010). Aditivos en alimentación animal: Presente y Futuro. *XXVI Curso de Especialización FEDNA*, 3–26. Retrieved from http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/invernada_promotores_crecimiento/44-10CAP_I.pdf
- Rebollar, P. G. y M. G. . (1999). XV Curso de Especialización AVANCES EN NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN ANIMAL, *3*, 2–5.
- Santos, T. T. dos. (2016). El uso de fitasa en la producción porcina, 2004–2007. Retrieved from http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_porcina/00-produccion_porcina_general/256-Fitasa.pdf
- Selle, P. H., & Ravindran, V. (2008). Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. *Livestock Science*, *113*(2–3), 99–122. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.05.014>

She, Y., Li, D., & Zhang, S. (2017). Methodological aspects of determining phosphorus digestibility in swine: A review. *Animal Nutrition*, 3(2), 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.02.003>

Viveros, I. Arija, C. Centeno, B. (2002). Efecto de la administración de fitasas de origen vegetal y microbiano sobre la utilización del fósforo en pollos broilers. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.*, 17(1–2), 81–92. Retrieved from http://digital.csic.es/bitstream/10261/113484/1/Efecto_de_la_administracion_.pdf