

## Efecto de la administración de fitasas de origen vegetal y microbiano sobre la utilización del fósforo en pollos *broilers*

A. Viveros<sup>1</sup>, I. Arija<sup>1</sup>, C. Centeno<sup>2</sup>, A. Brenes<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Dpto. de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid

<sup>2</sup> Instituto de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid

abrenes@inb.csic.es

### RESUMEN

Se han realizado dos estudios con el objeto de evaluar la eficacia de la actividad fitásica endógena del salvado de centeno. El primero se ha llevado a cabo utilizando pollos *broiler* alimentados con una ración deficiente en fósforo (0,23 % P no fitico) a la que se incorporaba el salvado de centeno sin tratar y tratado térmicamente (100 g kg<sup>-1</sup>) con y sin enzima microbiana frente a una ración control (0,45 % P no fitico), y el segundo, un estudio *in vitro* sobre la estabilidad de la fitasa endógena del salvado a distintas temperaturas (25 a 75 °C) y pH (2,2 a 8,2). La presencia del salvado de centeno sin tratar y tratado en las raciones disminuyó significativamente la ganancia de peso ( $P < 0,05$ ; hasta un 21 y 17 % respectivamente) y el consumo de alimento ( $P < 0,05$ ; hasta un 18 y 14 % respectivamente) de las aves con respecto a las que consumieron la ración control y la que incorporaba la enzima microbiana. El índice de transformación estaba sólo significativamente aumentado ( $P < 0,0001$ ; hasta un 5,8 %) en la ración que contenía el salvado sin tratar en comparación con la ración control y la que se había incorporado la enzima microbiana. No hubo diferencias significativas en el porcentaje de fósforo plasmático ni en la concentración de cenizas de la tibia, entre la ración control y la que contenía la enzima comercial microbiana. Sin embargo, las aves que consumieron las raciones con el salvado sin tratar y tratado tenían significativamente disminuidos estos últimos parámetros ( $P < 0,0001$ ; hasta un 56 y un 18 % respectivamente). En el segundo estudio se demostraba que la actividad fitásica endógena del salvado de centeno fue disminuyendo de forma progresiva conforme se incrementaba la temperatura, obteniéndose una reducción del 56 % en su actividad a los 65 °C y una actividad casi nula a los 75 °C. En cuanto al efecto del pH, los valores más altos se obtuvieron en el rango de 4,6 a 6,2. En conclusión, estos resultados demuestran la menor eficacia de las fitasas de origen vegetal sobre la microbiana con respecto a la utilización del fósforo, hechos que pueden estar en parte relacionados con el estrecho margen de actuación de la enzima con el pH y su limitada estabilidad a las temperaturas.

**Palabras clave:** salvado centeno, fitasas, fósforo, pollos.

---

\* Autor para correspondencia

Recibido: 16-4-02

Aceptado para su publicación: 15-7-02

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de los alimentos utilizados en la alimentación de las aves, posee una considerable proporción de fósforo de origen vegetal (50-70 %) que está presente en forma de fitato (Reddy *et al.*, 1982; Kratzer y Vohra, 1986). Los fitatos son una mezcla de sales del ácido mioinositol hexafosfórico o ácido fítico. La capacidad de utilización de este P por parte de los animales es muy baja (Ravindran *et al.*, 1995; Kornegay *et al.*, 1996), debido a la carencia de la enzima fitasa necesaria para hidrolizar y liberar el fósforo.

Las fitasas se encuentran en la naturaleza en un gran número de granos, semillas y subproductos, siendo el centeno, el triticale, el trigo y los salvados los que poseen una mayor riqueza (Eeckhout y De Paepe, 1994; Viveros *et al.*, 2000). En los microorganismos (Wyss *et al.*, 1999), principalmente en hongos, también se encuentran en muy altas concentraciones. De igual forma se presentan en la mucosa del tracto gastrointestinal, pero en cantidades muy poco representativas (Maenz y Classen, 1998). Durante el procesado de los alimentos, y en particular durante la germinación de los granos de los cereales, se produce un incremento significativo en la actividad de la fitasa (Danisova *et al.*, 1994; Centeno *et al.*, 2001).

Las fitasas (fosfohidrolasas de hexafosfato de mioinositol) son fosfatasa específicas que hidrolizan los fitatos a inositol y ortofosfato (Wyss *et al.*, 1999). La IUPAC-IUB (1984) reconoce dos tipos de actividad fitásica, 3 y 6-fitasas. Su diferencia radica en que la primera inicia su hidrólisis en el grupo fosfato que está en la posición 3 y la 6-fitasa en el que está en la 6. La 3-fitasa se ha encontrado en microorganismos y animales, mientras que la 6-fitasa es de origen vegetal (Reddy *et al.*, 1982; Turk *et al.*, 2000). Por otra parte, la función de la fosfatasa ácida en la hidrólisis de los fitatos y de los distintos ésteres de inositol ha sido señalada por Ullah and Phillippy (1994) y corroborada por Zyla *et al.* (1995), al comprobar *in vitro* su capacidad para complementar la hidrólisis de los fitatos de una ración maíz-soja. Sin embargo, Nasi *et al.* (1999) indicaron que la interacción sinérgica entre la fitasa y la fosfatasa ácida estaba limitada en la cebada, el maíz y la soja con respecto a la hidrólisis de los fitatos.

El uso de las fitasas microbianas como aditivo en las raciones de las aves fue inicialmente estudiado por Nelson (1976). Más recientemente, la eficacia de las fitasas comerciales ha permitido una mejora en la digestibilidad del P fítico en las aves desde 35 hasta alrededor del 60 % (Shoner *et al.*, 1993; Ravindran *et al.*, 1995; Kornegay *et al.*, 1996), con la consiguiente reducción en la concentración de P en las excretas (Simons *et al.*, 1990) y, por tanto, una mejora en la mineralización de los huesos (Qian *et al.*, 1996). Otros trabajos también han demostrado el efecto beneficioso de su administración al mejorar la retención de Ca, Zn, Mg, Fe y Cu (Sebastián *et al.*, 1996; Mohanna y Nys, 1999; Ravindran *et al.*, 2000) y la digestibilidad de los aminoácidos (Ravindran *et al.*, 1999; Selle *et al.*, 2000).

La mayoría de los estudios evaluando la utilidad de las fitasas microbianas ha sido llevado a cabo con el uso de dietas basadas en el maíz y la soja sin considerar a otros ingredientes potenciales con actividad fitásica. La información que existe sobre el efecto de la concentración de fitato de la ración y la fitasa de origen vegetal sobre la utilización del P es muy escasa y sólo se tienen referencias con el uso del trigo y sus subproductos (Frappin y Nys, 1995; Eeckhout y De Paepe, 1991). Por todo ello, el objetivo de estos trabajos ha sido estudiar la inclusión del salvado de centeno, por ser un ingrediente con una consi-

derable actividad fitásica, en las raciones de las aves y observar en un estudio *in vitro* la influencia de la temperatura y el pH sobre dicha actividad endógena.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales y dietas

Pollos tipo *broiler*, sexados, machos, de la estirpe Cobb, de un día de edad y con un peso medio inicial de 45 gramos, fueron distribuidos al azar y alojados en baterías provistas de resistencias eléctricas como sistema de calefacción, permaneciendo en ellas hasta los 14 días de edad. La nave experimental reunía las condiciones de temperatura, humedad y renovación del aire adecuadas para el crecimiento normal de los animales. La iluminación se mantuvo durante 23 horas con una hora de oscuridad. El alimento y el agua de bebida fueron administrados *ad libitum*. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

Se ha realizado una prueba experimental para evaluar el efecto de la incorporación de 100 g kg<sup>-1</sup> de salvado de centeno sin tratar (S) y tratado térmicamente (ST) sobre la utilización del fósforo en raciones para pollos broilers. Este ingrediente fue sometido a tratamiento térmico (autoclave, 120 °C durante 15 min.) con el objeto de reducir la actividad fitásica endógena. Todas las raciones experimentales fueron isocalóricas e isoproteicas. Se utilizaron un total de 140 aves repartidas en 5 repeticiones por ración y siete aves por cada una de ellas. Las cuatro raciones experimentales se formularon de la siguiente manera: 1) ración control maíz-soja (MS) con 0,45 % de P no fitico; 2) MS con 0,23 % de P no fitico + S (100 g kg<sup>-1</sup>); 3) MS con 0,23 % de P no fitico + ST (100 g kg<sup>-1</sup>); 4) MS con 0,23 % P no fitico + ST (100 g kg<sup>-1</sup>) + Enzima (0,1 g kg<sup>-1</sup>). La fitasa microbiana utilizada en la prueba experimental (Natuphos® 5000, BASF) tenía una actividad declarada de aproximadamente 5.000 UF g<sup>-1</sup>. La composición química de las raciones viene recogida en la tabla 1.

A los 14 días de edad las aves fueron pesadas individualmente determinándose asimismo el consumo de alimento. La sangre fue recogida por punción cardiaca de 8 aves por tratamiento. Posteriormente y después del sacrificio de las aves por dislocación cervical, se recogieron las tibias de 12 animales por tratamiento.

### Procedimiento *in vitro*

En el estudio *in vitro*, las modificaciones producidas por la actividad enzimática endógena del salvado de centeno fueron determinadas a diferentes pH (entre 2,2 y 8,2 con intervalos de 0,4 unidades) con el objeto de estudiar su pH óptimo de actuación y también observar su evolución a distintas temperaturas (25, 35, 45, 55, 65, 75 °C) para así verificar su termoestabilidad. La actividad fitásica tanto para el pH como para la temperatura se realizó siguiendo la metodología de Eeckout y De Paepe (1994). Para ello se pesaron 100 mg de salvado de centeno finamente molido en un matraz a los que se añadió 50 ml de una solución de fitato sódico (1,722 g de fitato sódico, 180 ml de agua destilada y 820 ml

**Tabla 1**  
**Composición de las raciones experimentales**  
**(g kg<sup>-1</sup> de materia fresca)**

	Tratamientos			
	MS <sup>a</sup>	MS + S <sup>b</sup>	MS + ST <sup>c</sup>	MS + ST + E <sup>d</sup>
<b>INGREDIENTES</b>				
Maíz (84 g kg <sup>-1</sup> ) PB	515	405	405	405
Soja (440 g kg <sup>-1</sup> ) PB	409	408	408	408
Salvado de centeno sin tratar	–	100	–	–
Salvado de centeno tratado	–	–	100	100
Aceite de girasol	33,4	58	58	58
Carbonato cálcico	10,9	11	11	11
Fosfato bicálcico	19	5,3	5,3	5,3
Sal	3,0	3,0	3,0	3,0
Corrector <sup>1</sup>	5,0	5,0	5,0	5,0
DL-Metionina (990 g kg <sup>-1</sup> )	1,7	1,7	1,7	1,7
Óxido crómico	3,0	3,0	3,0	3,0
Natuphos®5000 <sup>2</sup> (0,1 g kg <sup>-1</sup> )	–	–	–	+
<b>VALOR NUTRITIVO ANALIZADO</b>				
Proteína bruta	220	220	220	220
Fósforo total (Pt)	7,1	4,9	4,9	4,9
Activ. fitasa (UF kg <sup>-1</sup> )	230	1.091	388	567
Activ. fosfatasa ácida (UFA g <sup>-1</sup> )	1.616	7.105	7.105	151.105
<b>VALOR NUTRITIVO DETERMINADO</b>				
EMAn <sup>3</sup> (MJ kg <sup>-1</sup> )	12,6	12,6	12,6	12,6
Extracto etéreo	58,0	82,5	82,5	82,5
Fibra bruta	39,5	46,7	46,7	46,7
Calcio (Ca)	10	6,9	6,9	6,9
Fósforo disponible	4,5	2,3	2,3	2,3
Fósforo fítico	2,6	2,6	2,6	2,6
Relación Ca/Pt	1,41	1,41	1,41	1,41
Metionina + cistina	9,0	9,0	9,0	9,0
Lisina	13,2	13,4	13,4	13,4

<sup>a</sup> MS: Maíz-Soja; <sup>b</sup> S: Salvado de centeno sin tratar (106,6 g kg<sup>-1</sup> PB); <sup>c</sup> ST: Salvado de centeno tratado térmicamente (autoclave 120°, 15 min); <sup>d</sup> E enzima Natuphos®5000 (0,1 g kg<sup>-1</sup>; Fitasa, 5000 FTU g<sup>-1</sup>; Fosfatasa ácida, 1.440.000 FAU g<sup>-1</sup>).

<sup>1</sup> Composición del corrector por kg de alimento: Vit A, 13.000 UI; Vit D3, 3.000 UI; Vit E, 11 mg; Vit K3, 2 mg; Vit B2, 5,7 mg; Vit B6, 2 mg; Vit B12, 0,024 mg; Ác. nicotínico, 28 mg; Ác. fólico, 0,5 mg; Ác. pantoténico, 12 mg; Cloruro de colina, 250 mg; Virginiamicina, 20 mg; Zn, 65 mg; Mn, 90 mg; Fe, 40 mg; Cu, 5 mg; Co, 0,5 mg; Se, 0,22 mg; I, 0,5 mg.

<sup>2</sup> Natuphos®5000 se utilizó 0,1 g kg<sup>-1</sup> como fuente de fitasa microbiana proporcionando 500 unidades fitasa/kg

<sup>3</sup> Ha sido calculado a partir de la ecuación propuesta por Janssen (1989) European Table of Energy Values for Poultry Feedstuffs.

de un tampón 0,25 M). Los tampones utilizados para la modificación del pH fueron de glicocola (pH desde 2,2 a 3,4), citrato (pH desde 3,8 a 5,8) y Tris (pH desde 6,2 a 8,2). Los matraces eran agitados durante 15 minutos y posteriormente incubados durante 10 y 70 min. a 37 °C. Para el estudio de la termoestabilidad se hicieron las incubaciones a diferentes temperaturas (25, 35, 45, 55, 65 y 75 °C). Posteriormente, 2 ml de cada incubado se añadieron a tubos de ensayo que contenían 2 ml de 10 % de tricloroacético. El contenido se filtró y 1 ml de este filtrado se transfirió a una cubeta junto con 1 ml de reactivo de color. Éste estaba formado por una mezcla de cuatro partes de la solución A (15 g de heptamolibdato amónico, 55 ml de ácido sulfúrico concentrado y agua destilada hasta 1 litro) y una parte de la Solución B (27 g sulfato ferroso, unas gotas de ácido sulfúrico concentrado y agua destilada hasta 250 ml). El desarrollo del color era determinado en un espectrofotómetro a 700 nm y comparado con una serie de calibrado conteniendo 1 ml de una solución estándar de P y 2 ml de reactivo de color. A la diferencia existente entre la densidad óptica del incubado a los 70 min. y a los 10 min. se la considera como actividad fitásica. Esta actividad era calculada de la siguiente manera: Unidades de fitasa  $\text{kg}^{-1} = (P \times 1.000) / (W \times 60)$ , siendo P los micromoles de P liberados por la fitasa en 60 min. y W el peso de la muestra (g).

### Métodos analíticos

Previamente a la realización de los análisis químicos las muestras de las raciones y del salvado de centeno fueron molidas (tamiz de 1 mm.). Para la determinación de la proteína y el fósforo total de las raciones se siguieron los métodos descritos por la AOAC (1990). Las actividades de la fitasa y fosfatasa ácida de las raciones y del salvado de centeno se determinaron siguiendo la metodología de Eeckhout and De Paepe (1994) y Zyla *et al.* (1989) y descritos detalladamente por Viveros *et al.* (2000).

La concentración de P en el plasma se determinó siguiendo la metodología de Duque *et al.* (1971). El análisis de las cenizas óseas se realizó en la tibia después de ser secada a 110 °C durante 24 horas y posteriormente incinerada en un horno mufla a 500 °C durante 12 horas.

### Análisis estadístico

Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza y tests de comparaciones múltiples de Duncan utilizando el Sistema de Análisis Estadístico, SAS (1990). El modelo usado fue el siguiente  $Y = \mu + x + \varepsilon$ . Donde  $\mu$  = media general;  $x$  = efecto ración; y  $\varepsilon$  = error residual.

## RESULTADOS

En la tabla 1 se recogen las determinaciones de las actividades de la fitasa y fosfatasa ácida de las raciones, observándose un incremento en los valores de ambas actividades con la incorporación de la fuente vegetal (salvado de centeno) y de la enzima comercial

microbiana. Se aprecia también una reducción de la actividad fitásica de la ración elaborada con el salvado de centeno tratado térmicamente que no se modifica para el caso de la actividad de la fosfatasa ácida.

En la tabla 2 se muestran los resultados relativos a la inclusión del salvado de centeno como fuente vegetal de actividad fitásica y una fitasa microbiana en raciones deficientes en P disponible sobre la ganancia de peso, consumo de alimento e índice de transformación. La presencia del salvado de centeno sin tratar y tratado térmicamente disminuyó significativamente la ganancia de peso de las aves con respecto a las que consumieron la ración control ( $P < 0,0001$ ; hasta un 21 %) y con la que contenía la enzima microbiana ( $P < 0,0001$ ; hasta un 18 %). Las aves que consumieron la ración que incorporaba la enzima microbiana mostraron un crecimiento similar que las controles. De la misma forma, el consumo de alimento estaba significativamente disminuido cuando se comparaba con las aves a las que se administraba la ración control ( $P < 0,0001$ ; 17 %) y la ración con la fitasa microbiana ( $P < 0,0001$ ; 14 %). Por el contrario, el índice de transformación estaba significativamente aumentado ( $P < 0,0001$ ; hasta el 5,8 %) en la ración que contenía el salvado de centeno sin tratar en comparación con la ración control y con la que incorporaba la fitasa microbiana.

**Tabla 2**

**Efecto de la inclusión del salvado de centeno sin tratar y tratado con autoclave y de una enzima microbiana, sobre los índices productivos de pollos *broiler*, a las 2 semanas de edad**

	Ganancia de peso (g)	Consumo de alimento (g)	Índice de transformación
<b>Ración</b>			
MS <sup>1</sup>	326 <sup>a</sup>	395 <sup>a</sup>	1,21 <sup>b</sup>
MS + S <sup>2</sup>	257 <sup>b</sup>	328 <sup>b</sup>	1,28 <sup>a</sup>
MS + ST <sup>3</sup>	262 <sup>b</sup>	328 <sup>b</sup>	1,25 <sup>ab</sup>
MS + ST + E <sup>4</sup>	315 <sup>a</sup>	382 <sup>a</sup>	1,22 <sup>b</sup>
<b>Valor P</b>	0,0001	0,0001	0,0001
<b>ESM</b>	4,24	6,97	0,009

<sup>a,b</sup> Valores con distintas letras dentro de la misma columna muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). ESM Error estándar de la media.

<sup>1</sup> MS: Maíz-Soja; <sup>2</sup> S: Salvado de centeno sin tratar; <sup>3</sup> ST: Salvado de centeno tratado térmicamente (autoclave 120° 15 min); <sup>4</sup> E: enzima Natuphos®5000.

En lo referente a los parámetros relacionados con el metabolismo del fósforo, los resultados obtenidos se recogen en la tabla 3. Con la adición de la enzima microbiana a la ración deficiente de fósforo, se obtuvieron valores similares a los conseguidos con la ración control para el porcentaje de fósforo en el plasma y la concentración de cenizas de la tibia. Sin embargo, con aquellas raciones que contenían el salvado de centeno sin tratar y tratado, estos mismos parámetros estuvieron disminuidos ( $P < 0,0001$ ) en un 56 % para el porcentaje de P en el plasma y un 18 % para la concentración de cenizas en la tibia en comparación con la ración control y la suplementada con la enzima microbiana.

Tabla 3

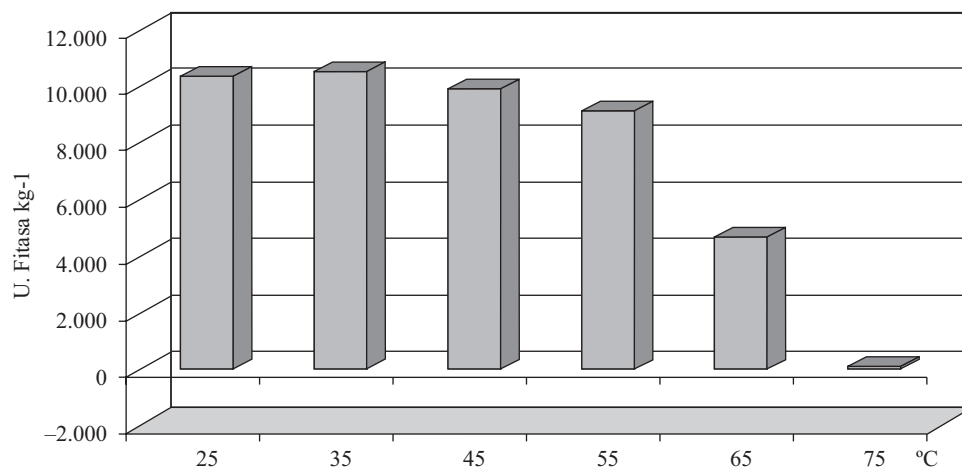
**Efecto de la inclusión del salvado de centeno sin tratar y tratado con autoclave y de una enzima microbiana, sobre la concentración plasmática de fósforo y las cenizas óseas, de pollos *broiler*, a las 2 semanas de edad**

	Fósforo en plasma (g dl <sup>-1</sup> )	Cenizas óseas (%)
<b>Raciones</b>		
MS <sup>1</sup>	3,36 <sup>a</sup>	29,05 <sup>a</sup>
MS + S <sup>2</sup>	2,11 <sup>b</sup>	24,38 <sup>b</sup>
MS + ST <sup>3</sup>	1,47 <sup>c</sup>	23,70 <sup>b</sup>
MS + ST + E <sup>4</sup>	2,91 <sup>a</sup>	27,10 <sup>a</sup>
<b>Valor P</b>	0,0001	0,002
<b>ESM</b>	0,15	0,55

<sup>a,b,c</sup> Valores con distintas letras dentro de la misma columna muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).  
ESM Error estándar de la media.

<sup>1</sup> MS: Maíz-Soja; <sup>2</sup> S: Salvado de centeno sin tratar; <sup>3</sup> ST: Salvado de centeno tratado térmicamente (autoclave 120°, 15 min); <sup>4</sup> E: enzima Natuphos®5000.

Los resultados referentes al estudio *in vitro* vienen recogidos en las figuras 1 y 2. Con respecto a las modificaciones de la temperatura, la actividad fitásica endógena del salvado de centeno fue disminuyendo progresivamente según se elevaba la temperatura. A los 65 °C la actividad enzimática disminuyó de forma significativa hasta un 56 % cuando se comparaba con temperaturas inferiores. Hay que resaltar que a los 75 °C la actividad enzimática fue nula. En cuanto al efecto del pH sobre la actividad enzimática del salvado de



**Fig. 1.—Efecto de la temperatura sobre la actividad de la fitasa endógena del salvado de centeno**

centeno, los valores más altos se consiguieron en un rango de pH que oscilaba entre 4,6 y 6,2, siendo el pH óptimo el de 5,4 que fue cuando se obtuvieron los valores más altos. A pH muy básicos o muy ácidos la actividad fitásica disminuía de forma considerable.

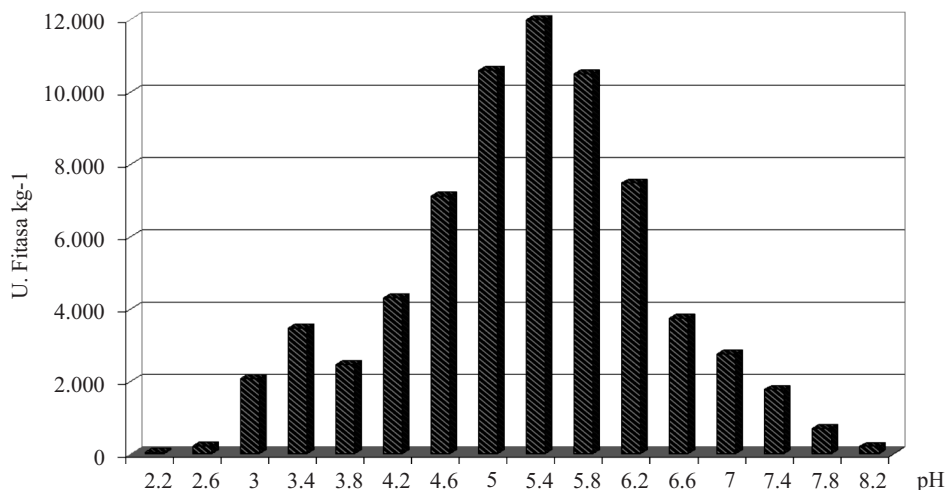


Fig. 2.—Efecto del pH sobre la actividad de la fitasa endógena del salvado de centeno

## DISCUSIÓN

La administración de una ración deficiente en fósforo disponible tiene un efecto negativo sobre los índices productivos. La incapacidad de las aves para utilizar el fósforo fítico es muy clara y también se refleja en una menor concentración de P plasmático y en una reducida mineralización de los huesos relacionado con la concentración de cenizas óseas (Qian *et al.*, 1996; Sebastian *et al.*, 1996). La incorporación del salvado de centeno como fuente extra de actividad fitasa en las raciones deficientes en fósforo no mejoraron los índices productivos ni las concentraciones de fósforo en plasma y el porcentaje de cenizas óseas. Distintos autores han demostrado que la utilización del fósforo fítico en las aves puede ser mejorado con el uso de fuentes de origen vegetal como el trigo y su subproducto el salvado (Temperton y Cassidy, 1964; Salmon *et al.*, 1969). Sin embargo, esta efectividad es muy variable dependiendo del cultivar y de las condiciones de la recolección (Ravindran *et al.*, 1995). El efecto de la temperatura del procesado de la ración, como la granulación, pueden parcial o totalmente inactivar las fitasas presentes en el trigo y la cebada (Jongbloed y Kemme, 1990). En nuestro caso particular, el tratamiento térmico con autoclave produjo solamente una reducción de la actividad fitasa que se reflejó con una disminución significativa del fósforo plasmático en comparación con el salvado de centeno sin tratar. Sin embargo, y contrariamente a lo esperado, la actividad fosfatasa ácida de la dieta no se modificó pudiendo deberse a su mayor termoestabilidad tal como confirma



Nasi *et al.* (1999) en sus investigaciones. Asimismo, en nuestro estudio *in vitro*, la estabilidad de la enzima estaba claramente comprometida, ya que temperaturas superiores a 65 °C disminuyeron de forma muy significativa su actividad. A pesar de todo ello, la falta de respuesta del salvado de centeno pudo también deberse al efecto del pH en el tracto digestivo. El pH óptimo de actuación de las fitasas de origen vegetal, tal como se demuestra en nuestro estudio *in vitro*, se expresa con mayor actividad en el rango de 4 a 6. Estos resultados son coincidentes con los expuestos por Irving (1980) y Reddy *et al.* (1982). Parece improbable que cantidades significativas de la enzima de origen vegetal puedan sobrevivir al pH ácido del proventrículo, sobre todo cuando ha sido demostrado por parte de Eeckout y De Paepe (1991) que la fitasa del trigo ya es inactiva a pH 3 y que puede ser hasta irreversible su inactivación a pH 2,5 (Lantzch, 1989). Además, este estrecho rango de pH provoca una disminución del tiempo de actuación en el tracto digestivo que hace que la fitasa vegetal muestre una eficacia entre 40 y 79 % menor que la microbiana (Potkansky, 2000). Esto está justificado porque la enzima microbiana es activa a un mayor rango de pH (Simons *et al.*, 1990), con dos picos de actuación, el primero a pH 5-5,5 y el segundo a pH ácido (2,5), permitiendo que se exprese su actividad en mayor grado y en diferentes lugares del tracto digestivo. Por lo tanto, creemos que la falta de eficacia de la enzima endógena vegetal pueda deberse conjuntamente a una inactivación o a una menor expresión de su actividad en el tiempo motivada por el bajo pH y también a las temperaturas utilizadas en el proceso de fabricación de los piensos.

La adición de la enzima microbiana a la ración deficiente en P disponible con el salvado de centeno tratado térmicamente, produjo una mejora significativa en el crecimiento de las aves comparado con la ración sin enzima. Los parámetros productivos (peso corporal e índice de transformación) obtenido por las aves suplementadas con enzima microbiana era comparable a aquellos obtenidos con la dieta control que contenía una fuente de P orgánico. Resultados similares han sido señaladas para pollos broilers por Simons *et al.* (1990), Broz *et al.* (1994), Rama Rao *et al.* (1999) y Ahmad *et al.* (2000). Estas mejoras en el crecimiento observadas en las aves por la acción de la fitasa pueden estar muy relacionadas con la liberación de minerales (Ca, P, Mg) y oligoelementos (Zn, Fe, Cu) de la molécula polianiónica del ácido fítico (Simons *et al.*, 1990) y por la utilización del mioinositol producto final de la defosforilación del ácido fítico. Igualmente este efecto pudo ser debido a un incremento en la digestibilidad del almidón, tal como sugiere Knuckles y Betschert (1987) o a un aumento en la digestibilidad de los aminoácidos de la ración (Selle *et al.*, 2000). Como resultado de todo ello, la eficacia de la enzima fitasa resultaría de la combinación de una mejora no sólo en la disponibilidad de los minerales, sino también de un aumento en la utilización de la energía y la proteína.

El incremento significativo del fósforo plasmático obtenido con la incorporación de la fitasa a la ración deficiente en fósforo, comparable con el obtenido con la ración control, ha sido también señalado en las investigaciones realizadas por Broz *et al.* (1994), Sebastián *et al.* (1996) y Rama Rao *et al.* (1999) en pollos, Orban *et al.* (1999) en patos y Attia *et al.* (2000) en pavos. De igual forma, en nuestro estudio el porcentaje de cenizas en la tibia también estaba significativamente aumentado por la presencia de la fitasa microbiana. Estos resultados son similares a los obtenidos por Sebastián *et al.* (1996), Ahmad *et al.* (2000) y Leeson *et al.* (2000). El aumento en el porcentaje de cenizas es una buena indicación de la existencia de un aumento en la mineralización del hueso que puede estar relacionada con el incremento en la disponibilidad de P, Ca, Zn y Cu del complejo fitato-mineral por la acción de la fitasa.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos con este trabajo demuestran que la adición de fitasas de origen microbiano a raciones deficientes en fósforo mejora los índices productivos de las aves y la utilización del fósforo. Sin embargo, la inclusión en estas raciones de ingredientes vegetales con actividades fitásicas relativamente altas, como el salvado de centeno, no es capaz de mejorar la utilización del fósforo de forma significativa. El estrecho margen de actuación de las fitasas vegetales con respecto al pH y su limitada estabilidad a las temperaturas pueden condicionar su eficacia.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la CICYT (Proyecto AGF98-0889).

## SUMMARY

### Effect of vegetal and microbial phytases on phosphorus utilization in broiler chickens

A feeding trial with broiler chickens to study the efficacy of plant (rye bran) and microbial phytase on growth performance, plasma P and tibia ash, and an *in vitro* assay to study the rye bran enzyme stability by changing temperature (25 to 75 °C) and pH (2.2 to 8.2) were conducted. Treatments involved a normal P level corn-soybean diet and three low P diets including 10 % of rye bran non heated or heated without or with microbial phytase (500 units kg<sup>-1</sup>). Weight gain (P < 0.05, up to 21 and 17 %) and feed consumption (P < 0.05, up to 18 and 14 % respectively) of birds fed rye bran non heated and heated without microbial enzyme were significantly reduced in comparison to those fed the control and the microbial enzyme diets. Feed to gain ratio only was significantly increased (P < 0.0001, up to 5.8 %) in the rye bran non-heated diet compared with the rest of the diets. There were not significant differences in plasma P and tibia ash concentrations in birds fed control and microbial enzyme diets. However, these former parameters were significantly reduced (P < 0.0001, up to 56 and 18 % respectively) in the birds fed diets containing rye bran non heated and heated. In the *in vitro* assay, the rye bran endogenous phytase activity were progressively reduced by the temperature (56 % reduction at 65 °C and no activity at 70 °C). In the pH range from 5.0 to 6.2 the phytase was rather stable, while below pH 3.8 and above pH 6.6 a rapid decline in activity was observed. In conclusion, these results show that microbial phytases are more effective than plant phytase to utilise P and it could be related to the limited pH range of activity and to the thermolability of the enzyme.

**Key words:** rye bran, phytase, phosphorus, chickens.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD T., RASOOL S., SARWAR M., HAQ A., ZIA-UL H., 2000. Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 83, 103-114.
- ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMIST, 1990. Official methods of analysis. 15<sup>th</sup> ed. Association of official analytical chemist, Washington D.C.
- ATTIA F.A., WAIBEL P.E., HERMES I., CARLSON C.W., WALSER M.M., 2000. Effect of dietary phosphorus, calcium, and phytase on performance of growing turkeys. *Poult. Sci.* 79, 231-239.

- BROZ J., OLDALE P., PERRIN-BOLTZ A.H., RYCHEN G., SCHULZE J., SIMOES NUNES C., 1994. Effect of supplemental phytase on performance and phosphorus utilization in broiler chickens fed a low phosphorus diet without addition of inorganic phosphates. *Br. Poult. Sci.* 35, 243-247.
- CENTENO C., VIVEROS A., BRENES A., CANALES R., LOZANO A., DE LA CUADRA C., 2001. Effect of several germination conditions on total P, phytate P, phytase, and acid phosphatase activities and inositol phosphate esters in rye and barley. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3208-3215.
- DANISOVA C., HOLOTNAKOVA E., HOZOVA B., BUCHTOVA V., 1994. Effect of germination on a range of nutrients of selected grains and legumes. *Acta Aliment.* 23, 287-298.
- DUQUE M., 1971. Determinación conjunta de fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, manganeso, cobre y cinc en plantas. *Anal. Edaf. Agrobiol.* 30, 3-11.
- EECKHOUT W., DE PAEPE M., 1991. The quantitative effects of an industrial microbial phytase and wheat phytase on the apparent phosphorus absorbability of a mixed feed by piglets. *Medical Faculty Landbouwwijkuniversity, Gent* 56, 1643-1647.
- EECKHOUT W., DE PAEPE M., 1994. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 47, 19-29.
- FRAPIN D., NYS Y., 1995. Relative efficiency of microbial and vegetal phytases and additional effect of phosphorus in broilers. In: Tenth European Symposium on Poultry Nutrition. Antalya (TUR), WPSA Turkish branch, Tekirdag (TUR), pp.352-354.
- IRVING G.C.J., 1980. Phytases. In: Inositol phosphates. Ed.D.J. Cosgrove, Elsevier, Amsterdam, pp. 85-112.
- IUPAC-IUB, 1984. Recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry. In: Enzyme nomenclature. Academic Press Inc., Orlando.
- JONGBLOED A.W., KEMME P.A., 1990. Apparent digestible phosphorus in the feeding of pigs in relation to availability, requirement and environment. 1. Digestible phosphorus in feedstuffs from plant and animal origin. *Netherl. J. Agric. Sci.* 38, 567-578.
- KNUCKLES B.E., BETSCHART A.A., 1987. Effect of phytate and other myo-inositol phosphate esters on alpha amylase digestion of starch. *J. Food Sci.* 52, 719-721.
- KORNEGAY E.T., DENBOW D.M., YI Z., RAVINDRAN V., 1996. Response of broilers to graded levels of microbial phytase added to maize-soybean-meal-based diets containing three levels of non phytate phosphorus. *Brit. J. Nutr.* 75, 839-852.
- KRATZER F.H., VOHRA P., 1986. Role of phytic acid and other phosphates as chelating agents. En: Chelates in nutrition. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 49-61.
- LANTZSCH H.J., 1989. Einführung und stand der diskussion zur intestinalen verfügbarkeit des phosphors beim schwein. In: Industriel-verband agrar, Fachausschub futterphosphate, pp 53-77.
- LEESON S., NAMKUNG H., COTTRILL M., FORSBERG C.W., 2000. Efficacy of new bacterial phytase in poultry diets. *Can. J. Anim. Sci.* 80, 527-528
- MAENZ D.D., CLASSEN H.L., 1998. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poult. Sci.* 77, 557-563
- NÄSI M., PIIRONEN J., PARTANEN K., 1999. Efficacy of *Trichoderma reesei* and acid phosphatase activity ratios in phytate phosphorus degradations *in vitro* and in pigs fed maize-soybean meal diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 77, 125-137.
- NELSON T.S., 1976. The hydrolysis of phytate phosphorus by chicks and laying hens. *Poult. Sci.* 55, 2262-2264
- ORBAN J.I., ADEOLA O., STROSHINE R., 1999. Microbial phytase in finisher diets of white Pekin ducks: Effect on growth performance, plasma phosphorus concentration, and leg bone characteristics. *Poult. Sci.* 78, 366-377.
- POTKANSKY A., 2000. The comparison of plant and microbial phytases in the feeding. In: Proceeding of the International Symposium on Phytase in Animal Nutrition. Grela E.R. ed., Lublin, Polonia, pp 21-27.
- QIAN H., KORNEGAY E.T., DENBOW D.M., 1996. Phosphorus equivalence of microbial phytase in turkey diets as influenced by calcium to phosphorus ratios and phosphorus levels. *Poult. Sci.* 75, 69-81.
- RAMA RAO S.V., RAVINDRAN V., RAMASUBBA V., 1999. Enhancement of phytate phosphorus availability in the diets of commercial broilers and layers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79, 211-222.
- RAVINDRAN V., BRYDEN W.L., KORNEGAY E.T., 1995. Phytates: Occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Dis. Biol. Rev.* 6, 125-143.
- REDDY N.R., SATHE S.K., SALUNKHE D.K., 1982. Phytases in legumes and cereals. *Adv. Food Res.* 28, 1-92.
- SALMON A.J., ALI M.S., MCGINNIS J., 1969. Effect of level and sources of phosphorus and different levels of productivity on phosphorus utilization by laying hens. *Poult. Sci.* 48, 1004-1009.
- SAS INSTITUTE, 1990. SAS User's Guide: Statistics. Version 8 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC.

- SCHONER F.J., HOPPE P., SCHWARZ G., WIESCHE H., 1993. Effects of microbial phytases and inorganic phosphate in broiler chickens: performance and mineral retention at various calcium levels. *J. Anim. Phy. Anim Nutr.* 69, 235-244.
- SEBASTIAN S., TOUCHBURN S.P., CHÁVEZ E.R., LAGUE P.C., 1996. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and utilization of dietary calcium, phosphorus, copper, and zinc in broiler chickens fed corn-soybean diets. *Poult. Sci.* 75, 729-736.
- SELLE P.H., RAVINDRAN V., CALDWELL R.A., BRYDEN W.L., 2000. Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. *Nutr. Res. Rev.* 13, 255-278.
- SIMONS P.C.M., VERSTEEGH H.A.J., JONBLOED A.W., KEMME P.A., STUMP P., BOS K.D., WOLTERS M.G.E., BEUDEKER R.F., VERSCHOOR G.J., 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *Br. J. Nutr.* 64, 525-540.
- TEMPERTON H., CASSIDY J., 1964. Phosphorus requirement of poultry. III. The effect of feeding a vegetable type diet without supplemental phosphorus to turkeys. *Br. Poult. Sci.* 5, 87-88.
- TURK M., SANDBERG A-S, CARLSSON N-G, ANDLID T., 2000. Inositol hexaphosphate hydrolysis by baker's yeast. Capacity, kinetics and degradation products. *J. Agric. Food Chem.* 48, 100-104.
- ULLAH A.H.J., PHILLIPPY B.Q., 1994. Substrate selectivity in *Aspergillus ficum* phytase and acid phosphatase using *myo*-inositol phosphates. *J. Agric. Food Chem.* 42, 423-425.
- VIVEROS A., CENTENO C., BRENES A., CANALES R., LOZANO A., 2000. Phytase and acid phosphatase activities in plant feedstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4009-4013.
- WYSS M., BRUGGER R., KRONENBERGER A., REMY R., FIMBELD R., OESTERHELT G., LEHMANN M., VAN LOON A.P., 1999. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Catalytic properties. *App. Environ. Microbiol.* 65, 367-373.
- ZYLA K., KORELESKI J., KUJAWSKI M., 1989. Dephosphorylation of phytate compounds by means of acid phosphatase from *Aspergillus niger*. *J. Sci. Food Agric.* 49, 315-324.
- ZYLA K., LEDOUX D.R., VEUM, T.L., 1995. Complete enzymic dephosphorylation of corn-soybean meal feed under simulated intestinal conditions of the turkey. *J. Agri. Food Chem.* 43, 288-294.