



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

MÁSTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

Eficacia de una nueva fitasa microbiana en dietas de cerdos en crecimiento

Trabajo Fin de Máster

Valencia, Septiembre 2015

Yoany D. Leiva Villanueva

Directores:

Alba Cerisuelo García

María Cambra López

Juan José Pascual Amorós

Agradecimientos

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

Al personal del CITA, especialmente a Alba y Pablo; por compartir sus conocimientos y experiencias y además por su dedicación y apoyo. A Paula y Bea, compañeras de trabajo en granja, por su amistad y apoyo.

Al personal de laboratorio de la UPV, Luis y Inés; por compartir sus conocimientos y apoyarme en los análisis de muestras en el laboratorio. A todos ellos muchas gracias porque de alguna u otra manera han contribuido y han hecho posible lograr la presente meta.

A todos los docentes del Master de Producción Animal de la UPV, por sus enseñanzas y compartir conocimientos y experiencias. A Ion por su paciencia y apoyo en todos los trámites del máster.

A mis papas; Consuelo y Víctor, a mis hermanos; Wuillian, Milly, Ronald, Victor y a toda mi familia por su cariño, apoyo incondicional.

Al Programa Nacional de Becas y Créditos Educativos (PRONABEC), por haberme concedido la beca para realizar mí máster en España.

Y A todos los he tenido el gusto de conocer y compartir momentos gratos, durante mi estadía en España.

Gracias!

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar los efectos de incorporación en el pienso de cerdos en crecimiento, una nueva fitasa de origen bacteriano sobre el coeficiente de digestibilidad aparente y retención de los diferentes nutrientes en cerdos en crecimiento. Se utilizaron cinco dietas experimentales que difieren en el nivel de incorporación de la fitasa y en el contenido en fósforo (P): la dieta control positivo (C+) con 7,1 g de P total/Kg sin fitasa, dieta control negativo (C-) con niveles bajos de P (5,6 g P total/Kg) sin fitasa y tres dietas a partir del C- suplementado con 250, 500 y 1000 unidades de fitasa, UFT/Kg de pienso. Se utilizaron 75 cerdos machos ($32,24 \pm 2,77$ Kg peso vivo medio), en 5 tandas, cada tanda conformada por 15 cerdos. El periodo experimental tuvo una duración de 18 días, en cada tanda (7 días de adaptación a corral y pienso, 7 días de adaptación a la jaula de digestibilidad y 4 días de recogida de heces y orina – ensayo digestibilidad). En nuestras condiciones de estudio, la suplementación con fitasa en cerdos en crecimiento, a niveles de 500 y 1000 UFT/kg, produjo un incremento ($p > 0.05$) de la digestibilidad del P en 5 y 9 puntos porcentuales y un aumento en la retención del P en 5,4 y 10 puntos porcentuales, respectivamente, en comparación con dietas bajas en P y sin fitasas (C-). Mientras que otros minerales no se vieron afectados por la dieta suplementada con fitasa.

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the effects of inclusion of a new phytase of bacterial origin in the feed of growing pigs, on apparent digestibility coefficient and retention of different nutrients. Five experimental diets differing in the addition of phytase and in phosphorus (P) content were used: positive control (C+) with 7.1g of total / kg P without phytase, negative control (C-) with low P (5.6 g total P/ kg) without phytase and three diets base don C- supplemented with 250, 500 and 1000 phytase units,UFT / Kg of feed. Seventy five male pigs (32.24 ± 2.77 kg live weight on average) were used, in five batches, each batch consisting of 15 pigs. The experimental period lasted 18 days, in each batch (7 days of adaptation to pen and feed, 7 days adaptation to digestibility cage and four days of collection of feces and urine – digestibility trial). In the conditions of this study, the addition of the new phytase in growing pigs at levels of 500 and 1000 UFT / kg produced an increase ($p>0.05$) in the digestibility of P in 5 to 9 percentage points and an increase in the retention of P in 5.4 and 10 percentage points, respectively compared with diets low in phosphorus and without phytase (C-). Other minerals were not affected by the addition of phytase.

RESUM

El present treball de recerca va tenir com a objectiu avaluar els efectes d'incorporació al pinso de porcs en creixement, una nova fitasa d'origen bacterià sobre el coeficient de digestibilitat aparent i retenció dels diferents nutrients. Es van utilitzar cinc dietes experimentals que difereixen en el nivell d'incorporació de la fitasa i en el contingut de fòsfor (P): la dieta control positiu (C+) amb 7,1 g de P total / kg sense fitasa, dieta control negatiu (C-) amb nivells baixos de P (5,6 g P total / kg) sense fitasa i tres dietes a partir del C- and 250, 500 i 1000 unitats de fitasa, UFT / kg de pinso). Es van utilitzar 75 porcs mascles ($32,24 \pm 2,77$ kg de pes viu de mitjana), treballats en 5 tandes, cada tanda conformada per 15 porcs. El període experimental va tenir una durada de 18 dies, en cada tanda (7 dies d'adaptació a corral i pinso, 7 dies d'adaptació a la gàbia de digestibilitat i 4 dies de recollida d'excrements i orina – període de digestibilitat). A les nostres condicions d'estudi, la suplementació amb fitasa en porcs en creixement, a nivells de 500 i 1000 UFT / kg, va produir un increment de la digestibilitat del P en 5 i 9 punts percentuals i un augment en la retenció del P en 5,4 i 10 punts percentuals, respectivament en comparació amb dietes baixes en fòsfor i sense fitases (C-). Mentre que altres minerals no es van veure afectats per la dieta suplementada amb fitasa.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El fósforo en alimentación de cerdos	1
1.2 Ácido fítico: Estructura y composición química	3
1.3 Fitasas.....	6
1.3.1 Clasificación de las fitasas.....	7
1.3.2 Efecto de fitasas sobre la disponibilidad de nutrientes en la dieta	11
2. MATERIALES Y METODOS	15
2.1 Ubicación e instalaciones	15
2.2 Animales y diseño experimental	15
2.3 Medidas.....	19
2.3.1 Peso y consumo de pienso:	19
2.3.2 Digestibilidad aparente	21
2.3.3 Cálculos y análisis químicos	21
2.4 Análisis estadístico	24
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4. CONCLUSIONES	31
5. BIBLIOGRAFÍA.....	32

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Naturaleza del P contenido en las materias primas en la alimentación animal (Adaptado de Bref, 2003).....	3
Figura 2. Posibles interacciones del ácido fítico (IP ₆) con minerales, elementos traza, proteínas y almidón (Egli, 2001).....	4
Figura 3. Productos generados (inositol-5 fosfato, IP ₅ a inositol-1 fosafato, IP ₁) a partir de la hidrólisis del ácido fítico (IP ₆) (Frontela, 2008)	7
Figura 4. Posición de inicio de la hidrólisis en 3 y 6-fitasas (Acosta y Cárdenas, 2006).	8
Figura 5. Unidad experimental de cerdos de cebo del Centro de Investigación y Tecnología Animal	15
Figura 6. Subida a jaulas de digestibilidad (6a) y Jaulas de digestibilidad de cerdos, durante el periodo de recogida de heces y orina (6b).....	17
Figura 7. Pesaje del cerdo a la llegada	20
Figura 8. Análisis de muestras de pienso y heces en el equipo LECO®	23
Figura 9. Cálculos de la energía: energía liberada al quemar la muestra en la bomba calorimétrica	24

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de fósforo (P) fítico y actividad fitasa en algunos ingredientes de origen vegetal (Adaptado de Ravindran <i>et al.</i> , 2002).....	5
Tabla 2. Composición piensos experimentales en base a materia fresca.	18
Tabla 3. Unidades de fitasas (UFT) por kg de pienso en los piensos experimentales.....	19
Tabla 4. Periodo experimental del estudio en cerdos en crecimiento	20
Tabla 5. Peso medio, Ganancia media diaria de peso (GMD), Consumo medio diario de pienso (CMD) e Índice de conversión alimenticia (IC), durante el periodo de adaptación a jaula y recogida de muestras de digestibilidad en cerdos en crecimiento alimentados con pienso suplementado con diferentes niveles de una nueva fitasa.	25
Tabla 6. Coeficiente de digestibilidad aparente (%) de nutrientes en cerdos de crecimiento alimentados con pienso suplementado con diferentes niveles de una nueva fitasa.....	27
Tabla 7. Energía digestible (ED) y balance (ingestión, excreción y retención) de calcio (Ca) y fósforo (P) de cerdos en crecimiento alimentados con piensos con diferentes niveles de una nueva fitasa.	29

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El fósforo en alimentación de cerdos

El fósforo (P) es uno de los minerales esenciales para el organismo de los animales ya que juega un papel muy importante en el metabolismo celular, desarrollo y mantenimiento de los huesos (Fernández, 2005). Aproximadamente el 80% de P presente en el organismo de los animales forma parte de los huesos. El otro 20% restante se encuentra en diversos compuestos orgánicos que juegan un papel clave en el metabolismo (ejemplo ATP, creatinina, enzimas), en los ácidos nucleicos (ejemplo, ADN, ARN) y en los fosfolípidos de membrana (Vitti y Kebreab, 2010).

El P contenido en los piensos se puede encontrar bien en forma orgánica o inorgánica (Figura 1). En los alimentos de origen vegetal, el P se encuentra en su mayoría en forma orgánica, siendo el ácido fítico (IP_6) el más abundante. Alrededor de un 60-80% del P total contenido en los granos y subproductos, se encuentra como parte del IP_6 y sus sales (fitatos de calcio (Ca), potasio (K) y magnesio (Mg)) (Ravindran *et al.*, 1995). Mientras que en los alimentos de origen animal, el P inorgánico es el componente mayoritario, encontrándose en forma de ortofosfatos (PO_4^{-3}), siendo ésta la única forma en que los animales pueden absorber y utilizar el P. Por otro lado, las principales fuentes de fosfatos minerales (P inorgánico) disponibles en alimentación animal son los PO_4^{-3} de sodio (Na), Ca, K, amonio (NH_4) y sus combinaciones. Estas pueden contener cantidades variables de meta [$(PO_3)^{3-}$] y piro [$(P_2O_7)^{4-}$] fosfatos, dependiendo de la temperaturas alcanzadas durante el proceso de obtención (Rebollar y Mateos, 1999).

Tradicionalmente, las fuentes de P en los piensos para animales han sido la harina de carne y huesos, los subproductos de origen animal en las raciones de monogástricos y las fuentes de p inorgánicos (mineral). Sin embargo, a partir del año 2000 la Unión Europea, prohíbe el uso de estas harinas de origen animal en piensos para animales, provocando un incremento del uso de fuentes de P inorgánicos para cubrir las necesidades de los animales (Selle y Ravindran, 2008). Por ello, en la actualidad, las principales fuentes de P son el P orgánico

contenido en los cereales, legumbres y semillas oleaginosas y las fuentes de P inorgánico.

Como ya se ha comentado, el P almacenado en las materias primas vegetales (P orgánico) se encuentra principalmente en forma de fitato (Casey y Walsh, 2004). Los monogástricos como el cerdo no puede aprovechar al máximo ese P, debido a que carecen de las enzimas (fitasas) endógenas necesarias y suficientes para liberar el grupo fosfato de la molécula del fitato en el tracto intestinal (Steiner *et al.*, 2007). El P no aprovechado es eliminado a través de las heces y la orina. La ineficiencia en la utilización del P puede provocar problemas en la salud y rendimiento de los animales por un lado y también puede generar problemas medioambientales a través de las deyecciones. Con el tiempo, la acumulación de P en los suelos derivado de las deyecciones ganaderas puede dar lugar a las escorrentías y, junto con el nitrógeno (N), pueden contribuir a la eutrofización (enriquecimiento excesivo de nutrientes) del suelo y aguas superficiales (Adeola y Sands, 2003). Esta pérdida representa un problema ambiental grave relacionado con la producción porcina y amenaza su sostenibilidad.

Según estudios realizados en países como Dinamarca, Países Bajos y Francia, la excreción fecal de P por cerdo producido es de 1,0 a 1,3 Kg (Poulsen *et al.*, 1999). En el balance de P en porcino, del total de P ingerido, los cerdos retienen el 36%, mientras que el 55% es excretado en las heces y el 9% en la orina (Selle, 2008). Esta ineficiencia en el aprovechamiento del P ocasiona mayores costes de producción al productor debido a la necesidad de adicionar P inorgánico a las dietas (Bedford *et al.*, 2001). Además, cabe indicar que las reservas globales de fosfato mineral no son renovables y su agotamiento podría con llevar a una futura crisis en el abastecimiento de P (Abelson, 1999).

En la actualidad existe una tendencia creciente a utilizar enzimas exógenas como las fitasas en la industria porcina, con la finalidad de incrementar la disponibilidad del P de las materias primas vegetales y otros minerales y reducir la excreción fecal de las mismas, así como la necesidad de emplear P inorgánico.

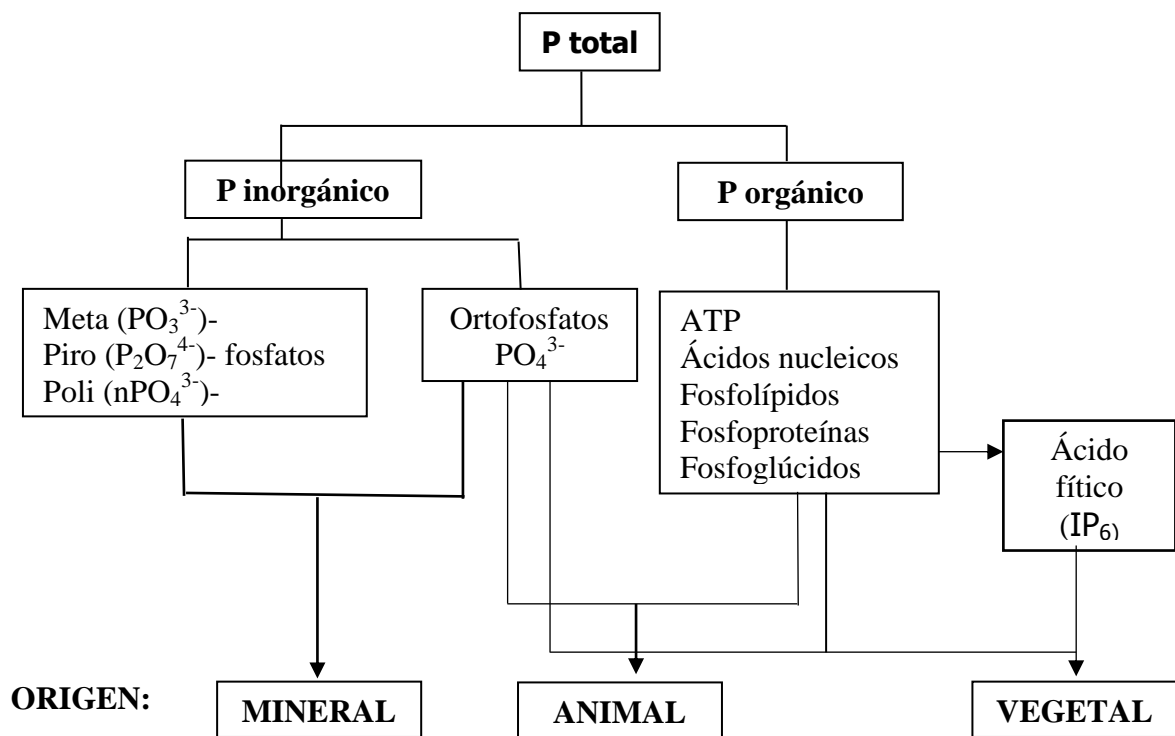


Figura 1. Naturaleza del P contenido en las materias primas en la alimentación animal (Adaptado de Bref, 2003)

1.2 Ácido fítico: Estructura y composición química

El IP₆ químicamente se describe como myo-inositol 1, 2, 3, 4, 5,6-hexakis dihidrógeno fosfato (Adeola y Sands, 2003); su fórmula química es C₆H₁₈O₂₄P₆. Se compone de un anillo de myo-inositol totalmente fosforilado (Bedford, 2001). La molécula de IP₆ contiene un alto contenido de P (28,2%) y posee 6 radicales fosfóricos con fuerte afinidad por varios cationes (Sauer *et al.*, 2009). El IP₆, además, puede interactuar con diferentes componentes de los alimentos. En la Figura 2 se muestra la posible interacción con; minerales y elementos traza, proteínas y almidón.

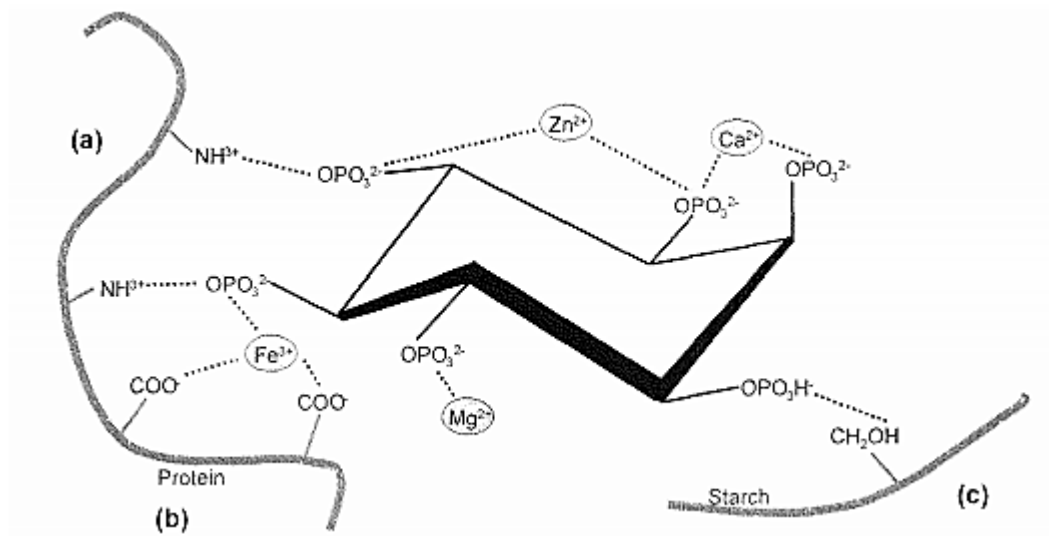


Figura 2. Posibles interacciones del ácido fítico (IP₆) con minerales, elementos traza, proteínas y almidón (Egli, 2001)

En función de los complejos que forma se le denomina fitato o fitina. Los fitatos son sales de IP₆ con diferentes cationes, mientras que la fitina es la sal del IP₆ con los cationes Ca²⁺ y Mg²⁺. Por lo tanto fitatos y fitina no pueden ser términos equivalentes (Sauveur, 1989).

En la tabla 1, se observa el contenido de P fítico en valor absoluto y en proporción del P total, así como la actividad fitásica endógena de los ingredientes comúnmente utilizados en piensos de monogástricos.

Tabla 1. Contenido de fósforo (P) fítico y actividad fitasa en algunos ingredientes de origen vegetal (Adaptado de Ravindran *et al.*, 2002)

Ingredientes	P fítico (g/kg)	P fítico (% P total)	Actividad fitasa ¹ (UFT/kg)
Cereales y subproductos			
Trigo	2,4 (1,9-2,9) ²	68 (61-78) ²	1190
Maíz	2,0 (1,6-2,6)	73 (62-85)	15
Sorgo	2,2 (1,9-2,9)	68 (61-76)	25
Cebada	2,1 (1,9-2,4)	58 (55-62)	580
Avena	2,8 (1,6-3,5)	69 (48-78)	40
Salvado de trigo	8,8 (6,0-12,7)	76 (68-93)	2.960
Leguminosas grano			
Altramuz	3,0 (2,9-3,0)	55 (46-61)	0
Guisantes	1,7 (1,3-2,1)	45 (36-53)	115
Harinas de oleaginosas			
Harina de soja	3,7 (2,8-4,0)	57 (46-61)	40
Harina de colza	6,5 (4,6-7,8)	58 (36-70)	15
Harina de girasol	4,4 (3,2-5,1)	44 (35-47)	60

¹ Unidad fitasa (UFT): cantidad de enzima que libera 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de fósforo inorgánico de una solución 1 mM de fitato sódico a pH 5,5 y 37°C.

² Rango de variación.

El P fítico constituye entre el 0,7 y el 2% de la mayoría de los granos de cereales y oleaginosas y es la forma de almacenamiento de P, representando entre el 50 y el 85% del P total (Adeola y Sands, 2003). Cabe indicar que la fitina se acumula de forma diferente y según el tipo de semilla. Kies (2005), reporta que en el maíz el 88% se acumula en el germen, mientras que en el trigo el 87% se acumula en la capa de la aleurona. Esto es importante debido a que puede originar diferencias en los efectos de la adición de fitasas, probablemente por la diferencia en la accesibilidad al sustrato.

Además de contener el P, el IP_6 se considera, por tanto, un factor antinutricional, debido a su elevado potencial quelante, formando, a pH neutro sales insolubles con numerosos cationes di y tri valentes como el Ca, Mg, Zin (Zn), Cobre (Cu), Cobalto (Co), Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Cu; impidiendo por lo tanto su absorción a nivel intestinal (Sauveur, 1989).

También puede formar complejos con las proteínas y aminoácidos en la dieta (Bedford *et al.*, 2001) y posiblemente con el almidón (Selle *et al.*, 2012),

impidiendo su correcta digestión. La interacción IP_6 -proteína es de tipo iónico y depende del pH. A pH bajo el IP_6 se une con grupos amino, formando complejos insolubles. Mientras que a pH neutro los complejos se solubilizan y es el grupo carboxilo (COO^-), que se une al IP_6 utilizando con intermediarios a cationes multivalentes (Anderson, 1985). Además el IP_6 puede inhibir la actividad de ciertas enzimas como: α amilasas, proteasas (tripsina y pepsina) y lipasas (Liu *et al.*, 2010) al formar complejos con ellas. Los complejos fitato-nutriente pueden formarse en los alimentos o en el aparato digestivo, cambiando su estructura y disminuyendo su digestibilidad (Adeola *et al.*, 2005). Por ello, según algunos estudios de la literatura (Jongbloed *et al.*, 2004; Jongbloed *et al.*, 2008; Woyengo *et al.*, 2008; Emiola *et al.*, 2009; Poulsen *et al.*, 2010; Mosenthin y Broz; 2010) las fitasas exógenas en el pienso pueden liberar otros nutrientes a parte del P como la proteína y otros minerales e incrementar su digestibilidad, especialmente en dietas deficientes.

1.3 Fitasas

Las fitasas (mioinositol hexakisfosfato fosfohidrolasas) son una gran familia de hidrolasas capaces de catalizar la hidrólisis gradual del IP_6 (Adeola y Cowieson, 2011) generando productos como el inositol-5 fosfato (IP_5), luego el inositol-4 fosfato (IP_4), inositol-3 fosfato (IP_3), inositol-2 fosfato (IP_2) y por último el inositol-1 fosfato (IP_1), siendo los tres últimos fuentes de P capaces de atravesar la barrera intestinal (Pointillart, 1994) (figura 3).

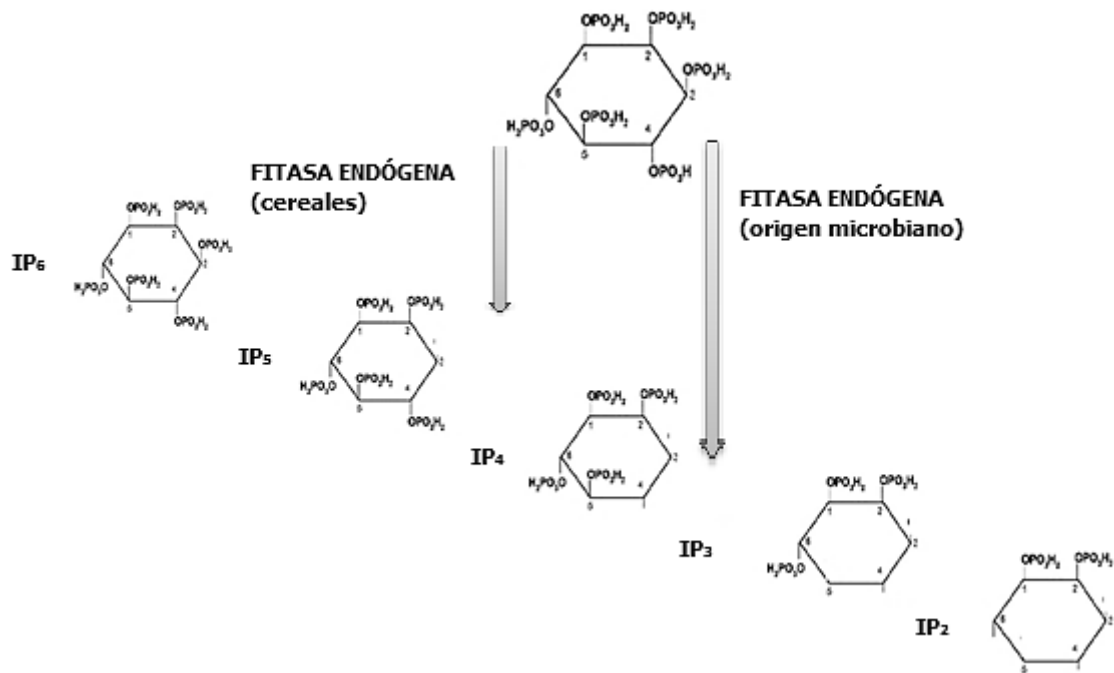


Figura 3. Productos generados (inositol-5 fosfato, IP₅ a inositol-1 fosfato, IP₁) a partir de la hidrólisis del ácido fítico (IP₆) (Frontela, 2008)

Las fitasas hidrolizan solamente los fitatos en solución y su actuación requiere de unas condiciones determinadas de humedad, pH y temperatura y son variables según el tipo de fitasa (Rebollar y Mateos, 1999). En forma natural las fitasas están presentes en varios cultivos de bacterias, hongos y levaduras (Selle y Ravindran, 2008; Prasad *et al.*, 2015) y también en los alimentos y en el tracto intestinal de los animales.

La actividad fitásica clásicamente se define en unidades de fitasa (UFT) y se expresa en UFT por kg. Una UFT es la cantidad de enzima que necesita para liberar 1 mol de ortofosfato inorgánico por minuto, de 0,0051 mol L⁻¹ de fitato de Na a pH 5,5 y 37 °C (Selle, 2008).

1.3.1 Clasificación de las fitasas

Existen dos bases de clasificación de las fitasas. En función del pH óptimo de actuación, las fitasas se pueden clasificar en fitasas ácidas (pH óptimo de 3,0-5,5) y fitasas alcalinas (pH óptimo alrededor 8,0) (Yin *et al.*, 2007). Por otro lado, teniendo en cuenta el sitio donde se inicia la hidrólisis de la molécula de fitato, se reconocen dos tipos de fitasas: una 3-fitasa (EC 3.1.3.8) y otra 6-fitasa (EC 3.1.3.26) (IUPAC-IUB, 1984). La diferencia radica en el grupo fosfato

donde inicia su hidrólisis, es decir, la 3-fitasa comienza la desfosforilación del mio-inositol en la posición 3 y la 6-fitasa en la posición 6; figura 4. La 3-fitasa se ha encontrado en animales y microorganismos, mientras que la 6-fitasa está presente en los vegetales (Turk *et al.*, 2000).

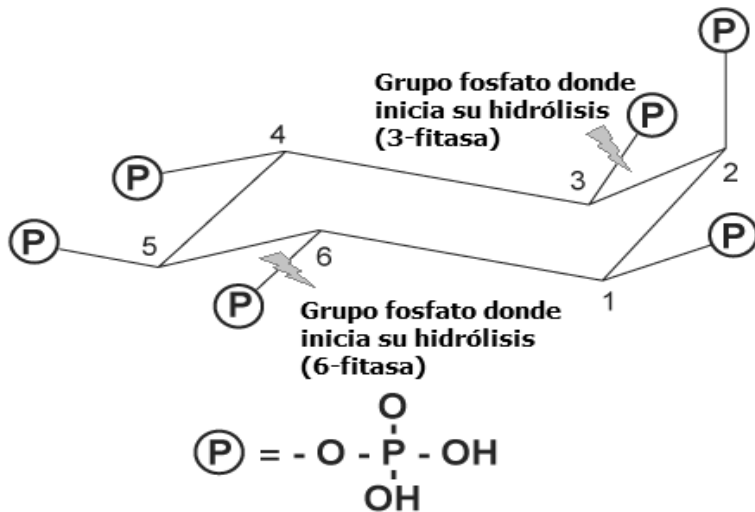


Figura 4. Posición de inicio de la hidrólisis en 3 y 6-fitasas (Acosta y Cárdenas, 2006).

No obstante, en la práctica, el criterio más importante para clasificar las fitasas es su origen, pudiendo ser endógena o exógena (Kerovuuo, 2000). Según Kornegay (2001) y Selle y Ravindran (2008), existen cuatro posibles fuentes de actividad de la enzima-fitato degradante en los monogástricos, y son: (a) actividad fitásica en la mucosa del intestino delgado, (b) fitasas endógena producida en la flora intestinal, (c) fitasas endógenas procedentes de algunos ingredientes de los piensos, (d) fitasas exógenas de origen microbiano.

a) Actividad fitásica en la mucosa intestinal

La actividad fitásica en el intestino se demostró por primera vez en ratas por Patwarthan (1937). Posteriormente se ha demostrado que existe actividad fitásica en la mucosa del intestino delgado de los cerdos (Huet *al.*, 1996) pero muy reducida (Pointillart, 1993). Debido a la escasa actividad fitásica, en esta especie, las fitasas intestinales no son capaces de hidrolizar la molécula de fitato pero si pueden de hidrolizar las moléculas de intermediarios del inositol fosfato con menor número de iones ortofosfatos (IP₃ a IP₁) dando como

producto final a inositol libre (Kempe, 1998). Además la producción de fitasas en la mucosa intestinal puede verse favorecida por niveles bajos de P y Ca y altos de vitamina D en la dieta (Näsi *et al.*, 1999).

b) Fitasas endógenas producidas en la flora intestinal

Diversos hongos y microorganismos del tracto intestinal pueden producir fitasas. La actividad de la flora microbiana en porcino tiene lugar, principalmente, en el intestino grueso. Por tal razón, aunque las fitasas microbianas hidrolizan los fitatos y liberen el P inorgánico, el cerdo no lo puede aprovechar ya que este P se excretará mayoritariamente en las heces (Jendza *et al.*, 2006).

c) Fitasas endógenas en materias primas

Algunos ingredientes de piensos de origen vegetal pueden contener cierta actividad fitásica. Cierta tipo de semillas poseen actividad fitásica propia, especialmente dentro del grupo de cereales. Tal y como se observa en la Tabla 1, dentro de los que poseen mayor actividad fitásica intrínseca, encontramos a los cereales como el trigo, centeno y triticale y de menor importancia en el resto de los granos que se utilizan mayormente. Cabe mencionar que las harinas de oleaginosas (soya, colza y algodón) y los granos de leguminosas, tienen una actividad fitásica muy reducida (Ravindran *et al.*, 1995).

Sin embargo, los subproductos de molinería, especialmente en los obtenidos de los derivados del trigo (salvados) o los que se obtiene de procesos de fermentación (granos de destilería con solubles, raicilla de cebada, gérmenes de maíz) son ricos en actividad fitásica (Yi y Kornegay, 1996). El pH óptimo de actuación de las fitasas vegetales está entre 4,0 y 7,5, preferentemente por encima de 5 y limitan su actividad a un pH entre 2.5-3 (Pointillart, 1993). Cabe mencionar que los valores óptimos de pH para su máxima actividad son superiores a los encontrados en el estómago del cerdo, principal punto de acción de las fitasas (Pointillart, 1993; Yi y Kornegay, 1996), por lo que generalmente no son activas en este punto. Además, su temperatura óptima de acción se encuentra entre 45 a 60°C (Pointillart, 1994) y se degradan rápidamente a temperaturas superiores. Por este motivo, a nivel práctico no es

considerada la actividad de estas fitasas en las materias primas a la hora de optimizar el nivel de P en los piensos para animales. Se consideran fuentes poco fiables de suministro de actividad fitásica especialmente en condiciones de bajo pH digestivo o de altas temperaturas durante el proceso de fabricación de los piensos (Jongbloed *et al.*, 1993).

d) Fitasas exógenas de origen microbiano

Las fitasas microbianas exógenas utilizadas en alimentación animal estuvieron disponibles comercialmente a partir de 1991 (Lenis y Jongbloed, 1999). Las fitasas exógenas más empleadas en la alimentación animal derivan tanto de hongos (especies de *Aspergillus*) como de levaduras (*Saccharomyces* y *Peniophora*) y de algunas bacterias (*Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*).

Las fitasas de origen bacteriano existentes hasta el momento (excepto el *Bacillus subtilis*), son de naturaleza intracelular. Su pH óptimo de actividad es neutro o alcalino, por lo que hasta ahora han sido menos interesantes que las fúngicas en alimentación animal. Las fitasas producidas por hongos del género *Aspergillus*, producen enzimas extracelulares del tipo 3-fitasa con capacidad hidrolítica del IP₆. De todas las fitasas exógenas, *Aspergillus niger* es el que produce una fitasa extracelular más activa. Este hongo produce dos tipos (A y B) y una fosfatasa ácida (pH 6,0). La fitasa de tipo A, su pH óptimo esta entre 2,5-5,0 y a una temperatura óptima de 58°C. Mientras que la fitasa de tipo B actúa a un pH óptimo de 2,5 y una temperatura optima de 63°C (Wodzinski y Ullah, 1996).

Actualmente, existen al menos cuatro fitasas comerciales disponibles de las cuales tres son obtenidas por fermentación de un *Aspergillus* genéticamente modificado (Natuphos[®], Novo phytase[®] y Finase[®]), y la otra por extracción del medio de cultivo de un *Aspergillus* no modificado genéticamente (Alltech phytase[®]). Su uso a nivel industrial para la alimentación animal ha crecido tanto por su efectividad a nivel práctico y por la generación de nuevas tecnologías que han permitido la obtención de esta enzima a nivel industrial,

que consecuentemente genera una disminución de precios, facilitando la inclusión en dietas para cerdos (Selle, 2008; Sauer *et al.*, 2009).

1.3.2 Efecto de fitasas sobre la disponibilidad de nutrientes en la dieta

Como se ha comentado con anterioridad, la inclusión de fitasas exógenas en los piensos contribuye a incrementar la disponibilidad del P orgánico. La formulación de piensos con bajos contenidos de P inorgánico y adición de fitasas es una estrategia ampliamente utilizada y muy interesante a nivel económico y medioambiental que permite aumentar la utilización del P y reducir su excreción al medio. Además, la adición de fitasas en los piensos, puede tener un efecto sobre otros nutrientes e incrementar su digestibilidad, como indican algunos estudios previos con fitasas las diferentes fases de la producción porcina descritos en la literatura.

En un estudio con **cerdas**, realizado por Jongbloed *et al.* (2004), utilizando una fitasa microbiana (derivada de *Peniophora lycii*), observaron un incremento en la digestibilidad del P en 16 unidades porcentuales con la adición de 750 UFT/kg en lactación y en 24% en cerdas gestantes con la adición de 1000 UFT/kg, en comparación con dietas bajas en P sin fitasas.

En evaluaciones con **lechones destetados**, Young *et al.* (1993), al adicionar fitasa microbiana en niveles de 500 y 1000 UFT/kg, obtuvieron un aumento en la digestibilidad del P en 8 y 11 unidades porcentuales, respecto a dietas bajas en P sin fitasa. También observaron incremento en la concentración del P sérico y aumento en las cenizas y concentración de P en el metatarso a estas dosis. Además, los resultados obtenidos por estos autores fueron similares a los obtenidos con una dieta similar pero suplementada con fosfato de Ca (P inorgánico).

También en cerdos de crecimiento – acabado, Jongbloed *et al.* (2000) indica en su trabajo de revisión que la mayoría de investigaciones en lechones y en cerdos de estas edades, la fitasa microbiana tiene efecto positivo sobre la digestibilidad del P.

En **cerdos en crecimiento**, Woyengo *et al.* (2008), al adicionar una fitasa exógena a dietas de cerdos de 20 y 60 kg de peso vivo (PV) demostraron que la digestibilidad del P incrementó con la adición de 250 UFT/kg tanto en cerdos de 20 como de 60kg PV. No obstante, al aumentar la dosis de fitasa a 500 UFT/kg, solo se observa efecto en cerdos de 20 Kg. Al igual, Emiola *et al.* (2009), en estudios con cerdos en crecimiento (16 Kg PV), observaron que con la utilización de fitasa microbiana a dosis 1000 y 4000 UFT/Kg obtienen una mayor retención del P ($p < 0,05$) en un 14 y 15 de unidades porcentuales, respectivamente, respecto al control negativo sin fitasa. Mientras que Almeida y Stein (2012), en cerdos en crecimiento (18 Kg de PV), encontraron que con la suplementación de 1500 UFT de fitasa microbiana/kg, incrementó la digestibilidad del P hasta un 34%, respecto a una dieta sin fitasa.

En estudios con **cerdos de finalización**, Poulsen *et al.* (2010), también observaron que la digestibilidad del P cambió en función de la dosis de fitasas suplementada. Estos autores obtuvieron un incremento de la digestibilidad del P de 31 a 45, 50 y 53% cuando suplementaban fitasas a niveles de 250, 500 ó 750 UFT/kg, respectivamente, en comparación con un pienso sin fitasas. Estos autores concluyeron que el aumento de la digestibilidad era más grande en el rango de concentración de 0 a 250 UFT/kg, que de 250 a 750 UFT/kg.

Por otro lado, la inclusión de fitasas en piensos de cerdos puede producir un aumento de la digestibilidad y retención de otros nutrientes, por ejemplo de proteínas, aminoácidos y otros minerales, según indican algunos estudios.

Como ya se ha comentado con anterioridad, la acción hidrolítica de la fitasa sobre los fitatos en el estómago del cerdo, no sólo aumenta la digestibilidad del P, también indirectamente, puede elevar la del Ca. Kornegay y Qian (1996), en un estudio con cerdos destetados, observaron que con la adición de fitasa microbiana a dosis de 500 UFT/kg de alimento obtiene 0,73g de Ca liberado. Guggenbuhl *et al.* (2007b), igualmente en un estudio con cerdos en crecimiento, utilizando tres fitasas diferentes (Quantum[®], Ronozyme[®] y Natuphos[®]), observaron un aumento en la digestibilidad del Ca de 15,8, 15,6 y

14,6% respectivamente, al compararlo con la misma dieta sin enzima. Mientras Harper *et al.* (1997), con cerdos en crecimiento y acabado observaron que al incrementar la dosis de la fitasa microbiana comercial (Nutuphos[®]) de 250 a 500 UFT/Kg de alimento, en dietas con baja concentración de P, no encontraron respuesta en la digestibilidad de Ca, a pesar de haber estimado que la digestibilidad del P podría incrementar en un 30%. Igualmente, tampoco encontraron efecto en la digestibilidad de materia seca (MS). La inconsistencia en los resultados obtenidos sobre la efectividad de la fitasa sobre otros minerales como el Ca puede deberse a la cantidad de Ca y/o a la relación Ca/P, el nivel de P y el nivel de fitato en la dieta. Según otros autores estos son factores importantes que afectan a la efectividad de las fitasas (Quian *et al.*, 1996; Yi *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1998; Liao *et al.*, 2002; Poulsen *et al.*, 2010).

Otros estudios, indican que al adicionar fitasa en los piensos de cerdos se incrementa la **disponibilidad de microminerales** como el Cu, Zn, K, Na y Mg. Jongbloed *et al.* (2004), reportaron que con suplementación de fitasas en las dietas de cerdas aumentaban la digestibilidad del Ca (9,3%), Mg (24,5%), Na (10,8%) y K (5%). Mientras que Chu *et al.* (2009), reportaron un incremento de la absorción verdadera de Zn de un 42%, cuando adicionaba una fitasa al pienso. Además Adeola *et al.*, (1995) observaron una mejora del crecimiento y retención de Zn, Cu, P y Ca con la adición de 1500 UFT/Kg a una dieta de cerdos en crecimiento,, sin embargo, no encontraron efectos en la digestibilidad de Mg y Mn.

Al adicionar fitasas al pienso también podrían mejorar la digestibilidad aparente de la **proteína y los aminoácidos**, tal como lo indica algunos investigadores (Guggenbuhl *et al.*, 2007a; Woyengo *et al.*, 2008). Jongbloed *et al.* (2000) sugieren en su revisión que el empleo de fitasas puede aumentar en un 0,85% la digestibilidad total aparente de la proteína.

Además de sus efectos sobre la digestibilidad del P y otros nutrientes, algunos trabajos de investigación indican que la suplementación de fitasas produce un aumento de los **parámetros productivos en cerdos**, alimentados con dietas

bajas en P. En estudios con cerdos recién destetados (7,8 kg PV), Varley *et al.*, (2010), observó mejoras en el índice de conversión alimenticia con la adición de fitasa. También otros trabajos de investigación de Harper *et al.* (1997) y Adeola *et al.* (2004), han reportado un incremento en los parámetros productivos, con el uso de fitasas en cerdos en crecimiento.

Cabe mencionar, que la respuesta a la suplementación de fitasas en piensos porcinos no siempre ha sido la esperada. Según Adeola y Cowieson (2011), indicaron que el efecto de la fitasas microbiana sobre la liberación de P inorgánico depende de diversos factores:

- (a) la concentración de fitato en los piensos,
- (b) la fuente de fitato,
- (c) las especies, edad de los animales y su estado fisiológico,
- (d) las concentraciones minerales en la dieta (relación Ca:P),
- (e) el origen de las fitasa y
- (f) el nivel de fitasa añadida.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos de la incorporación en el pienso porcino de cebo de una nueva fitasa de origen microbiano (producida por *Pichia pastoris* a partir de un gen clonado de *Serratia odorifera*) sobre el coeficiente de digestibilidad aparente y retención de los diferentes nutrientes en cerdos en crecimiento.

Estos resultados contribuirán al desarrollo del sector porcino, mediante la utilización de esta nueva fitasa. Se trata de una nueva molécula con actividad fitásica óptima en un rango de pH entre 3,5 y 5,8 y una alta resistencia a la pepsina y tripsina. Estas propiedades le confieren ventajas con respecto a las fitasas existentes y se requiere de su autorización por las autoridades europeas para finalmente poder ser utilizada como aditivo en la fabricación de piensos destinados a la nutrición porcina.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Ubicación e instalaciones

El trabajo de investigación se realizó en la unidad experimental del Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA), localizado en Segorbe, Castellón. Para este estudio se utilizó la granja experimental de cerdos de cebo y laboratorio del centro experimental. Parte de los análisis se realizaron los laboratorios del Departamento de Ciencia Animal de la Universitat Politècnica de València (UPV) y el Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana (CECAV).



Figura 5. Unidad experimental de cerdos de cebo del Centro de Investigación y Tecnología Animal

2.2 Animales y diseño experimental

En el presente trabajo de investigación se llevó a cabo entre los meses de enero y abril de 2015. Se utilizaron 75 cerdos machos (Pietrain x ACMC-Meidam) en crecimiento, procedentes de una granja de madres del Grupo Fertinagro Nutrientes S.L. El total de animales ingresaron en 5 tandas. Cada tanda estaba conformada por 15 cerdos con PV inicial medio de $32,24 \pm 2,77$ kg.

En el estudio se emplearon dos salas del complejo de la nave de porcino de cebo del CITA, una sala tipo isowean ("wean to finish") para el periodo en

corral de los animales y una sala de digestibilidad donde se realizaron los balances de digestibilidad correspondientes. En ambas salas se controló la temperatura máxima y mínima diaria mediante sistemas de ventilación y calefacción.

Cada tanda tuvo una duración de 18 días (7 días de adaptación al pienso en corral, 7 días de adaptación a la jaula y 4 días de balance de digestibilidad). En el momento de la recepción de los animales de cada tanda, éstos fueron pesados e identificados de forma individual mediante crotales y distribuidos según peso (pesos similares entre corrales) en 5 corrales, cada uno con 3 individuos. A cada corral se le asignó un tratamiento experimental (5 tratamientos), que se detalla más adelante.

A los 7 días de estudio, se seleccionaron dos de los tres animales del corral (los de peso medio dentro del corral) para la realización de un balance de digestibilidad. Durante el periodo de digestibilidad, los animales seleccionados fueron alojados individualmente en una sala acondicionada con corrales de digestibilidad (1x1,2m²), donde permanecieron 11 días (7 días de adaptación a las jaulas y 4 días de recogida de heces y orina (figura 6a y figura 6b). Los animales permanecieron en las jaulas de digestibilidad hasta los 18 días de estudio.



Figura 6. Subida a jaulas de digestibilidad (6a) y Jaulas de digestibilidad de cerdos, durante el periodo de recogida de heces y orina (6b)

Los tratamientos experimentales, consistieron en 5 piensos (Tratamiento C+, Tratamiento C-, Tratamiento 250, Tratamiento 500 y Tratamiento 1000) que difieren en los niveles de incorporación de fitasa y en su composición:

- Tratamiento C+ (control positivo): sin fitasa y con niveles comerciales de P (7,1 g/Kg de pienso)
- Tratamiento C- (control negativo): sin fitasa y con niveles bajos de P (5,6 g/Kg de pienso)
- Tratamiento 250: C- suplementado con 250 UFT/kg de pienso.
- Tratamiento 500: C- suplementado con 500 UFT/kg de pienso.
- Tratamiento 1000: C- suplementado con 1000 UFT/kg de pienso.

La tabla 2 muestra la composición en ingredientes y composición química de las dietas experimentales. Los piensos fueron fabricados en la UPV y se formularon para el resto de nutrientes (energía, proteína y aminoácidos) de acuerdo a las recomendaciones que dicta FEDNA (2013) para cerdos en crecimiento.

Tabla 2. Composición piensos experimentales en base a materia fresca.

	Tratamiento	
	Control negativo (C-)	Control positivo (C+)
Ingredientes, %		
Trigo	4,4	4,4
Cebada 2 carreras	65	65
Soja 47%	12	12
Girasol integral	1,9	1,9
Cilindro de arroz	4,0	4,0
Harina de galletas	7,0	7,0
L-lisina	0,64	0,64
DL-Metionina	0,12	0,12
L-Treonina	0,17	0,17
Triptófano	0,08	0,08
Clorhidrato de colina	0,01	0,01
Lecitina de soja	0,81	0,81
Sebo	1,6	1,6
Carbonato cálcico	1,1	1,1
Fosfato bicálcico	0	0,65
Bicarbonato sódico	0,07	0,07
Sulfato de hidrógeno	0,06	0,06
Sal	0,25	0,25
Nutrientes calculados, %		
Energía metabolizable (kcal/kg)	3163	3163
Proteína bruta	16,0	16,0
Lisina	1,04	1,04
Metionina + cistina	0,65	0,65
Treonina	0,70	0,70
Triptófano	0,27	0,27
Isoleucina	0,60	0,60
Extracto etéreo	5,34	5,34
Almidón	40,0	40,0
Calcio	0,52	0,70
Fósforo total	0,42	0,55
Fósforo disponible	0,14	0,24
Fósforo digestible	0,13	0,21
Sodio	0,17	0,17
Cloro	0,30	0,30

La fitasa se incorporó de forma líquida al pienso. La fitasa utilizada es una nueva enzima desarrollada por Fertinagro Nutrientes S.L (Teruel, España) a partir de un gen aislado de *Serratia odorifera* (género de bacteria gram

negativa, *Enterobacteriaceae*), expresado en una cepa de la levadura *Pichia pastoris*. Se trata de una 3-fitasa (EC 3.1.3.8.) que presenta una actividad fitásica preferentemente con un pH óptimo de 3,7 a 5,8 y temperatura óptima a 50°C con alta resistencia a la pepsina y la tripsina (proteasas del tracto digestivo que catabolizan gran parte de la enzima).

Los piensos experimentales fueron administrados desde el primer día de estudio en forma de harina y *ad libitum* en comederos tipo tolva de plástico. El agua fue suministrada *ad libitum*, en bebederos tipo chupete, durante todo el periodo experimental. La tabla 3 recoge los valores analizados de fitasa en los piensos experimentales.

Tabla 3. Unidades de fitasas (UFT) por kg de pienso en los piensos experimentales

	Tratamiento				
	C+	C-	250	500	1000
Fitasa (UFT¹/kg)	0	0	337	529	1038

Tratamiento C+: Control positivo; Tratamiento C-: Control negativo; Tratamiento 250: C- suplementado con 250 unidades de fitasa UFT/kg; Tratamiento 500: Tratamiento C- suplementado con 500 UFT/kg; Tratamiento 1000: Tratamiento C- suplementado con 1000 UFT/kg.

¹ La 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".

2.3 Medidas

2.3.1 Peso y consumo de pienso:

Durante el estudio se registró el peso individual de los animales a la llegada a las instalaciones (0 día de inicio de adaptación), el día de subida a los corrales digestibilidad (día 8 de estudio; figura 7) y el día de finalización del balance de digestibilidad (día 18 de estudio).



Figura 7. Pesaje del cerdo a la llegada

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, como muestra a continuación:

$$\text{Pienso consumido} = \text{Pienso ofertado} - \text{pienso rechazado}$$

Con esta información se calculó las variables de rendimiento medidas como: Ganancia media diaria de peso (GMD), el consumo medio diario de pienso (CMD) y el índice de conversión alimenticia (IC, kg de pienso/kg de peso).

En la tabla 4 se muestra un esquema del periodo experimental de cerdos en crecimiento.

Tabla 4. Periodo experimental del estudio en cerdos en crecimiento

DIAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
ACTIVIDAD	I y AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AJ	AJ	AJ	AJ	AJ	AJ	AJ	D	D	D	D
PERIODO	ADAPATACIÓN AL PIENSO							ADAPTACIÓN A JAULA							DIGESTIBILIDAD			

Dónde: I= Ingreso; AC= Adaptación al pienso; AJ=Adaptación en Jaula; D= Digestibilidad.

2.3.2 Digestibilidad aparente

Durante los 4 días de recogida del balance de digestibilidad se recogió el total de heces y orina producidos cada 24 horas, 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 excretas (heces y orina por separado) por corral y se congeló una muestra representativa (aproximadamente 500 g/animal) en congelación (-20°C) de cada pool hasta su análisis.

Con respecto a la orina, ésta se recogió en recipientes que contenía 200 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 10% en cada uno de ellos y por día, con la finalidad de acidificarla y evitar fermentación y pérdidas de nitrógeno amoniacal por volatilización. El pH de la orina tras su recogida fue inferior a 2 (Canh *et al.*, 1997; APHA, 2005; Jarret *et al.*, 2012).

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 MS real del pienso consumido por tratamiento. El último día de recogida los animales se bajaron de los corrales de digestibilidad y se devolvieron a los corrales de origen.

2.3.3 Cálculos y análisis químicos

Los análisis químicos de las muestras obtenidas se realizaron en laboratorios del CITA, UPV y CECAV.

En las muestras de piensos y heces se realizaron las siguientes determinaciones: MS, cenizas (Cz), proteína bruta (PB), EB (energía bruta) y minerales (P y Ca). Los análisis de MS, Cz y PB se realizaron por métodos estándar según la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 2003). La EB se analizó mediante combustión en una bomba calorimétrica (Gallenkamp, London, Reino Unido). A partir de las cenizas se analizó el contenido en Ca y P total, mediante espectrofotometría según la metodología descrita en Haugh y Lantzch (1993). Por otro lado, en las muestras de orina se analizó el contenido en MS y minerales (P y Ca). 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 (pienso, heces y orina), se utilizaron las siguientes fórmulas para el cálculo del coeficiente de digestibilidad y retención aparente:

Coeficiente de digestibilidad (%)

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

Retención total, g/animal y día

$$= \text{mineral ingerido} - \text{mineral excretado en heces} \\ - \text{mineral excretado en orina}$$

Coeficiente de retención total, %

$$= \frac{(\text{mineral ingerido} - \text{mineral excretado en heces} - \text{mineral excretados en orina})}{\text{mineral ingerido}}$$

* 100

A continuación se detallan las analíticas realizadas en los piensos, heces y orina.

a) **Materia seca**

Para la determinación de MS de las muestras de pienso se realizó por triplicado y heces duplicado. De las muestras obtenidas previa descongelación y homogenización, fueron colocadas en bandejas de aluminio y sometidas a deshidratación en una estufa a 80°C, hasta peso constante (durante 24 horas).

La MS es el peso obtenido después de la desecación y calculado su porcentaje.

$$\text{MS (\%)} = \frac{\text{Peso muestra seca}}{\text{peso muestra fresca}} * 100$$

Obtenido el valor de MS, las muestras son deshidratadas luego son molidas para continuar con las determinaciones previstas.

b) Cenizas

A partir de la MS molida, las muestras son sometidas a pre combustión en la placa calefactora. Posteriormente son puestas en la mufla a 550° C, durante 3 horas hasta conseguir cenizas blandas. Luego son puestas en el desecador con la finalidad de mantener deshidratada la muestra. Para obtener el porcentaje de Cz y MO, se calcula de la siguiente manera.

$$\% \text{ Cz} = \frac{\text{Peso cenizas}}{\frac{\text{Peso muestra} * \text{MS}}{100}} * 100$$

$$\% \text{ MO} = 100 - \% \text{ Cz} (\% \text{ MS})$$

c) Proteína bruta

Se determinó la PB por el método de combustión directa LECO® /DUMAS. Las muestras son pesada y envueltas en papel de estaño. En muestras de heces se utiliza 0,18 y pienso 0,16. Las muestras son colocadas en el cabezal de carga y purga del LECO. El resultado final, es mostrado en la computadora y obtenido en porcentaje de Proteína; figura 8.



Figura 8. Análisis de muestras de pienso y heces en el equipo LECO®

d) Energía

Bomba calorimétrica adiabática utilizada en la determinación del contenido de energía de las muestras liofilizadas; figura 9.

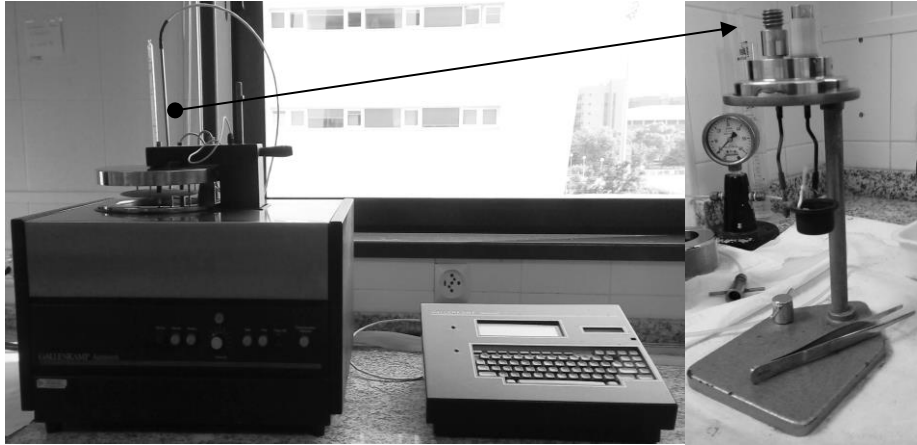


Figura 9. Cálculos de la energía: energía liberada al quemar la muestra en la bomba calorimétrica

e) Minerales

Para el análisis de minerales (contenido de P total y Ca) en pienso y heces, se determinó a partir de las cenizas mediante un equipo de espectroscopia de emisión atómica (ICP-OES) (modelo Varian 720-ES, Varian Inc.)

2.4 Análisis estadístico

Una vez finalizadas las pruebas, se realizó un filtrado y análisis exploratorio de los datos, así como los análisis estadísticos pertinentes utilizando un Software estadístico SAS® (Statistical Analysis System).

Para el análisis de los rendimientos productivos y balance de nutrientes, la unidad experimental fue el animal (animales alojados individualmente). Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza, con el procedimiento GLM en el SAS, que incluyeron la dieta como efecto principal y la tanda como efecto bloque.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Performance durante el periodo de digestibilidad

En la tabla 5 se muestra el peso vivo medio de los animales a la subida y bajada de las jaulas metabólicas, la GMD, el CMD y el IC de cada tratamiento durante este periodo (periodo de adaptación a jaula y periodo de digestibilidad).

Tabla 5. Peso medio, Ganancia media diaria de peso (GMD), consumo medio diario de pienso (CMD) e índice de conversión alimenticia (IC), durante el periodo de adaptación a jaula y recogida de muestras de digestibilidad en cerdos en crecimiento alimentados con pienso suplementado con diferentes niveles de una nueva fitasa.

	Tratamientos					EEM ¹	p-valor
	C+	C-	250	500	1000		
n	10	12	12	12	12	-	-
Peso, kg							
Subida a jaula	38,6	38,7	37,4	38,6	38,5	0,927	0,812
Bajada de jaula	46,4	45,2	44,9	45,6	46,5	1,04	0,750
GMD, kg/día	861a	726b	837ab	779ab	885a	44,0	0,075
CMD, kg/día	1934a	1769ab	1797ab	1712b	1942a	75,3	0,093
IC (kg pienso/kg peso)	2,21b	2,51a	2,15b	2,22b	2,33ab	0,102	0,077

Tratamiento C+: Control positivo; Tratamiento C-: Control negativo; Tratamiento 250: C- suplementado con 250 unidades de fitasa (UFT)/kg; Tratamiento 500: Tratamiento C- suplementado con 500 UFT/kg; Tratamiento 1000: Tratamiento C- suplementado con 1000 UFT/kg.

a, b y c Valores dentro de una misma fila sin superíndice en común son significativamente diferentes ($p < 0.05$); ¹EEM= Error Estándar de la media.

El peso medio a la subida y bajada de jaula no fue significativamente diferente entre tratamientos. Sin embargo, la GMD durante el periodo de digestibilidad fue superior y el IC fue inferior en el tratamiento C+ en comparación con el tratamiento C-. Al comparar el tratamiento C- con el resto de tratamientos con fitasa se observa que el tratamiento 1000 presenta una mayor ($p < 0,05$) GMD durante el periodo de digestibilidad y el tratamiento 500 un menor ($p < 0.05$) CMD en comparación con el tratamiento C-. En términos de IC los tratamientos 250 y 500 presentaron menores IC durante el periodo de digestibilidad que el C-.

Según estos resultados, los animales del tratamiento C- tienen un mayor IC que el resto probablemente debido a su bajo contenido en P y la no adición de fitasa. Al ser menos eficientes, estos animales deberán comer más pienso para igualar a los demás animales con dietas suplementadas con fitasa.

Además, parece que la adición de 250 y 500 UFT/kg podría mejorar el IC de cerdos en crecimiento en comparación con la no adición de fitasa en el pienso (C-). Varley *et al.* (2011), en un estudio con cerdos destetados (7,8 a 33 kg) observaron una mejora lineal ($P < 0,01$) del IC cuando el nivel de fitasa microbiana en dieta aumentó (500, 1000 y 1500 UFT/kg) con respecto a una dieta baja en P y sin fitasa. Sin embargo, en cerdos de crecimiento, no se observaron diferencias en el IC, utilizando los mismos niveles de fitasas, respecto a dietas bajas en P.

De todos modos, es importante destacar que dado que el objetivo del estudio era estudiar la digestibilidad/aprovechamiento 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 crecieron y comieron normalmente a lo largo del estudio.

Digestibilidad aparente de nutrientes

En la tabla 6 se presentan los resultados de medias del coeficiente de digestibilidad aparente (%) de MS, MO, PB, EB, Cz, P y Ca para los distintos tratamientos.

Tabla 6. Coeficiente de digestibilidad aparente (%) de la energía y nutrientes en cerdos de crecimiento alimentados con pienso suplementado con diferentes niveles de una nueva fitasa.

	Tratamientos					EEM ¹	p-valor
	C+	C-	250	500	1000		
Materia seca	80,4	80,3	80,8	81,5	81,1	0,61	0,601
Materia orgánica	82,1	82,0	82,5	83,2	82,7	0,56	0,538
Proteína bruta	80,1	79,2	79,5	79,7	78,2	1,00	0,706
Energía bruta	79,5	79,5	80,2	80,5	80,4	0,59	0,584
Cenizas	57,9a	53,2b	54,6ab	53,0b	55,2ab	1,43	0,121
Calcio	60,9	53,6	53,8	55,8	57,7	2,61	0,253
Fósforo	54,8a	42,7c	45,8bc	48,0b	52,6a	1,43	<0,001

Tratamiento C+: Control positivo; Tratamiento C-: Control negativo; Tratamiento 250: C- suplementado con 250 unidades de fitasa UFT/kg; Tratamiento 500: Tratamiento C- suplementado con 500 UFT/kg; Tratamiento 1000: Tratamiento C- suplementado con 1000 UFT/kg.

a, b y c Valores dentro de una misma fila sin superíndice en común son significativamente diferentes ($p < 0.05$); ¹EEM= Error Estándar de la media.

No se observaron diferencias significativas en digestibilidad para la MS, MO, PB, EB y Ca entre los tratamientos C+ y C-. Sin embargo, el coeficiente de digestibilidad aparente de las Cz y P del pienso resultó ser significativamente mayor ($p < 0.05$) en el tratamiento C+ en comparación con el C-.

Entre el tratamiento C- y los tratamientos con fitasa, únicamente se observaron diferencias significativas en el coeficiente de digestibilidad del P. En este sentido, el tratamiento 250 presentó digestibilidades similares al C-. Sin embargo, la inclusión de 500 y 1000 UFT/kg resultó en una mejora ($p < 0,05$) de 5 y 9 puntos porcentuales, respectivamente, con respecto a la no adición de fitasa (C-). Esta mejora del P se atribuye a la capacidad que tienen las fitasa

para hidrolizar la molécula del fitato y liberar el fósforo (Selle y Ravindran, 2008) y supone una reducción de la excreción de P al medio.

Otros estudios llevados a cabo con fitasa en cerdos en crecimiento demuestran que la suplementación con fitasas microbianas de dietas para cerdos mejora la eficiencia y la utilización de P y Ca (Braña *et al.*, 2006; Woyengo *et al.*, 2008; Emiola *et al.*, 2009). Madrid *et al.* (2013), en un experimento realizado en cerdos en crecimiento observó una mejora de 11,8 unidades porcentuales en la digestibilidad del P con un nivel de suplementación de fitasa microbiana de 500 UFT/kg en una dieta baja en P total. También Poulsen *et al.* (2010), observaron un aumento de la digestibilidad del P de 31 a 45, 50 y 53% cuando se suplementaba fitasa a 250, 500 ó 750 UFT/kg, respectivamente, y concluyeron que el incremento de la digestibilidad del P fue mayor en el rango de concentración de 0 a 250 UFT/kg, que de 250 a 750 UFT/kg. También Simons *et al.* (1990), lograron un incremento de un 26% en la digestibilidad aparente del P, adicionando fitasa microbiana a 1000 UFT/kg en una dieta de maíz-soja y otra con una dieta con harina de yuca y maíz para cerdos en crecimiento. Por lo tanto, aunque la efectividad de las fitasas para incrementar la digestibilidad del P en porcino parece indiscutible, las dosis de fitasas que barajan estos estudios son variables.

En el presente estudio, las dosis recomendadas para incrementar la disponibilidad del P son 500 y 1000 UFT/kg de pienso. Sin embargo, a estas dosis no se observa el efecto en otros nutrientes (MS, MO, PB, EB, Cz y Ca). Otros investigadores (Jongbloed *et al.*, 2004; Jongbloed *et al.*, 2008; Woyengo *et al.*, 2008; Emiola *et al.*, 2009; Mosenthin y Broz; 2010; Poulsen *et al.*, 2010), sugieren que la adición de fitasas exógenas podría mejorar la disponibilidad de otros nutrientes debido a que las fitasas tienen la capacidad de hidrolizar la molécula de fitato liberando los minerales ligados al fitato, consecuentemente incrementando la disponibilidad para su absorción en el intestinal (Selle y Ravindran, 2008). Este efecto podría estar ligado a otros factores como el tipo de ingredientes de la dieta o algunas de las propiedades de las fitasas que no nos han permitido observar estos efectos en el presente estudio.

Energía Digestible y balance del Ca y P

Los resultados del contenido de energía digestible (ED) de los piensos y el balance de minerales de Ca y P obtenidos en este estudio se presentan la tabla 7.

Tabla 7. Energía digestible (ED) y balance (ingestión, excreción y retención) de calcio (Ca) y fósforo (P) de cerdos en crecimiento alimentados con piensos con diferentes niveles de una nueva fitasa.

	Tratamientos					EEM	p-valor
	C+	C-	250	500	1000		
ED, kcal/Kg. MS	3611bc	3610c	3724a	3687b	3667abc	27,0	0,014
Ingestión, g/animal y día							
Ca	18,2a	13,2c	12,8c	12,7c	14,7b	0,536	<0,001
P	8,97a	5,89c	5,89c	5,94c	6,65b	0,258	<0,001
Excreción en heces, g/animal y día							
Ca	7,00a	6,29ab	6,21ab	5,66b	5,77ab	0,491	0,283
P	4,08a	3,47b	3,30bc	2,99c	3,11bc	0,174	<0,001
Excreción en orina, g/animal y día							
Ca	1,01a	0,90ab	0,75b	0,80b	0,81ab	0,078	0,120
P	0,021a	0,019ab	0,020a	0,016b	0,020ab	0,002	0,190
Retención total, g/animal y día²							
Ca	9,73a	6,05c	5,86c	6,23c	7,52b	0,407	<0,001
P	4,87a	2,47d	2,64cd	2,94c	3,58b	0,148	<0,001
Coefficiente de retención total, %³							
Ca	55,0a	46,6b	47,4b	49,5ab	51,1ab	2,67	0,188
P	54,5a	42,3c	45,5bc	47,7b	52,3a	1,35	<0,001

Tratamiento C+: Control positivo; Tratamiento C-: Control negativo; Tratamiento 250: C- suplementado con 250 unidades de fitasa UFT/kg; Tratamiento 500: Tratamiento C- suplementado con 500 UFT/kg; Tratamiento 1000: Tratamiento C- suplementado con 1000 UFT/kg.

a, b y c Valores dentro de una misma fila sin superíndice en común son significativamente diferentes ($p < 0.05$); ¹EEM= Error Estándar de la media;

² Calculado como: mineral ingerido – mineral excretado en heces – mineral excretado en orina;

³ Calculado como: [(mineral ingerido – mineral excretado en heces mineral excretado en orina)/mineral ingerido]* 100

Entre los tratamientos C+ y C- no se observaron diferencias significativas en contenido en ED. Por otro lado, sí se observaron diferencias en la ingestión y excreción netas de P. Ambas fueron superiores ($p < 0.05$) en el tratamiento C+, como era de esperar por su mayor concentración de este mineral en el pienso.

Sin embargo, la excreción en orina de estos minerales no difirió entre el tratamiento C- y el C+. Con respecto a la cantidad ingerida, el tratamiento C+ mostró una mayor ($p < 0,05$) retención tanto de Ca como de P con respecto al tratamiento C-.

Entre el tratamiento C- y el resto de tratamientos con fitasas se observa un incremento significativo del valor energético de los piensos con 250 y 500 UFT/kg de pienso en comparación con el tratamiento C-. Este incremento en el valor energético supone 114 kcal/kg y 77 kcal/kg más, respectivamente.

La ingestión y excreción de Ca y P en heces y orina fue similar entre los tratamientos con fitasa y el C-. Sin embargo, la retención total de minerales fue significativamente diferente entre tratamientos. Entre el C- y los tratamientos con fitasa se observa que existen únicamente diferencias significativas en la retención de P (retención total y coeficiente de retención total), siendo el coeficiente de retención total de P en el tratamiento 500 y 1000 UFT/kg superior en 5,4 y 10 puntos porcentuales, respectivamente, con respecto al tratamiento C-.

Por lo tanto, los resultados del presente estudio muestran que la adición de esta nueva fitasa en raciones de cerdos de crecimiento a dosis de 500 UFT/kg y 1000 UFT/kg permite liberar parte del P fítico de los ingredientes del pienso, aumentando la cantidad de P disponible y la cantidad de P retenido. Emiola *et al.* (2009), también en cerdos de crecimiento (16 kg PV), observan un aumento de la retención del P en un 14%, cuando una fitasa microbiana era añadida a dosis de 1.000 UFT/kg. Mientras que en Mroz *et al.* (1994), observaron que con la utilización de fitasa microbiana (*Aspergillus niger*) a dosis 800 UFT/Kg mejora significativamente la retención de Ca en cerdos en crecimiento. La mayoría de los estudios muestran efectos más consistentes sobre el P que sobre el Ca. En conjunto se puede sugerir que el uso de fitasas supone un beneficio medioambiental permitiendo reducir la excreción de P en proporciones variables, entre un 5 y un 40%, tal y como indican Harper *et al.* (1997) y los resultados del presente estudio.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación permiten extraer las siguientes conclusiones sobre la eficacia de esta nueva fitasa microbiana en dietas de cerdos en crecimiento:

1. La adición de 250 y 500 UFT/kg podría mejorar el índice de conversión alimenticia de cerdos en crecimiento en comparación con el control negativo sin fitasa.
2. Las dosis recomendadas de esta nueva fitasa para incrementar la digestibilidad y reducir la excreción del P son 500 y 1000 UFT/kg de pienso. Sin embargo, a estas dosis no se observa el efecto en otros nutrientes.
3. A las dosis recomendadas (500 y 1000 UFT/kg), se observó un incremento en el coeficiente de retención total (considerando la excreción en heces y orina) de P en 5,4 y 10 puntos porcentuales, respectivamente, en comparación con el control negativo sin fitasa.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abelson, P. H. (1999). A potential phosphate crisis. *Science*, 283, 2015.
- Acosta, A., & Cárdenas, M. (2006). Enzimas en la alimentación de las aves. *Fitasas. Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 40(4), 377-387.
- Adeola, O., Lawrence, B. V., Sutton, A. L., & Cline, T. R. (1995). Phytase-induced changes in mineral utilization in zinc-supplemented diets for pigs. *Journal of Animal Science*, 73(11), 3384-3391.
- Adeola, O., and Sands, J. S. (2003). Does supplemental dietary microbial phytase improve amino acid utilization? A perspective that it does not. *Journal of Animal Science*, 81(14_suppl_2), E78-E85.
- Adeola, O., Sands, J. S., Simmins, P. H., & Schulze, H. (2004). The efficacy of an-derived phytase preparation. *Journal of animal science*, 82(9), 2657-2666.
- Adeola, O., & Cowieson, A. J. (2011). Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *Journal of animal science*, 89(10), 3189-3218.
- Almeida, F. N., & Stein, H. H. (2012). Effects of graded levels of microbial phytase on the standardized total tract digestibility of phosphorus in corn and corn coproducts fed to pigs. *Journal of animal science*, 90 (4), 1262-1269.
- AOAC (2000). *Official Methods of Analysis*. 17th ed. Assoc. Anal. Chem., Arlington, VA.
- APHA (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Centennial Edition, Baltimore, Maryland, USA.
- Bedford, M. R., & Partridge, G. G. (Eds.) (2001). *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. Wallingford, Oxon, GBR: CABI. ProQuest ebrary. Web. 30 June 2015. Pag 61- 84.

Bedford, M.R. (2003). New enzyme technologies for poultry feeds. *British Poultry Science*, 44(S1), pp. 14-16.

Brana, D. V., Ellis, M., Castaneda, E. O., Sands, J. S., & Baker, D. H. (2006). Effect of a novel phytase on growth performance, bone ash, and mineral digestibility in nursery and grower-finisher pigs. *Journal of animal science*, 84(7), 1839-1849.

Bref (2003). Reference document on best available techniques for intensive rearing of poultry and pigs. Integrated pollution prevention and control. European Commission.

Bühler, K., Bucher, B., & Wenk, C. (2010). Apparent nutrient and mineral digestibility in growing–finishing pigs fed phosphorus reduced diets supplemented with benzoic acid and phytase. *Livestock Science*, 134(1), 103-105.

Canh, T. T., Verstegen, M. W., Aarnink, A. J., & Schrama, J. W. (1997). Influence of dietary factors on nitrogen partitioning and composition of urine and feces of fattening pigs. *Journal of Animal Science*, 75(3), 700-706.

Casey, A., & Walsh, G. (2004). Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *Journal of Biotechnology*, 110(3), 313-322.

Chesson, A. (1987). Supplementary enzymes to improve the utilization of pig and poultry diets. *Recent advances in animal nutrition*, 1987, 71-89.

Chu, G. M., Komori, M., Hattori, R., & Matsui, T. (2009). Dietary phytase increases the true absorption and endogenous fecal excretion of zinc in growing pigs given a corn-soybean meal based diet. *Animal Science Journal*, 80(1), 46-51.

De Groote, G. (1990) En: VI Curso de Especialización FEDNA. Madrid. 45 pp.

Egli I.M. (2001) Traditional food processing methods to increase mineral bioavailability from cereal and legume based weaning foods. Tesis doctoral. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich (Suiza).

Emiola, A., Akinremi, O., Slominski, B., & Nyachoti, C. M. (2009). Nutrient utilization and manure P excretion in growing pigs fed corn-barley-soybean based diets supplemented with microbial phytase. *Animal science journal*, 80(1), 19-26.

FEDNA. (2013). Necesidades nutricionales para ganado porcino. Normas FEDNA (2ª edición. (Fecha de consulta: 13 abril 2015). Disponible en: http://www.fundacionfedna.org/sites/default/files/Normas%20PORCINO_2013.pdf

Fernández Martínez, Carlos (2005). Aditivos Zootécnicos alternativa a los antibióticos como promotores del crecimiento. Madrid, pág. 7 – 19.

Fernández, J. A., Poulsen, H. D., Boisen, S., & Rom, H. B. (1999). Nitrogen and phosphorus consumption, utilisation and losses in pig production: Denmark. *Livestock Production Science*, 58 (3), 225-242.7

Finley, J. W., & Hopkins, D. T. (1985). Digestibility and amino acid availability in cereals and oilseeds. *American Association of Cereal Chemists, Inc.*, pp 31- 46.

Frontela, C., Ros, G., & Martínez, C. (2008). Empleo de fitasas como ingrediente funcional en alimentos. *ALAN*, 58(3), 215-20.

Greiner, R., & Konietzny, U. (2006). Phytase for food application. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 123-140.

Guggenbuhl, P., & Nunes, C. S. (2007a). Effects of two phytases on the ileal apparent digestibility of minerals and amino acids in ileo-rectal anastomosed pigs fed on a maize–rapeseed meal diet. *Livestock Science*, 109(1), 261-263.

Guggenbuhl, P., Quintana, A. P., & Nunes, C. S. (2007b). Comparative effects of three phytases on phosphorus and calcium digestibility in the growing pig. *Livestock Science*, 109(1), 258-260.

Haefner, S., Knietsch, A., Scholten, E., Braun, J., Lohscheidt, M., & Zelder, O. (2005). Biotechnological production and applications of phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(5), 588-597.

Harper, A. F., Kornegay, E. T., & Schell, T. C. (1997). Phytase supplementation of low-phosphorus growing-finishing pig diets improves performance, phosphorus digestibility, and bone mineralization and reduces phosphorus excretion. *Journal of Animal Science*, 75(12), 3174-3186.

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.

Jarret, G., Cerisuelo, A., Peu, P., Martinez, J., & Dourmad, J. Y. (2012). Impact of pig diets with different fibre contents on the composition of excreta and their gaseous emissions and anaerobic digestion. *Agriculture, ecosystems & environment*, 160, 51-58.

Jendza, J. A., Dilger, R. N., Adedokun, S. A., Sands, J. S., & Adeola, O. (2005). Phytase improves growth performance of starter, grower, and finisher pigs fed phosphorus-deficient diets. *Journal of animal science*, 83(8), 1882-1889.

Jendza, J. A., Dilger, R. N., Sands, J. S., & Adeola, O. (2006). Efficacy and equivalency of an-derived phytase for replacing inorganic phosphorus in the diets of broiler chickens and young pigs. *Journal of animal science*, 84(12), 3364-3374.

Jeong, Y. D., Lee, S. H., Park, C. S., Cho, S. B., & Park, S. K. (2015). Variation in coefficient of total tract apparent digestibility of dry matter, nitrogen, and phosphorus and coefficient of total tract standardized digestibility of

phosphorus in different corns fed to growing-finishing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 201, 66-71.

Jongbloed, A. W., Mroz, Z., Van der Weij-Jongbloed, R., & Kemme, P. A. (2000). The effects of microbial phytase, organic acids and their interaction in diets for growing pigs. *Livestock Production Science*, 67(1), 113-122.

Jongbloed, A. W., van Diepen, J. T. M., Kemme, P. A., & Broz, J. (2004). Efficacy of microbial phytase on mineral digestibility in diets for gestating and lactating sows. *Livestock Production Science*, 91(1), 143-155.

Kemme, P. A. (1998). Phytate and phytases in pig nutrition. Ph.D. Diss., Utrecht Univ., Utrecht, The Netherlands.

Kerovuo J. (2000). A novel phytase from *Bacillus*. Characterization and production of the enzyme. Academic Dissertation. Faculty of Science of the University of Helsinki

Kies, A. K. (2005). Phytase studies in pigs and poultry: effect on protein digestion and energy utilization= Fytasestudies in varkens en pluimvee: effect op eiwitvertering en energiebenutting. [Sl: sn].

Kornegay, E. T., & Qian, H. (1996). Replacement of inorganic phosphorus by microbial phytase for young pigs fed on a maize-soyabean-meal diet. *British Journal of Nutrition*, 76(04), 563-578.

Kornegay, E. T. (2001). Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity. *Enzymes in farm animal nutrition*, 2001, 237-271.

Liao, S. F., Sauer, W. C., & Kies, A. K. (2002). Supplementation of microbial phytase to swine diets: effects on utilization of nutrients. *Food Science and Product Technology. Research Signpost. Kerala, India*, 199-227.

Liebert F, Wecke C & Schoner FJ (1993). Phytase activity in different gut contents of chickens as dependent on levels of phosphorus and phytase

supplementation. Pages 202-205 in Proc. 1993 Symp. *Enzymes in Animal Nutrition*, Karthause Ittingen, Switzerland.

Liu, J; Bollinger, D W; Ledoux, D R; Veum, T. (1998) Lowering the dietary calcium to total phosphorus ratio increases phosphorus utilization in low-phosphorus corn-soybean meal diets supplemented with microbial phytase for growing-finishing pigs. *Journal of animal science* 76, 808-813

Maenz, D. D. (2001). Enzymatic Characteristics of 3 Phytases as they Relate to Their. *Enzymes in farm animal nutrition*, 61.

Mateos, G. G., & Jiménez, M. G. (1998). Uso de premezclas en fabricación de piensos. Características y composición de las materias primas utilizadas en macrocorrectores. In *Avances en nutrición y alimentación animal: XIV Curso de especialización, Expoaviga 98* (pp. 171-190). Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.

Mosenthin R, Broz J (2010). Mineral digestibility and environmental issues. Efficacy and interactions of phytases. *Livestock Science* 134, 258-260.

Näsi, M., Pironen, J. y Partanen, K. (1999) *Anim. Feed. Sci. Techn.* 77, 125-137.

Olukosi, O. A., Sands, J. S., & Adeola, O. (2007). Supplementation of carbohydrases or phytase individually or in combination to diets for weanling and growing-finishing pigs. *Journal of animal science*, 85(7), 1702-1711.

Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C. R., Rodriguez-Leon, J. A., & Soccol, V. T. (2001). Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource technology*, 77(3), 203-214.

Patwardhan, V. N. (1937). The occurrence of a phytin-splitting enzyme in the intestines of albino rats. *Biochemical Journal*, 31(4), 560.

Poulsen, H. D., Jongbloed, A. W., Latimier, P., & Fernández, J. A. (1999). Phosphorus consumption, utilisation and losses in pig production in France, The Netherlands and Denmark. *Livestock Production Science*, 58 (3), 251-259.

Pointillart A. (1993). Importance of phytates and cereal phytases in the feeding of pigs. En: Proceeding 1st Symposium on Enzymes in Animal Nutrition, Kartause Ittingen, Switzerland

Pointillart, A. (1994). Fitatos, fitasas: su importancia en la alimentación de los monogástricos. INRA Prod. Anim. 7(1), 29-39.

Poulsen HD, Carlson D, Nørgaard JV, Blaabjerg K (2010). Phosphorus digestibility is highly influenced by phytase but slightly by calcium in growing pigs. Livestock Science 134, 100-102.

Prasad, C. S., Mandal, A. B., Gowda, N. K. S., Sharma, K., Pattanaik, A. K., Tyagi, P. K., & Elangovan, A. V. (2015). Enhancing phosphorus utilization for better animal production and environment sustainability. Current Science, 108(7), 1315.

Patwardhan, V. N. (1937). The occurrence of a phytin-splitting enzyme in the intestines of albino rats. Biochemical Journal, 31(4), 560.

Qian, H., Kornegay, E. T., & Conner, D. E. (1996). Adverse effects of wide calcium: phosphorus ratios on supplemental phytase efficacy for weanling pigs fed two dietary phosphorus levels. Journal of animal science, 74(6), 1288-1297.

Ravindran V., Bryden W.L., & Kornegay E.T. (1995). Phytates: Occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. Poultry and Avian Biology Reviews, 6, 125-143.

Rebollar, P. G., & Mateos, G. G. (1999). El fósforo en nutrición animal. Necesidades, valoración de materias primas y mejora de la disponibilidad. Curso de especialización FEDNA. Avances en nutrición y alimentación animal, XV, 19-64.

Sandberg, A. S., & Andlid, T. (2002). Phytogenic and microbial phytases in human nutrition. International journal of food science & technology, 37(7), 823-833.

Sauveur, B. (1989). Phosphore phytique et phytases dans l'alimentation des volailles. *INRA Productions animales*, 2(5), 343-351.

Sauer, W. C., Morales, A., Araiza, B., Espinoza, S., & Yáñez, J. (2009). Manipulación nutricional del cerdo para disminuir la contaminación ambiental. Instituto de Investigaciones Porcinas (Cuba).

Sauveur, B. (1989) *INRA Prod. Anim.* 2, 343-351.

Selle, P. H., & Ravindran, V. (2007). Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 135(1), 1-41.

Selle, P. H., & Ravindran, V. (2008). Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. *Livestock Science*, 113(2), 99-122.

Selle, P. H., Cowieson, A. J., & Ravindran, V. (2009). Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. *Livestock Science*, 124(1), 126-141.

Selle, P. H., Cowieson, A. J., Cowieson, N. P., & Ravindran, V. (2012). Protein–phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. *Nutrition research reviews*, 25(01), 1-17.

Simons, P. C. M., Versteegh, H. A., Jongbloed, A., Kemme, P. A., Slump, P., Bos, K. D., & Verschoor, G. J. (1990). Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *British Journal of Nutrition*, 64(02), 525-540.

Singh, B., & Satyanarayana, T. (2011). Phytases from thermophilic molds: their production, characteristics and multifarious applications. *Process Biochemistry*, 46(7), 1391-1398.

Steiner, T., Mosenthin, R., Zimmermann, B., Greiner, R., & Roth, S. (2007). Distribution of phytase activity, total phosphorus and phytate phosphorus in legume seeds, cereals and cereal by-products as influenced by harvest year and cultivar. *Animal Feed Science and Technology*, 133(3), 320-334.

Turner, B. L., Richardson, A. E., & Mullaney, E. F. (Eds.). (2006). *Inositol Phosphates: Linking Agriculture and the Environment*. Wallingford, Oxfordshire, GBR: CABI Publishing. Retrieved from <http://www.ebrary.com>

Türk, M., Sandberg, A. S., Carlsson, N. G., & Andlid, T. (2000). Inositol hexaphosphate hydrolysis by Baker's yeast. Capacity, kinetics, and degradation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(1), 100-104.

Varley, P. F., Callan, J. J., & O'Doherty, J. V. (2010). Effect of phosphorus level and phytase inclusion on the performance, bone mineral concentration, apparent nutrient digestibility, and on mineral and nitrogen utilisation in finisher pigs. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 141-152.

Varley, P. F., Flynn, B., Callan, J. J., & O'Doherty, J. V. (2011). Effect of phytase level in a low phosphorus diet on performance and bone development in weaner pigs and the subsequent effect on finisher pig bone development. *Livestock Science*, 138(1), 152-158.

Viteri, T., & Rafael, R. (2011). Utilización de Fitasa Líquida en la Alimentación de Cerdos en las Etapas de Crecimiento-Engorde. (Fecha de consulta:10 agosto 2015). Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1129/1/17T01005.pdf>.

Vitti, D. M., & Kebreab, E. (Eds.). (2010). *Phosphorus and calcium utilization and requirements in farm animals*. CABI.

Wodzinski, R. J., & Ullah, A. H. J. (1996). Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.*, 42, 263.

Woyengo, T. A., Sands, J. S., Guenter, W., & Nyachoti, C. M. (2008). Nutrient digestibility and performance responses of growing pigs fed phytase-and xylanase-supplemented wheat-based diets. *Journal of animal science*, 86(4), 848-857.

Yi, Z. & Kornegay, E.T. (1996). Sites of phytase activity in the gastrointestinal tract of young pigs. *Anim Feed Sci. and Tech.* 61, 361

Yin, Q. Q., Zheng, Q. H., & Kang, X. T. (2007). Biochemical characteristics of phytases from fungi and the transformed microorganism. *Animal feed science and technology*, 132(3), 341-350.

Young, L. G., Leunissen, M., & Atkinson, J. L. (1993). Addition of microbial phytase to diets of young pigs. *Journal of Animal Science-Menasha then Albany then Champaign Illinois*, 71, 2147-2147.

Zeng, Z. K., Wang, D., Piao, X. S., Li, P. F., Zhang, H. Y., Shi, C. X., & Yu, S. K. (2014). Effects of Adding Super Dose Phytase to the Phosphorus-deficient Diets of Young Pigs on Growth Performance, Bone Quality, Minerals and Amino Acids Digestibilities. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(2), 237–246.