



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

MÁSTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

Eficacia de una nueva fitasa microbiana en dietas de gallinas ponedoras: efecto sobre los rendimientos productivos y la utilización de los nutrientes

Trabajo Fin de Máster
Valencia, septiembre 2015

Javier C. Pareja Loayza

Directores:
Alba Cerisuelo García
María Cambra López
Juan José Pascual Amorós

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia de una nueva fitasa producida por *Pichia pastoris* a partir de un gen aislado de *Serratia odorifera* sobre los rendimientos productivos (producción de huevos, consumo de pienso e índice de transformación) y los coeficientes de utilización del fósforo (P) y de otros nutrientes determinando la dosis eficaz mínima de esta nueva enzima a dos edades.

La experimentación se realizó con 240 gallinas de la línea Lohmann Brown de 16 semanas de vida. A estas gallinas se asignaron 5 tratamientos experimentales que consistieron en un pienso control y cuatro piensos experimentales que diferían entre sí en los niveles de la nueva enzima (unidades de fitasa (UFT)/kg de pienso). Los tratamientos fueron: C- (control, sin fitasa y con niveles bajos de P), 250 (C- con 250 UFT/kg de pienso), 500 (C- con 500 UFT/kg de pienso), 1.000 (C- con 1.000 UFT/ kg de pienso) y 10.000 (C- con 10.000 UFT/kg de pienso). Durante el experimento se realizó un balance de nutrientes a nivel fecal a las 25 semanas de vida y otro balance de nutrientes fecal e ileal a las 30 semanas de vida. Con ello se calculó el coeficiente de utilización de nutrientes del calcio (Ca) y P, materia seca (MS), materia orgánica (MO), proteína (PB) y energía (EB). Además, se estudió la producción de huevos e índice de Transformación (IT) y el Consumo medio diario (CMD).

No se observaron diferencias significativas con la adición de fitasas en los parámetros productivos (peso del animal, CMD, producción de huevos, peso del huevo, masa e IT) respecto al control negativo. En gallinas de 25 semanas, la adición de fitasa mejoró ($P < 0,05$) el coeficiente de utilización de la MS con 1.000 UFT/kg, el coeficiente de utilización de la MO, PB y Ca con 250 UFT/kg y el del P con 500 UFT/kg respecto al pienso sin fitasa. En gallinas de 30 semanas, la adición de fitasa mejoró ($P < 0,05$) el coeficiente de utilización de la MS, MO y el P con 1.000 UFT/kg y el coeficiente de utilización del Ca con 10.000 UFT/kg respecto al pienso sin fitasa. La adición de 500 UFT/kg mejoró ($P < 0,05$) la retención de Ca y P en gallinas de 25 semanas. La adición de 1.000 UFT/kg mejoró ($P < 0,05$) la retención de P en gallinas de 30 semanas. La adición de la fitasa en ningún caso redujo la excreción de estos minerales de forma significativa. En conclusión, respecto a la utilización del P, la dosis eficaz mínima para esta nueva fitasa es de 500 UFT/kg para gallinas de 25 semanas y de 1.000 UFT/kg para gallinas de 30-31 semanas. Para la MO, PB y Ca, la dosis eficaz mínima sería de 250 UFT/kg en gallinas de 25 semanas.

Palabra Clave: Fitasa, eficacia, gallinas de puesta

Summary

The aim of this study was to evaluate the efficacy of a new phytase produced by *Pichia pastoris* from a single gene of *Serratia odorifera* on performance (egg production, feed intake and feed conversion) and phosphorus utilization rates (P) and other nutrients determining the minimum of two new enzyme effective dose ages.

Experiments were carried out with 240 hens Lohmann Brown line 16 weeks of life. These hens were assigned to five experimental treatments consisting on a control diet and four experimental diets that differed in the levels of the new enzyme (phytase units were assigned (UFT) / kg feed). The treatments were: C (control, without phytase and low P), 250 (C-250 UFT / kg feed), 500 (C-500 UFT / kg feed), 1000 (C- with 1000 UFT / kg feed) and 10,000 (10,000 C- UFT / kg feed). During the experiment a nutrient balance (fecal level) at 25 weeks of age and another nutrient balance (fecal and ileal level) at 30 weeks of age was

performed. Thus the utilization ratio of calcium (Ca) and P, dry matter (DM), organic matter (OM), protein (CP) and energy (EB) was calculated. In addition, egg production and feed conversion (IT) and the average daily feed intake (CMD) were studied.

No significant differences with the addition of phytase in the performance parameters (weight of animal, CMD, egg production, egg weight, mass and IT) relative to negative control were observed. With 25 week old hens, the addition of phytase improved ($P < 0.05$) the rate of use of MS with 1,000 UFT / kg, the coefficient of digestibility of OM, CP and Ca 250 UFT / kg and the P 500 UFT / kg based on feed without phytase. With 30 week old hens, the addition of phytase improved ($P < 0.05$) coefficient for DM, OM and P 1,000 UFT / kg and the coefficient of digestibility of Ca 10,000 UFT / kg compared to the feed without phytase. Adding 500 UFT / kg improved retention of Ca and P in 25 week old hens. Adding 1,000 UFT / kg improved retention of P in 30 week old hens. Mineral excretion was not significantly reduced in any case. In conclusion, the minimum effective dose for this new phytase is 500 UFT / kg for 25 week old hens and 1,000 UFT / kg in 30-31 week old hens. The minimum effective dose for PM, CP and Ca is 250 UFT/kg in 25 week old hens.

Keyword: Phytase, efficacy, laying hens

Resum

L'objectiu del present estudi va ser avaluar l'eficàcia d'una nova fitasa produïda *per Pichia pastoris* a partir d'un gen aïllat de *Serratia odorifera* sobre els rendiments productius (producció d'ous, consum de pinso i índex de transformació) i els coeficients d'utilització del fòsfor (P) i d'altres nutrients, determinant la dosi eficaç mínima d'aquest nou enzim a dos edats.

L'experimentació es va realitzar amb 240 gallines de la línia Lohmann Brown de 16 setmanes de vida. A aquests gallines es van assignar 5 tractaments experimentals que van consistir en un pinso control i quatre pinsos experimentals que diferien entre sí en els nivells del nou enzim (unitats de fitasa (UFT) /kg de pinso). Els tractaments van ser: C- (control, sense fitasa i amb nivells baixos de P) , 250 (C- amb 250 UFT/kg de pinso), 500 (C- amb 500 UFT/kg de pinso), 1.000 (C- amb 1.000 UFT/ kg de pinso) i 10.000 (C- amb 10.000 UFT/kg de pinso). Durant l'experiment es va realitzar un balanç de nutrients a nivell fecal a les 25 setmanes de vida i un altre balanç de nutrients a nivell fecal i ileal a les 30 setmanes de vida. Amb això es va calcular el coeficient d'utilització del calci (Ca) i P, matèria seca (MS) , matèria orgànica (MO) , proteïna (PB) i energia (EB) . A més, es va estudiar la producció d'ous i índex de Transformació (IT) i el Consum mitjà diari (CMD).

No es van observar diferències significatives amb l'addició de fitasa en els paràmetres productius (pes de l'animal, CMD, producció d'ous, pes de l'ou, massa i IT) respecte al control negatiu. Amb gallines de 25 setmanes, l'addició de fitasa va millorar ($P < 0,05$) el coeficient d'utilització de la MS, MO i el P amb 1.000 UFT/kg i el coeficient d'utilització del Ca amb 10.000 UFT/kg respecte al pinso sense fitasa. L'addició de 500 UFT/kg va millorar la retenció de Ca i P en gallines de 25 setmanes. L'addició de 1.000 UFT/kg va millorar la retenció de P en gallines de 30 setmanes. L'addició de la fitasa no va reduir l'excreció de minerals de forma significativa en cap edat. En conclusió, la dosi eficaç mínima per a esta nova fitasa és de 500 UFT/kg per a gallines de 25 setmanes i de 1.000 UFT/kg per a gallines de 30-31 setmanes. Per a la MO, PB y Ca, la dosi eficaç mínima és de 250 UFT/kg en gallines de 25 setmanes.

Paraula Clau: Fitasa, eficàcia, gallines de posada

Agradecimientos

Gracias Totales:

A mi Gobierno que viene apostando por el capital humano. Al Departamento de Ciencia Animal de la Universitat Politècnica de Valencia por acogerme durante todo este tiempo.

Al Centro de Investigación y Tecnología Animal por permitir desarrollar el trabajo de investigación y a su personal que con mucha dedicación lleva a cabo su labor (Alba, Pablo y Pepe).

A Fertinagro Nutrientes S.L. por permitir ser parte de esta investigación.

A mis asesores (María, Alba y Juanjo) por su paciencia y guía para poder concluir con el trabajo de fin de master y en general a todo el personal de campo, laboratorio y demás investigadores gracias por su apoyo.

A mi familia y amigos que la distancia hizo sentir el verdadero sentido de la comunicación, el compromiso y el gran valor hacia ellos.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
I.1.	Las enzimas en la nutrición de aves.....	1
I.2.	El fósforo en alimentación animal.....	3
I.3.	Problemática ambiental del fósforo	7
I.4.	Factores que influyen la disponibilidad del fósforo en aves	8
I.5.	Fitasas exógenas	13
I.6.	Eficacia de las fitasas exógenas en aves	14
II.	OBJETIVO	16
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
III.1.	Ubicación e instalaciones	17
III.2.	Animales y tratamientos	18
III.3.	Procedimiento experimental y medidas	20
III.3.1.	Rendimiento productivo	21
III.3.2.	Balance de nutrientes	23
III.3.3.	Análisis de laboratorio.....	25
III.4.	Análisis Estadístico	26
IV.	RESULTADOS	27
IV.1.	Rendimiento productivo.....	27
IV.2.	Balance de nutrientes.....	29
V.	DISCUSIÓN	38
VI.	CONCLUSIONES	42
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	43
VIII.	ANEXOS.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

➤ Tabla 1 Principales enzimas exógenas utilizadas en la alimentación de las aves, sustrato sobre el que actúan y sus efectos (Bedford, 2000)	3
➤ Tabla 2 Contenido en P total, fítico, inorgánico, no fítico y disponible de algunas materias primas (g/kg MS) (Rebollar y Mateos, 1999)	5
➤ Tabla 3 Condiciones de pH en el tracto gastrointestinal de aves (Chesson 1993)	9
➤ Tabla 4 Origen y ubicación de las principales fitasas (Ravindran, 2013)	12
➤ Tabla 5 Composición del pienso control negativo utilizado durante la fase experimental	19
➤ Tabla 6 Calendario de medidas y controles durante la fase experimental	21
➤ Tabla 7 Peso medio y consumo medio diario (CMD) de pienso a lo largo del estudio en gallinas alimentadas con piensos a diferentes niveles de una nueva fitasa	27
➤ Tabla 8 Producción de huevos, peso, masa e índice de transformación (IT) del huevo en gallinas alimentadas con piensos a diferentes niveles de una nueva fitasa, en dos periodos (22-25 y 26-31 semanas de edad).	28
➤ Tabla 9 Coeficientes de utilización de nutrientes y energía (%) en gallinas de 25 semanas de edad alimentadas con piensos con diferentes niveles de una nueva fitasa.	29
➤ Tabla 10 Coeficientes de utilización de nutrientes y energía (%) en gallinas de 30 semanas de edad alimentados con piensos con diferentes niveles de una nueva fitasa	31
➤ Tabla 11 Energía metabolizable aparente (EMA, kcal/kg) de materia seca (MS) y balance (ingestión, excreción y retención) de calcio y fósforo en gallinas de 25 semanas de edad alimentadas con piensos a diferentes niveles de una nueva fitasa	33
➤ Tabla 12 Energía metabolizable aparente (EMA, kcal/kg de materia seca (MS) y balance (ingestión, excreción y retención) de calcio y fósforo en gallinas de 30 semanas de edad alimentadas con piensos a diferentes niveles de una nueva fitasa	35
➤ Tabla 13 Digestibilidad ileal de la materia seca, calcio y fósforo (%) en gallinas de 31 semanas de edad alimentadas con piensos a diferentes niveles de una nueva fitasa	37

ÍNDICE DE FIGURAS

➤ Figura 1 Naturaleza del fósforo contenido en las materias prima (Rebollar y Mateos 1999)	4
➤ Figura 2 Estructura de la molécula del fitato y posibles enlaces con los minerales de la dieta (Sauveur 1989)	6
➤ Figura 3 Vista exterior (a) e interior (b) de las salas experimentales de aves de puesta del Centro de Investigación y Tecnología Animal	18
➤ Figura 4 Báscula y huevera para el pesaje de los huevos	22
➤ Figura 5 Bandejas para la recepción de las excreta, colocadas debajo de las jaulas	23
➤ Figura 6 Intestino delgado de gallina localizando el Íleon	25

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Las enzimas en la nutrición de aves

La industria ganadera exige cada vez mejores rendimientos productivos y eficiencia en la producción. Durante los últimos años, estas mejoras se han conseguido a través de la mejora genética, optimización de los programas sanitarios y de bioseguridad y de los avances conseguidos en el manejo y nutrición del ganado. En aves de puesta, esto se traduce en aves más precoces y con niveles de producción más altos, por lo tanto mantener unos niveles altos de producción por un periodo prolongado del ciclo productivo es una tarea complicada debido a la alta demanda metabólica de las aves. La formulación de los piensos y el manejo de la alimentación son factores clave para asegurar el éxito productivo en este sector y una rentabilidad económica, ya que la alimentación representa entre el 50 y el 70% del coste total de la producción (Selle y Ravindran, 2007).

Además de las propias necesidades de producción, estas aves están sujetas a una serie de factores como: temperatura, tasa de puesta, tamaño del huevo y el propio peso del ave, que afectan sus necesidades de nutrientes y que también deben ser contempladas a la hora de formular los piensos. En este sentido, las aves son especialmente sensibles a deficiencias o excesos de minerales y ciertas vitaminas en los piensos, siendo esencial respetar estas necesidades en los piensos. Al mismo tiempo, esta industria debe cumplir con requerimientos, cada vez más exigentes, por parte de:

- El consumidor: por ejemplo, en características deseadas en el producto final (yemas de color más intenso, carnes menos pálidas, productos más homogéneos y naturales).
- La legislación: por ejemplo,
 - a) Reglamento (CE) 1069/2009 que regula el cumplimiento de normas para el cuidado del medio ambiente respecto a la eliminación de excretas
 - b) Real Decreto 3/2002 que establece las normas respecto a la protección de gallinas ponedoras.

Respecto a ello, en el reglamento (CE) 1831/2003 referente a los aditivos en la alimentación animal, se incluyen las enzimas exógenas como aditivo zotécnico que mejoran el rendimiento y eficiencia productiva de los animales, reduciendo a la vez la carga en nutrientes de los purines y reduciendo el impacto ambiental de la ganadería.

En concreto, la aplicación de enzimas tal como manifiestan, Bedford (2000) y Ravindran (2013), en alimentación animal tiene como finalidad:

- a) Destruir factores anti nutritivos en las raciones de animales monogástricos.
- b) Mejorar la digestibilidad de algunos nutrientes de la dieta como los carbohidratos, proteína o minerales. La baja digestibilidad de algunas materias primas por lo regular es el resultado de la falta de enzimas endógenas del animal para extraer los nutrientes de algunos insumos utilizados en el pienso.
- c) Complementar la adición de las enzimas endógenas producidas por el animal en algunas etapas del crecimiento. Las aves jóvenes cuentan con un sistema enzimático poco desarrollado.
- d) Liberar algunos de los nutrientes atrapados, como azúcares simples, lisina y minerales como el calcio (Ca), Zinc (Zn), Magnesio (Mg) y Hierro (Fe).
- e) Reducir el impacto contaminante de las heces/purines hacia el medio ambiente.

Las enzimas son compuestos orgánicos, de origen proteico, que actúan como catalizadores biológicos de los procesos digestivos y metabólicos. Estos incluyen todas las reacciones de síntesis, digestión y degradación que ocurren en el animal, convirtiendo a las enzimas en el motor que mueve la actividad de todas las células del organismo controlando así, todas las funciones de mantenimiento, crecimiento y reproducción de los animales (Acosta *et al.*, 2007). Las enzimas se caracterizan por su especificidad, por ejemplo en ejercer efectos específicos sobre la digestibilidad de algún nutriente (Bedford, 2000), como muestra en la tabla 1 de las principales enzimas que participan en la alimentación de las aves para una digestión eficaz mejorando la biodisponibilidad y la absorción del alimento

Tabla 1 Principales enzimas exógenas utilizadas en la alimentación de las aves, sustrato sobre el que actúan y sus efectos (Bedford, 2000).

Enzimas	Sustrato	Efecto
Xilanasas	Arabinoxylanos	Reducción de la viscosidad de la digesta
Glucanasas	β -Glucanos	Reducción de la viscosidad de la digesta
Pectinasas	Pectina	Reducción de la viscosidad de la digesta
Celulasas	Celulosa y derivado	Mejora la digestibilidad de la fibra y la celulosa
Proteasas	Proteína	Mejora la degradación de la proteína
Amilasas	Almidón	Mejora la degradación de los componentes amiláceo
Fitasa	Ácido fítico	Mejora el aprovechamiento del fósforo vegetal
Galactosidasas	α -galactósidos	Eliminación de los galactósidos

A modo de ejemplo, la utilización de fitasas, motivo de la presente investigación, mejora el aprovechamiento del fósforo (P) contenido en los vegetales en forma de ácido fítico, reduciendo su excreción al medio ambiente. La utilización de fitasas conlleva reducir el uso de insumos no renovables como el P inorgánico de origen mineral.

I.2. El fósforo en alimentación animal

El P es un mineral esencial para el crecimiento y el desarrollo estructural y metabólico de los animales. Participa en numerosos procesos metabólicos como el mantenimiento del equilibrio ácido-base y la capacidad tampón de la sangre, la calcificación y formación de la cáscara del huevo y los procesos de intercambio de energía (ATP) (Mateos y García, 1998). En aves, su deficiencia conlleva a una mayor incidencia de decomisos en matadero, (problemas de raquitismo o fracturas), empeoramiento de la calidad de cáscara (Rebollar y Mateos, 1999). Por otro lado, el exceso no es sólo caro y contaminante sino que además influye negativamente sobre los procesos de calcificación y de formación de la cáscara.

Las fuentes de P en alimentación animal son numerosas y difíciles de estandarizar. A efectos prácticos se clasifican en orgánicas (vegetal o animal) e inorgánicas (mineral) tal como se muestran en la figura 1. El P de **origen animal**, en forma de ortofosfatos (PO_4)³ de Ca mayoritariamente, presenta una alta disponibilidad, especialmente con molturaciones finas de los componentes óseos. Sin embargo, su uso para animales de suprimida, debido a consideraciones éticas y para el control de transmisión de enfermedades (Encefalopatía

Espongiforme Bovina) (Reglamento UE nº 142/2011).

En cuanto al P de **origen mineral**, las fuentes más utilizadas en alimentación animal son los ortofosfatos de sodio (Na), calcio (Ca), potasio (K), amoníaco (NH_4) y sus combinaciones y los fosfatos. Los ortofosfatos son la fuente principal y común de los aportes minerales (P, Ca, Mg, Fe, K y Cu) en los piensos comerciales formulados por las empresas. Las formas de utilización de los fosfatos son el fosfato monocalcico o el fosfato bicalcico, y estas formulaciones muchas veces tienen una disponibilidad mineral del P superior a lo requerido.

El P de **origen vegetal** viene representado por P orgánico en forma de ácido fítico, que es el fosfoglicido más abundante, a razón de un 60-80%. Aunque existen tres terminologías para definir este complejo, a saber, fitato, fitina y ácido fítico, el fitato es la más comúnmente utilizada. Esta, se refiere a la sal mixta de ácido fítico de K, Mg y Ca (myo-inositol hexafosfato; IP_6). La fitina, se refiere específicamente al complejo depositado de IP_6 con un mineral (K, Mg y Ca) que se produce en las plantas, mientras que el ácido fítico es la forma libre de IP_6 . Sea como fuere, su absorción por los animales monogástricos es casi nula. En términos prácticos se admite que la digestibilidad del P inorgánico y del P orgánico no fítico es similar y cercana al 100% (80-100) (Rebollar y Mateos, 1999). El P fítico se le asigna una digestibilidad de 0,9 siendo poco útil su utilización por monogástricos.

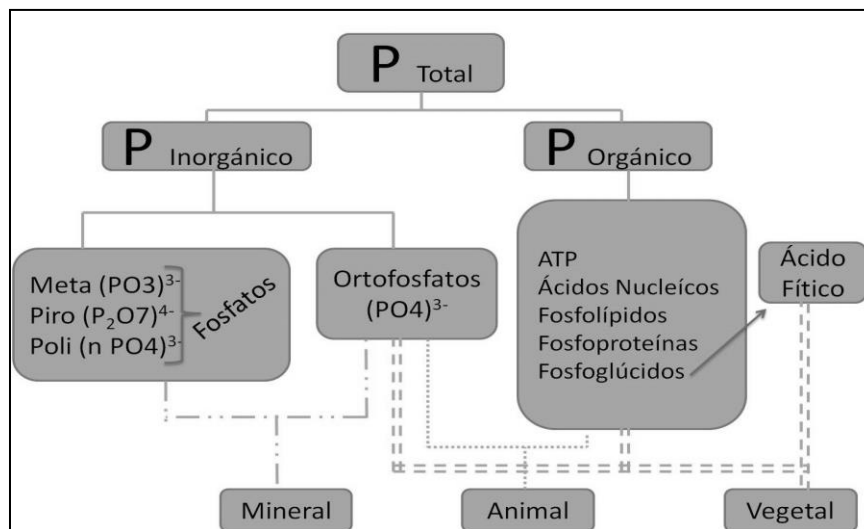


Figura 1 Naturaleza del fósforo contenido en las materias prima (Rebollar y Mateos 1999)

El nivel de P varía no sólo entre fuentes sino también dentro de cada fuente. En este sentido, en materias primas de origen vegetal el contenido en P depende del tipo de suelo, variedad cultivada, estado de maduración, condiciones de cultivo, climatología, etc. (Rebollar y Mateos, 1999; Ravindran, 2013). La tabla 2 recoge la comparación de la concentración de P presente en gramíneas y leguminosas frecuentemente utilizadas en la fabricación de piensos, expresada tanto en contenido de P total, P fítico o P inorgánico, así como el valor de P disponible calculado como el 30% del P total (Rodehutschord, 2011). Se puede apreciar que los valores más altos de P inorgánico corresponden a guisantes, habas y colza (50 a 80% del P total), lo que explica la mayor disponibilidad del P en leguminosas y oleaginosas que en cereales. En cambio los datos de P no fítico varía entre el 30 y el 80% del P total, mostrándose que un 70% del P vegetal es P fítico. La diferencia entre P no fítico y P inorgánico indica que existe un nivel variable de P orgánico de naturaleza no fítica de alta disponibilidad en monogástricos. En dietas para monogástricos debe considerarse la naturaleza del P de las materias primas vegetales, analizando sus contenidos en P total y P fítico, a fin de asignar en la matriz un valor más preciso del contenido en P utilizable para monogástricos.

Tabla 2 Contenido en P total, fítico, inorgánico, no fítico y disponible de algunas materias primas (g/kg MS) (Rebollar y Mateos, 1999)

	P total	P fítico	P inorgánico ¹	P no fítico ²	P disponible ³
Gramíneas					
Trigo	3,9	2,2	1,1	1,7	1,2
Cebada	4,3	2,4	1,2	1,9	1,3
Avena	3,6	1,9	1,2	1,7	1,1
Triticale	4,4	3	1,5	1,4	1,3
Maíz	3	2	1,2	1	0,9
Gluten feed	7,2	2,9	2,6	4,3	2,2
Leguminosas					
Guisantes	4,3	2,1	1,3	2,2	1,3
Habas	5,8	1,5	1,5	4,3	1,7
Harina de Pradera	2,6	1,1	1,2	1,5	0,8
Harina de Soja	7	3	1,4	4	2,1
Soja integral	5,3	2,3	1,2	3	1,6
Harina de girasol	9,4	3	1,4	6,4	2,8
Harina de colza	12,4	2,1	1,7	10,3	3,7

⁽¹⁾P inorgánico se determina analíticamente (Pons y Guthrie, 1946); P no fítico = ⁽²⁾P total - P fítico; ⁽³⁾P disponible = 30% P

total

Además de ser una fuente poco digestible de P, el ácido fítico tiene un alto potencial quelante y forma sales insolubles a pH neutro con numerosos cationes di y trivalentes (Ca, Mg, Zn, Cu, Co, Fe, Mn, Cu) (Selle y Ravindran, 2007), lo que limita su absorción a nivel intestinal. En la figura 2 se muestra la estructura molecular del fitato formando sales insolubles de Ca, y otros minerales con el Zn, Mg y Fe, disminuyendo su digestibilidad, considerándose como un anti nutriente en alimentación. La principal problemática se da con el Ca, Zn y Cu (Beutler, 2009). Acosta *et al.* (2006) señalan que sólo el ácido fítico (IP₆ y IP₅) tienen poder quelante con los minerales. Por ello, la hidrólisis del P fítico mediante la acción de las fitasas de origen endógeno o exógeno mejora, además de la digestibilidad del P, la absorción y retención del P, Ca, Mg, Zn, Cu, Fe y aminoácidos en proporciones variables y especialmente en dietas deficientes (Kornegay, 1999).

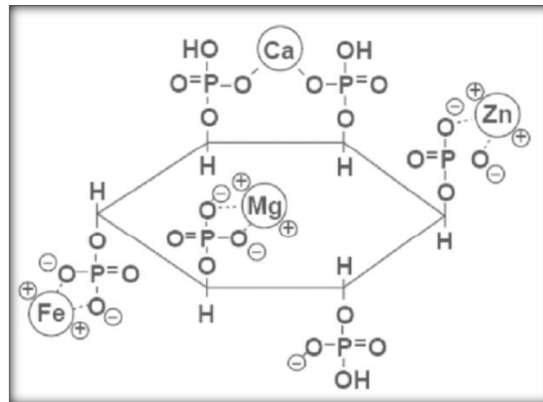


Figura 2 Estructura de la molécula del fitato y posibles enlaces con los minerales de la dieta (Sauveur 1989)

A pesar de ser esencial, el P en alimentación animal lleva asociados problemas como: aspectos ligados a la contaminación ambiental, a las restricciones de algunas fuentes (P de origen animal), al elevado coste para su obtención y al bienestar animal. Por ejemplo, una reducción en el nivel de P de la dieta, disminuye de forma sensible la excreción y la contaminación. Sin embargo, por debajo de ciertos niveles críticos, el bienestar animal puede verse comprometido con mayor incidencia de fracturas óseas y reducción del valor comercial del producto final (Chen y Moran, 1995). De aquí la necesidad de avanzar en el conocimiento de la disponibilidad de las fuentes de P en las diversas especies domésticas, especialmente en monogástricos.

Merece la pena destacar que existen diferentes factores que ejercen una influencia importante sobre el aprovechamiento del P, tal como la relación Ca:P de la dieta, la inclusión de niveles altos de vitamina D3 o sus análogos, la adición de fitasas y, probablemente, la acidificación de piensos (Kornegay, 1999). Es esencial poder controlar todos estos factores para reducir la problemática medioambiental del P.

I.3. Problemática ambiental del fósforo

Entre los problemas asociados al aprovechamiento del P se encuentra que este nutriente constituye un riesgo para el medio ambiente cuando es liberado en exceso (Rebollar y Mateos, 1999). En la actualidad, la intensificación de la producción y la concentración de empresas pecuarias en áreas específicas, junto con las nuevas normas de conservación han limitado el interés de esta vía de disposición de los purines. La cantidad de estiércol a esparcir en un campo de cultivo está definida por la capacidad de las plantas para extraer del terreno los minerales aportados por el purín, estipulado en el Real Decreto 506/2013. En aves, de la cantidad total consumida de P, aproximadamente un 33% es retenido, mientras que 67% restante es desechado en las heces (Vielma *et al.*, 2013). El P presente en los purines y estiércoles de monogástricos se encuentra fundamentalmente en forma de ácido fítico. Por ello, en zonas de elevada carga ganadera, las altas concentraciones de ácido fítico en el excremento, resulta en una acumulación de éste en las áreas de pastoreo, mantos acuíferos y cuerpos de agua dulce. Además, su presencia favorece la eutrofización, crecimiento acelerado de algas y agotamiento de oxígeno del agua, provocando la muerte de peces y animales acuáticos, y la liberación de óxido nitroso, como un potente gas de efecto invernadero (Selle *et al.*, 2006; Plazas, 2011; Vielma *et al.*, 2013).

Existen diversas tecnologías que permiten reducir la cantidad de P excretado al medio a través de las deyecciones. Sin embargo, una primera vía y probablemente la más rentable a nivel global de un país, es ajustar el consumo de P a las necesidades reales del animal y evitar la sobre dosificación de P en los piensos. Esta estrategia lleva consigo tres posibles líneas de actuación:

- 1) el estudio exhaustivo de las necesidades de los animales según productividad y estado fisiológico con la subsiguiente revisión de los niveles de P en las dietas.
- 2) la evaluación del aprovechamiento del P contenido en las diversas materias primas en función de la especie considerada.
- 3) modificaciones de la dieta con incorporación de aditivos (sobre todo enzimas- fitasas) capaces de mejorar la utilización del P.

I.4. Factores que influyen la disponibilidad del fósforo en aves

Puesto que la utilización del P de la dieta (incluyendo digestión, absorción y metabolismo) en monogástricos es incompleta, la determinación de la proporción realmente utilizada es muy importante. Por tal motivo, los factores que influyen en la disponibilidad del P en monogástricos, en concreto en las aves se analizan a continuación:

a) Estado fisiológico

La disponibilidad del P en monogástricos es limitada, por la deficiente producción endógena de la fitasa, tanto en el proventrículo, molleja, así como en los distintos tramos del intestino delgado. La fitasa microbiana endógena presente a nivel del intestino grueso, tiene limitado valor nutricional. Los diferentes niveles de pH en el tracto gastrointestinal, como muestran en la tabla 3, determina la eficacia de las fitasas exógenas. Siendo en el intestino delgado el lugar de mayor actividad.

Tabla 3 Condiciones de pH en el tracto gastrointestinal de aves (Chesson 1993)

Órgano	pH medio (mín.-máx.)	
	Aves	
Buche	6,3	4,0 - 7,8
Proventrículo	1,8	0,3 - 4,1
Molleja	2,5	0,4 - 5,4
Estómago	-	-
Duodeno	6,4	5,2 - 7,6
Yeyuno	6,6	5,5 - 7,7
Íleon	7,2	5,7 - 8,2
Ciego	6,9	5,7 - 8,4
Colon	7,0	5,4 - 8,4

También entre especies, en monogástricos, las aves utilizan mejor el P de los vegetales que otras especies. Algunos autores (Arija *et al.*, 2002; Ortiz, 2013) señalan que la mayor digestibilidad del P de los vegetales en aves se debe a la mayor actividad fosfatasa endógena, especialmente en dietas con un bajo contenido en P y Ca. Por otro lado, Aunque las posibles diferencias en cuanto al aprovechamiento del P en función de la edad y el estado fisiológico del animal son difíciles de valorar, el tiempo de retención de la digesta y los valores de pH en el aparato digestivo son más favorables a la actividad fitásica en animales adultos que en animales jóvenes.

b) Composición y tratamiento del pienso

Todos los factores relacionados con el metabolismo y absorción del P en el organismo, tales como los niveles de P fítico, Ca y vitamina D, junto con aquellos factores que afecten a la eficacia de la actividad fitásica (endógena o exógena) pueden influir en el aprovechamiento del P de la dieta. Los factores importantes en la dieta son:

➤ **Relación de ingredientes**

Los ingredientes de origen vegetal son los componentes mayoritarios en las dietas para aves, por tanto, una fracción importante del P del pienso estará naturalmente presente como P fítico. Tal y como se ha comentado con anterioridad, el nivel de P varía no sólo entre ingredientes (por ejemplo: leguminosas vs gramíneas) sino también dentro de cada ingrediente según el tipo de suelo, variedad cultivada, estado de maduración, condiciones de cultivo y climatología (Rebollar y Mateos, 1999; Ravindran, 2013). Por lo tanto, la relación de ingredientes vegetales contenidos en el pienso así como su cantidad presente en la fórmula puede hacer que el P sea más o menos disponible. Por otro lado, el P de origen mineral utilizado en las dietas es altamente digestible por lo que, a más cantidad de P inorgánico, mayor digestibilidad del P en los piensos. Sin embargo, la adición de P inorgánico asegura que el animal reciba la cantidad necesaria de P pero no evita su excreción al medio ambiente, ya que el P fítico seguirá siendo indigestible.

➤ **Relación Ca:P total**

La recomendación de la relación de Ca:P total para aves de puesta es de 4:1. Un exceso de Ca con relación al P en la dieta reduce la absorción de este último, al igual que la de otros minerales (Mg, Mn, Zn, etc.), y resulta en menores crecimientos y peores índices de mineralización ósea (NRC, 1998). Además, una relación Ca: P alta disminuye la efectividad de las fitasas (Rebollar y Mateos, 1999).

➤ **Nivel de Vitamina D**

La vitamina D estimula el transporte activo de Ca y P a través del epitelio intestinal hacia la sangre por lo que se recomienda adicionar dosis superiores a las necesidades estrictas para mejorar la utilización del P. Adeola *et al.* (2005), sugieren que la suplementación con 1,25 dihidroxicalciferol [(OH)² Vit. D3] incrementa la retención del P fítico en broilers del 31

al 68%. Qian *et al.* (1997), demostraron que la suplementación en exceso de vitamina D3 (66 vs 660 g/kg) en dietas de broilers aumentó la retención de P y mejoró los parámetros productivos, con independencia de la adición o no de fitasas o del nivel de Ca de la dieta.

➤ **Granulación**

Existe una tendencia hacia el aumento de las temperaturas de granulación (> 80 ° C) en las fábricas de piensos para controlar los patógenos como *Salmonella* y *Campylobacter*, y para mejorar la durabilidad de pellets. Sin embargo este proceso se asocia con una reducción de la actividad enzimática, comprometiendo sobre la actuación del P. Esto es debido a que, generalmente, las enzimas no superan temperaturas de granulación superiores a los 70 °C. Para evitar el compromiso de la actividad de las enzimas las industrias utilizan diferentes métodos para adicionar fitasas exógenas como la aplicación de enzimas líquidas post-granulación y el recubrimiento de enzimas sólidas (Slominski, 2011; Wilkinson *et al.*, 2013).

c) Utilización de fitasas exógenas

Como ya se ha comentado con anterioridad y se desarrollará más a fondo en los siguientes apartados, las fitasas exógenas pueden liberar el P contenido en los fitatos vegetales y aumentar así la disponibilidad del P (Acosta *et al.*, 2007).

Las fitasas forman parte de un subgrupo de enzimas de la familia de las fosfatasas ácidas, las cuales son del tipo hidrolasas. Éstas actúan degradando los fitatos a myo-inositol hexafosfato y P inorgánico, y esta acción requiere de condiciones como humedad en el medio, de pH y temperatura. En el tabla 4 se muestra las fuentes naturales de fitasa, como las fitasas de origen vegetal (cereales, legumbres, tubérculos, etc.), las fitasas de origen animal, presentes en el intestino y las fitasas de origen microbiano endógeno, que son organismos componentes de la microflora de animales rumiantes y las fitasas de origen microbiano exógeno del *Aspergillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *levaduras*, etc. (Ravindran, 2013).

Tabla 4 Origen y ubicación de las principales fitasas (Ravindran, 2013)

Origen	Ubicación
Animal	Intestino de rumiantes, principalmente ganado bovino.
Vegetal	Cascarilla y granos de cereales, legumbres y algunos vegetales.
Microbiana exógena	<i>Aspergillus ssp.</i> , <i>Candida</i> , <i>Pseudomonas</i> , entre otros.
Microbiana endógena	<i>E. coli</i> , principalmente.

Las fitasas de origen animal, vegetal y microbiano endógeno se caracterizan por ser prácticamente insignificantes (Munir y Maqsood, 2013) y mostrar ciertas restricciones en su actividad. Por ejemplo, las fitasas endógenas de la microflora animal aparte de tener actividad muy reducida, hidroliza moléculas intermedias del inositol (IP-1, IP-3) que no ejercen influencia quelante como la IP₆. Además, por la localización de la microflora, las fitasas de origen microbiano endógeno presentes en los monogástricos hidrolizan los fitatos a nivel del intestino grueso, liberando allí el P inorgánico que se excreta directamente en las heces, sin posibilidad de ser absorbido (Rebollar y Mateos, 1999).

En el caso de las fitasas de origen vegetal, el pH de actuación está por encima de 5,0 perdiendo irreversiblemente su actividad a pH comprendidos entre 2,5-3. Estos son precisamente los pH naturales del buche y estomago (Pointillart, 1994) lo que sugiere que las fitasas de origen vegetal se inactivan en el tracto digestivo. Igualmente, su temperatura óptima de acción se sitúa entre 45 y 60 °C y se degradan rápidamente a temperaturas superiores, por ejemplo, durante la granulación de los piensos. Por todo ello la industria avícola no muestra importancia comercial en estas fitasas endógenas.

Sin embargo, existe un cuarto grupo de fitasas naturales no endógenas (exógenas) que son las fitasas exógenas de origen microbiano que son las que reciben mayor atención por la industria de piensos, tal y como se comenta en el siguiente apartado.

I.5. Fitasas exógenas

Las fitasas exógenas de origen microbiano fueron introducidas en 1991 y aceptadas por la Comisión Europea como nuevos aditivo en el año 1993 (Directiva 93/113/CE). Dentro de este grupo son especialmente importantes las cepas derivadas de *Aspergillus niger*, por ser un microorganismo por excelencia productor de gran cantidad de enzimas (Frontela *et al.*, 2008). En la actualidad las fitasas exógenas más utilizadas provienen de *Aspergillus spp.*, *Penicillium sp.*, *Phytase canola*, *Pichia pastoris*, *Aspergillus niger* y *Escherichia coli* (Munir y Maqsood, 2013). De estas, las fitasas de origen fúngico tienen dos principales ventajas sobre las de origen bacteriano como son:

1) Su pH óptimo de actividad fitásica que está entre 2.5 y 5.5, valores similares a los que posee el sistema gastrointestinal de los animales no rumiantes, a diferencia de las fitasas de origen bacteriano cuyo pH óptimo de actividad es próximo al neutro, haciéndolo 40% menos efectiva (Dvořáková, 1998; Bedford, 2000). Esto es de gran importancia debido a que la mayor absorción de P ocurre en las proximidades del intestino delgado, donde el pH de 5.5 es óptimo para que la fitasa actúe hidrolizando los fosfatos, siendo primero necesario que la enzima se active en el medio ácido del estómago (Godoy *et al.*, 1993).

2) Su capacidad de separación de la matriz en donde se producen, debido a que son extracelulares, a diferencia de las bacterianas, las cuales son intracelulares (excepto las del género *Bacillus*), facilita el proceso de purificación (Costa *et al.*, 2010).

En el uso de fitasas en las gallinas ponedoras, Hidalgo y Rodríguez (2015) llegaron a la conclusión de que es posible utilizar fitasas, con equivalencias de 1 g de fósforo disponible por cada 500 de unidad fitásica (UFT¹), sin que haya diferencias en los resultados productivos. Además el uso de fitasas esta alentado por:

- **Su utilidad ecológica.** El beneficio de fitasas en las dietas de monogástricos es la menor excreción de P al ambiente, por su aprovechamiento del P fítico por el animal.

¹ Una UFT es una unidad de fitasa, que se define como la cantidad de enzima fitasa que libera 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de fosfato inorgánico a partir de fitato, en las condiciones experimentales que se describen en la ISO 30024:2009 "Alimentos para animales. Determinación de la actividad fitasa".

Según (Kornegay, 2001), el uso de fitasa en aves (200 a 1000 UFT/kg) reduce la excreción de P en las heces entre 25 y 50 %. Acosta *et al.* (2007) manifiesta haber reducido completamente la suplementación con P inorgánico en dietas de gallinas ponedoras, al utilizar 450 UFT/kg de fitasa (Natuphos®), sin que se afectaran los indicadores productivos ni el metabolismo mineral. Además, la excreción de P al ambiente se redujo en casi un 60 %.

- **Su utilidad económica.** En la práctica el uso de fitasa en aves puede disminuir el costo de la ración entre 0,5 y 5 dólares por tonelada. Sin embargo, la magnitud del ahorro depende del precio y disponibilidad de los ingredientes, así como del requerimiento de nutrientes definido en cada fórmula (Kornegay, 1999). En pruebas de campo realizadas en Centro América con 450.000 aves testigo y 477.000 en prueba, no se observaron diferencias significativas en la conversión alimentaria y el peso corporal con la inclusión de fitasas; pero el ahorro en dólares, por tonelada métrica de pienso, fue cercano a 1.90/TM de alimento (Juampere *et al.*, 2005).

I.6. Eficacia de las fitasas exógenas en aves

La investigación sobre fitasas microbianas exógenas se dirigió hacia la mejora de la utilización del P y muchas investigaciones en el área de producción de gallinas ponedoras han dejado como resultado estudios de gran importancia para su aplicación en el mejoramiento del desempeño productivo y el impacto medioambiental, estableciéndose mejoras en la disponibilidad del P que van desde el 20 al 45% en los trabajos realizados en aves y cerdos, descritos por Selle y Ravindran (2007).

Tal y como indican Selle *et al.* (2006), la cantidad de P fítico liberado por las fitasas depende de factores como:

- Nivel de fitasas añadidas.
- Nivel de P fítico en el pienso.
- Nivel de Ca de la dieta y ratio Ca:P.
- Fuente de las fitasas y fitatos.
- Presencia de aditivos (vitamina D, ácidos orgánicos).
- Contenido en fitatos de la dieta.

Son numerosos los estudios que indican mejoras en la digestibilidad del P con la adición de fitasas exógenas de distintos orígenes en los piensos de gallinas ponedoras (Snow *et al.*, 2003; Acosta *et al.*, 2006; Vallardi *et al.*, 2012). Algunos de ellos encuentran también mejoras en la productividad de las gallinas (Sebastian *et al.*, 1996; Boling *et al.*, 2000; Snow *et al.*, 2003; Živkov *et al.*, 2012). Y otros observaron disminución de la excreción del P al medio ambiente (Boling *et al.*, 2000; Keshavarz, 2003; Vallardi *et al.*, 2012) Sin embargo, las dosis que se barajan pueden ser muy diferentes, de 300 UFT/kg hasta 1200 UFT/kg (Boling *et al.*, 2000; Acosta *et al.*, 2006; Vallardi *et al.*, 2012; Živkov *et al.*, 2012).

Estos resultados muestran que las fitasas garantizan la disponibilidad adicional del P cubriendo parte de los requerimientos dietéticos necesarios para un óptimo comportamiento mineral.

En conclusión, para obtener resultados favorables de la fitasa se debe tomar en consideración lo siguiente:

- La eficacia depende de la dosis de fitasa utilizada.
- Se debe precisar un nivel de fitatos mínimo en la dieta.
- Que la edad del ave y el tipo de alimentación puede afectar los resultados esperados.

II. OBJETIVO

En este contexto, el objetivo del presente estudio es evaluar los efectos de la incorporación en el pienso de una nueva fitasa de origen microbiano (producida por *Pichia pastoris* a partir de un gen clonado de *Serratia odorifera*) sobre los coeficientes de utilización del P y de otros nutrientes en gallinas ponedoras a dos edades, determinando la dosis eficaz mínima de esta nueva enzima. Además, se pretende analizar el efecto de la adición de esta enzima sobre los rendimientos productivos (producción de huevos, consumo de pienso e índice de transformación).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Ubicación e instalaciones

El estudio se realizó en el Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA) perteneciente al Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Se utilizaron dos salas (Salas 2 y 3) de la nave experimental para gallinas de puesta (figura 3). Cada sala tenía una dimensión de 11 x 6.5 metros, contaba con cuatro hileras de jaulas y tres pasadizos (dos laterales y uno central), dispuestas en tres pisos. Para el experimento se aprovechó las jaulas del primer y segundo piso. Las jaulas estuvieron adecuadas según la normativa del Real Decreto N° 3/2002 del 11 de enero donde se establecen las normas mínimas de protección de las gallinas ponedoras y cuentan con las siguientes características:

- Áreas mínimas de 750 cm² de jaula por gallina.
- Un nido.
- Una yacija que permita picotear y escarbar.
- Aселaderos convenientes que ofrezcan como mínimo un espacio de 15 centímetros por gallina.
- Comederos que puedan ser utilizados sin restricciones con una longitud que deberá ser como mínimo de 12 centímetros multiplicada por el número de gallinas en la jaula.
- Jaula con bebederos apropiados teniendo en cuenta especialmente el tamaño del grupo.

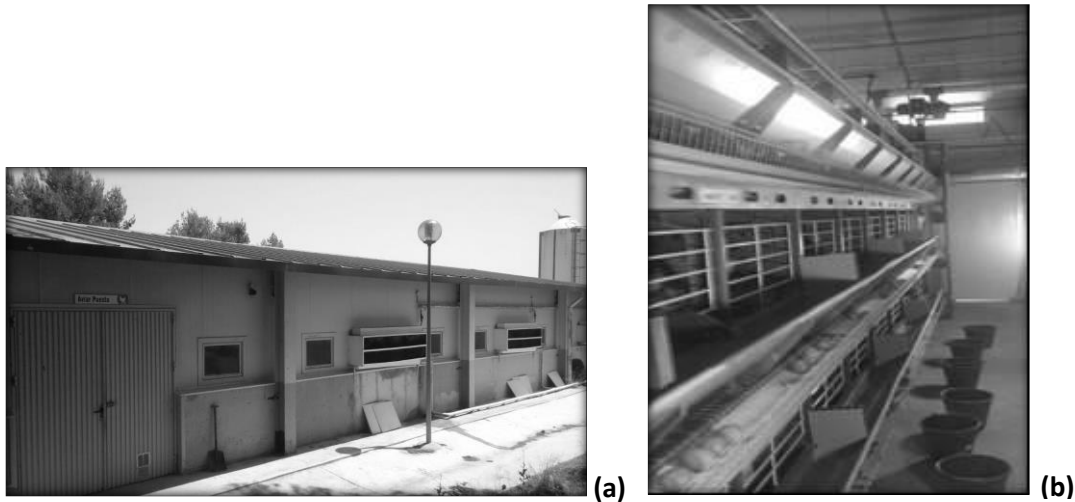


Figura 3 Vista exterior (a) e interior (b) de las salas experimentales de aves de puesta del Centro de Investigación y Tecnología Animal

Las salas disponían de mecanismos de ventilación forzada con un extractor situado en el techo de cada sala. La temperatura fue controlada para mantenerse entre 18-21 °C. Las naves contaron con iluminación artificial para estimular la puesta de las gallinas. El programa de luz consistió en 10 h de luz al día a la llegada de los animales (16 semanas de vida), un incremento de 1 h al día hasta la semana 19 de vida y de 2 h al día la semana 20 de vida alcanzando el régimen 16 h de luz y 8 h de oscuridad hasta el final del estudio.

III.2. Animales y tratamientos

Se emplearon un total de 240 gallinas procedentes de la empresa “Huevos Guillén” (Valencia) de línea comercial Lohmann Brown. Estos animales ingresaron con 16 semanas de vida, permaneciendo hasta las 31 semanas, que duró el experimento. En cada sala se usaron 30 jaulas. Las gallinas se distribuyeron de forma aleatoria en las jaulas, con 4 animales por jaula. A cada jaula se le asignó un tratamiento experimental distribuyéndose de manera homogénea en toda la sala y entre salas.

La alimentación se desarrolló de la siguiente manera: desde la llegada de los animales (16 semanas de edad) hasta las 21 semanas éstos consumieron pienso comercial y desde las 22 hasta las 31 semanas de vida, se administró pienso experimental que difirió en los niveles de incorporación de fitasa por kg de pienso. En total se obtuvo cuatro tipos de pienso

experimental más un pienso control negativo, tal como se describe a continuación:

- Tratamiento C- : (pienso control negativo): sin fitasa y con niveles bajos de P
- Tratamiento 250: pienso control negativo suplementado con 250 UFT/kg de pienso
- Tratamiento 500: pienso control negativo suplementado con 500 UFT/kg de pienso
- Tratamiento 1.000: pienso control negativo suplementado con 1.000 UFT/kg de pienso
- Tratamiento 10.000: pienso control negativo suplementado con 10.000 UFT/kg de pienso

La fórmula del tratamiento C- (composición en ingredientes y nutrientes) se detalla en la tabla 5. Este pienso fue formulado en base a las recomendaciones para aves de puesta propuestas en FEDNA (2008).

Tabla 5 Composición del pienso control negativo utilizado durante la fase experimental²

Materias primas (%)¹	
Maíz	60,0
Soja 44% PB	27,6
Aceite de Soja	2,5
DL-Metionina	0,16
Carbonato cálcico	7,5
Fosfato bicálcico	0,35
Sal	0,35
Colorante rojo (cantaxantina 10%)	0,005
Corrector ponedoras	0,50
Nutrientes analizados²	
Energía Bruta (kcal/kg)	3.815
Proteína bruta (%)	17,2
Cenizas (%)	11,1
Extracto etéreo (%)	4,44
Calcio (%)	2,97
Fósforo (%)	0,37
Fósforo fítico (%)	0,17

¹Para determinar la digestibilidad ileal en el segundo periodo de digestibilidad, se añadió dióxido de titanio (TiO₂) a un nivel de inclusión del 0.4%; ²En base a materia fresca

² En el Anexo se detalla la composición del pienso, los nutrientes calculados y analizados.

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* (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT 11047). 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. La actividad fitásica medida de cada pienso experimental se detalla en la tabla a del anexo.

III.3. Procedimiento experimental y medidas

Los animales llegaron a las instalaciones con 16 semanas de vida. El día de su llegada los animales se distribuyeron de manera aleatoria en las 120 jaulas a razón de 4 animales por jaula. Pesándose estos cuatro animales por jaula. Se tuvo una fase de adecuación de 5 semanas, hasta las 21 semanas de edad, donde las aves fueron alimentadas con pienso comercial. En la fase experimental del estudio fue a las 22 semanas de edad, consumiendo el pienso experimental, durante toda esta fase se registró la cantidad de pienso consumido así como la producción diaria de huevos por jaula. Durante este periodo, en la semana 25 y 30 de edad, se realizaron las pruebas de balance de nutrientes. Finalizando el experimento a las 31 semanas edad con el sacrificio de los animales. Todo el proceso experimental tuvo una duración de 16 semanas.

Este proceso se detalla en la tabla 6 indicando los momentos que se realizaron las diferentes actividades desde la llegada de los animales hasta el sacrificio, durante las 16 semanas de periodo experimental.

A continuación la tabla 6 ofrece un calendario de las medidas realizadas a lo largo del estudio.

Tabla 6 Calendario de medidas y controles durante la fase experimental.

Actividades	Semana experimental	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	Edad de las gallinas (semanas)	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Llegada de animales		x															
Distribución de forma aleatoria en las jaulas		x															
Pesado de animales		x									x						x
Alimentación (Pienso comercial)		x	x	X	x	X	x										
Alimentación (Pienso experimental)								x	x	X	x	x	x				
Alimentación (Pienso experimental marcado)														x	x	x	x
Pesado de huevos			x	X	x	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Pruebas de balance de nutrientes											x					x	
Sacrificio de animales																	x

Durante el periodo experimental se realizaron las siguientes medidas y determinaciones:

III.3.1. Rendimiento productivo

Las gallinas fueron pesadas en grupos de cuatro, según la jaula que correspondían, en 3 momentos (Tabla 6). Los controles de peso se realizaron a las 16 semanas de edad, correspondiendo al momento que se colocaron en las jaulas, a las 25 semanas de vida, para el primer periodo de digestibilidad y a las 31 semanas de vida, al finalizar el experimento.

El pienso consumido se controló pesando el pienso ofrecido a cada jaula durante toda la prueba y el pienso rechazado al mismo tiempo que se registraban los pesos de los animales y al final de cada periodo de balance de nutrientes. Regularmente, se controló el estado sanitario de los animales, se anotó cualquier signo de anormalidad, enfermedad,

tratamiento aplicado y muerte, así como el peso de la baja. Además, durante toda la fase experimental se registró la producción de huevos (número y peso) por jaula. Con estos datos se pudo calcular:

a) Consumo medio diario de pienso (CMD).

Se obtuvo de restar el alimento rechazado (R) del alimento ofrecido (ΣAO) entre el número de días (nd). Como se tuvo en jaulas de cuatro gallinas, se divide por el número de gallinas.

$$CMD = \frac{\Sigma AO - R}{nd}$$

b) Peso individual de huevo (PIH)

El peso del huevo se registró diariamente, pesando el total de producción diaria por jaula como se muestra en la figura 4, utilizando una báscula, y una huevera.



Figura 4 Báscula y huevera para el pesaje de los huevos.

c) Producción de Huevos (PH)

Está representada por la Producción en un periodo dividido entre el número de gallinas y día multiplicado por cien:

$$\text{Producción de Huevos (PH)} = \frac{\text{Total huevos producidos}}{\text{Número de gallinas y día}} \times 100$$

d) Masa del huevo (g.)

La Masa de huevos expresa la capacidad fisiológica de producción de la gallina está representado por:

$$\text{Masa del Huevo (g)} = \text{Numero de huevos} * \text{Peso promedio del huevo(g)}$$

e) Índice de transformación (IT)

Es la división de la cantidad de alimento consumido entre la producción de huevos, durante los periodos analizados.

$$\text{Indice de Transformación (IT)} = \frac{\text{Total de alimento consumido (kg)}}{\text{Total de huevos producidos (kg)}}$$

III.3.2. Balance de nutrientes

Se realizaron dos balances de nutrientes, el primero a nivel fecal en la semana 25 de edad de las gallinas y el segundo en las semanas 30 y 31 de edad de las gallinas. En este segundo balance se determinó la tasa de utilización de los nutrientes a nivel fecal e ileal. Para la determinación ileal, los animales comieron un pienso marcado con 0,4% de óxido de titanio a partir de las 13 semanas de estudio. Los balances de nutrientes se realizaron en las mismas jaulas donde se encontraban alojadas las gallinas durante 2 días consecutivos. Los procedimientos realizados dentro de los ensayos de balance de nutrientes tanto a nivel fecal como ileal se detallan a continuación:

a) Recogida total de excretas:

Se realizó con los animales en jaula, a una hora específica (10:00). El día anterior de la recogida se colocaron, por debajo de las jaulas unas bandejas con plástico previamente identificadas. A las 24 horas fueron recuperándose y volviendo a colocar con nuevos

plásticos para la siguiente recogida (figura 5). Las excretas fueron colocadas en bolsas de plástico rotuladas, registrándose el peso y refrigerándose a 4°C. Se volvió a repetir el mismo procedimiento al día siguiente. Las excretas de ambos días fueron unidas, homogenizadas, y almacenadas (-20 °C) para su posterior análisis.

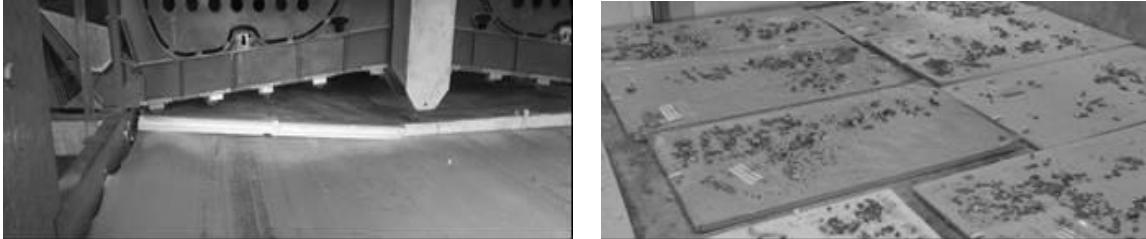


Figura 5 Bandejas para la recepción de las excreta, colocadas debajo de las jaulas

b) Determinación del pienso consumido por jaula:

La oferta y rechazo del pienso fue medido también los días de inicio y fin de la recogida de las muestras de excretas. Durante los dos días de recogida se obtuvo una muestra representativa de pienso directamente del comedero agrupándose por tratamiento para la determinación de materia seca (MS) *in situ*.

c) Obtención del contenido ileal:

A la semana 31 de vida, se sacrificaron todos los animales mediante aturdimiento y desangrado (según disposición BOE-A-2007-19321), identificándose el intestino delgado y a su vez la proporción que corresponde al íleon (10 cm anterior desde la válvula ileocecal; referencia), como se observa en la figura 6. Para extraer el contenido ileal, se inyectó suavemente 4 ml de agua destilada por cada íleon con una jeringa de plástico (Chung *et al.*, 2013). El pool de este contenido ileal de todos los animales por jaula se guardó en una placa petri a -80°C hasta su posterior análisis.

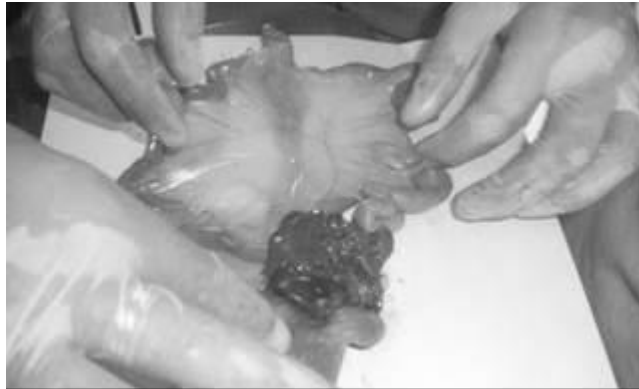


Figura 6 Intestino delgado de gallina localizando el Íleon

III.3.3. Análisis de laboratorio

Después de la fase experimental, con las muestras obtenidas se procedió al análisis de laboratorio. Con las muestras de excreta y pienso obtenidas durante los periodos de balance de nutrientes se determinó lo siguiente: Energía bruta (EB), materia seca (MS), cenizas (Cz), nitrógeno (N) y minerales (P total y Ca). Los análisis de MS, Cz y N se realizaron mediante la metodología AOAC (2003), La EB se determinó mediante una bomba calorimétrica diabática (Gallenkämpf, London, UK). En el contenido ileal se realizaron las siguientes determinaciones: MS, Ca y P. Además en el pienso C- se analizó el contenido en P fítico mediante espectrofotometría según la metodología descrita en Haugh y Lantzch (1993). En el segundo balance de utilización de nutrientes la concentración de TiO_2 en pienso y excretas se determinó según la metodología descrita por Short *et al.* (1996). Todas las muestras, tanto de pienso como de excretas o contenido ileal, fueron tratadas del mismo modo y se analizaron por duplicado, a excepción del contenido en P total y Ca del pienso que se analizó por cuadruplicado. Los análisis de laboratorio de las muestras se realizaron en el 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).

Se estimó la Energía Metabolizable Aparente (EMA) como la cantidad ingerida multiplicada por el coeficiente de utilización de la energía.

De igual manera con los demás resultados obtenidos de los diferentes nutrientes en pienso y heces se realizaron los cálculos del coeficiente de utilización aparente y coeficiente de utilización ileal con marcador:

$$\text{Coeficiente de digestibilidad}(\%) = \frac{\text{Nutriente ingerido} - \text{Nutriente excretado}}{\text{Nutriente ingerido}} \times 100$$

$$\text{Coeficiente de Digestibilidad Aparente}\%(CDIA) = 1 - \left(\frac{MD \times Nd}{Md \times ND} \right)$$

Dónde:

- ✓ M: Marcador
- ✓ D: Dieta.
- ✓ d: Digesta.
- ✓ N: Nutriente

III.4. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el paquete estadístico SAS® System Software (SAS 9.1, SAS Instituto Inc., Cary, Norte de California). Para el análisis del balance de nutrientes, la producción de huevos y los parámetros productivos se realizaron de cada jaula como una unidad experimental. El modelo estadístico utilizado fue un análisis de varianza (PROC GLM de SAS) que incluyó la dieta como efecto principal. El nivel de significación estadística se estableció en 5% (0,05).

IV. RESULTADOS

IV.1. Rendimiento productivo

En la tabla 7 se muestra la media del peso vivo de las aves y el CMD de cada tratamiento.

Tabla 7 Peso medio y consumo medio diario (CMD) de pienso a lo largo del estudio en gallinas alimentadas con piensos a diferentes niveles de una nueva fitasa

	Tratamientos					EEM ¹	P-valor
	C-	250	500	1000	10000		
Peso (g)							
16 semanas de vida	1303	1299	1325	1300	1311	14,9	0,687
25 Semanas de vida	1827	1792	1811	1775	1815	26,7	0,666
31 Semanas de vida	1863	1857	1892	1844	1836	32,9	0,764
CMD (g/día)							
22-25 Semanas de vida	109	109	113	107	108	2,00	0,281
26-31 Semanas de vida	118	117	118	114	114	2,67	0,837

Los datos representan los valores medios de 12 jaulas por tratamiento

C-: Control negativo; 250: Tratamiento C- con 250 unidades de fitasa (UFT)/kg.; 500: Tratamiento C- con 500 UFT/kg.; 1000: Tratamiento C- con 1000 UFT/kg; 10.000: Tratamiento C- con 10.000 UFT/kg

¹*Error estándar de la media*

Las aves ingresaron a las jaulas con un peso medio de 1308 ± 14.9 g de media sin mostrar diferencias significativas entre tratamientos. Finalizando el experimento el peso medio fue de 1858 g observándose que el peso y el CMD no mostraron diferencias significativas de los tratamientos frente el C- ni entre los tratamientos.

Los resultados de la producción de huevos se presentan en la tabla 8, analizando la producción de huevos (% Prod huevos por día), el peso del huevo, la masa del huevo (producción de huevos * peso del huevo) y el IT (g de pienso/g de huevo).

Tabla 8 Producción de huevos, peso, masa e índice de transformación (IT) del huevo en gallinas alimentadas con piensos a diferentes niveles de una nueva fitasa, en dos periodos (22-25 y 26-31 semanas de edad)

	Tratamientos					EEM ¹	P-valor
	C-	250	500	1000	10000		
22-25 semanas							
% Prod huevos/día	97,5 ^{ab}	97,5 ^{ab}	97,2 ^{ab}	98,0 ^a	96,9 ^b	0,40	0,261
Peso (g)	62,1	62	61,8	60,7	60,7	0,66	0,331
Masa (g/día)	60,6	60,4	59,7	59,8	58,8	0,76	0,551
IT (g pienso/g huevo)	1,80	1,80	1,83	1,80	1,82	0,028	0,491
26-31 semanas							
% Prod huevos/día	96,4 ^{ab}	96,7 ^{ab}	95,7 ^{ab}	98,0 ^a	95,0 ^b	0,95	0,227
Peso (g)	63,7 ^{ab}	64,0 ^a	63,4 ^{ab}	62,8 ^{ab}	61,7 ^b	0,70	0,179
Masa (g/día)	61,4 ^{ab}	61,7 ^a	59,8 ^{ab}	61,5 ^a	58,7 ^b	0,99	0,127
IT (g pienso/g huevo)	1,91 ^{ab}	1,92 ^{ab}	1,94 ^{ab}	1,83 ^b	1,99 ^a	0,051	0,285

^{a-b} Valores dentro de una fila sin superíndice en común son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$)
Los datos representan los valores medios de 12 jaulas por tratamiento

C-: Control negativo; 250: Tratamiento C- con 250 unidades de fitasa (UFT)/kg.; 500: Tratamiento C- con 500 UFT/kg.; 1000: Tratamiento C- con 1000 UFT/kg; 10.000: Tratamiento C- con 10.000 UFT/kg

¹Error estándar de la media

Las gallinas de 22-25 semanas de edad, respecto a porcentaje de producción al día, no se aprecia diferencias ($P < 0,05$) de los tratamientos frente al tratamiento C-. Sin embargo, entre los tratamientos con fitasa el tratamiento 10.000 muestra un menor ($P < 0,05$) porcentaje de gallinas en puesta que el tratamiento 1.000, siendo este último el que mayor índice de puesta presenta. Respecto al peso, la masa del huevo y el IT no se observaron diferencias de los tratamientos frente al C- ni entre tratamientos.

Las gallinas de 26 a 31 semanas de edad, no se observaron diferencias significativas de los tratamientos respecto al C- en lo que respecta a la producción de huevos por día, el peso y la masa del huevo y el IT. El tratamiento 10.000 mostró valores de producción de huevos y

peso/masa del huevo, y mayores (peores) índices de transformación con respecto a los tratamientos con menores concentraciones de fitasa. Los mayores ($P < 0.05$) valores se obtuvieron en el tratamiento 1.000 para la producción de huevos, en el tratamiento 250 para el peso del huevo, en los tratamientos 250 y 1.000 para la masa del huevo y en el tratamiento 1.000 para el IT.

IV.2. Balance de nutrientes

Los resultados referentes a los coeficientes de utilización de nutrientes analizados a diferentes edades (semanas 25 y 30 de edad) se presentan en la tabla 9 y tabla 10.

La tabla 9 muestra los coeficientes de utilización de nutrientes del primer periodo con gallinas de 25 semanas de edad.

Tabla 9 Coeficientes de utilización de nutrientes y energía (%) en gallinas de 25 semanas de edad alimentadas con piensos con diferentes niveles de una nueva fitasa

	Tratamientos					EEM ¹	P-valor
	C-	250	500	1000	10000		
Materia seca	74,4 ^c	74,9 ^{bc}	74,8 ^{bc}	75,5 ^{ab}	76,1 ^a	0,286	0,001
Cenizas	63,1 ^a	58,2 ^b	59,5 ^b	57,8 ^b	58,2 ^b	1,013	0,002
Materia orgánica	76,0 ^c	77,4 ^b	77,1 ^b	77,6 ^{ab}	78,2 ^a	0,263	<0,001
Proteína bruta	51,6 ^c	56,9 ^{ab}	56,8 ^{ab}	58,1 ^a	55,5 ^b	0,756	<0,001
Energía bruta	78,1 ^b	79,4 ^a	78,8 ^{ab}	78,9 ^a	79,1 ^a	0,258	0,017
Calcio	67,1 ^a	60,5 ^b	67,0 ^a	68,2 ^a	70,0 ^a	1,322	<0,001
Fósforo	31,7 ^b	34,4 ^{ab}	37,2 ^a	33,1 ^{ab}	34,3 ^{ab}	1,727	0,231

^{a-b} Valores dentro de una fila sin superíndice en común son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$)

Los datos representan los valores medios de 12 jaulas por tratamiento

C-: Control negativo; 250: Tratamiento C- con 250 unidades de fitasa (UFT)/kg.; 500: Tratamiento C- con 500 UFT/kg.; 1000: Tratamiento C- con 1000 UFT/kg.; 10.000: Tratamiento C- con 10.000 UFT/kg

¹Error estándar de la media.

Respecto al coeficiente de utilización de la MS, los tratamientos 1.000 y 10.000 mostraron mayores ($P < 0,05$) coeficientes respecto al tratamiento C-. Esta diferencia fue de media 1,4 puntos porcentuales. El resto de tratamientos con fitasa no mostraron diferencias respecto al

tratamiento C-. Y entre tratamientos el tratamiento 10.000 su fue mayor ($P < 0,05$) que los tratamientos 250 y 500. El coeficiente de utilización de las Cz fue superior en el tratamiento C- y no mejoró con la adición de fitasa. Respecto al coeficiente de utilización de la MO, todos los tratamientos con fitasa mostraron mayores ($P < 0,05$) coeficientes que el tratamiento C-. La media de todos los tratamientos con fitasa incrementó el coeficiente de utilización de la MO en 1,6 puntos porcentuales respecto al tratamiento C-. Entre los tratamientos con fitasa, el tratamiento 10.000 mostró mayor ($P < 0,05$) coeficiente que los tratamientos 250 y 500. Respecto al coeficiente de utilización de la PB, todos los tratamientos con fitasa mostraron mayores ($P < 0,05$) coeficientes que el tratamiento C-. Esta diferencia fue de 5,2 puntos porcentuales como media. Entre los tratamientos con fitasa, el tratamiento 1.000 mostró diferencias ($P < 0,05$) solo frente al tratamiento 10.000. Respecto al coeficiente de utilización de la EB, los tratamientos 250, 1.000 y 10.000 mostraron mayores coeficientes ($P < 0,05$) respecto al tratamiento C-, diferencias de 1,3; 0,8 y 1 unidades porcentuales, respectivamente. No hubo diferencias entre tratamientos con fitasa.

Respecto a los coeficiente de utilización del Ca y P; no mostraron diferencias relevantes en el coeficiente de utilización del Ca entre los tratamientos con fitasas ni con el C-, excepto en el tratamiento 250 que fue menor ($P < 0,05$) que el tratamiento C-. Respecto coeficiente de utilización del P, el tratamiento 500 mostró mayores ($P < 0,05$) coeficientes que el tratamiento C-, observándose un incremento de 5,5 unidades porcentuales respecto al tratamiento C-. No hubo diferencias entre los tratamientos con fitasa.

Por lo tanto, en este primer balance de digestibilidad parece que la inclusión de 500 UFT/kg mejoraría la digestibilidad del P con respecto a la no adición de fitasa. La digestibilidad de los demás nutrientes también se ve mejorada con la adición de esta nueva fitasa a dosis de 250 UFT/kg en el caso de la MO, proteína y energía. Sin embargo, la digestibilidad del Ca no parece verse afectada por la fitasa añadida.

La tabla 10 muestra los coeficientes de digestibilidad del segundo periodo con gallinas de 30 semanas de edad.

Tabla 10 Coeficientes de utilización de nutrientes y energía (%) en gallinas de 30 semanas de edad alimentados con piensos con diferentes niveles de una nueva fitasa

	Tratamientos					EEM ¹	P-valor
	C-	250	500	1000	10000		
Materia seca	72,4 ^{bc}	72,8 ^{ac}	71,9 ^c	73,6 ^a	73,2 ^{ab}	0,427	0,038
Cenizas	59,0 ^a	52,0 ^c	51,3 ^c	54,6 ^{bc}	56,1 ^{ab}	1,254	0,0003
Materia orgánica	74,4 ^b	75,1 ^{ab}	74,4 ^b	76,0 ^a	75,4 ^{ab}	0,367	0,012
Proteína bruta	55,0 ^a	53,6 ^{ab}	54,1 ^{ab}	52,2 ^b	53,3 ^{ab}	1,006	0,348
Energía bruta	76,4 ^a	75,8 ^{ab}	75,0 ^b	76,1 ^a	75,5 ^{ab}	0,387	0,101
Calcio	67,0 ^{bc}	64,5 ^c	64,3 ^c	70,3 ^{ab}	73,1 ^a	1,676	0,001
Fósforo	31,7 ^b	34,2 ^{ab}	29,9 ^b	38,9 ^a	32,5 ^{ab}	2,449	0,086

a-b Valores dentro de una fila sin superíndice en común son estadísticamente diferentes (P < 0,05)

Los datos representan los valores medios de 12 jaulas por tratamiento

C-: Control negativo; 250: Tratamiento C- con 250 unidades de fitasa (UFT)/kg.; 500: Tratamiento C- con 500 UFT/kg.; 1000: Tratamiento C- con 1000 UFT/kg.; 10.000: Tratamiento C- con 10.000 UFT/kg

¹*Error estándar de la media.*

Respecto al coeficiente de utilización de la MS, solo el tratamiento 1.000 mostró mayores (P <0,05) valores que el tratamiento C-. Esta diferencia fue pequeña, de 1,2 puntos porcentuales. Entre los tratamientos con fitasa, el tratamiento 1.000 mostró un coeficiente de utilización de la MO mayor (P <0,05) que el tratamiento 500. Respecto al coeficiente de utilización de las Cz, éstos no mejoraron con la adición de fitasa al igual que el resultado del primer periodo de digestibilidad. Prácticamente en todos los tratamientos con fitasa (excepto en el tratamiento 10.000), el coeficiente de utilización de Cz fue menor (P <0,05) que el tratamiento C-. Entre los tratamientos con fitasa, el tratamientos 10.000 mostró un coeficiente de digestibilidad de las Cz mayor (P <0,05) que los tratamientos 250 y 500. Respecto a los coeficientes de digestibilidad de la MO, el tratamiento 1.000 mostró coeficientes de digestibilidad mayores que el tratamiento C-. Esta diferencia fue de 2,4 puntos porcentuales. Entre los tratamientos con fitasa, el tratamiento 1.000 mostró valores mayores (P <0,05) que el tratamiento 500. Los coeficientes de digestibilidad de la PB y EB no mejoraron con la adición de fitasa y fueron similares entre tratamientos, únicamente el

tratamiento 1.000 mostró mayores ($P < 0,05$) coeficientes de digestibilidad de la EB que el tratamiento 500.

Respecto a los coeficiente de utilización del Ca, el tratamiento 10.000 mostró mayor ($P < 0,05$) coeficiente de utilización del Ca que el tratamiento C-. Esta diferencia fue de 5,1 puntos porcentuales. Entre los tratamientos con fitasa, el tratamiento 10.000 presentó coeficiente de utilización del Ca mayores ($P < 0,05$) que los tratamientos 250 y 500. Respecto al coeficiente de utilización del P, el tratamiento 1.000 mostró mayores ($P < 0,05$) coeficiente de utilización que el tratamiento C-, observándose un incremento de 7,2 unidades porcentuales respecto al tratamiento C-. Entre los tratamientos con fitasa, el tratamiento 1.000 presentó mayores ($P < 0,05$) coeficiente de utilización de P que el tratamiento 500.

Por lo tanto, en este segundo balance de digestibilidad muestra que la inclusión de 1.000 UFT/kg mejoraría la digestibilidad del P con respecto a la no adición de fitasa. También se ve mejorada la digestibilidad de los nutrientes como la MS y la MO. Respecto al Ca se muestra efecto con 10.000 UFT/kg.

En la tabla 11 se muestra los resultados de la EMA, la ingestión, excreción y retención de minerales (Ca y P) en las gallinas durante el primer periodo de digestibilidad (25 semanas de edad).

Tabla 11 Energía metabolizable aparente (EMA, kcal/kg) de materia seca (MS) y balance (ingestión, excreción y retención) de calcio y fósforo en gallinas de 25 semanas de edad alimentadas con piensos a diferentes niveles de una nueva fitasa

	Tratamientos					EEM ¹	P-valor
	C-	250	500	1000	10000		
EMA (kcal/kg MS)	3311 ^{ab}	3308 ^{ab}	3252 ^c	3333 ^a	3301 ^b	10,80	< 0,0001
Ingestión (g/animal y día)							
Calcio	3,57 ^c	3,98 ^b	4,36 ^a	3,57 ^c	3,53 ^c	0,061	< 0,0001
Fósforo	0,446 ^a	0,454 ^a	0,507 ^b	0,486 ^{bc}	0,477 ^c	0,008	< 0,0001
Excreción (g/animal y día)							
Calcio	1,19 ^b	1,57 ^a	1,420 ^a	1,101 ^b	1,062 ^b	0,056	< 0,0001
Fósforo	0,299	0,299	0,308	0,320	0,314	0,010	0,486
Excreción (%)							
Calcio	32,9 ^b	39,5 ^a	33,0 ^b	31,3 ^b	30,1 ^b	1,322	< 0,0001
Fósforo	68,3 ^a	65,6 ^{ab}	62,8 ^b	66,9 ^{ab}	65,7 ^{ab}	1,727	0,231
Retención (g/animal y día)(de la ingesta)							
Calcio	2,367 ^b	2,408 ^b	2,880 ^a	2,433 ^b	2,469 ^b	0,073	< 0,0001
Fósforo	0,142 ^b	0,156 ^b	0,186 ^a	0,160 ^b	0,163 ^{ab}	0,008	0,011

a-b Valores dentro de una fila sin superíndice en común son estadísticamente diferentes (P < 0,05). Los datos representan los valores medios de 12 jaulas por tratamiento.

C-: Control negativo; 250: Tratamiento C- con 250 unidades de fitasa (UFT)/kg.; 500: Tratamiento C- con 500 UFT/kg.; 1000: Tratamiento C- con 1000 UFT/kg; 10.000: Tratamiento C- con 10.000 UFT/kg

¹Error estándar de la media.

Respecto a la EMA, el tratamiento 500 fue ligeramente inferior (P <0,05) (61 kcal/kg MS) respecto al tratamiento C-. Entre tratamientos con fitasa, la EMA más elevada (P <0,05) la obtuvo el tratamiento 1.000 respecto a los tratamientos 500 y 10.000. En la ingestión de Ca, los tratamientos 250 y 500 mostraron mayores ingestiones (P <0,001) frente al tratamiento C-. Y entre los tratamientos, el tratamiento 500 fue superior (P <0,001) respecto al resto de los tratamientos. En la ingestión de P, no mostró diferencia (P >0,05) de los tratamientos respecto al tratamiento C-. Y entre tratamientos con fitasa, el tratamiento 250 fue mayor (P < 0,001) respecto al tratamiento 500 y (P <0,05) frente a los tratamientos 1,000 y 10,000. La

excreción de Ca no se redujo con la adición de fitasa respecto al C-, especialmente en el tratamiento 250 donde la excreción fue mayor ($P < 0,05$) tanto en g/animal y día como en porcentaje de excreción. Y entre tratamientos el porcentaje de excreción de los tratamiento 500, 1.000 y 10.000 mostraron menores ($P < 0,05$) porcentajes de excreciones respecto al tratamiento 250. Respecto a la excreción del P, el tratamiento 500, redujo ($P < 0,05$) el porcentaje de excreción de P respecto al C-. Y entre tratamientos no se mostró diferencias. En la retención de Ca y P, el Tratamiento 500 hubo mayor retención ($P < 0,001$) para el Ca y ($P < 0,05$) para el P respecto al tratamiento C-. Estas diferencias fueron de 0,51 y de 0.04 g/animal/día respetivamente. Entre los tratamientos con fitasas, la retención de Ca con el tratamiento 500 fue superior ($P < 0,001$) respecto a los tratamientos 250, 1.000 y ($P < 0,05$) con el tratamiento 10.000. La retención de P con el tratamiento 500 fue superior ($P < 0,05$) respecto a los tratamientos 250 y 1.000.

Por lo tanto, en gallinas de 25 semanas, adicionando diferentes dosis de fitasas, la EMA y la excreción del Ca no evidenciaron mayores diferencias respecto al control. En cambio el porcentaje de excreción de P se evidencia menor a dosis de 500 UFT/kg. La retención de Ca y P se observó superior con la adición de 500 UFT/kg de pienso.

En la tabla 12 se muestra los resultados de la EMA, la ingestión, excreción y retención de minerales (Ca y P) en las gallinas durante el segundo periodo de digestibilidad (30 semanas de edad).

Tabla 12 Energía metabolizable aparente (EMA, kcal/kg de materia seca (MS) y balance (ingestión, excreción y retención) de calcio y fósforo en gallinas de 30 semanas de edad alimentadas con piensos a diferentes niveles de una nueva fitasa

	Tratamientos					EEM ¹	P-valor
	C-	250	500	1000	10000		
EMA (kcal/kg MS)	3245 ^a	3014 ^c	2933 ^{bc}	3056 ^b	3039 ^b	15,52	< 0,0001
Ingestión (g/animal y día)							
Calcio	3,77 ^b	4,09 ^a	3,98 ^{ab}	3,50 ^c	3,27 ^c	0,088	< 0,0001
Fósforo	0,427 ^c	0,446 ^{bc}	0,423 ^c	0,478 ^a	0,466 ^{ab}	0,011	0,001
Excreción (g/animal y día)							
Calcio	1,241 ^b	1,438 ^a	1,417 ^a	1,035 ^c	0,877 ^c	0,057	< 0,0001
Fósforo	0,292	0,293	0,295	0,293	0,312	0,011	0,648
Excreción (%)							
Calcio	33,0 ^{ab}	35,5 ^a	35,7 ^a	29,7 ^{bc}	26,9 ^c	1,676	0,001
Fósforo	68,3 ^a	65,8 ^{ab}	70,1 ^a	61,1 ^b	67,5 ^{ab}	2,449	0,086
Retención (g/animal y día)							
Calcio	2,57 ^{ab}	2,74 ^a	2,50 ^{ab}	2,47 ^b	2,40 ^b	0,086	0,0651
Fósforo	0,135 ^{bc}	0,16 ^{ab}	0,127 ^c	0,185 ^a	0,154 ^{abc}	0,012	0,007

a-b Valores dentro de una fila sin superíndice en común son estadísticamente diferentes (P < 0,05)

Los datos representan los valores medios de 12 jaulas por tratamiento

C-: Control negativo; 250: Tratamiento C- con 250 unidades de fitasa (UFT)/kg.; 500: Tratamiento C- con 500 UFT/kg.; 1000: Tratamiento C- con 1000 UFT/kg; 10.000: Tratamiento C- con 10.000 UFT/kg

¹*Error estándar de la media.*

La EMA fue superior (P <0,001) en el tratamiento C- respecto al resto de tratamientos. Entre tratamientos con fitasa, la EMA fue la más elevada (P <0,05) en los tratamientos 1.000 y 10.000 frente al tratamiento 250. La ingestión de Ca fue mayor (P <0,05) en el tratamiento 250 que en el tratamiento C-. Entre los tratamientos con fitasa, el tratamiento 250 presentó valores superiores (P <0,001) de ingestión de Ca frente a los tratamientos 1.000 y 10.000. La ingestión de P fue superior (P <0,05) el tratamiento 1.000 respecto al C-. Entre los tratamientos con fitasa, el tratamiento 1.000 presentó una mayor ingestión (P <0,05) que el tratamiento 250 y 500. En la excreción de Ca (g/animal y día), los tratamientos 1.000 y 10.000, obtuvieron diferencias significativas (P <0,05) y (P <0,001) respectivamente respecto a C-. Y entre tratamientos, los tratamientos 1.000 y 10.000 redujeron su excreción,

mostrando diferencias significativas ($P < 0,05$) y ($P < 0,001$) respecto a los tratamientos 250 y 500 respectivamente. En el Porcentaje de excreción del P, el Tratamiento 1.000 obtuvo menor excreción ($P < 0,05$) en 7,2 unidades porcentuales respecto al C-. Entre tratamientos, el tratamiento 1.000 solo fue diferente ($P < 0,05$) con el tratamiento 500. Respecto a la retención de minerales. En la retención del Ca, no se mostró diferencias significativas comparando con el tratamiento C-. Entre los tratamientos con fitasa, el tratamiento 250 mostró mayor ($P < 0,05$) retenciones que los tratamientos 1.000 y 10.000. La retención de P fue mayor ($P < 0,05$) en el tratamiento 1.000 que en el tratamiento C-. Esta diferencia se refleja con una retención de 0,050 g/animal y día de P traduciéndose en una retención de 13,7% más del tratamiento 1.000 en comparación al C-. Entre los tratamientos con fitasa, el tratamiento 1.000 presentó valores superiores ($P < 0,05$) de retención de P que el tratamiento 500.

Respecto a las gallinas con 30 semanas nuevamente no se aprecia diferencias de la EMA de los tratamientos respecto al C-. Con el tratamiento 250 UFT/ kg de pienso se muestra una mayor ingestión así como una mayor excreción de Ca. Respecto al P con el tratamiento 1.000 UFT/kg de pienso se muestra una mayor ingestión de P, y a esta misma dosis un menor porcentaje de excreción de P. Respecto a la retención del Ca que a dosis de 250 UFT/kg se aprecia mayores diferencias. Y la con la retención de P a dosis de 1000 UFT se evidencia resultados.

En la tabla 13 se muestra los resultados del porcentaje de digestibilidad ileal de la MS, Ca y P obtenida al final del experimento, a las 31 semanas de vida de los animales.

Tabla 13 Digestibilidad ileal de la materia seca, calcio y fósforo (%) en gallinas de 31 semanas de edad alimentadas con piensos a diferentes niveles de una nueva fitasa

	Tratamientos					EEM ¹	P-valor
	C-	250	500	1000	10000		
Materia Seca (%)	68,8 ^b	63,6 ^c	66,6 ^{bc}	76,5 ^a	73,5 ^a	1,43	< 0,001
Calcio (%)	59,9 ^{ab}	38,2 ^c	53,1 ^b	65,6 ^a	62,7 ^{ab}	4,28	< 0,001
Fosforo (%)	22,9 ^b	18,6 ^b	29,7 ^b	53,0 ^a	55,7 ^a	3,40	< 0,001

a-b Valores dentro de una fila sin superíndice en común son estadísticamente diferentes (P < 0,05)

Los datos representan los valores medios de 12 jaulas por tratamiento

C-: Control negativo; 250: Tratamiento C- con 250 unidades de fitasa (UFT)/kg.; 500: Tratamiento C- con 500 UFT/kg.; 1000: Tratamiento C- con 1000 UFT/kg; 10.000: Tratamiento C- con 10.000 UFT/kg

¹Error estándar de la media.

Respecto a la digestibilidad ileal a las 31 semanas de edad, se aprecia mayor diferencias significativas (P <0,05) en el porcentaje de digestibilidad de la MS en los tratamientos 1.000 y 10.000 respecto al tratamiento C-. Entre los tratamientos con fitasa, los tratamientos 1.000 y 10.000 presentaron mayores (P <0,001) coeficientes de digestibilidad ileal de la MS que los tratamientos 250 y 500. No se apreciaron diferencias significativas en el coeficiente de digestibilidad ileal del Ca de los tratamientos respecto al control C-, excepto en el tratamiento 250 que presentó valores más bajos (P <0,05) que el C-. Entre los tratamientos con fitasa, el tratamiento 1.000 presentó mayores (P <0,05) coeficientes de digestibilidad ileal del Ca que los tratamientos 250 y 500. El coeficiente de digestibilidad ileal del P fue mayor (P <0,001) en los tratamientos 1.000 y 10.000 respecto al tratamiento C-. Entre los tratamientos con fitasa, los tratamientos 1.000 y 10.000 presentaron mayores (P <0,001) coeficientes de digestibilidad ileal del P que los tratamientos 250 y 500.

En resumen, la digestibilidad ileal en gallinas de 31 semanas con los tratamientos 1.000 y 10.000 UFT/kg de pienso muestra mayor digestibilidad de la MS, Ca y P.

V. DISCUSIÓN

Rendimiento productivo

El **peso promedio** de gallinas Lohmann Brown obtenido en el presente estudio está dentro de los parámetros normales (1600-1700 g a las 20 semanas) expuestos en la guía de manejo de gallinas Lohmann Brown (LOHMANN TIERZUCHT GmbH, 1995). La adición de fitasa a diferentes dosis no influyó en la ganancia de peso durante las 16 semanas que duró el experimento ni tampoco en el consumo de pienso para gallinas de 22 a 31 semanas de vida. En cambio Acosta *et al.* (2006), observaron mayores ganancias de peso en gallinas ponedoras White Leghorn de 24 a 60 semanas de vida con la adición de 250, 350 y 450 UFT/kg de fitasa a una dieta más baja en P disponible (0,14 %). De la misma manera, Vallardi *et al.* (2012) demostraron en gallinas de postura Hy-Line W36 de 64 semanas de edad, que adicionando fitasa microbiana a una dosis de 600 UFT/kg y una dieta baja en P disponible (0,12 % de la dieta) se producía un incremento de peso significativo. Nuestro estudio se realizó en el primer tercio del ciclo de puesta, estas diferencias pudieran deberse a que durante este periodo (pico de producción), gran parte de los nutrientes se destinan a la producción de huevos.

En cuanto al **consumo**, los resultados de este estudio no mostraron diferencias en el CMD con la adición de fitasa. Tampoco Kim *et al.* (2001) en gallinas Lohmann Brown evaluadas de 22 a 61 semanas encontraron mayores diferencias significativas a la suplementación de fitasas. En cambio, otros estudios (Roland y Punna, 1999; Jalal y Scheideler, 2001 y Silversides y Hruby, 2009) evidenciaron que a diferentes dosis (300 y 600 UFT/kg) de suplementación con fitasas y a diferentes edades (19, 40, 60 semanas de edad) observaron mayor consumo respecto a las aves control.

En cuanto a la **producción de huevos**, en general, no se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos con fitasa frente al tratamiento C- en este estudio. En cambio, Jalal y Scheideler (2001) obtuvieron efectos beneficiosos al suplementar con fitasa los piensos de gallinas Hy-Line W36 de 40 a 60 semanas de edad en la conversión alimenticia y masa de huevo, sin influenciar en el peso y producción de huevo. Por otro lado,

Roland y Punna (1999) evaluaron el efecto de la incorporación de fitasa (300 UFT/kg de pienso) en dietas de gallinas ponedoras de 19 a 50 semanas de edad con cuatro niveles de P disponible (0,1%, 0,2%, 0,3% y 0,4%) dividiendo el periodo en dos fases (19 a 36 y 37 a 48 semanas de edad). Estos autores observaron efectos positivos al adicionar fitasa en piensos deficientes en P únicamente en la segunda fase sobre la producción de huevo, mejorándose en un 9,3%, sin influir sobre el peso del huevo. Del mismo modo Berry *et al.* (2003), con gallinas reproductoras Ross de 27 a 60 semanas de edad en jaula, adicionaron 300 UFT/kg de fitasa a un pienso con 0,3% de P, incrementaron en 9,8% la producción de huevo, redujo la mortalidad y mejoró los contenidos minerales; sin embargo, no apreciaron diferencias significativas en el peso del huevo, en la fertilidad, ni en la gravedad específica, comparada con los huevos de las gallinas sin fitasa.

Estos resultados contradictorios entre los distintos trabajos pueden estar relacionados con el tipo de fitasa utilizada, la dosis basal de P disponible, la edad de las gallinas y el período de mantenimiento de las dietas evaluadas. Parece que existe una tendencia general a mejorar la producción de huevos con la adición de fitasas en diferentes líneas genéticas de gallinas. Probablemente, la duración del estudio tenga un papel importante para evaluar los efectos de la adición de fitasas en los parámetros productivos. En este sentido, debido a que el objetivo principal de este estudio fue evaluar el balance de nutrientes, su duración fue probablemente demasiado corta como para observar diferencias relevantes en estos parámetros.

Utilización de nutrientes

Dado que el ácido fítico liga nutrientes, el uso de fitasas podría aumentar la disponibilidad de ellos y eventualmente su digestibilidad. De los **nutrientes analizados** (MS, Cz, MO, PB, EB, Ca y P) a dos edades distintas, en general, la MS, MO, PB y EB obtuvieron mejores digestibilidades a la suplementación de fitasa, desde la dosis mínima de 250 UFT/kg de pienso, estos resultados también los obtuvieron Lim *et al.* (2003) y Ravidran *et al.* (2000). Respecto al Ca, los resultados no fueron claros, ya que en las dos edades y a dosis recomendables no se obtuvo mejoras, evidenciándose solo con la dosis 10.000 UFT/kg a las 30 semanas de edad con una digestibilidad mayor que el pienso sin fitasa (5,1 puntos porcentuales más). En este sentido, Jalal y Scheideler (2001) adicionando 300 UFT/kg en dietas bajas en P digestible (0,10%), en gallinas de 60 semanas de edad obtuvieron mejoras

en porcentaje de coeficiente de utilización del Ca hasta 60,39%. Además, en este estudio se observó un aumento del coeficiente de utilización de algunos aminoácidos (metionina, cisteína, aminoácidos azufrados totales, valina, isoleucina, ácido glutámico, alanina y glicina) a niveles bajos de P digestible. Pero también existen trabajos en los cuales se ha demostrado la ausencia de efecto de la fitasa sobre los nutrientes como el nitrógeno (Um y Paik, 1999; Ledoux y Firman, 2001; Keshavarz, 2003); P (Keshavarz 2003); proteína bruta (Sebastian *et al.*, 1997; Jalal y Scheideler, 2001; Ledoux *et al.*, 2001;) y aminoácidos (Sebastian *et al.*, 1997; Ledoux *et al.*, 2001). Por lo tanto, en general se recomienda no dar sobrevalores extras a las fitasas para otros nutrientes diferentes del P, siendo necesaria más información científica. En todo caso, las mejoras sería un beneficio extra de la utilización de fitasas.

Respecto a la **utilización del P**, se aprecia un claro aumento del aprovechamiento del P fítico con la adición de fitasa en el presente estudio. En las gallinas de 25 y 30 semanas de edad, la fitasa ejerció un efecto positivo ($P < 0,05$) a dosis de 500 UFT/kg (25 semanas) y a 1.000 UFT/kg de pienso (30 semanas). Esta mejora fue de 5,5 y 7,2 % a las edades y dosis mencionadas, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Acosta *et al.* (2006) suplementando con 450 UFT/ kg de pienso. De igual manera, Carlos y Edwards (1998) con 600 UFT/ kg de pienso. De otra parte Van der Klis *et al.* (1997), reportaron que con 500 UFT/kg de pienso se obtuvieron la máxima degradación del P fítico en gallinas de 24 como de 36 semanas de edad. También Boling *et al.* (2000) demostraron en aves de 20 y 70 semanas y piensos con 0,15% de P disponible que suplementando con 300 UFT/kg se corrigieron síntomas de deficiencia (raquitismo, fracturas). Pero tal como manifiesta Bougouin *et al.* (2014), se puede apreciar que las gallinas de mayor edad requieren mayores dosis de fitasa, ya que la edad ejerce un efecto negativo en la eficacia de la fitasa en la retención del P.

Respecto a la **excreción y retención de minerales (Ca y P)**, el porcentaje de excreción del P fue menor a partir de 500 UFT/kg en las aves a 25 semana (5,5% menos que el control negativo) y de 1.000 UFT/kg para las aves de 30 semanas (7,2% menos que el control negativo). Boling *et al.* (2000) y Keshavarz (2003), pudieron reducir en un 50% y 34-47% los niveles de P excretado con la adición de 300 UFT/kg con niveles de 0,1% de P disponibles en gallinas Dekalb Delta de 22 a 40 semanas de edad respecto a las no suplementadas.

También Lim *et al.* (2003) señalan que en aves de 21 a 41 semanas con 300 UFT/kg se redujo la excreción de P en un 11,76%. Terreros (2001), suplementando con 300 y 600 UFT/kg de pienso permitió disminuir la excreción de P en un 3,91% y 12,61% respectivamente. Por lo tanto, aunque parece evidente que la excreción de P se reduce con la adición de fitasas, la dosis de fitasa efectiva y el porcentaje de reducción puede ser muy diferente entre estudios ya que depende de factores como la dieta, la dosis de P inorgánico, el P fítico de los vegetales y la edad de las aves y En cuanto al también dependerá del momento de producción de postura. Con respecto a la retención de Ca y P, la mayor retención del Ca fue evidenciada solo a las 25 semanas, a dosis de 500 UFT/kg de pienso en un 22% más que el control negativo. A las 30 semanas no se obtuvo diferencias frente el control negativo.

En conjunto, en el presente estudio se demuestra que con el uso de fitasas no sólo mejoramos la utilización y retención del P, sino que además reducimos su eliminación al medio. Así lo confirman Keshavarz y Austic (2004) alimentando con niveles bajos de P disponible (0,2%) más 300 UFT/kg de pienso disminuyeron la excreción de P en 48% respecto a las no suplementadas. También Leske y Coon (1998) estimaron que la retención del P fítico en ponedoras fue un 36,7%; 29,0% y 14,8% mayor al suplementar con 300 UFT/kg de pienso para la harina de soya, maíz y afrecho de arroz respectivamente, lo que demostró que la suplementación de fitasa es un método efectivo para liberar P fítico, permitiendo disminuir la suplementación con P inorgánico

Respecto a la digestibilidad Ileal, en el presente estudio se evidencio que las aves a 31 semanas con la suplementación de 1.000 UFT/kg de pienso, obtuvieron resultados favorables en la digestibilidad de la MS y el P en comparación del control en 7,7% (%MS) y 30,1% (%P). Estos resultados confirman la eficacia de la fitasa respecto al efecto producido sobre el ácido fítico de los vegetales, evidenciándose a los mostrados en la digestibilidad fecal.

VI. CONCLUSIONES

El presente estudio, en el que se ha evaluado de la eficacia de una nueva enzima en piensos para aves de puesta a través de su posible efecto sobre los coeficientes de utilización del P y de otros nutrientes en gallinas ponedoras a dos edades, así como de los rendimientos productivos de huevos, consumo, e índice de transformación, ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

- En gallinas de 22 a 31 semanas de vida, no se evidenciaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros productivos de las aves (ganancia de peso y consumo medio diario) ni del huevo (porcentaje de gallinas de puesta, el peso y la masa del huevo y el índice de transformación) con la adición de fitasa a ninguna de las dosis estudiadas respecto al control negativo.
- En gallinas de 25 semanas, la adición de la fitasa mejoró ($P < 0,05$) el coeficiente de utilización de la MS con 1.000 UFT/kg, el coeficiente de digestibilidad de la MO, PB y Ca con 250 UFT/kg y el del P con 500 UFT/kg respecto al pienso sin fitasa añadida.
- En gallinas de 30 semanas, la adición de fitasa mejoró ($P < 0,05$) el coeficiente de utilización de la MS, MO y el P con 1.000 UFT/kg y el coeficiente de digestibilidad del Ca con 10.000 UFT/kg respecto al pienso sin fitasa añadida.
- La adición de 500 UFT/kg mejoró la retención de Ca y P, aunque no redujo la excreción de forma significativa en gallinas de 25 semanas de edad.
- La adición de 1.000 UFT/kg mejoró la retención de P en gallinas de 30 semanas.

A partir de estos resultados, respecto al P, podríamos recomendar como dosis eficaz mínima para esta nueva fitasa 500 UFT/kg para gallinas de 25 semanas y 1.000 UFT/kg para gallinas de 30-31 semanas. Para la MO, PB y Ca, la dosis eficaz mínima sería de 250 UFT/kg en gallinas de 25 semanas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, A., Lon-Wo, E., Cárdenas, M., y Almeida, M. (2006) Efecto de la enzima fitasa en el metabolismo mineral y el comportamiento productivo de gallinas ponedoras con bajo aporte de fósforo. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. vol. 40, no 2, p. 201-208.
- Acosta, A., Wo, E. L., Dieppa, O., Febles, M., y Almeida, M. (2007) Efecto de dos fitasas microbianas procedentes de *Aspergillus ficuum* y *Pichia pastoris* en el metabolismo mineral y comportamiento productivo del pollo de ceba.
- Adeola, O., Dilger, R. N., Onyango, E. M., y Jendza, J. A. (2005) Utilización del fósforo en aves y ganado porcino. En: XXI Curso de Especialización FEDNA, vol. 7, p. 343-365.
- Arijia, I., Brenes, A., Cortés, C. C., y Viveros, A. (2002) Efecto de la administración de fitasas de origen vegetal y microbiano sobre la utilización del fósforo en pollos broilers. *Investigación agraria. Producción y sanidad animales*, vol. 17, no 1, p. 81-92.
- Bedford, M. R. (2000). Exogenous enzymes in monogastric nutrition—their current value and future benefits. *Animal Feed Science and Technology*, 86 1-13.
- Berry, W. D., Hess, J. B., Lien, R. J., y Roland, D. A. (2003) Egg production, fertility, and hatchability of breeder hens receiving dietary phytase. *The Journal of Applied Poultry Research*, vol. 12, no 3, p. 264-270.
- Beutler, A. L. (2009) The efficacy of Quantum™ phytase in laying hens fed corn-soybean meal based diets. Tesis Doctoral. University of Saskatchewan Saskatoon.
- Boling, S. D., Douglas, M. W., Johnson, M. L., Wang, X., Parsons, C. M., Koelkebeck, K. W., y Zimmerman, R. A. (2000) The effects of dietary available phosphorus levels and phytase on performance of young and older laying hens. *Poultry Science*, vol. 79, no 2, p. 224-230.
- Bougouin, A., Appuhamy, J. A. D. R. N., Kebreab, E., Dijkstra, J., Kwakkel, R. P., & France, J. (2014). Effects of phytase supplementation on phosphorus retention in broilers and layers: A meta-analysis. *Poultry science*, 93(8), 1981-1992.

- Carlos, A. B., & Edwards, H. M. (1998). The effects of 1, 25-dihydroxycholecalciferol and phytase on the natural phytate phosphorus utilization by laying hens. *Poultry Science*, vol. 77, no 6, p. 850-858.
- Costa, M., Torres, M., Magariños, H., y Reyes, A. (2010) Producción y purificación parcial de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* en fermentación sólida sobre residuos agroindustriales. *Rev. colomb. biotecnol*, vol. 11, no 2, p. 163-175.
- Chen, X., y Moran, E. T. (1995) The withdrawal feed of broilers: Carcass responses to dietary phosphorus. *The Journal of Applied Poultry Research*, vol. 4, no 1, p. 69-82.
- Chesson, A. (1993) Feed enzymes. *Animal feed science and technology*, vol. 45, no 1, p. 65-79.
- Chung, T. K., Rutherford, S. M., Thomas, D. V., y Moughan, P. J. (2013) Effect of two microbial phytases on mineral availability and retention and bone mineral density in low-phosphorus diets for broilers. *British poultry science*, vol. 54, no 3, p. 362-373.
- Dvořáková, J. (1998) Phytase: sources, preparation and exploitation. *Folia microbiologica*, vol. 43, no 4, p. 323-338.
- Frontela, C., Ros, G., y Martínez, C. (2008) Empleo de fitasas como ingrediente funcional en alimentos. *ALAN*, vol. 58, no 3, p. 215-20.
- Godoy, S., Hernández, G., y Chicco, C. (2002) Efecto de la suplementación de fitasa microbial en la utilización de fósforo fítico en pollos de engorde alimentados con dietas a base de maíz-soya. *Revista científica*, vol. 12, no Suplemento 2, p. 519-523.
- 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*, vol. 34, no 12, p. 1423-1426.
- Hidalgo, K., y Rodríguez, B. (2015) La alimentación de las aves, cincuenta años de investigaciones en el Instituto de Ciencia Animal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, vol. 49, no 2, p. 197-204.
- Hughes, A. L., Dahiya, J. P., Wyatt, C. L., y Classen, H. L. (2008) The efficacy of quantum phytase in a forty-week production trial using white leghorn laying hens fed corn-soybean meal-based diets. *Poultry science*, vol. 87, no 6, p. 1156-1161.

- Jalal, M. A., y Scheideler, S. E. (2001). Effect of supplementation of two different sources of phytase on egg production parameters in laying hens and nutrient digestibility. *Poultry Science*, vol. 80, no 10, p. 1463-1471.
- Keshavarz, K. (2003) The effect of different levels of nonphytate phosphorus with and without phytase on the performance of four strains of laying hens. *Poultry Science*, vol. 82, no 1, p. 71-91.
- Keshavarz, K., & Austic, R. E. (2004). The use of low-protein, low-phosphorus, amino acid-and phytase-supplemented diets on laying hen performance and nitrogen and phosphorus excretion. *Poultry Science*, 83(1), 75-83.
- Kies, A. K., Van Hemert, K. H. F., & Sauer, W. C. (2001). Effect of phytase on protein and amino acid digestibility and energy utilisation. *World's poultry science Journal*, 57(02), 109-126.
- Kim S.H.; Lee W.J.; Lee S.J.; Yu D. J.; Park S.Y.; Kang B. S.; Na J. C.; Ryu K. S. (2001). Effects of dietary supplemental microbial phytase and nonphytate phosphorus on performance, nutrient digestibility and egg quality of laying hens. *Poultry Science* 80, 478.
- Kornegay, E. T. (1999) Feeding to reduce nutrient excretion: effects of phytase on phosphorus and other nutrients. *Biotechnology in the feed industry*, 461-89.
- 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.
- Ledoux, D. R., Broomhead, J. N., y Firman, J. D. (2001). Effects of microbial phytase on apparent ileal digestibility of amino acids in broiler chicks fed a corn-soybean meal diet formulated on an ideal protein basis. *J. Anim. Sci*, 79(Suppl 1), 477.
- Leske, K. L., & Coon, C. N. (1999). A bioassay to determine the effect of phytase on phytate phosphorus hydrolysis and total phosphorus retention of feed ingredients as determined with broilers and laying hens. *Poultry Science*, 78(8), 1151-1157.
- Lim, H. S., Namkung, H., y Paik, I. K. (2003). Effects of phytase supplementation on the performance, egg quality, and phosphorous excretion of laying hens fed different levels of dietary calcium and nonphytate phosphorous. *Poultry Science*, vol. 82, no 1, p. 92-99.

- Lohmann Tierzucht GmbH. (1995) Guía de Manejo de Gallinas Lohmann Brown. <http://www.ltz.de> / Accedido el 05 de Septiembre 2015.
- Mateos, G. G., García, J. M. (1998) Uso de premezclas en fabricación de piensos. Características y composición de las materias primas utilizadas en macrocorrectores. XIV Curso de especialización FEDNA pp. 171-190
- Méndez J. (1998) Fitasas en avicultura. En: XV Curso de Especialización Avances en Nutrición y Alimentación Animal. FEDNA, Madrid. Pp 109-116
- Munir, K., y Maqsood, S. (2013) A review on role of exogenous enzyme supplementation in poultry production. Emirates Journal of Food and Agriculture, vol. 25, no 1, p. 66-80.
- NRC (1998) Nutrient requirements of swine. 10th revised ed. National Research Council, National Academy Press, Washington D.C
- Plazas, R. A. S. (2011) Investigación y uso de fitasas en avicultura. Spei Domus, vol. 7, no 15.
- Pointillart, A. (1994) Phytates, phytases: leur importance dans l'alimentation des monogastriques. INRA Productions animales, vol. 7, no 1, p. 29-39.
- Punna, S., y Roland, D. A. (1999). Influence of supplemental microbial phytase on first cycle laying hens fed phosphorus-deficient diets from day one of age. Poultry science, vol. 78, no 10, p. 1407-1411.
- Qian, H., Kornegay, E. T., y Denbow, D. M. (1997) Utilization of phytate phosphorus and calcium as influenced by microbial phytase, cholecalciferol, and the calcium: total phosphorus ratio in broiler diets. Poultry Science, vol. 76, no 1, p. 37-46.
- Rao, S. R., Reddy, V. R., & Reddy, V. R. (1999). Enhancement of phytate phosphorus availability in the diets of commercial broilers and layers. Animal feed science and technology, vol. 79, no 3, p. 211-222.
- Ravindran, V. (2013) Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities. The Journal of Applied Poultry Research, 22(3), 628-636.
- Ravindran, V., Cabahug, S., Ravindran, G., Selle, P. H., & Bryden, W. L. (2000). Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorous levels. II. Effects on apparent metabolisable energy, nutrient digestibility and nutrient retention. British Poultry Science, vol. 41, no 2, p. 193-200.

- Rebollar, P.G. y Mateos, G.G. (1999) El fósforo en nutrición animal. Necesidades, valoración de materias primas y mejora de la disponibilidad. FEDNA Cap.2 19-64
- Rodehutschord, M. (2011) Avances en la valoración del fósforo en aves. XXVII Curso de Especialización FEDNA pp. 237-246
- Sauveur, B. (1989) Phosphore phytique et phytases dans l'alimentation des volailles. INRA Productions animales, vol. 2, no 5, p. 343-351.
- Scott, T. A. (2014) Tecnologías de procesamiento de pienso para broilers. Albéitar: publicación veterinaria independiente, (174), 40-41.
- Sebastian, S., Touchburn, S. P., Chavez, E. R., & Lague, P. C. (1997). Apparent digestibility of protein and amino acids in broiler chickens fed a corn-soybean diet supplemented with microbial phytase. Poultry Science, 76(12), 1760-1769.
- Selle, P. H., Ravindran, V. (2007) Microbial phytase in poultry nutrition. Animal Feed Science and Technology, 135 1-41.
- Selle, P. H., Ravindran, V., Bryden, W. L., y Scott, T. (2006) Influence of dietary phytate and exogenous phytase on amino acid digestibility in poultry: a review. The journal of poultry science, vol. 43, no 2, p. 89-103.
- Short, F. J., Gorton, P., Wiseman, J., y Boorman, K. N. (1996) Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. Animal feed science and technology, vol. 59, no 4, p. 215-221.
- Silversides, F. G., y Hruby, M. (2009) Feed formulation using phytase in laying hen diets. The Journal of Applied Poultry Research, vol. 18, no 1, p. 15-22.
- Slominski, B. A. (2011) Recent advances in research on enzymes for poultry diets. Poultry science, 90(9), 2013-2023.
- Snow, J. L., Douglas, M. W., y Parsons, C. M. (2003) Phytase effects on amino acid digestibility in molted laying hens. Poultry Science vol. 82, no 3, p. 474-477.
- Terreros, M.C. (2001) Efectos del uso de una fitasa (Natuphos®) sobre indicadores de la calidad del huevo y la dinámica de excreción fecal de fósforo en gallinas Leghorn. Memoria título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 88 p.
- Um, J. S., & Paik, I. K. (1999). Effects of microbial phytase supplementation on egg production, eggshell quality, and mineral retention of laying hens fed different levels of phosphorus. Poultry Science, vol. 78, no 1, p. 75-79.

- Vallardi, G. M., Morales, L. R., y Ávila, G. E. (2012) Efecto de la adición de fitasa como fuente de fósforo inorgánico en dietas para gallinas de postura. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, vol. 40, no 2.
- Van der Klis, J. D., Versteegh, H. A., Simons, P. C., & Kies, A. K. (1997). The efficacy of phytase in corn-soybean meal-based diets for laying hens. *Poultry Science*, vol. 76, no 11, p. 1535-1542.
- Vielma, A. A. N., Reyna, E. N., Iliná, A., Álvarez, G. M., Lozano, J. G. G., y Hernández, J. L. M. (2013) Aspectos fundamentales de las fitasas. *Investigación y Ciencia*, 21(57), 58-63.
- Wilkinson, S. J., Walk, C. L., Bedford, M. R., & Cowieson, A. J. (2013). Influence of conditioning temperature on the postpellet recovery and efficacy of 2 microbial phytases for broiler chicks. *The Journal of Applied Poultry Research*, 22(2), 308-313.
- Živkov-Baloš, M., Kovačević, M., Mihaljev, Ž., Stojanov, I., Kapetanov, M., Stojanović, D., y Petrović, J. (2012). The effectiveness of phytase in broiler diets in improving production performances and bone features. *Acta veterinaria*, vol. 62, no 2-3, p. 297-311.

VIII. ANEXOS

Tabla a Composición piensos experimentales del tratamiento control negativo para aves de puesta en base a materia fresca

Materias Primas	%
Maíz	60,0
Soja 44% PB	27,6
DL-Metionina	0,16
Aceite de Soja	2,5
Carbonato cálcico	7,5
Fosfato bicálcico	0,35
Sal	0,35
Colorante rojo (cantaxantina 10%)	0,005
Corrector ponedoras	0,50
Nutrientes calculados	%
Energía Metabolizable Aparente (kcal/kg) ¹	2.811
Proteína bruta	16,7
Lisina digestible	0,74
Metionina+Cisteína digestible	0,61
Treonina digestible	0,53
Triptófano digestible	0,17
Arginina	1,09
Isoleucina	0,70
Ácido linoleico	2,64
Extracto etéreo	5,22
Almidón	38,1
Calcio	3,18
Fósforo	0,38
Fósforo disponible	0,14
Fósforo digestible	0,16
Sodio	0,15
Cloro	0,25
Nutrientes analizados	
Energía Bruta (kcal/kg)	3.815
Proteína bruta	17,2
Cenizas	11,1
Extracto etéreo	4,44

Calcio	2,97
Fósforo	0,37
Fósforo fítico	0,17

¹En base a materia fresca

²En base a materia seca

Tabla b Contenido analizado de fitasa en las dietas experimentales para las aves de puesta (unidades de fitasa, UFT¹/kg pienso).

Tratamiento	C-	250	500	1.000	10.000
	0	275	481	1001	12442

C-: Control negativo; 250: Tratamiento C- con 250 unidades de fitasa (UFT)/kg.; 500: Tratamiento C- con 500 UFT/kg.; 1000: Tratamiento C- con 1000 UFT/kg; 10.000: Tratamiento C- con 10.000 UFT/kg

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".