



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO Y MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UNA FITASA Y ÁCIDO LÁCTICO EN
DIETA A BASE DE SORGO Y PASTA DE SOYA SOBRE LA
UTILIZACIÓN DE FÓSFORO, CALCIO Y ZINC EN GALLINA DE
POSTURA**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA
INGRID YOLANI MARTINEZ ROJAS**

MVZ. MC. Dr. CARLOS LÓPEZ COELLO

FMVZ UNAM

MVZ. MC. ERNESTO ÁVILA GONZÁLEZ

FMVZ UNAM

MVZ. MC. Dr. SERGIO GÓMEZ ROSALES

PROGRAMA DE DOCTORADO Y MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL

México D.F. NOVIEMBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres Virginia y Gilberto, por ser el gran ejemplo que hasta el momento he seguido y sobre todo por enseñarme el lado de humanidad que todos tenemos. Siempre los llevaré en mi corazón.

A mi hermano por haberme permitido tener muy buenos recuerdos de mi infancia, de tener aún ese apoyo incomparable y claro por habernos brindado nuestro nuevo motivo de felicidad Andresito.

A ti tía Leonor por todos esos momentos que vivimos y darme tu amor desinteresado siempre: Te veré en la infinitud del tiempo. A mi familia por brindarme apoyo constante en todo sentido cuando lo he necesitado: tías, tíos, primos y primas, mil gracias por ser parte de éste proceso en la lejanía, en especial a mi tía Blanca.

A una gran persona la cual he tenido la fortuna de conocer y amar: Migue gracias, porque siendo amigo, confidente y novio me has hecho feliz y latir mi corazón a mil.

A mis nuevos grandes amigos Dianota, Kadihña , Leidy, Miguel y Sergio por su parceria y compañía en los momentos más difíciles.

Además a todas y cada una de esas personas con las cuales he vivido y compartido un tiempo en éste maravilloso país no solo en el ambiente educativo sino de vivencias a diario, de lo cual estaré siempre muy complacida que se hayan cruzado nuestros caminos.

Y sobre todo a Dios, mi gran fuente de espiritualidad que me permitió seguir adelante cuando más lo necesite y él cual creo que cada momento me hace sentir más respeto y amor por el mundo y los seres que la habitamos, porque solo en nuestras manos está el poder de vivir en paz.

“Sin desafíos la vida es una rutina, una lenta agonía”

AGRADECIMIENTOS

Al personal del Centro de Enseñanza, Investigación y extensión en Producción Avícola (C.E.I.E.P.Av.) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por su apoyo en la realización de la prueba biológica, en especial a David.

Al personal del Laboratorio de Nutrición de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por su colaboración en el procesamiento de las muestras , Tere Martinez por su cooperación y enseñanza del proceso.

Al personal del Departamento de Aves por permitirnos desarrollar actividades en sus instalaciones y apoyo en el proceso de la toma de muestra.

Al Consejo Nacional De Ciencia Y Tecnología del Gobierno de México por la beca destinada al apoyo de programa de posgrado.

Al personal de AB Vista por su acompañamiento en la realización de la investigación y financiamiento de la misma.

Al Dr. Carlos López por su acompañamiento y continuo asesoramiento en el desarrollo del proceso investigativo. Además por su enseñanza no solo a nivel académico si no de vida que siempre llevaré conmigo.

Al Dr. Ernesto Ávila por su colaboración y cooperación en la realización de la investigación y de mi estancia en la maestría.

Al Dr. Sergio Gómez por sus oportunas observaciones para el mejoramiento del desarrollo y análisis de la prueba.

Al Ing. Pablos Hach por su asesoramiento en el análisis estadístico de los resultados; junto a la Dra. Sara Caballero, les agradezco por brindarme su trato siempre cordial como persona.

RESUMEN

El fitato presente en cereales como el sorgo son más solubles en pH ácidos. Al adicionar ácido láctico(AL) en alimento para ponedoras se esperaría potencializar la acción de una fitasa (F). Así, se incrementa el fósforo disponible cubriendo las necesidades fisiológicas y productivas del ave. Se emplearon 50 gallinas de la línea Hy-Line W36 por 16 semanas con cinco tratamientos: Control Positivo (0.25% fósforo disponible), Control Negativo (0.12% fósforo disponible), Control Negativo+ AL (0.5%), Control Negativo+ F (450 FTU) y Control Negativo+ AL+ F. Se registraron los parámetros productivos semanalmente y se hicieron pruebas de calidad en huevo mensualmente. Se tomaron muestras de huevo y excretas y se realizó eutanasia a las aves para determinar el pH gastrointestinal y tomar muestras de tibias. Se determinó el fósforo, calcio y cinc en el hueso compacto, médula ósea, yema de huevo y excretas por absorción atómica. Niveles bajos de fósforo disponible afectó negativamente el porcentaje de postura, masa de huevo y peso del ave y se mejoraron con niveles mayores de fósforo o la inclusión de la F. La adición de AL a la F no mostró mejores resultados productivos. La calidad de huevo no se afectó. No se encontraron cambios en el pH gastrointestinal vinculado a la adición del AL, aunque los valores fueron más altos de los reportados anteriormente. El contenido de minerales en hueso compacto no se afectó. En médula ósea se encontraron menores contenidos de cinc con niveles bajos de fósforo disponible. El hierro en yema de huevo fue menor en dietas bajas en fósforo y con adición de AL sin fitasa. El fósforo en excretas fue mayor con dietas altas en fósforo y el cinc menor con F. Gallinas alimentadas con dietas de sorgo y pasta de soya bajas en fósforo disponible presentan menor desempeño productivo y contenido mineral en hueso y yema de huevo comparadas con las aves suplementadas con AL; además, el contenido aumentó con niveles mayores de fósforo disponible o con inclusión de la F, sin que la adición de AL mejorara el efecto de la F.

Palabras Claves: Gallina de postura, fitasa, ácido láctico, parámetros productivos, utilización de fósforo-calcio-cinc.

ABSTRACT

Phytate molecules present in cereals as sorghum are most soluble in acid pH; adding lactic acid (LA) to laying hen diets increases the action of phytases (P) supplementation. So, the phosphorous available to bird of the feed increases allowing the physiologic and productive needs of the animal get better; furthermore it will reduce the inorganic phosphorous source in the feed. The study has developed in 50 laying hens, for 16 weeks with five treatments: PC (0.25% PD), NC (0.12% PD), NC+LA (0.5%), NC+P (450 FTU) y NC+LA+P. Productive parameters data were registered weekly and every month was measured the quality egg. At the end of experimentation, samples of eggs and excretas were taken. All birds were euthanized to determinate gastrointestinal pH and take samples. The contents of phosphorous, calcium and cinc were determined into compact bone, bone marrow, egg yolk and excretas by atomic absorption. The low content of available phosphorous had negatively in productive performance and bird weight; these parameters were better with increase of available phosphorus or supplement with P. The supplement with LA and P were not improved the productive parameters. No changes in egg quality and eggshell thickness were found. Also changes were not found in pH gastrointestinal linked to LA addition. The mineral content in compact bone was not affected. In bone marrow, the cinc contents in diet with low available phosphorus. The content of iron in egg yolk was low in diets with low available phosphorous and LA additions. The excretas had higher content of phosphorous within higher available phosphorous diets and lower cinc content when the P was adding. Diets with lower available phosphorous had bad productive performance and mineral content into bone and yolk is worse than diets including LA. However the mineral content increases with higher levels of available phosphorous or with addition of P. The lactic LA not improved the effect of phytase statistically.

Key Words: Laying hen, phytase, lactic acid, parameters productive, phosphorus-calcium-cinc utilization.

CONTENIDO

RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
CONTENIDO.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE CUADROS.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO DE REFERENCIA.....	3
2.1 Sorgo.....	3
2.2 Fitato.....	3
2.2.1 El ácido fítico en vegetales y cereales.....	4
2.2.2 Fitato en el sorgo.....	6
2.2.3 Propiedad quelante del fitato.....	8
2.2.4 Efecto del pH en el fitato.....	10
2.3 Cinc.....	11
2.4 Fitasa.....	12
2.4.1 Pruebas para medir la eficacia in vitro.....	15
2.4.2 Rango de pH de fitasas de origen microbiano.....	16
2.4.3 Acción de las enzimas proteolíticas.....	18
2.5 pH intestinal del ave.....	19
2.6 Ácidos orgánicos.....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS.....	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
6.1 Prueba biológica.....	24
6.2 Prueba de pH intestinal.....	26
6.3 Análisis de laboratorio.....	27
6.3.1 Resistencia a la ruptura en hueso.....	27

6.3.2	Alimento y materia prima.....	27
6.3.3	Determinación de minerales en hueso, yema de huevo y excretas.....	27
6.4	Análisis estadístico.....	29
7.	RESULTADOS.....	32
7.1	Alimento y materias primas.....	32
7.1.1	Ácido fítico.....	32
7.1.2	Fitato.....	32
7.1.3	Fitato susceptible.....	32
7.1.4	Recuperación de la enzima.....	32
7.2	Parámetros productivos.....	32
7.2.1	Porcentaje de postura.....	32
7.2.2	Peso de huevo.....	34
7.2.3	Consumo de alimento.....	34
7.2.4	Índice de conversión.....	34
7.2.5	Masa de huevo.....	34
7.2.6	Huevo roto, sucio y fáfara.....	35
7.2.7	Peso vivo de las aves.....	35
7.2.8	Pruebas de calidad en huevo.....	35
7.3	Prueba de pH gastrointestinal y resistencia a la ruptura de la tibia.....	36
7.3.1	Prueba de pH gastrointestinal.....	36
7.3.2	Prueba de ruptura de tibia.....	36
7.4	Minerales en hueso compacto, médula ósea, excretas y yema de huevo.....	37
7.4.1	Hueso compacto.....	37
7.4.2	Médula ósea.....	37
7.4.3	Huevo.....	38
7.4.4	Excretas.....	39
8.	DISCUSIÓN.....	41
8.1	Parámetros productivos.....	41
8.1.1	Porcentaje de postura.....	41
8.1.2	Consumo de alimento.....	42
8.1.3	Peso del huevo.....	43

8.1.4 Masa de huevo.....	43
8.1.5 Índice de conversión.....	44
8.1.6 Huevo sucio, roto y en fáfara.....	44
8.1.7 Peso vivo.....	44
8.1.8 Pruebas de calidad en huevo.....	45
8.2 Prueba de pH gastrointestinal y resistencia a la ruptura en tibia.....	46
8.2.1 pH gastrointestinal.....	46
8.2.2 Resistencia a la ruptura.....	47
8.3 Minerales en hueso compacto, médula ósea, excretas y yema de huevo.....	47
8.3.1 Hueso compacto.....	47
8.3.2 Médula ósea.....	49
8.3.3 Yema de huevo.....	50
8.3.4 Excretas.....	52
9. CONCLUSIONES.....	55
REFERENCIAS.....	57
CUADROS.....	66
REPORTE DE RESULTADOS PARCIALES.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Contenido de ácido fítico en el sorgo.....	7
Figura 2. Interacciones del ácido fítico con otras moléculas.....	11
Figura 3. Rango de pH en diferentes fitasas. Fitasa del arroz (Greiner et al., 1998), Aspergillus niger (Greiner et al., 2009) y bacteria Malaysian waste-water (Greiner y Farouk, 2007).....	17
Figura 4. Muestras de hueso compacto y médula ósea de la tibia izquierda.....	28
Figura 5. Porcentaje de postura en los cinco tratamientos durante las 14 semanas. ..	33

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Contenido de fósforo fítico y total en materias primas importantes en avicultura.....	5
Cuadro 2. pH del tracto digestivo de pollo de engorda.....	19
Cuadro 3. Tratamientos empleados en la prueba biológica.	25
Cuadro 4. Contenido nutricional de las dietas experimentales (calculado).....	66
Cuadro 5. Contenido de ácido fítico, fitato y fitasa en sorgo y dietas en experimentación.....	67
Cuadro 6. Parámetros productivos obtenidos en catorce semanas de experimentación.....	68
Cuadro 7. Resultados en peso del ave, pruebas de calidad de huevo y prueba de resistencia a la ruptura en tibia.....	69
Cuadro 8. Resultados en prueba de pH gastrointestinal.....	70
Cuadro 9. Resultados del contenido de fósforo, calcio y cinc en hueso compacto y médula ósea.....	71
Cuadro 10. Resultados del contenido de fósforo, calcio, cinc y hierro en yema de huevo y de fósforo, calcio y cinc en excretas.....	72
Cuadro 11. Análisis de regresión lineal entre la secuencia de tratamientos en la toma de muestra y tiempo transcurrido de la misma para la prueba de determinación de pH gastrointestinal.....	73
Cuadro 12. Correlación entre las pruebas de resistencia a la ruptura, cenizas y contenido mineral en hueso compacto.....	73
Cuadro 13. Verificación de supuesto de homogeneidad de varianzas.	¡Error!
Marcador no definido.	

1. INTRODUCCIÓN

El fitato es la principal reserva de fósforo en cereales como el sorgo; sin embargo, es considerado un antinutriente en dietas comerciales para animales monogástricos dada su baja actividad de la enzima endógena requerida para hidrolizar la molécula. Además de ser una fuente de fósforo, el fitato aporta otro tipo de nutrientes al cereal debido a su capacidad de quelar cationes divalentes (entre los cuales se encuentra el calcio y cinc) (Kumar *et al.*, 2010), proteínas (Bye *et al.*, 2013; Pontoppidan *et al.*, 2007) y en algunos casos carbohidratos (Thompson, 1986).

Cuando existe una mayor disponibilidad de reservas de fósforo en cereales y subproductos, las cantidades liberadas aportan el elemento en la dieta y así reducen las cantidades de fósforo inorgánico empleadas como suplemento. Mitigando el impacto ambiental en las reservas acuíferas (Nahm, 2007) e igualmente permite frenar el agotamiento de las reservas de éste mineral a nivel mundial (Bennett y Elser, 2011).

En la industria pecuaria se realizan acciones para controlar los efectos negativos del fitato desarrollando nuevas tecnologías que permitan optimizar la inclusión de cereales como es el caso de las variedades genéticamente modificadas (Haefner *et al.*, 2005). No obstante, una de las opciones más comunes y con mejores resultados aceptados por los productores ha sido la inclusión en el alimento de enzimas, en este caso las fitasas (Selle y Ravindran, 2007; Bedford, 2000). Existen cuatro fuentes de fitasas en aves de corral: la proveniente de cereales, la generada en las células de las vellosidades intestinales, la producida por la flora microbiana interna y la de microorganismos exógenos (Angel *et al.*, 2002). Ésta última, es la de mayor eficacia, debido a que las demás no se produce en cantidad suficiente para metabolizar el contenido de fitato presente en las dietas comerciales de aves de postura (Selle y Ravindran, 2007).

Las fitasas comerciales provienen de organismos genéticamente modificados como hongos y bacterias, aunque sus características a factores del medio como

susceptibilidad a proteólisis por las enzimas internas del organismo, cambios de temperatura y de pH varían, (Lei y Porres, 2003; Greiner y Konietzny, 2011) de tal manera que éstas características son las que pueden principalmente mejorar o no la actividad de las enzimas. Existen estudios *in vitro* que determinan los rangos de pH del medio en los cuales las diferentes clases de fitasas tienen mejor desempeño, sin embargo, son pocos los estudios *in vivo* donde se demuestren los efectos que producen los cambios en el pH sobre el desempeño de las fitasas.

El pH del medio (como el que se encuentra en el sistema digestivo) desempeña otra función importante, ya que en pH ácidos el fitato es más soluble y pierde su capacidad de quelar otro tipo de moléculas y en pH básicos tiene la capacidad de atrapar moléculas produciendo complejos que no son metabolizados y provocan pérdida de los nutrientes (Selle y Ravindran, 2007; Angel *et al.*, 2002; Sebastian *et al.*, 1998).

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1 Sorgo

El sorgo es una de las materias primas más empleadas en alimento para animales de producción y un alimento en la dieta de humanos en algunos países como Nigeria (FAO, 2012). El sorgo por su capacidad de ser cultivado en climas semiseco y semicálido es considerado como una fuente importante de alimento para humanos y animales, debido a la tendencia de aumento en la temperatura ambiental global y por otra parte dada la disminución del inventario mundial de granos (Bryden *et al.*, 2009). Sin embargo, éste cereal presenta ciertas características negativas que repercuten en la digestibilidad del mismo como es el caso en la presencia de kaifirinas, taninos y fitatos, los cuales provocan una disminución en la asimilación de aminoácidos por parte del animal (Selle *et al.*, 2010); otro factor limitante del sorgo, es el hecho, que sus almidones son generalmente menos digestibles si se comparan con el maíz; posiblemente generado porque la capa del endospermo periférico es más resistente a la digestión y por ende tiende a encapsular los gránulos de almidón (Rooney y Pflugfelder, 1986).

A nivel mundial el sorgo ocupa el quinto lugar en cosecha de cereales, destinado principalmente para consumo animal. En el caso de México se estima que el sorgo es la segunda fuente de cereal (después del maíz) para dietas de aves de producción y su estimación en toneladas para el año 2011 fue de 6,429,310; Tamaulipas es el estado con mayor producción por hectárea (FAO, 2012).

2.2 Fitato

El fitato se define como un compuesto químico formado por seis moléculas de ortofosfato unido a un anillo de inositol; desde un punto de vista más preciso, el término fitato se conoce como el anión mono a dodeca del ácido fítico a un pH

neutro(Shi *et al.*, 2004). Cuando el fitato se encuentra estable, es decir sin cargas negativas, se conoce como ácido fítico o ácido inositol hexa-fosfórico 1,2,3,4,5,6 con fórmula química $C_6H_{12}O_{24}P_6$. En caso que el ácido fítico se encuentre unido a metales catiónicos divalentes como el calcio, magnesio y potasio, se conoce con el nombre de fitina (Angel *et al.* , 2002). La fitina en alimentos representa de un 50 a 80% del contenido total de fósforo (Ravindran, 1995) y es posible que éste tipo de molécula es la que causa más problemas nutricionales, si se compara con el fitato, ya que se ha demostrado que en pollo de engorda alimentado con dietas bajas en minerales la absorción de ácido fítico es mayor (Dos-Santos, 2013).

Además, la molécula del fitato es la principal reserva de fósforo e inositol en vegetales y por lo tanto una fuente de fósforo orgánico para animales herbívoros y omnívoros, pero por su naturaleza química, las moléculas de fitato no son utilizados en gran parte por los animales monogástricos por la poca capacidad de desdoblar la molécula a metabolitos absorbibles.

2.2.1 El ácido fítico en vegetales y cereales

La presencia de moléculas de fitato desempeñan un papel fundamental en el proceso de latencia de semillas, al evitar procesos oxidativos naturales (Graf *et al.*, 1987). Posterior al proceso de germinación el fitato se une a minerales como el calcio, magnesio y potasio y de esta manera se mantiene en su mayor proporción como una reserva para contribuir en la formación de la pared celular. Éste tipo de moléculas se encuentra presenta de 60 a 80% en semillas de cereales, legumbres y semillas oleaginosas, ubicada en diferentes partes y en distintas cantidades (Ravindran *et al.*, 1994; Rebollar y Mateos, 1999; Singh, 2008). En granos, la presencia de la fitina cumple varias funciones como: 1) reserva de fósforo y energía 2) inhibición de la producción de ATP fomentando el proceso de latencia 3) control de cationes divalentes 4) regulador del fósforo disponible (Angel *et al.* , 2002).

Sin embargo se ha detectado que las cantidades de ácido fítico varían entre los vegetales (lo cual se abordará más adelante), condicionado a ciertos factores que

pueden cambiar las cantidades, como el estado de maduración, proceso de degradación, factores climáticos y condiciones de cultivo (Reddy *et al.*, 1982).

Cuadro 1. Contenido de fósforo fítico y total en materias primas importantes en avicultura.

Ingrediente	N° de Muestras	P Total (ppm)	P Fítico (ppm)	Proporción (P Fítico/ P Total)
Cereales				
Avena	4/41	3.21 [2.73-3.70]	1.96 [1.86-2.20]	61
Maíz	7/45	2.62 [2.30-2.90]	1.88 [1.70-2.20]	71.6
Sorgo	5/41	3.01 [2.90-4.09]	2.18 [1.70-2.46]	72.6
Trigo	6/97	3.07 [2.90-4.09]	2.19 [1.80-2.89]	71.6
Semillas Oleaginosas				
Harina de canola	4/28	9.72 [8.79-11.50]	6.45 [4.00-7.78]	66.4
Harina de algodón	3/21	10.02 [6.40-11.36]	7.72 [4.9-9.11]	77.1
Harina de soya	6/89	6.49 [5.70-6.94]	3.88 [3.54-4.53]	59.9
Sub-productos				
Salvado de arroz	6/37	17.82 [13.40-27.19]	14.17 [7.90-24.20]	79.5
Salvado de trigo	6/25	10.96 [8.02-13.71]	8.36 [7.00-9.60]	76.3

Fuente: Tomado Selle y Ravindran (2007).

Dado que la mayoría de las dietas empleadas en la alimentación de aves de producción son de origen vegetal, la disponibilidad de minerales como el fósforo es un punto clave en el momento de realizar las fórmulas. La mayoría de fósforo en plantas se encuentra en forma de ácido fítico (Cuadro 1); según Ravindran (1995) “generalmente, una dieta en avicultura contiene de 2.5 a 4 ppm de fósforo fítico”, en caso que se consumieran 321 millones de toneladas de alimento en un año en producciones tanto de pollo de engorda como de ponedoras, el consumo total de fósforo fítico sería de un millón de toneladas aproximadamente (Selle y Ravindran, 2007) lo cuál evidencia la importancia de propiciar una mejor asimilación de está

molécula por parte del animal. Generalmente una dieta de ave y cerdo contiene 10g/kg de fitato (Bye *et al.* , 2013).

El contenido de fitato respecto a fósforo total, es mayor en cereales y sub productos del trigo respecto a semillas oleosas y leguminosas (Eeckhout y Paepe, 1994). La distribución del mismo en los granos no es uniforme aunque se encuentra asociado a elementos estructurales. En el caso del trigo y arroz más del 80% del fitato se encuentra en el salvado (Odell *et al.*, 1972). En semillas dicotiledonas incluyendo semillas oleosas, el fitato está en forma de globoides localizados en la semilla, excepto en la soya donde no tiene un lugar fijo (Sebastian *et al.* , 1998).

Un estudio realizado por Eeckhout (1994) demostró que el contenido de fitato en arroz, trigo y avena es mayor que el presente en cereales. En el caso de trigo y arroz, la mayor cantidad de fitato se encuentra en la aleurona y salvado; éste último en el arroz contiene más del 80% (Odell *et al.* , 1972).

El contenido de fósforo fítico en maíz representa de 66 a 85% del total de fósforo (Selle y Ravindran, 2007; Bedford, 2000) y alrededor del 90% de este, se encuentra en las porción de la semilla. En el caso de subproductos del maíz la cantidad de fitato aumenta debido a la concentración del contenido de fósforo (Eeckhout y Paepe, 1994). Respecto a la soya la proporción de fósforo fítico es menor comparado con maíz ya que es de 53-68% (Selle y Ravindran, 2007).

2.2.2 Fitato en el sorgo

El germen es el sitio con mayor contenido de ácido fítico en el sorgo (Figura 1), aunque la aleurona es un sitio de reserva del fósforo fítico (Doherty *et al.*, 1982). El sorgo, es uno de los cereales que presenta una mayor proporción respecto al contenido total de fósforo. Según Bryden *et al.* (2009) en un recuento de 64 muestras de sorgo en seis estudios, determinaron que en promedio el contenido de fósforo fue de 3.42 ppm y de fósforo fítico de 2.66 g/kg, lo que representa el 77.6%. Sin embargo el contenido varía dependiendo de la variedad ya que en sorgos oscuros el contenido es mayor respecto a sorgos claros (Ravindran *et al.* , 1994).

El ácido fítico presente en el grano tiene la capacidad de atrapar proteínas, pero en el sorgo por la presencia de aminoácidos básicos provenientes de la kaifirina, éste proceso tiene menor impacto respecto al trigo (Selle *et al.*, 2010). Por este motivo, en un estudio realizado el sorgo tuvo una menor respuesta con una fitasa (6.6%) respecto a la digestión ileal de aminoácidos que en trigo (9.3%), pero mayor que en el caso del maíz (3.4%) (Ravindran *et al.*, 1999).

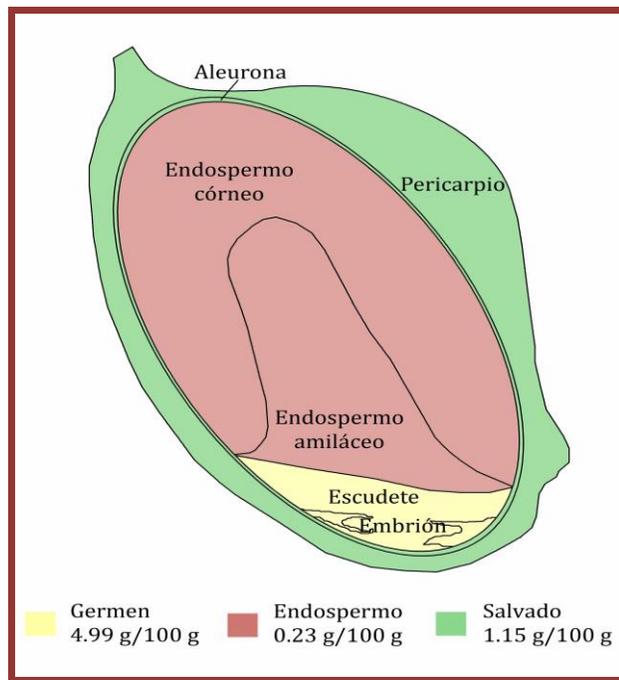


Figura 1. Contenido de ácido fítico en el sorgo.
Fuente: Adaptado de Glennie *et al.* (1983).

El contenido de fitatos en los alimentos puede variar dependiendo del tipo de materia prima que se emplea y del proceso de elaboración como el cambio en la temperatura. La actividad de la fitasa es mínima a temperaturas inferiores a 50°C o superiores a 70°C, sin embargo el contenido de fitatos disminuye puesto que a esta temperatura se da el rompimiento de la pared celular de los granos que permite el contacto del contenido de ácido fítico y fitasa (Chang *et al.*, 1977). Otro proceso es la molienda que permite la separación de ciertas partes en los granos, como en el caso del arroz, provocando

una disminución del contenido de fitatos dado que la mayor parte se queda en el salvado (Cheryan, 1980).

2.2.3 Propiedad quelante del fitato

La molécula del ácido fítico posee de 6 a 12 protones fuertemente intercambiables (OH, aquellos con un $pK_a < 3,5$) y seis que se disocian poco ($pK_a 4.6-10$) (Costello *et al.*, 1976; Erdman, 1979). De esta manera se conoce que el ácido fítico a pH como el encontrado en el tracto digestivo y alimentos, está cargado negativamente lo que permite la formación de enlaces con cationes divalentes (Angel *et al.*, 2002). Las uniones se pueden dar con fosfatos de una misma molécula de fitato o entre varias. Diferentes cationes pueden adherirse a una misma molécula de fitato y a los metabolitos provenientes del ácido fítico como es el caso del IP5, IP4 e IP3 (Persson *et al.*, 1998). Según estudios realizados, la afinidad de fitato con minerales es diferente respecto al tipo de catión; se ha reportado la siguiente secuencia en fuerza de quelación: $Zn^{2+} > Cu^{2+} > Co^{2+} > Mn^{3+} > Ca^{2+}$ (Maddaiah *et al.*, 1964); sin embargo existen otro tipo de reportes donde el cobre tiene mayor afinidad que el cinc (Persson *et al.*, 1998; Vohra *et al.*, 1965). Aunque el fitato muestra mayor afinidad por otros minerales; en las dietas de aves de corral, el mineral que más debe tenerse en cuenta es el calcio debido a las cantidades elevadas que se emplean en las dietas, lo que le permite estar más disponible para la formación de complejos.

El calcio cumple un papel decisivo en el funcionamiento de la fitasa; se ha demostrado que altos contenidos de calcio provocan la formación de moléculas de fitina que no permite la acción de la fitasa para degradar el ácido fítico (Selle *et al.*, 2009). Adicionalmente, se cree que el calcio promueve la formación de moléculas calcio-cinc-fitato (Byrd y Matrone, 1965) que probablemente resultan ser más estables comparadas con las formadas por cinc-fitato (Pontoppidan *et al.*, 2007; Maenz *et al.*, 1999). La importancia del calcio en el desempeño de las fitasas está dada por los altos niveles de inclusión de éste mineral en dietas de aves y cerdos en la actualidad; además varios autores reconocen el efecto que el pH del intestino tiene

sobre la formación de las uniones calcio- fitato (Selle *et al.* , 2009) puesto que a pH ácido ésta unión se ve afectada.

En varios estudios se ha demostrado la capacidad del fitato de atrapar además de cationes divalentes, moléculas de mayor peso como son las proteínas (pH dependiente), carbohidrato y enzimas digestivas. En el caso de las proteínas, cabe recordar que a pH ácido (por debajo del punto isoeléctrico) se encuentran con carga positiva en el grupo α -NH₂ y en algunos aminoácidos básicos como la histidina, arginin y lisina, lo cual provoca la unión directa con la molécula del fitato (Cheryan, 1980). Rutherford *et al.* (1997) encontró que al incubar lisina con puliduras de arroz a pH de 4.5 disminuía la lisina libre en 13%. Sin embargo, a pH básico (por encima del punto isoeléctrico) las proteínas se encuentran con carga negativa en los grupos carboxilos que les permite la unión con un catión divalente (Nosworthy y Caldwell, 1988; Prattley *et al.*, 1982) y éste a la par se puede encontrar unido al fitato.

El catión que mayor capacidad de unión posee es el calcio, ya que un exceso en la dieta provoca la formación de complejos con fitatos y proteínas, que resultan ser poco solubles y no absorbibles (Gifford y Clydesdale, 1990). En el caso de los carbohidratos la unión se logra con la formación de puentes de hidrógeno con la proteína que va unida al fitato (Thompson, 1986; Thompson y Erdman, 1982).

Además, se ha demostrado que el fitato tiene la capacidad de inhibir la acción de enzimas digestivas como pepsina, α -amilasa y tripsina (Singh, 2008). En el caso de la tripsina, un estudio demostró que es inhibida con la inclusión de ácido fítico y es menos activa a medida que se incrementa la concentración del fitato; mas aún la inhibición no se vió afectada por la ausencia de calcio (Singh y Krikorian, 1982). Se ha evidenciado que los fitatos pueden inhibir la pepsina a un pH ácido, posiblemente por la carga positiva del grupo amino terminal (Vaintraub y Bulmaga, 1991). Por el contrario en otros estudios se advierte que para darse la inhibición es necesaria la formación de complejos quelados con calcio ó que este catión es fundamental para la acción de la tripsina, quimotripsina (Caldwell, 1992) y α -amilasa (Liener, 1989).

Esta característica química indica que el fitato posee una alta capacidad de formar complejos con una variedad de moléculas fundamentales en el proceso de digestión y asimilación de los alimentos por parte de los animales. Lo anterior es el principal fundamento para denominar el fitato como un elemento antinutricional contenido en los vegetales; sin embargo existen otras características que le condicionan como un factor positivo en la alimentación y salud de quien la consume.

2.2.4 Efecto del pH en el fitato

El pH del medio tiene una gran influencia en la estructura del ácido fítico y por ende su capacidad de quelar elementos (Figura 2). Cuando el pH de un medio es ácido, la cantidad de iones hidronios es mayor lo que permite la unión con las cargas negativas del ácido. De esta manera la molécula de ácido fítico no está en disponibilidad para unirse con minerales, proteínas y carbohidratos, así que es susceptible a la acción de las fitasas por hidrólisis de los enlaces de hidrógeno para hacer que el fósforo esté disponible. En el caso contrario en pH básico, el ácido fítico tiende a formar quelatos impidiendo la acción de la fitasa y de esta manera no es posible la asimilación tanto de los nutrientes quelados como del fósforo contenido en la estructura del ácido (Selle y Ravindran, 2007; Angel *et al.*, 2002; Sebastian *et al.*, 1998).

Maenz *et al.* (1999) estudiaron el efecto de los minerales en la susceptibilidad de la fitasa, encontrando que al disminuir el pH en un medio se incrementaba la relación molar mineral: fitato; así la formación de fósforo inorgánico se incrementaba posiblemente porque a ese pH se produce la protonación del ácido fítico, impidiendo la unión de cationes divalentes y la acción de la fitasa sobre su sustrato. Sin embargo de los metales estudiados el Fe^{3+} es el único mineral que podía inhibir la formación de fitato a un pH ácido, pero en pH básicos no lo conseguía a diferencia del comportamiento de Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} y Mg^{2+} , los cuales a un pH básico aumentan su capacidad de unirse al ácido fítico. Igualmente, Pontoppidan *et al.* (2007) al evaluar el contenido de fitato en dietas a base de maíz y pasta de soya sobre el efecto del pH en la solubilidad de minerales y proteínas, determinaron que a pH ácido la solubilidad

de ambos compuestos era mayor y que dentro de los minerales, el cinc a partir de un pH mayor de 4 disminuía drásticamente su solubilidad (éste estudio concuerda con lo encontrado en un reporte previo (Persson *et al.* , 1998)).

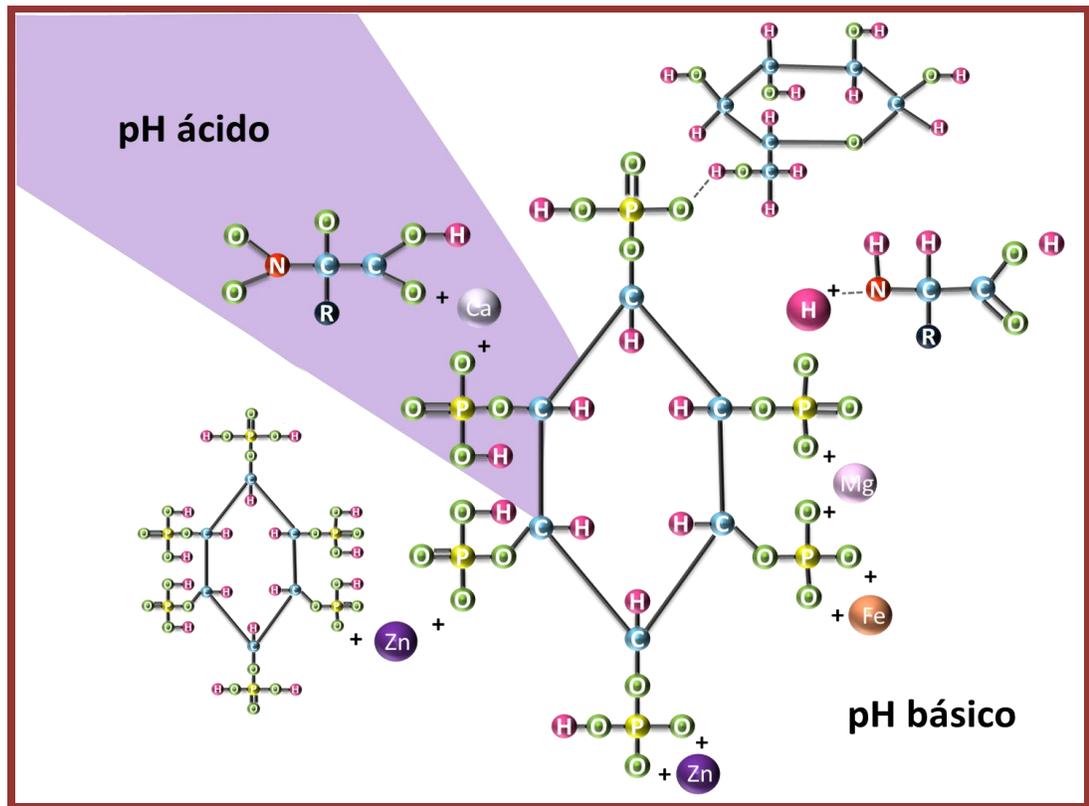


Figura 2. Interacciones del ácido fólico con otras moléculas.
Fuente: Adaptado de Singh *et al.* (2008)

2.3 CINC

El cinc es un elemento fundamental para el desarrollo y mantenimiento de los seres vivos porque participa activamente en reacciones químicas (Song, 1987). El cinc actúa como parte integral de varias enzimas; por ejemplo en el caso de las DNA y RNA polimerasas interviene como un cofactor influyendo en la síntesis y expresión de los genes (Duncan y Hurley, 1978).

El animal obtiene el cinc por medio de las dietas pero la absorción depende de factores como los niveles dietarios, la presencia en el lumen intestinal de otros minerales, la disponibilidad del cinc (puede encontrarse quelado) y la síntesis de las moléculas acarreadoras del cinc en las células de la mucosa del intestino delgado (Park *et al.*, 2004); el transporte para la absorción al parecer es a favor del gradiente de concentración pero su excreción si requiere de energía y al parecer existe un ligando encargado de este proceso conocido como LMW-ZBL (Song, 1987; Song y Adham, 1979); otros factores que se mencionan es la fibra, la caseína y la prostaglandina 2 α (Song, 1987). En el caso de la disponibilidad del cinc, existen varios estudios donde se demuestra la capacidad de sustratos como el ácido fólico de quelar este mineral.

El cinc es el catión divalente más relacionado a la unión del fitato por tener afinidad para formar uniones entre dos moléculas de fitato ya que se une al fosfato 5, mecanismo similar al del cobre (Champagne y Fisher, 1990) y por presentar menor proporción relación molar: fitato para inhibir la formación de fitato a un pH de 7 (Maenz *et al.*, 1999).

2.4 Fitasa

Las fitasas son una clase especial de fosfatasas que catalizan la hidrólisis secuencial del ácido fólico vía inositol pentafofato a monofosfato que es un producto intermedio (Wyss *et al.*, 1999). Otra definición la refiere como la enzima que tiene la capacidad de catalizar y remover el ortofosfato inorgánico del ácido fólico vía inositol pentafofato a monofosfato que es un producto intermedio (Selle *et al.*, 2010). Pruebas *in vitro* han demostrado que la capacidad de la fitasa tiene diferente estereoespecificidad para la desfosforilación del fitato, sin embargo esta función *in vivo* ha sido deducida de suposiciones ya que podría estar involucrada en otros procesos (Greiner y Konietzny, 2011).

Existen varias clasificaciones de las fitasas dependiendo de factores como el tamaño, estructura y mecanismo catalíticos. Referente al mecanismo catalítico se clasifican en fitasas ácidas de histidina (HAPhy, es la única clase disponible en productos comerciales en la actualidad), fitasas ácido púrpura (PAPhy), fitasas de cisteína (CPhy), fitasas β -hélice (BPPhy). Respecto al pH óptimo se han dividido en fitasas ácidas y alcalinas; y si es dependiendo del carbón en el anillo inositol donde se inicia la desfosforilación se definen tres tipos: 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8), 6-fitasa (E.C.3.1.3.26) y 5-fitasa (E.C. 3.1.3.72) (Li *et al.*, 2010). Generalmente se estipula que las 6-fitasa se encuentra en vegetales y 3-fitasa en microorganismos, más aún, existen algunas excepciones como el caso de la soya que es 3-fitasa y *E. coli* es 6-fitasa (Angel *et al.* , 2002). Las 6-fitasas son capaces de desfosforilar el ácido fítico en su totalidad, mientras las 3-fitasas no pueden hidrolizar las unidades de esterres (Wodzinski y Ullah, 1996).

Las fitasas pueden ser encontradas en plantas, individuos y microorganismos. En los vegetales la presencia de esta enzima permite dar paso al proceso de la germinación mediante la liberación de minerales, fosfatos e inositol (Greiner *et al.*, 2005). Su presencia se ha establecido en cereales como la avena, arroz, triticale, trigo, entre otros, donde varía su contenido y características específicas de temperatura y pH (Touchburn *et al.*, 2006). En un estudio realizado por Eeckhout y De Paepe (1994) determinaron las cantidades de fitasa contenida en 51 alimentos de uso común en Bélgica, indicando que de los cereales el arroz es el que más contenido posee seguido del triticale, trigo y avena. En el caso del sorgo, fue situado en la lista de los alimentos con menor contenido de fitasa, con, un contenido promedio de 24 unidades kg^{-1} comparado con 5130 unidades kg^{-1} que contiene el arroz.

Es importante destacar que ésta enzima no tiene importancia en la producción de alimentos, puesto que es inactivada por las altas temperaturas empleadas en el proceso (acepta temperaturas entre 40-60°C)(Wodzinski y Ullah, 1996) y por la susceptibilidad a pH ácidos, siendo valores cercanos a 5 los óptimos para su desempeño (Angel *et al.* , 2002).

Por otro lado se ha definido la capacidad de diferentes especies para producir fitasas en el tracto gastrointestinal; para el caso de las aves de corral, se demostró la presencia de una fosfatasa no específica en el intestino del pollo de engorda de 4 semanas y gallina de postura de 50 semanas de edad; además se estableció que existe mayor acción de la enzima en el duodeno, seguido del yeyuno e íleon en ambos animales, pero en las gallinas la producción de fitasa es mayor hasta en 35% comparada con el pollo de engorda (Maenz y Classen, 1998). Así mismo, la cantidad de fitasa y fosfatasas en el tracto intestinal son mayores en dietas con bajo contenidos de fósforo, lo que demuestra la capacidad del ave para adaptarse (McCuaig y Motzok, 1972).

Otra fuente de la enzima está dado por la flora microbiana inata del tracto intestinal; ésta fuente de enzimas es fundamental en el caso de los animales poligástricos, pero muy reducida en animales monogástricos como las aves. Según Selle (2007) son pocos los estudios que consideran la influencia de la fitasa generada por la flora microbiana en aves de corral; no obstante ésta fuente de la enzima desempeña un papel importante en la degradación de los fitatos (Kerr *et al.*, 2000).

Por último y no menos importante, se encuentran las fitasas provenientes de microorganismos exógenos; éstas enzimas han sido introducidas desde la época de los noventa como aditivos en alimentos de consumo humano y concentrados para aves de corral y cerdos, principalmente. En la actualidad en el mercado existen enzimas comerciales provenientes de *Aspergillus niger*, *Peniophora lycii*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Escherichia coli* (Greiner y Konietzny, 2011), los cuales como se puede apreciar pertenecen a dos fuentes de enzimas de origen microbiano: las fúngicas y bacterianas cada una con características específicas de desempeño. Las fitasas de origen fúngico generalmente se consideran 6 fitasas y se estima que tienen un rango de acción con tendencia a pH básicos y las de origen bacteriano generalmente pertenecen al tipo 3 fitasa con un rango de acción de pH tendientes a medios ácidos.

En general las enzimas son susceptibles a cambios drásticos en la temperatura ambiental por provocarles una desnaturalización de su estructura proteíca. En el caso de las fitasas comerciales se ha encontrado que a 70°C en solución acuosa, la enzima proveniente de *A. niger* es por poco más estable a estas condiciones que la de *P. lycii* seguida de *E. coli*. Resultados similares fueron encontrados en experimentos realizado sen dietas peletizadas (Simon y Igbasan, 2002).

En este contexto cabe destacar que la temperatura es un elemento fundamental en el momento de la elaboración de alimentos siendo de mayor consideración los alimentos peletizados. Por tal motivo se han buscado alternativas que permitan la inclusión de la fitasa luego de los procesos térmicos como un dosificador líquido de la misma, sin embargo, los costos que esto implica ha provocado la consideración por parte de los productores. De tal manera que con los adelantos genéticos de hoy en día, se está optando por mejorar la termoestabilidad de las fitasas y así asegurar al usuario mejores resultados.

2.4.1 Pruebas para medir la eficacia *in vitro*

Las pruebas *in vitro* para medir la eficacia de una enzima según las recomendaciones de la AOAC, estipula hay que realizarlas a pH de 5.5; respecto a esto, Bedford (2000) que sería mejor su realización a un valor de 3.0, ya que son los valores más cercanos al medio gástrico donde la enzima comercial hace su mayor trabajo. Las afirmaciones se basan en estudios donde al evaluar la eficacia de una enzima en pH de 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 y 5.5 se encontró mejor correlación de las variables desempeño productivo y cenizas de tibia en ensayos *in vivo* con pollo de engorda a pH de 3.0.

Otro punto interesante de resaltar es el hecho que este tipo de pruebas expresan la actividad de las fitasas en FTU (Unidades de fitasa); una FTU es definida como la cantidad de enzima que es necesaria para liberar 1 μ mol de fosfato inorgánico proveniente de una solución de 5.1 mM de fitato de sodio a pH 5.5. y 37°C en un minuto (Engelen *et al.*, 1994).

2.4.2 Rango de pH de fitasas de origen microbiano

El pH también afecta directamente la enzima dependiendo del estado aniónico de la misma; al igual que las proteínas, la fitasa tiene la capacidad de cambiar su carga especialmente por el componente carboxilo y amino de los aminoácidos constituyentes de la misma, que provoca en ésta una desnaturalización e incapacidad para realizar su función. En este sentido se acepta la existencia de un rango en el perfil de pH de la fitasa como concepto básico para su empleo y se ha encontrado que provoca la diferencia de acción entre las fitasas microbianas al implementarse en dietas para aves y cerdos (Greiner y Konietzny, 2011).

En general se ha reportado que a las fitasas a excepción de las provenientes de *Bacillus* y *Enterobacter*, tienen un rango de pH para su actividad de 4-6 (Konietzny y Greiner, 2002), pero varían dependiendo si el origen es de plantas o microorganismos. Como en el caso del arroz, cuya fitasa tiene un pH óptimo de 6 (Greiner RK, 1998), mientras la del *A. niger* lo presenta pH 5 y 2.8 (Greiner *et al.*, 2009) y la de *Malaysian waste water* en 4.5 (Greiner y Farouk, 2007); de lo anterior se deduce que las dos fitasas microbianas difieren de 1.5-3.5, mientras la fitasa del arroz tiene mayor actividad de 6-8 pero es menor su eficacia a 5.5 si se compara con las fitasas microbianas (Figura 3).

En tal caso, las fitasas microbianas son más estables en pH menores a 3.0 y por encima de 8.0, mientras que la mayoría de fitasas de las plantas son afectadas por valores menores a 4 y por encima de 7.5. En éste sentido, se encontró que las fitasas proveniente de *E. coli*, *A. niger* y *Malaysian waste water*, no pierden significativamente su actividad enzimática al ser expuestas a pH de 2.0 y 4°C por varias horas (Greiner *et al.*, 2005; Greiner *et al.*, 2009; Greiner y Farouk, 2007).

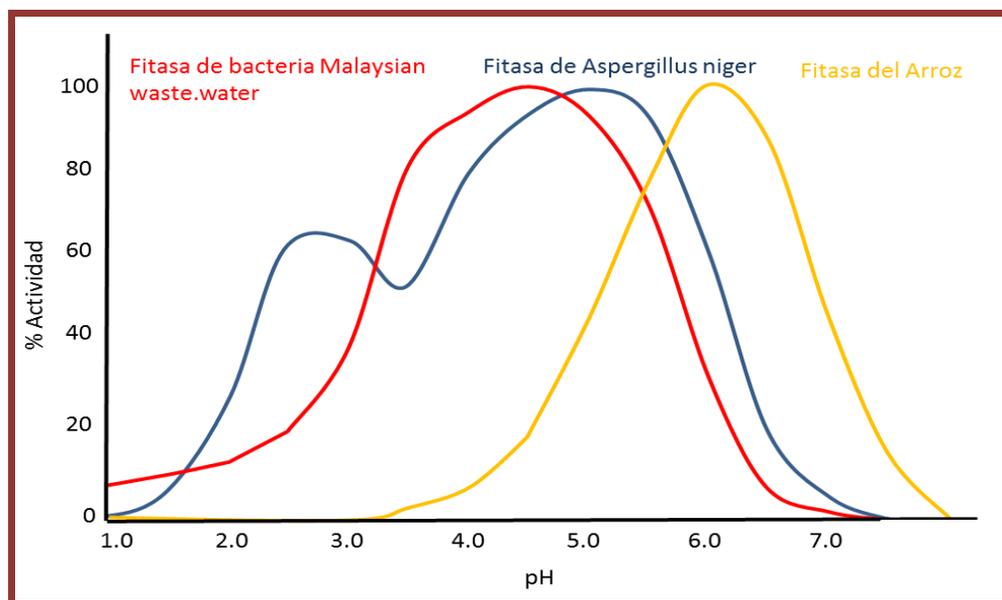


Figura 3. Rango de pH en diferentes fitasas. Fitasa del arroz (Greiner et al., 1998), *Aspergillus niger* (Greiner et al., 2009) y bacteria Malaysian waste-water (Greiner y Farouk, 2007).

Fuente: Tomado de Greiner *et al.* (2009).

Por lo anterior y teniendo en cuenta que las fitasas comerciales son del tipo ácido histidina, se hipotetiza que éstas enzimas son capaces de resistir el pH del tracto digestivo, pero que pueden ser susceptibles a otros factores internos como al ataque por parte de enzimas proteolíticas propias del animal y al ambiente electrostático del medio; Como ejemplo se tiene el cambio que muestra la fitasa de *E. coli* y *A. niger* al introducirlas en una sustancia búfer y sales al medio (Ullah *et al.*, 2008).

Según Greiner (2011) fitasas como las provenientes de *E. coli*, *Klebsiella terrígena*, del arroz, avena y cebada tienen un perfil de pH más estrecho que otras fitasas como la de *Aspergillus fumigatus* (capaz de mantener su actividad en un 80% a pH de 4-7.3)(Wyss *et al.* , 1999), *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus terreus*, *Myceliophthora thermophile* y *Yersinia rohdei*.

Otro punto esencial es el lugar donde se lleva a cabo la acción de la enzima en el tracto digestivo. Se ha encontrado que la enzima tiene mayor capacidad de acción en

la zona del proventrículo y buche para el caso de las aves de corral (Selle y Ravindran, 2007; Bedford, 2000; Greiner y Konietzny, 2011). En éste lugar se alcanzan los valores de pH más ácidos del tracto gastrointestinal de las aves; debido a ello se establece que una de las características deseables de las fitasas es la capacidad de resistencia a pH ácidos con el fin de que pueda realizar su acción adecuadamente y sea estable a cambios en el pH del medio en el tracto intestinal.

2.4.3 Acción de las enzimas proteolíticas

Estudios *in vitro* han demostrado la susceptibilidad de las fitasas a la acción de enzimas proteolíticas como la pepsina y la pancreatina. Se ha concluido que las fitasas provenientes de las plantas son las más atacadas, seguidas de las fitasas ácidas de origen fúngico y por último las bacterianas (Simon y Igbasan, 2002; Elkhilil *et al.*, 2007; Igbasan *et al.*, 2000).

En este contexto, se encontró que las fitasas bacterianas provenientes de *E. coli*, *Klebsiella spp.* y *Malaysian waste water bacterium* conservaban un 80% de la actividad cuando se exponen a la digestión de la pepsina, mientras que las provenientes de *A. niger* y *P. lycci* solo conservan en 26-42% y 2.20% respectivamente. En el caso de la pancreatina las fitasas bacterianas retienen más del 90%, mientras la de *A. niger* sostiene solamente 23-34% de la actividad y la proveniente de *P. lycii* fue inactivada (Greiner y Konietzny, 2011).

Sin embargo estudios *in vivo*, muestran resultados más favorables en la resistencia de las fitasas a la proteólisis por enzimas internas (Simon y Igbasan, 2002; Elkhilil *et al.*, 2007; Igbasan *et al.*, 2000). En tal caso, *B. subtilis* obtuvo una actividad de 68% en el estómago, mientras la de *A. niger* de 60-70% en el estómago y de 55-94% en intestino delgado y *P. lycii*, de 59% en estómago y de 85-95% en intestino delgado (Greiner y Konietzny, 2011). Estos resultados pueden ser consecuencia de la disponibilidad de otros sustrato protéicos para las enzimas internas y a la capacidad de la fitasa de unirse a las moléculas de fitatos que las hace más estable.

2.5 pH intestinal del ave

CUADRO 2. pH del tracto digestivo de pollo de engorda.

Órgano	Sturkie (1976)	Gao <i>et al.</i> (2008)	Murai <i>et al.</i> (2001)	Rynsburger y Classen (2007)
	**	21 días	17 días	2-15 días
Buche	4.51	4.9	5.9	5.0-6.0
Proventrículo	4.8	5.4	3.2	3.4-5.0
Ventrículo	2.5	4.9	3.4	3.3-3.5
Duodeno	5.7-6.0	6.1	--	6.4-6.6
Yeyuno	5.8-5.9	6	--	6.5-6.8
Íleon	6.3-6.4	--	6.4	--
Recto	6.3	--	--	--
Ciego	5.7	--	--	--
Bilis	5.9	--	--	--

Fuente: Tomado de Denbow (1999) y Ward (2009).

Se ha documentado que el tracto digestivo se presentan diferentes valores de pH provocado por mecanismos biológicos interno del animal. En el caso de las aves al igual que en otros individuos existen moléculas reguladoras del pH interno del tracto digestivo con el fin de llevar a cabo los procesos normales. Hormonas como la gastrina, colecistoquinina y polipéptido pancreático estimulan la secreción de ácido, necesario en gran parte para la activación de la pepsina.

En caso contrario, y con el objeto de amortiguar la secreción de los iones hidronios, se produce la secretina que estimula la producción de bicarbonato. Existen varios estudios que han determinado los valores de pH en el tracto digestivo; algunos se muestran en el Cuadro 2.

Sin embargo los rangos de pH normal pueden verse alterados por cambios en la dieta tal como es el caso del uso de materias primas con alto contenido de fibra

(Jiménez *et al.*, 2009), del tipo de flora microbiana endógena, la adición de ácidos orgánicos, entre otros.

2.6 Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos se han empleado por más de 30 años como aditivos en alimentos para animales con el fin de reducir el crecimiento de organismos patógenos y preservar las características higiénicas de los mismos. En la actualidad existe una gama amplia de productos acidificantes con mezclas de ácidos tanto de cadena larga como corta.

Los ácidos orgánicos tienen varios efectos: en el alimento, como permitir su inocuidad y reducir el pH. Además, se ha demostrado su capacidad para mejorar la digestión y absorción de nutrientes, y de igual manera aportar al requerimiento energético del animal, provocar la formación de complejos con agentes catiónicos y actuar como un agente antibacterial, siendo esta su función más favorable (Freitag, 2007). Sin embargo, la característica que es de interés para éste trabajo es la de reducir el pH en el proventrículo e intestino delgado, con lo cual se aumenta la actividad de la enzima.

En el caso de la reducción de pH en el tracto intestinal, se ha demostrado que solo los ácidos orgánicos aislados tienen esta capacidad más no las sales de los mismo. Un punto a tener en cuenta es que la propiedad de los ácidos para acidificar el medio depende de la capacidad de disociación del ácido; a valores bajos de pK, los ácidos fuertes son capaces de liberar hidronios al medio. Generalmente se toma el pK de 3 como el valor que determina a los ácidos fuertes; por tal motivo el ácido láctico (pK 3.08), fumárico y cítrico son más fuertes que el fórmico acético y propiónico (Kirchgessner y Roth, 1991).

3. JUSTIFICACIÓN

La adición de fitasa en alimento para gallina de postura es una práctica cada vez más frecuente por los efectos positivos que ha demostrado tener en la disponibilidad de nutrientes como el fósforo, mejorando los rendimientos productivos. En las últimas décadas se ha evaluado la eficacia de las fitasas en varios estudios, demostrando la posibilidad de reducir los niveles de inclusión de fósforo inorgánico en el alimento y de esta manera bajar el potencial contaminante de las excretas. No obstante, este planteamiento necesita ser constatado en condiciones productivas propias para cada país.

Adicionalmente, estudios *in vitro* se ha demostrado que el fitato tiende a ser más soluble de tal manera que la adición de moléculas capaces de acidificar el medio como los ácidos orgánicos en las dietas podrían potencializar la acción de fitasas exógenas al aumentar el rompimiento de las moléculas de fitato. Así, los elementos de la estructura interna del fitato como el fósforo y minerales con afinidad de ser quelados por la molécula como el calcio y cinc estarían más disponibles para el metabolismo del animal.

Con la realización de la presente investigación se aporta información actual sobre la acción de la fitasa en dietas con niveles bajos de fósforo disponible en condiciones productivas propias del país y el efecto que la acidificación del medio gástrico provoca sobre la acción de la enzima. Mediante la determinación del fósforo, calcio y cinc en hueso, la deposición en yema de huevo y la excreción de los mismos se definió el efecto que la fitasa ejerce en la disponibilidad de dichos minerales y su relación con el desempeño productivo del ave.

4. HIPÓTESIS

La inclusión de ácido láctico potencializa la acción de una fitasa adicionada en dietas a base de sorgo y pasta de soya para gallina de postura Hy-Line de 49 semanas de edad mejorando los parámetros productivos y la asimilación de fósforo, calcio y cinc por parte del ave.

La adición de fitasa en dietas a base de sorgo y pasta de soya con niveles de fósforo disponible bajos (0.12 mg/kg) mejora los parámetros productivos y y la asimilación de fósforo, calcio y cinc por parte del ave.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la inclusión de una fitasa y ácido láctico en dietas a base de sorgo y pasta de soya sobre la utilización de fósforo, calcio y cinc en gallina de postura Hy-Line de 49 semanas de edad.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de fitasa y ácido láctico incluidos en la dieta a base de sorgo y pasta de soya sobre los parámetros productivos en gallina de postura Hy-Line a partir de las 49 semanas de edad.
- Medir la calidad interna (pigmentación y unidades Haugh) y externa (groso de cascarón) del huevo así como la resistencia a la ruptura del hueso en gallina de postura Hy-line de 49 semanas de edad con la inclusión de fitasa y/o ácido láctico en dieta a base de sorgo y pasta de soya.
- Establecer el pH del contenido gastrointestinal en gallina de postura alimentada con dieta a base de sorgo y pasta de soya y suplementadas con fitasa y/o ácido láctico.
- Determinar el contenido de fósforo, calcio y cinc en hueso, yema de huevo y excretas de gallina Hy-Line alimentadas con dietas a base de sorgo que incluyen fitasa y/o ácido láctico.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Prueba biológica

El presente ensayo se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (C.E.I.E.P.Av.) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, el cual se localiza a un altura de 2250 msnm, en el paralelo 19° 17' latitud norte y el meridiano 99°02'30" longitud oeste.

Aves: Se emplearon cincuenta gallinas de postura comercial de la línea Hy Line W36 de 49 semanas de edad alojadas en jaulas individualmente.

Alimento: Se emplearon cinco dietas equivalente a los tratamientos evaluados (Cuadro 3). Las dietas se formularon a base de sorgo y pasta de soya según los requerimientos nutricionales sugeridos por la casa genética para la estirpe y por los requerimientos asignados de acuerdo a los intereses de la prueba: calcio total de 3.5% y fósforo disponible de 0.25% y 0.12%. No se realizó ajuste a la matriz de materias primas por la liberación de nutrientes de la enzima. Se empleo ácido láctico industrial del 64% en polvo en el alimento. Las dietas se elaboraron en la planta de procesamiento del centro cada cuatro semanas y se suministró dos veces por semana con una ración diaria de 92 g/ave.

Manejo de la prueba: Las cincuenta aves fueron distribuidas en los cinco tratamientos con diez réplicas de un ave. Los tratamientos fueron identificados con colores para evitar errores en la toma de datos. Las aves seleccionadas, se alojaron al azar en jaulas individualmente y alimentadas con la dieta correspondiente al tratamiento. Las dimensiones de la jaula fueron de 45 cm de alto, 30 cm de ancho y 45 cm de fondo; el comedero fue de canal de 30 cm por ave y los bebederos de tipo niple. Durante los primeros 7 días se realizó el cambio de las aves que presentaban postura irregular. El

experimento se llevó por dieciseis semanas durante las cuales se alimentaron a las aves con las dietas, y se tomaron los datos concernientes a parámetros productivos.

CUADRO 3. TRATAMIENTOS EMPLEADOS EN LA PRUEBA BIOLÓGICA.

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
CP	CONTROL POSITIVO (DIETA BASE) SIN FITASA, SIN ÁCIDOS ORGÁNICOS (P disponible(0.25 %), Ca total (3.5%) y Zn (30 mg/kg dieta))
CN	CONTROL NEGATIVO (DIETA BASE) SIN FITASA, SIN ÁCIDOS ORGÁNICOS (P disponible (0.12%), Ca (3.5%) y Zn (30 mg/kg dieta))
CN+ AL	T2 + ÁCIDO LÁCTICO (5 g/kg alimento)
CN+F	T2 + FITASA (Fitasa 450 FTU /kg alimento)
CN+AL+F	T3 + FITASA (fitasa 450 FTU /kg alimento)

CP= Control Positivo; **CN=** Control Negativo; **CN+AL=** Control Negativo + Ácido Láctico; **CN+F=** Control Negativo + Fitasa; **CN+AL+F=** Control Negativo + Ácido Láctico + Fitasa

Parámetros productivos: Se registraron y determinaron semanalmente las siguientes variables durante de catorce semanas (sin tener en cuenta la primera por ser la etapa de adaptación y última semana del experimento por corresponder a la toma de muestras).

- Consumo de Alimento. El consumo se cuantificó restando el peso del alimento no consumido al suministrado en cada semana.
- Peso del Ave. Se determinó el peso individual de las aves a las 49 semanas de vida y cada cuatro semanas, antes del suministro del alimento.
- Peso del Huevo. La información se obtuvo cada día, reportando semanalmente el peso promedio del huevo en cada unidad experimental.

- Porcentaje de Producción Semanal. Se obtuvo multiplicando el número de huevos producidos semanalmente por gallina por 100 y dividiéndolo entre el número de días de la semana.
- Conversión Semanal. Se estableció dividiendo los gramos de alimento consumidos entre los gramos de huevo producido semanalmente.
- Masa de Huevo Semanal Ave. Se obtuvo multiplicando el número de huevos producidos semanalmente por el peso del mismo.
- Porcentaje de Mortalidad Semanal. Durante el tiempo del experimento no se presentó muerte de las aves.

Calidad de huevo: Se realizó cada cuatro semanas y cada prueba se realizó a partir de una muestra de un huevo por réplica, el cual fue evaluado el mismo día de postura para evitar que se alterará la altura de la albúmina. Se determinó las unidades Haugh y pigmentación y grosor del cascarón sin membranas internas con micrómetro manual.

6.2 Prueba de pH intestinal

Al finalizar la etapa de experimentación las aves fueron llevadas a la sala de necropsias del departamento de aves en la FMVZ. Una por una a las aves se les realizó eutanasia utilizando el fármaco EUTAFIN® (Pentobarbital Sódico, Fenitoina Sódica, Cipermetrina y Glucosa) a una dosis de 1ml/5 kg suministrado por vía intravenosa; se esperó aproximadamente un minuto para corroborar la muerte del animal por reflejo de parpadeo.

Tras la muerte y en el menor tiempo posible se extrajo el sistema digestivo completo. El contenido de buche, proventrículo, ventrículo, duodeno, yeyuno e íleon se extrajo y se diluyeron en un volumen semejante de agua bidestilada acorde a la cantidad de muestra extraída. En el caso que no hubiera contenido, el órgano fue lavado internamente con el agua. A continuación se obtuvo el valor de pH del contenido con el potenciómetro Conductronic pH 20 calibrado; se fueron determinando los valores de los tratamientos en orden ascendente iniciando por el

tratamiento uno seguido del dos, tres, cuatro y por último el tratamiento cinco. Además de la determinación del pH, se obtuvieron muestras de las dos tibias.

Con el fin de determinar si el tiempo transcurrido en la toma de muestra influyó sobre los valores de pH, se realizó un análisis de asociación lineal entre el tiempo transcurrido en la toma de muestra y los valores de pH.

6.3 Análisis de laboratorio

6.3.1 Resistencia a la ruptura en hueso

La tibia derecha de las cincuenta gallinas fueron limpiadas de tejido muscular y cartílago, posteriormente se pesaron y determinó la resistencia a la ruptura (fractura) por flexión estática con el equipo IMADA.

6.3.2 Alimento y materia prima

En las cinco dietas experimentales y en el sorgo se determinó el fósforo fítico total y susceptible a la enzima, mediante el kit enzimático Megazyme®. La concentración de la enzima en los tratamientos cuatro y cinco fue cuantificada cada vez que se fabricó el alimento por la técnica de Basu *et al.* (2007).

6.3.3 Determinación de minerales en hueso, yema de huevo y excretas

Las determinaciones de los minerales se realizaron en el laboratorio de Nutrición de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Obtención de las muestras

Huevo: Las muestras de huevos fueron recolectadas durante los últimos cinco días de experimentación y se refrigeraron a 10°C; a partir de un “pool” de tres yemas por réplica se realizó el análisis de minerales. Las yemas fueron congeladas a 4°C, liofilizadas durante 48 horas y molidas para su almacenamiento.

Excretas: Las excretas fueron recolectadas durante tres días consecutivos en lapsos de 24 horas y se refrigeraron a 10°C. Las muestras fueron congeladas a 4°C,

liofilizadas por 72 horas y molidas para su almacenamiento. El contenido total de muestra por réplica fue pesado con el fin de obtener una estimación de la producción en materia seca de las excretas.

Hueso: La tibia izquierda fue limpiada de tejido muscular y cartílago y partida por la mitad. Ambas mitades fueron desengrasada con éter etílico en un extractor soxhlet por 4 horas y deshidratada a 50°C por 48 horas. El hueso fue partido longitudinalmente y mediante un raspado se obtuvo la médula ósea; el resto de la muestra fue el hueso compacto (Figura 4). La mitad proximal del hueso se escogió para realizar los análisis y la distal fue almacenada.



Figura 4. Muestras de hueso compacto y médula ósea de la tibia izquierda

Fuente: Autor

Contenido de cenizas en hueso y excretas: Las muestras fueron pesadas e incineradas en mufla a 500°C por 17 horas; las cenizas obtenidas fueron pesadas para determinar el porcentaje de cenizas por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Ceniza} = \text{Peso de cenizas} * 100 / \text{Peso de la muestra}$$

En el caso del hueso se determinó en el hueso compacto y en hueso medular obtenido por cada réplica; pero para las excretas se realizó a partir de un gramo de muestra. Las muestras se trabajaron por duplicado a excepción del hueso medular que se manejó individualmente debido a la cantidad de muestra obtenida.

Elaboración de la solución madre: Las cenizas obtenidas en el paso anterior fueron disueltas en 15 ml de ácido clorhídrico a 0.008 N por 15 minutos a 200°C, tras lo cual el contenido fue filtrado y diluido a 25 ml.

Determinación de calcio y cinc en hueso y excretas: EL contenido se determinó con el método de absorción atómica en el equipo Perkin Elmer modelo 3110. Para la lectura de cada mineral se realizó una dilución acorde a la curva de calibración en cada muestra. En el caso del cinc, la lectura se realizó a un alongitu de onda de 214 nm y el calcio a 240 nm, usando como combustibles aire comprimido y acetileno. La concentración del mineral se determinó por medio de la ecuación obtenida en la curva de calibración.

Determinación de fósforo en hueso y excretas: Se determinó con el método de espectrofotometría de UV visible en el equipo Genesys 10 por medio de la técnica 958.01 de la AOAC (1990).

Determinación de minerales en yema de huevo: Se utilizaron las técnicas aprobadas por la AOAC (2005) correspondientes a la 3.4.1 para el fósforo, 4.8.04 para el calcio y 9.1.09 para el cinc y hierro.

6.4 Análisis estadístico

Se empleo un diseño experimental completamente aleatorizado de cinco tratamientos correspondientes a las dieta y con diez réplicas siendo la unidad experimental un ave alojada en jaula. Todos los datos fueron analizados para comprobar los supuestos de normalidad y homocedasticidad con un nivel de significancia de 5%. Para el análisis se empleó el programa estadístico Statistical Package for Social Sciences versión 19.0.0 (2010).

Los datos de parámetros productivos en las 14 semanas se sometieron a un análisis de varianza con arreglo factorial de tratamiento, tiempo y bloqueo de las réplicas para disminuir la variabilidad en los datos; en aquellos datos con resultados estadísticos

significativos se les realizó una prueba de Tukey para la comparación de las medias de los tratamientos. El modelo que explica el análisis es el siguiente:

$$y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \alpha_j + \beta_k + (\alpha\beta)_{ik} + \varepsilon_{ijkl}$$

$$1 \leq i \leq 5; 1 \leq j \leq 10; 1 \leq k \leq 14$$

Dónde,

y_{ijkl} = l -ésima observación del i -ésimo tratamiento, j -ésima réplica y k -ésimo tiempo.

μ = Media general.

τ_i = Efecto del i -ésimo tratamiento.

α_i = Efecto de la j -ésima réplica.

β_k = Efecto del k -ésimo tiempo.

$(\alpha\beta)_{ijk}$ = Interacción del i -ésimo tratamiento y k -ésimo tiempo.

ε_{ijkl} = Error experimental aleatorio .

Aunque el análisis formal para éste tipo de datos es evaluar los tratamientos a lo largo del tiempo, no fue posible realizarlo dado el exceso en el número de observaciones; por tanto se consideró realizar el análisis con una estructura factorial tomando el tiempo como un factor.

Para el análisis de la variable peso del ave y calidad de huevo, pH del contenido gastrointestinal, resistencia a la ruptura del hueso, minerales en hueso, médula ósea, yema de huevo y excretas se llevó a cabo un análisis de varianza; aquellos resultados que fueran estadísticamente significativos se les aplicó una prueba de Tukey y un análisis por contrastes, donde, los contrastes se formularon con el fin de responder si existe un efecto de la acidez en la acción de la enzima. El modelo que explica el análisis es el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ijk}$$

$$1 \leq i \leq 5; 1 \leq j \leq 10$$

Dónde,

y_{ijk} = k -ésima observación del i -ésimo tratamiento y j -ésima réplica.

μ = Media general.

τ_i = Efecto del i -ésimo tratamiento.

ϵ_{ijk} = Error experimental aleatorio.

Con el objetivo de analizar la asociación entre los valores de pH del contenido gastrointestinal y el tiempo transcurrido en la toma de muestra, se realizó un análisis de regresión lineal simple. Dado que se requirió diez horas para el sacrificio de las aves, en promedio la variable tiempo se toma un ave cada 12 minutos. EL modelo utilizado para el análisis:

$$y_t = \beta_0 + \beta_1 t + \epsilon_t$$
$$1 \leq i \leq 5; 1 \leq t \leq 50$$

Dónde,

y = pH del contenido del órgano.

β_0 = Intercepto a la ordenada del origen.

β_1 = Pendiente.

ϵ = Error experimental aleatorio.

Se realizó un análisis de correlación lineal simple de Pearson (Daniel, 1989) entre la prueba de resistencia a la ruptura y contenidos de cenizas, fósforo, calcio y cinc en hueso compacto.

Además se analizó la correlación lineal simple de Pearson (Daniel, 1989) entre el contenido de cenizas en hueso compacto con el contenido de fósforo, calcio y cinc en hueso compacto.

7. RESULTADOS

7.1 Alimento y materias primas

7.1.1 Ácido fítico

El contenido de ácido fítico en el sorgo fue de 0.87 g /100 g. En los tratamientos el contenido fue mayor, aproximadamente, de 0.96 g /100 g, excepto para el control positivo que mostró un contenido igual al del sorgo (Cuadro 5).

7.1.2 Fitato

El contenido promedio de las dietas fue de 0.27 g/100 g, lo cual representa aproximadamente el 27% del contenido de ácido fítico en las dietas (Cuadro 5).

7.1.3 Fitato susceptible

Para el caso del fitato susceptible a la enzima en los cinco tratamientos representa el 57% del contenido total de fitato. En todas las dietas existe sustrato para la acción de la fitasa (Cuadro 5).

7.1.4 Recuperación de la enzima

La cuantificación de la fitasa en el primer lote de alimento fue superior a la dosis estipulada, el contenido esperado era de 450 FTU y resultó en 1900 y 945 FTU para el tratamiento de fitasa y fitasa con ácido láctico respectivamente. En los siguientes dos lotes de alimento las concentraciones fueron más cercanas a las cantidades esperadas (Cuadro 5).

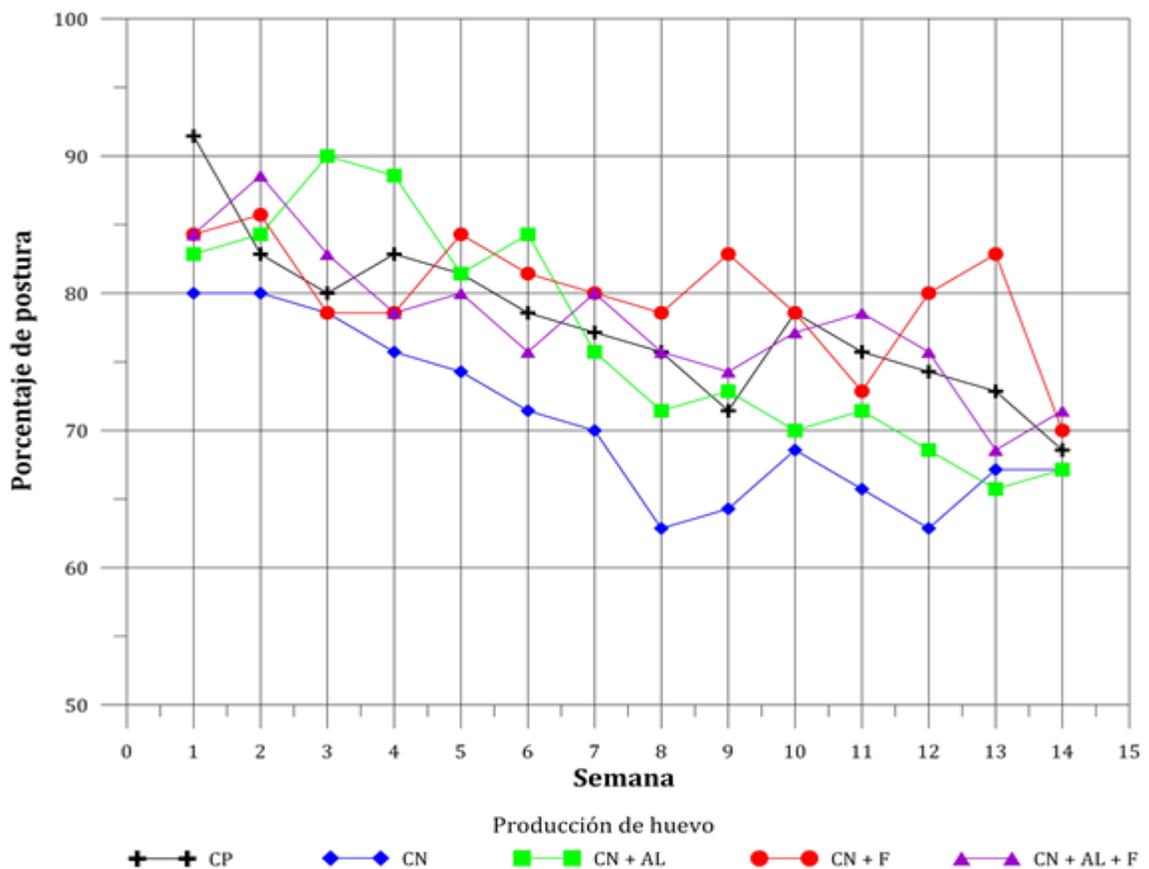
7.2 Parámetros productivos

7.2.1 Porcentaje de postura

Durante las catorce semanas el porcentaje de producción decreció en todos los tratamientos, iniciando con 85% y finalizando con 69% en promedio. Los

tratamientos que presentaron menor persistencia en la producción fue el control negativo y con la inclusión del ácido láctico (aunque éste al principio mostró un aumento). En cuanto a los demás tratamientos, se evidenció una persistencia más constante en el porcentaje de postura y entre ellos el mejor fue el tratamiento con la fitasa (Figura 5).

Figura 5. Porcentaje de postura en los cinco tratamientos durante las 14 semanas.



CP= Control Positivo; **CN=** Control Negativo; **CN+AL=** Control Negativo + Ácido Láctico; **CN+F=** Control Negativo + Fytasa; **CN+AL+F=** Control Negativo + Ácido Láctico + Fytasa

Respecto al análisis estadístico, los tratamientos no mostraron diferencia significativa en el tiempo ($p=0.881$) pero si se observó efecto por tratamiento y semana ($p=0.001$). En este sentido el control negativo tuvo menor porcentaje en

promedio (70.61%), seguido del tratamiento con ácido láctico (76.74%), control positivo y fitasa con ácido láctico (77.96%). El tratamiento con fitasa fue el que presentó mayor porcentaje de postura en promedio (79.90%) (Cuadro 6).

7.2.2 Peso de huevo

No se observó diferencia estadísticamente significativa en la interacción entre tratamientos y tiempo ($p=0.991$), ni efecto a través de las semanas ($p=0.999$) pero si respecto a los tratamientos ($p=0.001$). El control negativo presentó el menor peso en promedio (61.10 g), luego el tratamiento con ácido láctico (62.10 g), fitasa con ácido láctico (62.5 g), control positivo (62.92 g) y por último el tratamiento de fitasa (63.11 g) (Cuadro 6).

7.2.3 Consumo de alimento

En cuanto al consumo no se evidenciaron diferencia estadística a través del tiempo entre los tratamientos ($p=0.850$) y de igual manera de las semanas ($p=0.951$). Si se detectó efecto de tratamiento ($p= 0.001$) donde el control negativo fue diferente al resto de tratamientos y el menor (84.29 g), seguido del tratamiento con ácido láctico (86.83 g), control positivo (88.10 g) y por último los tratamientos con fitasa (88.25 g) y fitasa con ácido láctico (89.97 g) (Cuadro 6).

7.2.4 Índice de conversión

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas a través del tiempo ($p=0.518$) pero si en efecto de tratamiento y semana ($p=0.001$). En este caso, el control negativo presentó un índice más alto (2.07) junto al tratamiento con ácido láctico (1.95); luego de éstos se ubicó el tratamiento con fitasa y ácido láctico (1.90), control positivo (1.86) y el de fitasa (1.79), que resultó ser el de mejor desempeño con una diferencia del 0.3 si se compara con el control negativo (Cuadro 6).

7.2.5 Masa de huevo

No se encontró interacción del tiempo con los tratamientos ($p=0.533$), sin embargo tanto las semanas como los tratamientos si mostraron diferencias estadísticas

($p=0.001$). El tratamiento con fitasa presentó 50.33 g, siendo el mayor rendimiento seguido del control positivo con 49.01 g, fitasa con ácido láctico 48.72 g, el tratamiento con ácido láctico 47.53 g y por último el control negativo con 43.48 (Cuadro 6).

7.2.6 Huevo roto, sucio y fáfara

En el huevo roto se encontró un efecto del tiempo en los tratamientos ($p=0.049$), de semanas ($p=0.007$) y de tratamientos ($p=0.001$). El huevo en fáfara no evidenció diferencia estadística a través del tiempo respecto a los tratamiento ($p=0.114$), pero sí en el efecto de las semanas ($p=0.029$) y tratamientos ($p=0.001$). En la variable huevo sucio no se encontraron diferencias estadísticas en el tiempo por tratamiento ($p=0.492$) ni de tratamiento ($p=0.396$) pero si de semanas ($p=0.043$) (Cuadro 6).

Para el caso del total de sucio, roto y fáfara, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el efecto de tiempo por tratamiento, semanas y tratamiento ($p=0.023$, 0.001 y 0.001). Respecto a la diferencia por tratamiento de ésta última variable, el control negativo y tratamiento con ácido láctico presentaron los porcentajes más altos con (8.46 y 6.28% respectivamente), seguido del tratamiento con fitasa y ácido láctico (2.31%), el de fitasa (1.92%) y por último el control positivo (0.86%) (Cuadro 6).

7.2.7 Peso vivo de las aves

El peso de las aves al inicio del experimento no mostró diferencias estadísticas significativa entre los tratamientos ($p=0.975$), por el contrario al finalizar la etapa de investigación donde si se observaron diferencias ($p=0.042$). De tal modo que en la variable peso al finalizar, el control negativo y tratamiento con ácido láctico fueron los de menor peso (1347 y 1352 g) seguido de los tratamientos fitasa con ácido láctico (1436 g), fitasa (1455 g) y control positivo (1459 g) (Cuadro 7).

7.2.8 Pruebas de calidad en huevo

En las pruebas de pigmentación y grosor de cascarón no se encontraron diferencias significativas ($p=0.55$). Para las unidades Haugh se observaron diferencia en los

contrastes del tratamiento con fitasa y ácido láctico, al compararlo con el de fitasa ($p=0.01$) y ácido láctico ($p=0.02$) (Cuadro 7).

7.3 Prueba de pH gastrointestinal y resistencia a la ruptura de la tibia

7.3.1 Prueba de pH gastrointestinal

Los resultados de las medias en buche, proventrículo y ventrículo evidenciaron diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p<0.005$) pero no en duodeno, yeyuno e íleon ($p>0.005$). En el caso del buche el control positivo presentó un pH menor respecto a los tratamientos con ácido láctico, control negativo, ácido láctico con fitasa y el de fitasa, que fue el menos ácido.

En cuanto al proventrículo el control positivo presentó un pH más bajo respecto al control negativo, tratamiento con ácido láctico, fitasa y ácido láctico con fitasa, el cual resultó ser el menos ácido. Respecto al ventrículo el control positivo mostró el pH más ácido junto al control negativo; éstos fueron seguidos del tratamiento con ácido láctico, fitasa y ácido láctico con fitasa (Cuadro 8).

Cuándo se realizó el análisis de asociación lineal entre el tiempo transcurrido en la toma de muestra y el valor de pH del contenido gastrointestinal, se encontró que fue diferente estadísticamente significativo ($p<0.05$) en los órganos de buche, proventrículo y ventrículo pero no en el duodeno, yeyuno e íleon ($p>0.05$) (Cuadro 11).

7.3.2 Prueba de ruptura de tibia

La prueba de resistencia a la ruptura no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamiento ($p= 0.624$). No obstante el control positivo presentó una mayor resistencia y el tratamiento con ácido láctico la menor (Cuadro 7).

AL evaluar el grado de asociación entre la prueba de resistencia a la ruptura de tibia y el contenido de fósforo, calcio y cinc en hueso, no fue estadísticamente significativo ($p>0.05$) por lo cual no existe un grado de asociación entre dichas variables (Cuadro 12).

7.4 Minerales en hueso compacto, médula ósea, excretas y yema de huevo

7.4.1 Hueso compacto

Muestra deshidratada y cenizas: El peso de hueso deshidratado fue estadísticamente diferente entre los tratamientos ($p= 0.02$). El control negativo resultó ser inferior a los demás (3.82 g); éste fue seguido por el control positivo (4.04 g), el tratamiento con ácido láctico (4.09 g), ácido láctico con fitasa (4.26 g) y por último el de fitasa (4.31 g). Éste último tratamiento tuvo 10% más del peso total en promedio de hueso que el control negativo (Cuadro 9).

Las cenizas no mostraron diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p= 0.358$), sin embargo el tratamiento con ácido láctico y fitasa tuvieron mayor contenido. Al evaluar el grado de asociación entre el contenido de cenizas y el de fósforo, calcio y cinc, la relación fue altamente significativa ($p<0.05$) (Cuadro 9).

Contenido de minerales: El contenido de calcio y fósforo no mostró diferencia entre los tratamientos ($p>0.05$), aunque aquellos con fitasa presentaron mayores cantidades. El contenido de cinc fue estadísticamente significativo ($p=0.002$); el control negativo y el tratamiento con ácido láctico presentaron el menor contenido (0.478 y 0.485 mg) y el tratamiento de fitasa y ácido láctico el mayor (0.597 mg). El control positivo y el tratamiento con fitasa tuvieron contenidos medios (0.515 y 0.556 mg). En general al disminuir los niveles de fósforo disponible el contenido de minerales en el hueso disminuyó (Cuadro 9).

7.4.2 Médula ósea

Muestra deshidratada y ceniza: El contenido total de médula ósea deshidratada fue diferente estadísticamente significativo ($p=0.001$), siendo el control negativo y el tratamiento con ácido láctico los de menor cantidad (0.39 g), seguido por el tratamiento con fitasa, control positivo (0.51 y 0.54 g) y finalmente el de ácido láctico y fitasa (0.61 g); éste último tratamiento tuvo 36% aproximadamente más que el control negativo. Los resultados de las cenizas en las muestras de médula ósea no se reportan dada la variabilidad de los datos entre las muestras (cuadro 9).

Contenido de minerales: El contenido de fósforo mostró significancia ($p=0.001$), donde el control negativo resultó ser menor (18.56 mg) al tratamiento con fitasa; éste fue seguido del tratamiento con ácido láctico (19.52 mg), control positivo (25.04 mg), ácido láctico con fitasa (29.71 mg) y por último el que contenía fitasa (30.05 mg). Respecto al calcio, el control negativo presentó una menor cantidad (17.93 mg), seguido del control positivo (22.18 mg), tratamientos con ácido láctico (24.60 mg), ácido láctico con fitasa (34.04 mg) y por último el tratamiento con fitasa (35.83 mg) (Cuadro 9).

En cuanto al cinc, se encontraron diferencias estadísticas ($p=0.001$); el tratamiento con ácido láctico y control negativo tuvieron menos cantidad (0.053 y 0.055 mg); el control positivo un valor medio (0.08 mg) y por último el tratamiento con fitasa y ácido láctico con fitasa, tuvieron los valores más altos (0.098 y 0.119 mg). En general se encontró que al disminuir la cantidad de fósforo disponible se reduce la cantidad de minerales en la médula y que al aumentar los niveles de fósforo disponible e incluir la fitasa se aumentan (Cuadro 9).

7.4.3 Huevo

Contenido mineral: El contenido de fósforo y cinc no fueron diferentes estadísticamente significativos ($p>0.05$), pero si para el calcio y hierro ($p= 0.001$). Para el caso del calcio el tratamiento con ácido láctico fue el menor (47.16 mg), seguido del control negativo (49.68 mg) y de los tratamientos ácido láctico con fitasa (51.48 mg), fitasa (53.64 mg) y por último el control positivo (54.36 mg). En el hierro

el tratamiento con ácido láctico (1.48 mg) y el control negativo (1.60 mg) tuvieron los contenidos más bajos, seguido de los tratamientos de fitasa (2.01 mg), ácido láctico con fitasa (2.10 mg) y el control positivo (2.14 mg) es decir, 31% más cantidad al compararse con el tratamiento más bajo que es el ácido láctico. Se evidencia que la cantidad de fósforo y cinc no se ven afectados por la disponibilidad de fósforo en la dieta y la acción de la fitasa; en el calcio y sobre todo en el hierro una mayor cantidad de fósforo disponible aumenta los niveles de éstos minerales en la yema de huevo (Cuadro 10).

7.4.4 Excretas

Materia seca y cenizas: La cantidad de materia seca en las excretas fue diferente significativamente ($p=0.015$); el control positivo presentó menor cantidad de excretas (7.26 g), seguida del tratamiento con fitasa (7.83 g), ácido láctico con fitasa (8.41 g), control negativo (8.60 g) y por último el tratamiento con ácido láctico (9.07 g). Respecto a las cenizas, no se evidenciaron diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p=0.06$), aunque en la comparación por contrastes el control positivo resulto ser diferente a los demás tratamientos (Cuadro 10).

Contenido de minerales: El contenido de fósforo resultó ser diferente ($p=0.010$), donde los tratamientos con fitasa (86.72 y 90.13 mg) tuvieron menos contenido respecto al de ácido láctico (103.20 mg), control negativo (109.53 mg g) y control positivo (116.81 mg); en este sentido, el control positivo presentó un 23% más de contenido en fósforo que los tratamientos con fitasa. Por lo cual se demuestra que cantidades mayores de fósforo disponible en la dieta provocan mayor contenido de fósforo en las excretas y que al incluir fitasas, se presenta una disminución (Cuadro 10).

El contenido de calcio en las excretas no mostró diferencias estadísticas ($p=0.071$) entre las medias de los tratamientos; sin embargo existe una tendencia del control positivo de eliminar menor cantidad que los otros tratamientos. Por último, respecto al cinc, éste resulto ser diferente ($p=0.046$), donde el tratamiento con fitasa fue el de

menor cantidad (25.44 mg) junto con el control positivo (25.92 mg), seguido del tratamiento con ácido láctico (26.12 mg), ácido láctico con fitasa (30.20 mg) y por último el control negativo (31.23 mg). Por tanto, cantidades bajas de fósforo disponible produce excretas con mayor cantidad de cinc (Cuadro 10).

8. DISCUSIÓN

8.1 Parámetros productivos

El desempeño en parámetros productivos en gallinas de postura y pollo de engorda suplementados con fitasa y ácidos orgánicos en la dieta, ha sido reportado en investigaciones a nivel internacional, aunque con características experimentales propias tales como el tipo de fitasa y ácido orgánico, los niveles de fósforo disponible y calcio total, la edad y línea del ave, entre otras.

8.1.1 Porcentaje de postura

En el presente estudio, el porcentaje de postura se vió afectado por los niveles de 0.12% de fósforo disponible en la dieta. Cuando se adicionó ácido láctico y fitasa, solo o en conjunto, el porcentaje mejoró, pero en los tratamientos con fitasa el incremento fue más marcado; no obstante, la combinación del ácido con fitasa no mostró mejor desempeño que el tratamiento con fitasa. Resultados similares se reportan por Sharafat *et al.* (2009) y Nezhat *et al.* (2011); por el contrario, Mustafa *et al.* (2012) encontraron mejores resultados al incluir la fitasa y ácido orgánico juntos respecto al tratamiento con fitasa.

Son varios los estudios donde se demuestra que el uso de las fitasas mantiene la producción de huevo más constante a través del tiempo y de ésta manera permite resultados con desempeños similares respecto a dietas con niveles de fósforo disponible cercanos a 0.25% (Boling *et al.*, 2000; Keshavarz, 2000; Lim *et al.*, 2003; Vallardi *et al.*, 2002; Keshavarz, 2003; Francesch *et al.*, 2005). Keshavarz (2000) encontró que cuando se reduce el contenido de fósforo disponible en varias etapas de producción de 0.40% a 0.15%, el porcentaje de postura se veía afectado en las gallinas de más edad y que al suplementar la fitasa la disminución en la producción de huevo cesaba. Por otra parte existen estudios que contradicen tales resultados (Silversides *et al.*, 2006; Jalalm y Scheideler, 2001; Panda *et al.*, 2005). En el caso de las dietas con

fósforo disponible de 0.12% la incidencia de la patología de fatiga de jaula en el presente estudio provocó marcadas caídas en la postura por lo cual la producción de huevo no fue constante, concordando con lo reportado por Mustafa *et al.* (2012).

La inclusión de ácidos orgánicos en la dieta de aves ha mostrado mejorar la postura en diferentes etapas del ciclo. Sin embargo, reportes de investigaciones en la actualidad se han enfocado más en el efecto que los ácidos orgánicos tienen en el control de bacterias (Dibner y Buttin, 2002; Desai *et al.*, 2007; Aydin *et al.*, 2010); en el caso del ácido láctico esta situación ha sido frecuente (Byrd *et al.*, 2001; Adil *et al.*, 2010), por lo cual este trabajo enfoca la información de otra manera al evaluar el efecto de la inclusión de ácido láctico y fitasas en gallinas de postura al final de su ciclo de producción.

8.1.2 Consumo de alimento

La disminución del consumo del alimento que se encontró en éste estudio en dietas con niveles de fósforo de 0.12% ha sido señalado ya en otras investigaciones (Sharafat *et al.* , 2009; Mustafa *et al.* , 2012; Boling *et al.* , 2000; Keshavarz, 2000; Keshavarz, 2003). Gallinas que consumen dietas deficientes en minerales, especialmente fósforo presenta trastornos metabólicos con un efecto indirecto adverso sobre el consumo del alimento (Suttle, 2010).

También un aumento en el consumo se obtuvo cuando la fitasa fue adicionada, lo cual concuerda con lo que se ha reportado anteriormente (Sharafat *et al.* , 2009; Nezhad *et al.* , 2011; Brenes *et al.*, 2003). Cuando el ácido orgánico y la fitasa se suplementaron, la deficiencia en la dieta se corrigió en cierta manera por lo cual el consumo aumentó, aunque, en el caso de la fitasa se observó un incremento si se compara con dietas de niveles de fósforo disponible 0.25%. Respecto al ácido láctico, Adil *et al.* (2010) no encontraron en pollo de engorda cambios en el consumo. Además, las gallinas del tratamiento con ácido láctico y fitasa presentaron un mayor consumo que las del tratamiento solamente de fitasa.

8.1.3 Peso del huevo

Existe evidencia que el peso del huevo se ve afectado por los niveles de fósforo disponible en la dieta. En la presente investigación, la dieta con fósforo disponible de 0.12% provocó un menor peso y cuando la cantidad de fósforo disponible fue de 0.25% el peso fue mayor. Ceylan *et al.* (2003) mostraron que al disminuir el contenido de fósforo no fítico, el peso de huevo disminuía. Keshavarz (2000) indicó diferencia de peso en huevo en gallinas de 54 a 66 semanas de edad con la adición de fitasa en aves, aunque no en las más jóvenes. Al contrario, Gordon y Roland (1997) no encontraron diferencia en el peso del huevo en aves de 23 a 40 semanas.

En cuanto a los aditivos, la inclusión de ácido láctico mejoró el peso del huevo, igualmente la adición de fitasa sola o combinada con ácido láctico incrementó el peso pero en mayor proporción. Resultados similares en cuanto a la adición de fitasa sola, han sido reportados (Silversides *et al.* , 2006; Gordon y Roland, 1998; Punna y Roland, 1999) aunque también algunos autores indican que la fitasa no contribuye a un mejor peso del huevo en etapas tardías de postura (Boling *et al.* , 2000; Scott *et al.*, 2000; Carlos y Edwards, 1998). Nezhad *et al.* (2011) reportaron que el uso combinado de fitasa y ácidos orgánicos, así como el uso solo de fitasa y niveles de fósforo disponible en dieta de 0.3% mejoraban el tamaño del huevo, concordando con lo que se reporta en el presente estudio. Resultados diferentes fueron encontrados por Mustafa *et al.* (2012) puesto que la combinación de fitasa y ácidos orgánicos provocó una disminución en el peso, llegando a ser menor que el tratamiento con 0.1% de fósforo disponible.

8.1.4 Masa de huevo

Dada la disminución tanto del porcentaje de postura como del peso del huevo, la masa producida en el caso de la dieta con fósforo disponible bajo fue menor, contrario a las aves que se alimentaron con niveles más altos. El incluir ácido láctico reflejó un mejoramiento intermedio. Los tratamientos con fitasa mostraron mejores resultados

y aún más cuando se empleó sin el ácido láctico, lo cual es similar a resultados anteriores (Silversides *et al.*, 2006; Jalalm y Scheideler, 2001).

8.1.5 Índice de conversión

El tratamiento de fitasa al tener un consumo medio, una producción mayor y mejor peso de huevo, presentó un índice de conversión más bajo. No obstante, al adicionar el ácido a la fitasa el consumo subió y la producción de huevo y peso bajaron, provocando que el índice de conversión aumentara.

Las gallinas con la dieta con 0.25% de fósforo disponible, presentaron menor producción y peso de huevo que el tratamiento con fitasa por lo cual aunque su consumo fue menor, el índice de conversión fue mayor. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Sharafat *et al.* (2009), Nezhat *et al.* (2011), Mustafa *et al.* (2012) y Keshavarz (2003) para los niveles bajos de fósforo y uso de la fitasa. Respecto al ácido láctico, las gallinas presentaron un desempeño medio dado el aumento en la producción y peso del huevo.

8.1.6 Huevo sucio, roto y en fáfara

La presentación de huevo en fáfara y roto se incrementó en los tratamientos con bajos niveles de fósforo disponible y con ácido láctico. Cuando existe una deficiente disponibilidad de los minerales como el calcio, fósforo y cinc hacen que su deposición en la matriz proteica no sea la adecuada para formar una cáscara fuerte y por tanto la presencia de huevo en fáfara y roto aumenta (McAnena, 2005). En este estudio la adición de fitasa logró disminuir la incidencia, con porcentajes similares a las dietas con 0.25% de fósforo. El huevo sucio aunque fue mayor en los tratamientos bajos en fósforo disponible, no demostró diferencia estadística ni relación en la aplicación de los tratamientos.

8.1.7 Peso vivo

El peso de las aves al inicio de la experimentación no fue diferente entre los tratamientos, pero sí lo fue al finalizar la etapa de investigación. Las gallinas con el

tratamiento con 0.12% de fósforo disponible y el de ácido láctico disminuyeron aún más su peso comparadas con las de dietas de 0.25% de fósforo disponible e inclusión de fitasa, las cuales mantuvieron un peso mayor. Existen reportes similares (Nezhad *et al.* , 2011; Mustafa *et al.* , 2012; Keshavarz, 2003; Panda *et al.* , 2005; Akyurek *et al.*, 2011), mostrando que las aves con menor cantidad de fósforo disponible en la dieta presentan un bajo consumo y mayor pérdida de peso como mecanismo compensatorio para contrarrestar las cantidades menores de fósforo en la dieta. Esta reducción en el peso se debió posiblemente a la disminución en la grasa corporal y composición ósea. Caso contrario se observó cuando los niveles disponibles de fósforo en la dieta fueron mayores. No obstante, el peso de todas las aves disminuyó durante la etapa de investigación posiblemente provocado por la restricción en la ración diaria.

8.1.8 Pruebas de calidad en huevo

La pigmentación, unidades Haugh y grosor de cascarón no se afectaron por el contenido de fósforo disponible en la dieta. Resultados similares han sido reportados por Jalalm y Scheideler (2001) y Panda *et al.* (2005). No obstante, en otras investigaciones se ha demostrado que la inclusión de fitasa mejora la calidad cuando se determina por el método de gravedad específica (Keshavarz, 2003; McAnena, 2005; Sohail y Roland, 2000).

El grosor de cascarón ha sido relacionado con la fuerza a la ruptura de la cascara, a mayor grosor existe mejor resistencia a la ruptura. Por lo cual se esperaría que con el déficit de minerales en la dieta, no se diera una deposición correcta en el proceso de formación en la matriz orgánica del cascarón, de tal manera que la cáscara sería más delgada y potencialmente frágil. No obstante, los resultados obtenidos en grosor de cascarón contrastan con el aumento en la incidencia de huevo roto en la dieta con niveles de fósforo disponible de 0.12%.

Solomon citado por McAnena (2005) afirma que es importante determinar el efecto del uso de fitasa en la distribución de los minerales en la cáscara, puesto que en un

déficit de minerales podría afectar la deposición para la formación del cascarón pero no a nivel de la capa mamilar, la cual es la encargada de dar solidez a la cáscara. De tal manera que para tener un mejor concepto de la calidad de la cáscara, podría ser más útil determinar la estructura de las capas y membranas que constituyen la misma.

8.2 Prueba de pH gastrointestinal y resistencia a la ruptura en tibia

8.2.1 pH gastrointestinal

Los valores obtenidos de pH en el presente estudio son menos ácidos, sobre todo en órganos como el proventrículo y ventrículo cuando se compara con los valores reportados en estudios anteriores (Denbow, 1999; Ward, 2009). Dichos resultados pudieran ser producto de la técnica, es decir que la dilución del contenido en agua bidestilada provocó un pH más básico por disminuir las proporciones de hidronios en el medio. En este sentido, Smulikowska *et al.* (2008) reporta haber diluido el contenido gastrointestinal de pollo de engorda y obtuvo valores similares a la presente investigación.

Aunque se detectaron diferencias entre los tratamientos en órganos como el buche, proventrículo y ventrículo, éstos resultados no concuerdan con el uso en algunos tratamientos del ácido láctico. No obstante, se ha demostrado que uno de los principales efectos de los ácidos orgánicos en animales monogástricos es la disminución del pH en los órganos digestivos (Freitag, 2007). En éste sentido Byrd *et al.* (2001), señalaron que el suministro de ácido láctico en pollo de engorda provocó un pH más ácido en el buche cuando se comparó con el tratamiento control. Resultados similares se reportan por Humphrey *et al.* (1993) y Corrier *et al.* (1999). Por el contrario, Smulikowska *et al.* (2008) no encontraron diferencia en el pH de los órganos, excepto en el buche.

En el análisis de asociación lineal de los datos para ver el efecto del tiempo en la toma de muestra sobre el pH, se encontró que existía una relación lineal entre el

tiempo y el pH. Sin embargo, la asociación se estimó con menos del 30%. De tal manera que a medida que el tiempo transcurrió en la toma de muestra, el pH tuvo una tendencia al aumento, provocando que tratamientos con inclusión del ácido láctico presentaran valores más básicos que los controles. No obstante, referente a los tratamientos con fitasa que presentaron valores más básicos, Smulikowska *et al.* (2008) reportaron que la inclusión de fitasa provocó valores más básicos en el buche.

No se encontraron diferencias de pH en el duodeno, yeyuno e íleon; al respecto Aydi *et al.* (2010) no encontraron diferencias en el pH del intestino delgado cuando evaluó el efecto de una fitasa y ácido cítrico en pollo de engorda.

8.2.2 Resistencia a la ruptura

No se encontraron diferencias entre los tratamientos; éstos resultados coinciden con estudios previos de evaluación a la inclusión de una fitasa en dietas deficientes en fósforo (Gordon y Roland, 1997; Sohail y Roland, 2000). No obstante, hay resultados opuestos como el caso de Shaw *et al.* (2010) quienes indican mayor resistencia a la ruptura de tibia de pollo de engorda alimentados con una reducción de 0.10% en fósforo no fítico y adición de fitasa.

Aunque no se encontraron una asociación estadísticamente significativa entre la fuerza de ruptura y el contenido de minerales, el cinc resultó ser el mineral con mayor posibilidad de estar relacionado en el proceso de ruptura que el calcio y fósforo. Por tanto, es posible que el contenido de este mineral en hueso sea uno de los factores que provoque cambios en la fuerza de resistencia.

8.3 Minerales en hueso compacto, médula ósea, excretas y yema de huevo

8.3.1 Hueso compacto

El peso del hueso fue menor en la dieta con bajo niveles de fósforo y mayor con niveles de fósforo disponible más alto, adición de ácido láctico y fitasa solamente, o en

conjunto. Estudios anteriores han demostrado que el peso disminuye con dietas bajas en fósforo disponible (Akyurek *et al.* , 2011) y aumenta con la adición de fitasa (Brenes *et al.* , 2003). En contraste Keshavarz (2000) no encontró diferencia en el peso de la tibia a distintos niveles de fósforo disponible en la dieta y con la inclusión de fitasa.

El contenido de cenizas no se afectó por los tratamientos; Keshavarz (2000) reportó no encontrar diferencia en el contenido de cenizas con dietas bajas en fósforo al igual que Gordon y Roland (1997) y Sohail y Roland (2000). Sin embargo también existen reportes de aumento cuando se adicionó el ácido orgánico con la fitasa (Jalalm y Scheideler, 2001; Brenes *et al.* , 2003), y disminución de las cenizas con dietas bajas en fósforo disponible al compararse con las demás (Keshavarz, 2000; Brenes *et al.* , 2003; Smulikowska *et al.* , 2008).

Cuando se realizó la prueba de correlación del contenido de cenizas respecto al de minerales, el fósforo resultó ser el mineral más relacionado (82%), seguido del calcio (75%) y por último el cinc (62%); no obstante, en la prueba de resistencia a la ruptura el cinc fue el mineral con mayor probabilidad de estar relacionado.

Es importante tener en cuenta que en el presente estudio el ácido láctico presentó mejor contenido de cenizas que los demás, lo cual contrasta con lo reportado en otras investigaciones donde los contenidos mayores se ven en los tratamientos con fitasa (Akyurek *et al.* , 2011).

El contenido de fósforo en el hueso no fue afectado por la cantidad de fósforo disponible en la dieta ni por la adición de ácido láctico y/o fitasa. En éste mismo contexto la cantidad de calcio tampoco mostró cambio. Sin embargo para ambos minerales las cantidades fueron mayores en las dietas con la inclusión de fitasa (con o sin el ácido láctico) al compararse con el tratamiento con bajos niveles de fósforo disponible. Estudios previos han encontrado resultados similares (Brenes *et al.* , 2003; Akyurek *et al.* , 2011; Leeson *et al.*, 2000). Además se ha reportado que la retención intestinal de éstos minerales aumenta con el uso de fitasa (Um y Paik, 1999) por lo

cual se esperaría una mayor deposición de los mismos en los huesos como se presentó en esta investigación.

El cinc fue el único elemento que mostró diferencias entre los tratamientos; su cantidad fue afectada tanto por la disponibilidad de fósforo en la dieta como por la inclusión de fitasa. El contenido fue mayor en el tratamiento con fitasa y ácido láctico. Brenes *et al.* (2003) reportaron que cuando la disponibilidad de fósforo es baja, disminuye la concentración de cinc en hueso y que la adición de fitasa lo aumenta en pollo de engorda de 1-21 días de edad.

Además se ha reportado que la adición de fitasa produce mayor retención de cinc a nivel intestinal en gallina de postura (Um y Paik, 1999). La diferencia en el contenido de cinc posiblemente se dio por su mayor sensibilidad a cambios en la disponibilidad del mineral, ya que se ha demostrado que la principal reserva del cinc se encuentra en los huesos aunque en menor proporción que calcio y fósforo; de tal manera que se ha indicado que las reservas de cinc en el organismo son más sensibles a los cambios (McAnena, 2005).

8.3.2 Médula ósea

El peso total de la médula disminuyó en dietas con baja disponibilidad de fósforo y con la adición de ácido láctico; lo cual fue contrario al aumento con niveles altos de fósforo disponible y con la adición de la fitasa. Los resultados en minerales presentaron diferencias más marcadas acorde a los tratamientos que se aplicaron, lo cual contrasta con los resultados obtenidos en hueso compacto. Las diferencias entre tratamientos para el contenido de minerales que se encontraron en médula ósea, están relacionados con una mayor actividad en el proceso de intercambio mineral en el tejido óseo producto del aumento en la presencia de osteoclastos y osteoblastos en ésta zona (Sugiyama y Kusuhara, 2001; Dacke *et al.*, 1993). El contenido mineral de médula ósea, está influenciado por procesos de absorción y resorción ósea (Kim *et al.*, 2012), provocando un mayor intercambio con los minerales disponibles presentes en el organismo. De tal manera que mayores cantidades de minerales en médula ósea

demuestran un mayor contenido de minerales en el organismo y aumenta la disposición de los mismos como componente estructural de los huesos. En el caso de las ponedoras su importancia es mayor dada las necesidades de los mismos en la formación del huevo.

Dietas con niveles bajos de fósforo y adición de ácido láctico fueron las que menos contenido de fósforo, calcio y cinc presentaron en médula; y cuando se adicionó la fitasa el contenido aumentó significativamente, sobre todo para el caso del cinc. No se encontraron investigaciones previas donde el contenido en médula fuera evaluado. Sin embargo cuando la fitasa se combinó con el ácido láctico el contenido de fósforo y calcio no mejoró; la razón de éstos cambios se pueden ver desde dos puntos de vista: el primero se da suponiendo que al adicionar el ácido orgánico existe una mayor disponibilidad de fósforo soluble lo cual provoca un desbalance en la relación de Ca:P (Angel *et al.* , 2002); esto conlleva a cambios en el balance de los minerales y un efecto negativo en el desempeño (Brenes *et al.* , 2003). En el otro contexto, Sharafat *et al.* (2009) encontraron que el fósforo presente en el buche fue mayor cuando se combinó una fitasa y ácido cítrico que cuando se adicionó la fitasa sin el ácido, sugiriendo que la acción de la fitasa evaluada en ese ensayo pudo verse afectada con la adición del ácido orgánico.

8.3.3 Yema de huevo

No se encontraron diferencias en el contenido de fósforo y cinc en la yema de huevo, pero si para contenido de calcio y hierro. El contenido de calcio se redujo cuando las aves se alimentaron con dietas bajas en fósforo y ácido láctico. Contenidos mayores se encontraron con niveles superiores de fósforo en la dieta y con el uso de la fitasa individual y en combinación con el ácido láctico, sin que existiera una diferencia entre éstos últimos. No obstante, los resultados no están tan relacionados con la aplicación de los tratamientos a diferencia del hierro. En éste último, la concentración en la yema fue menor cuando se usó la dieta con fósforo disponible de 0.12% y ácido láctico si se compara con los tratamientos en los cuales se empleó 0.25% de fósforo y fitasa sin o

con ácido láctico. En un estudio previo Rodríguez *et al.* (2002) no encontraron diferencias en el contenido de fósforo y calcio en huevo al evaluar una fitasa y ácido cítrico. Sin embargo, resultados de contenido de hierro y cinc en yema de huevo no han sido reportados con anterioridad

Existen estudios en los cuales se ha buscado cambiar el contenido de minerales en yema y huevo completo, sobre todo en minerales trazas como cinc y hierro, (Richards, 1997; Richards y Packard, 1996; Dibner y Richards, 2005) teniendo en cuenta la implicación que esto tiene en el desarrollo del embrión cuando se trata de huevo fértil y del aporte nutricional que el huevo aporta al hombre. Se ha encontrado que es posible cambiar el contenido en ciertas condiciones, dependiendo de la forma química de los minerales y del contenido en el alimento, (Richards, 1997) aunque según Angel (2007) los cambios logrados son bajos. Los resultados han sido variables, en unos estudios se ha logrado conseguir una respuesta positiva y en otros no (Angel, 2007; Naber, 1979; Richards, 1997). Por otro lado se han encontrado casos donde el exceso en minerales en las dietas provocan una disminución en la producción (Yair y Uni, 2011).

El contenido de minerales en la yema de huevo es el reflejo de un control interno del ave para asegurar que las necesidades nutricionales del embrión sean cubiertas, de tal forma, que para el fósforo y cinc el contenido no varió. No obstante también depende de la disponibilidad de los minerales en el organismo (Richards y Packard, 1996). En este sentido, los minerales como el calcio y hierro demostraron ser más disponibles en dietas con alto contenido en fósforo disponible y en presencia de la fitasa, la cual se relaciona con la capacidad que posee el fitato de quelar cationes como el calcio y hierro (Maddaiah *et al.*, 1964). En el caso del calcio, el cambio no fue tan marcado dado que la principal reserva de éste mineral para el desarrollo embrionario se da en el cascarón (Yair y Uni, 2011).

La yema se ha identificado como el principal sitio de reserva de minerales trazas como hierro y cinc; Kienholz *et al.* (1964) y Stahl *et al.* (1988) han reportado que los

valores no se afectan por cambios en la dieta. Contrario en el presente estudio se demuestra que en dietas con déficit de fósforo, el contenido de hierro disminuye marcadamente. No obstante la adición de fitasa mejora el contenido en la yema, aunque el ácido láctico no la potencializa.

8.3.4 Excretas

La cantidad de excretas producidas fue mayor en las gallinas con el tratamiento con ácido láctico y menor en la dieta con 0.25% de fósforo disponible, similar a los tratamientos con fitasa. No obstante, el contenido de cenizas no fue afectado.

El uso de fitasas disminuyó aproximadamente en 24% la cantidad de fósforo presente en las excretas respecto al tratamiento con altos contenidos de fósforo disponible, lo cual concuerda con estudios reportados previamente (Lim *et al.* , 2003; Francesch *et al.* , 2005; Panda *et al.* , 2005; Rodríguez *et al.* , 2002). Según Simons *et al.* (1990) en pollo de engorda, el uso de fitasa puede llegar a reducir el contenido de fósforo en excretas hasta en 50%, lo cual concuerda con otros reportes (Żyła *et al.*, 2001; Paik, 2003). En estudios donde se ha medido el contenido de fósforo intestinal, se ha encontrado que la retención aumenta con el uso de fitasa sola (Li *et al.*, 2000) o con ácidos (Brenes *et al.* , 2003), concluyendo que el fósforo se mantiene en el cuerpo para cubrir la relación de procesos metabólicos internos con el calcio.

Sin embargo, teniendo en cuenta que en este estudio se desconoce el contenido de fósforo no fítico en las excretas, es posible especular que tanto el aumento de fósforo observado en las excretas en el tratamiento con bajo contenido de fósforo disponible, así como la disminución de fósforo con el uso de las fitasas hayan sido un reflejo del contenido de fósforo fítico presente en las excretas. Al contrario, en el caso de las dietas con alto fósforo disponible el contenido de fósforo en excretas sea por el fósforo inorgánico.

El calcio no mostró diferencias estadísticas; sin embargo en los tratamientos con baja disponibilidad de fósforo sin el uso de fitasas, la excreción fue mayor, probablemente por la disminución del fósforo disponible internamente ya que se ha

encontrado que bajos niveles de fósforo en plasma se correlacionan con altos niveles de calcio (Sebastian *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 1999). Igualmente en los tratamientos con fitasa la disponibilidad de calcio es mayor por lo cual su contenido en las excretas aumentó.

En el caso del cinc el contenido varió entre los tratamientos. Fue menor en los tratamientos con alto contenido de fósforo disponible, ácido láctico y fitasa contrario al tratamiento con bajo contenido de fósforo disponible. Esto puede relacionarse con lo reportado por Brenes *et al.* (2003) quienes encontraron que en dietas con déficit de fósforo, la retención de cinc en el organismo disminuía. Por otro lado el contenido de cinc fue mayor en el tratamiento con fitasa y ácido láctico respecto al tratamiento con fitasa, quizás por un aumento en la disponibilidad del mineral en estas aves lo cual concuerda con lo encontrado en el hueso.

En la actualidad a nivel mundial ha resurgido el interés por reducir la cantidad de contenido mineral en excretas mediante un mejor manejo nutricional (Nahm, 2007; Bruerton, 2005). En este estudio se demostró que en gallina alimentada con dietas con fitasa existió una disminución de 14% en el contenido de minerales respecto a dietas con bajos contenido de fósforo disponible. No obstante al comparar la inclusión de fitasa con dietas altas en fósforo disponible el contenido total aumento en 7%; éste cambio se dio principalmente por el contenido en calcio; por lo contrario a esto, se disminuyó el contenido de fósforo y cinc, los cuales son los minerales de mayor repercusión en los mantos freáticos a nivel mundial y por tanto de mayor control (Bennett y Elser, 2011; Ryssen, 2008). De esta manera se demuestra el potencial que aditivos como las fitasas tienen en disminuir los contaminantes al ambiente, representando así, una fuerte estrategia en la promoción de producciones pecuarias más racionales con los recursos naturales.

El contenido de minerales en hueso resultaron ser menores, pero más aún en médula ósea. Por tanto éste tipo de dieta tiene menos aporte de minerales comparada con la dieta de 0.25% de fósforo disponible y gracias a mecanismos compensatorios

internos en el ave la capacidad de producción de huevo se afectó medianamente en las semanas de experimentación. No obstante se desconoce hasta que etapa del ciclo una dieta con deficiencia en fósforo provoca producciones más ineficientes. El contenido de hierro en la yema de huevo disminuyó por la inclusión de 0.12% de fósforo disponible en la dieta y el contenido de minerales en excretas aumentó.

9. CONCLUSIONES

En gallinas alimentadas con dieta con niveles de fósforo disponible de 0.25% y calcio total de 3.5%, los rendimientos productivos fueron mejores que en dietas con menos contenido de fósforo. Los niveles de minerales en hueso compacto, médula ósea, yema de huevo y excretas demostraron ser adecuados para mantener dichos resultados productivos.

Cuando los niveles de fósforo disponible en la dieta fueron reducidos a 0.12% y se mantuvo el calcio total al 3.5%, los parámetros productivos se vieron afectados negativamente. El contenido de minerales en hueso disminuyó; en la yema de huevo el contenido de hierro fue menor que el de los demás tratamientos. No obstante, las excretas presentaron mayores cantidades de minerales. Estos resultados son causados por la poca disponibilidad de los minerales incluidos y quelados por el fitato.

En el caso de la adición de ácido láctico a la dieta, se observó una mejora en la producción de las gallinas y en los contenidos de fósforo, calcio y cinc en hueso. Mediante la acidificación del medio se produjo una mejor disponibilidad para las aves de los minerales provenientes del fitato.

Cuando se incluyó la fitasa en una dieta con 0.12% de fósforo disponible y 3.5% de calcio total, los rendimientos productivos mejoraron considerablemente. El consumo se regularizó, la producción de huevo mejoró y el peso vivo del ave fue mayor. Al evaluar el contenido de minerales en hueso y médula ósea se evidenció mayores cantidades que la obtenida con la dieta sin fitasa, por lo cual en proyección las aves alimentadas con fitasa tendrían mayores reservas de minerales para los procesos metabólicos internos y la formación del cascarón. El contenido de hierro en yema de huevo mejoró probablemente dado por una mayor disponibilidad de éste mineral. En las excretas se disminuyó su contenido de fósforo y cinc.

Al adicionar el ácido láctico junto a la fitasa, el rendimiento productivo de las aves no cambio respecto a la fitasa sola, aunque los valores fueron menores. El contenido en

minerales presentó cantidades similares al tratamiento con fitasa, excepto en el caso del cinc que resultó ser mayor.

La inclusión de fitasa y ácido láctico no mostró un mejor rendimiento productivo de las aves ni de contenido de fósforo, calcio y cinc en las muestras evaluadas estadísticamente, por lo cual no se logró el sinergismo esperado entre la fitasa y el ácido orgánico. La adición de la fitasa en dietas con bajos niveles de fósforo disponible (0.12%) mejora el comportamiento productivos y permite una mayor disponibilidad de fósforo, calcio y cinc en hueso y yema de huevo y disminuye el contenido de minerales contaminantes como el fosforo y cinc.

REFERENCIAS

1. KUMAR V, SINHA AK, MAKKAR HP, BECKER K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chem* 2010; 120 (4): 945-959.
2. BYE JW, COWIESON NP, COWIESON AJ, SELLE PH, FALCONER RJ. Dual effects of sodium phytate on the structural stability and solubility of proteins. *J. Agric. Food Chem* 2013; 61 (2): 290-295.
3. PONTOPPIDAN K, PETTERSSON D, SANDBERG AS. Interaction of phytate with protein and minerals in a soybean-maize meal blend depends on pH and calcium addition. *J Sci Food Agric* 2007; 87 (10): 1886-1892.
4. THOMPSON UU. *Phytic acid: A factor influencing starch digestibility and blood glucose response*. Minneapolis: Pilatus, 1986.
5. NAHM KH. Efficient phosphorus utilization in poultry feeding to lessen the environmental impact of excreta. *Worlds Poult Sci J* 2007; 63 (4): 625-654.
6. BENNETT E, ELSER J. A broken biogeochemical cycle. *Nature* 2011; 478: 29-31.
7. HAEFNER S, KNIETSCH A, SCHOLTEN E, BRAUN J, LOHSCHIEDT M, ZELDER O. Biotechnological production and applications of phytases. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 68 (5): 588-597.
8. SELLE H, RAVINDRAN V. Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim Feed Sci Technol* 2007; 135 (1): 1-41.
9. BEDFORD MR. Exogenous enzymes in monogastric nutrition - their current value and future benefitts. *Anim Feed Sci Technol* 2000; 86 (1): 1-13.
10. ANGEL R, TAMIM N, APLEGATE T, DHANDU A, ELLESTAD L. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. *J Appl Poult Res* 2002; 11 (4): 471-480.
11. LEI XG, PORRES JM. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnol Lett* 2003; 25 (21): 1787-1794.
12. GREINER R, KONIETZNY U. Phytases: biochemistry, enzimology and characteristics relevant to animal feed use. In: Partridge GG, Bedford MR, editores. *Enzymes in farm animal nutrition*. London: CAB international, 2011: 96-128.
13. SEBASTIAN S, TOUCHBURN SP, CHAVEZ ER. Implications of phytic acid and supplemental microbial phytase in poultry nutrition: a review. *Worlds Poult Sci J* 1998; 54 (1): 27-47.
14. FAO. FAOSTAT. 2012; Available from: <http://faostat3.fao.org/home/index.html>.
15. BRYDEN WL, SELLE PH, CADOGAN DJ, LI X, MULLER ND, JORDAN DR E et al. A review of the nutritive value of sorghum for broilers. RIRDC Publication 2009; 9: 077.
16. SELLE PH, CANDOGAN DJ, BRYDE WL. Implications of sorghum in broiler chicken nutrition. *Anim Feed Sci Technol* 2010; 156 (3): 54-57.
17. ROONEY LW, PFLUGFELDER RL. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. *J Anim Sci* 1986; 63 (5): 1607-1623.

18. SHI J, ARUNASALAM K, YEUNG D, KAKUDA Y, MITTAL G. Phytate from edible beans: chemistry, processing and health benefits. *Food Agr Environ* 2004; 2: 49-58.
19. RAVINDRAN V. Phytases in poultry nutrition. An overview. *Aust Poult Sci Symp* 1995; 7: 135-139.
20. DOS-SANTOS T. *El fitato como un anti-nutriente para aves y cerdos*. 2013; Available from: <http://www.tryadd.mx/index.php/2-sin-categoria/26-el-fitato-como-un-anti-nutriente-para-aves-y-cerdos>.
21. GRAF E, EMPSON KL, EATON J. Phytic acid. A natural antioxidant. *J Biol Chem* 1987; 262 (24): 11647 - 11650.
22. RAVINDRAN V, RAVINDRAN G, SIVALOGAN S. Total and phytate phosphorus contents of various foods and feedstuffs of plant origin. *Food Chem* 1994; 50 (2): 133-136.
23. REBOLLAR PG, MATEOS GG. El fósforo en nutrición animal. necesidades, valoración de materias primas y mejora de la disponibilidad. *Memorias XV Curso de Especialización. Avances en nutrición y alimentación animal. FEDNA* 1999: 19-64.
24. SINGH P. Significance of phytic acid and supplemental phytase in chicken nutrition: a review. *Worlds Poult Sci J* 2008; 64 (4): 553-580.
25. REDDY NR, SATHE SK, SALUNKHE DK. Phytates in legumes and cereals. *Adv Food Res* 1982; 28 (1): 1-91.
26. EECKHOUT W, PAEPE M DE. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Anim Feed Sci Technol* 1994; 47 (1): 19-29.
27. ODELL BL, BOLAND AR, KOIRTYOHANN SR. Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. *J Agric Food Chem* 1972; 20 (3): 718-721.
28. DOHERTY C, FAUBION JM, ROONEY LW. Semiautomated determination of phytate in sorghum and sorghum products. *Cereal Chem* 1982; 50: 373-377.
29. RAVINDRAN V, BRYDEN WL, KORNEGAY ET. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility in feedstuffs for broilers. *Poult Sci* 1999; 78 (5): 699-706.
30. GLENNIE CW, HARRIS J, NVDW, LIEBENBERG. Endosperm modification in germinating sorghum grain. *Cereal chem* 1983; 60: 27-31.
31. CHANG R, SCHWIMMER S, BURR HK. Phytate removal from whole dry beans by enzymatic hydrolysis and diffusion. *J Food Sci* 1977; 42 (4): 1098-1101.
32. CHERYAN M. Phytic acid interactions in food systems. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 1980; 13 (4): 297-335.
33. COSTELLO AJR, GLONEK T, MYERS TC. P nuclear magnetic resonance-pH titrations of myo-inositol hexaphosphate. *Carbohydr. Res* 1976; 46 (2): 159-165.
34. ERDMAN JW. Oilseed phytates: nutritional implications. *J Am Oil Chem Soc* 1979; 56 (8): 736-741.
35. PERSSON H, TURK M, NYMAN M, SANDBERG AS. Binding of Cu²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ to inositol Tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphate. *J Agric Food Chem* 1998; 46 (8): 3194-3200.
36. MADDAIAH VT, KURNICK AA, REID BL. Phytic acid studies. *Proc Soc Exptl Biol Med* 1964; 115 (2): 391-393.

37. VOHRA P, GRAY GA, KRATZER FI. Phytic acid-metal complexes. *Proc Soc Exptl Biol Med* 1965; 120 (2): 447-449.
38. SELLE PH, COWIESON AJ, RAVINDRAN V. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. *Livestock Science* 2009; 124 (1): 126-141.
39. BYRD CA, MATRONE G. Investigations of chemical basis of zinc-calcium-phytate interaction in biological systems. *Proc Soc Exp Biol Med* 1965; 119 (2): 347-354.
40. MAENZ DD, ENGELE-SCHAAN CM, NEWKIRK RW, CLASSEN HL. The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid insolubility and in a slurry of canola meal. *Anim Feed Sci Technol* 1999; 81 (3): 177-192.
41. RUTHERFORD SM, EDWARDS EC, SELLE PH, eds. *Effect of phytase on lysine-rich polard complexes*. Manipulating Pig Production, ed. CRANWELL P.D. Vol. 6. 1997, Australasian Pig Science Association: Werribee, Victoria.
42. NOSWORTHY N, CALDWELL RA. The interaction of zinc (II) and phytic acid with soya bean glycinin. *J Sci Food Agric* 1988; 44 (2): 143-150.
43. PRATTLE CA, STANLEY DW, VANDER FR. Protein-phytate interactions in soya beans. II. Mechanism of protein-phytate bindings affected by calcium. *J Food Chem* 1982; 6 (4): 255-271.
44. GIFFORD SR, CLYDESDALE FM. Interactions among calcium, zinc and phytate with three protein sources. *J Food Sci* 1990; 55 (6): 1720-1724.
45. THOMPSON DB, ERDMAN JW. Structural model of ferric phytate: implications for phytic acid analysis. *Cereal Chem* 1982; 59: 525-528.
46. SINGH M, KRİKORIAN AD. Inhibition of trypsin activity in vitro by phytate. *J Agric Food Chem* 1982; 30 (6): 799-800.
47. VAINTRAUB IA, BULMAGA VP. Effect of phytate on the in vitro activity of digestive proteinases. *J Agric Food Chem* 1991; 39 (5): 859-861.
48. CALDWELL RA. Effect of calcium and phytic acid on the activation of trypsinogen and the stability of trypsin. *J Agric Food Chem* 1992; 40 (1): 43-46.
49. LIENER IE, ed. *Anti nutritional factors in legume seeds: State of art*. In: HUISMEN, J, VAN DER POEL (Eds) ed. *Seeds Recent Advances of Research on Anti- nutritional Factors in Legume* 1989, T.F.B. & LIENER, I.E.: Pudoc, Wageningen, The Netherlands. 6 - 13.
50. SONG MK. Low-molecular weight zinc-binding ligand: a regulatory modulator of intestinal zinc transport. *Comp Biochem Physiol* 1987; 87: 223-230
51. DUNCAN JR, HURLEY LS. Thymidine kinase and DNA polymerase activity in normal and zinc-deficient developing rat embryos. *Proc Soc Exp Biol Med* 1978; 159 (1): 39-43.
52. PARK SY, BIRKHOLOD SG, KUBENA LF, NISBET DJ, RICKE SC. Review on the role of dietary zinc in poultry nutrition, immunity, and reproduction. *Biol Trace Elem Res* 2004; 101 (2): 147-163.
53. SONG MK, ADHAM NF. Evidence for an important role of prostaglandins E2 and F2 in the regulation of zinc transport in the rat. *J Nutr* 1979; 109 (12): 2152-2159.
54. CHAMPAGNE ET, FISHER MS. Binding differences of Zn(II) and Cu(II) ions with phytate. *J Inorg Biochem* 1990; 38 (3): 217-223.

55. WYSS M, PASAMONTES L, FRIEDLEIN A, REMY R, TESSIER M, KRONENBERGER A E et al. Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase): Molecular size, Glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. *Appl Environm Microbiol* 1999; 65 (2): 359-366.
56. LI R, ZHAO J, SUN C, LU W, GUO C, XIAO K. Biochemical properties, molecular characterizations, functions, and application perspectives of phytases. *Front Agric China* 2010; 4 (2): 195-209.
57. WODZINSKI RJ, ULLAH AHJ. Phytase. *Adv Appl Microbiol* 1996; 42: 263-303.
58. GREINER R, MUZQUIZ M, BURBANO C, CUADRADO C, PEDROSA MM, GOYOAGA C. *De novo synthesis of enzymes participating in phytate breakdown during germination of lentils (Lens culinaris var. Magda)*. In: Turner, B.L., Richardson, A.E. and Mullaney, E.J. (eds) *Inositol Phosphates in the Soil-Plant-Animal System: Linking Agriculture and Environment*. in *Proceedings of the Bouyoucos Conference on Inositol Phosphates in the Environment*. 2005. Sun Valley, Idaho, USA.
59. TOUCHBURN SP, SEBASTIAN S, CHAVEZ ER. Phytase in poultry nutrition. En *Recent developments in non-ruminant nutrition*. Nottingham: Nottingham University Press, 2006.
60. MAENZ DD, CLASSEN HL. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poult Sci* 1998; 77 (4): 557-563.
61. MCCUAIG LW, MOTZOK I. Regulation of intestinal alkaline phosphatase by dietary phosphate. *J Physiol Pharmacol* 1972; 50 (12): 1152-1156.
62. KERR MJ, CLASSEN HL, NEWKIRK RW. The effects of gastrointestinal tract micro-flora and dietary phytase on inositol hexaphosphate hydrolysis in the chicken. *Poult Sci* 2000; 79 (suppl 1): 11.
63. SIMON O, IGBASAN F. In vitro properties of phytases from various microbial origins. *Anim Feed Sci Technol* 2002; 37 (7): 813-822.
64. ENGELEN AJ, HEEFT EC VAN DER, RANDSDORP PHG, SMITH ELC. Simple and rapid determination of phytase activity. *J AOAC Int* 1994; 77 (3): 760-764.
65. KONIETZNY U, GREINER R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Anim Feed Sci Technol* 2002; 37 (7): 791-812.
66. GREINER R, KONIETZNY U, JANY KD. Purification and properties of a phytase from rye. *Journal of Food Biochemistry* 1998; 22 (2): 143-161.
67. GREINER R, SILVA L GOMES DA, COURI S. Purification and characterisation of an extracellular phytase from *Aspergillus niger* 11T53A9. *Braz J Microbiol* 2009; 40 (4): 795-807.
68. GREINER R, FAROUK A. Purification and characterisation of a bacterial phytase whose outstanding properties make it exceptionally useful as a feed supplement. *T Protein J* 2007; 26: 467-474.
69. ULLAH AHJ, SETHUMADHAVAN K, MULLANEY EJ. Salt effect on the pH profile and kinetic parameters of microbial phytases. *J Agric Food Chem* 2008; 56 (9): 3398-3402.
70. ELKHALIL EAI, MÄNNER K, BORRISS R, SIMON O. In vitro and in vivo characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens. *Br Poult Sci* 2007; 48 (1): 64-70.

71. IGBASAN FA, MÄNNER K, MIKSCH G, BORRISS R, FAROUK A, SIMON O. Comparative studies on the in vitro properties of phytases from various microbial origins. *Arch Anim Nutr* 2000; 53 (4): 353–373.
72. DENBOW DM, ed. *Gastrointestinal anatomy and physiology*. 3 ed. En Sturkie"s. Avian physiology, ed. Manoa University of Hawaii at1999, University of Hawaii at Manoa: Manoa.
73. WARD NE. Key considerations for phytase discussed. *Feedstuffs* 2009; 81: 2-5.
74. JIMÉNEZ E, GONZÁLEZ JM, COCA A, LÁZARO R, MATEOS GG. Effects of source of fibre on the development and pH of the gastrointestinal tract of broilers. *Anim Feed Sci Technol* 2009; 154 (1): 93-101.
75. FREITAG M. Organic acids and salts promote performance and health in animal husbandry. In: Lückstädt C, editores. *Acidifiers in animal nutrition: a guide for feed preservation and acidification to promote animal performance*. CAB Direct, 2007: 1-11.
76. KIRCHGESSNER M, ROTH FX. Ergotrope Effekte durch nutritiven Einsatz von organischen Säuren. [Nutritive effects of organic acids]. *Zentralblatt Für Hygiene Und Umweltmedizin* 1991; 191: 265-276.
77. BASU SS, WINSLOW S, NELSON A, ONO M, BETTS S. Extraction methods and assay for feed enzymes. WIPO 2007; WO/2007/002192:
78. AOAC. *Official Methods of Analysis*.15thed.Washington, DC:Association of Analytical Chemists, 1990.
79. *Official Methods of Analysis*.18thed.Arlington, VA.:Association of Analytical Chemists, 2005.
80. IBM® SPSS® STATISTICS VER. 19.0.0 ©COPYRIGHT SPSS INC. 1989 2010.:
81. DANIEL WW. *Base para Análisis de las Ciencias de la Salud Bioestadística México*, DF:Limusa, 1989.
82. SHARAFAT AA, DESIET BA, AL-KOURI S. The effect of calcium level, microbial phytase and citric acid on performance parameters and eggshell quality of laying hens fed corn soybean meal diet. *J Anim Vet Adv* 2009; 8: 1829-1837.
83. NEZHAD YE, SHIVAZAD M, TAHERKHANI R., NAZERADL K. *Effects of citric acid supplementation on phytate phosphorus utilization and efficiency of microbial phytase in laying hen*. 2011 [27/04/2013]; Available from: <http://www.aseanfood.info/Articles/11021848.pdf>.
84. MUSTAFA S, AHMET GÖ, MEHMET D, ÖZCAN C. Egg production and calcium-phosphorus utilization of laying hens fed diets supplemented with phytase alone or in combination with organic acid. *Int Jour Poul Sci* 2012; 11 (3): 181-189.
85. BOLING SD, DOUGLAS MW, JOHNSON ML, WANG X, PARSONS CM, KOELKEBECK KW E et al. The effects of dietary available phosphorus levels and phytase on performance of young and older laying hens. *Poult Sci* 2000; 79 (2): 224–230.
86. KESHAVARZ K. Nonphytate phosphorus requirement of laying hens with and without phytase on a phase feeding program. *Poult Sci* 2000; 79 (5): 748–763.

87. LIM HS, NAMKUNG H, PAIK IK. Effects of phytase supplementation on the performance, egg quality, and phosphorous excretion of laying hens fed different levels of dietary calcium and nonphytate phosphorous. *Poult Sci* 2003; 82 (1): 92-99.
88. VALLARDI M, MORALES R, ÁVILA E. Efecto de la adición de fitasa como fuente de fósforo inorgánico en dietas para gallinas de postura. *Tec Pecu Méx* 2002; 40 (2): 181-189.
89. KESHAVARZ K. Effects of continuous feeding of low-phosphorus diets with and without phytase during the growing and laying periods on performance of two strains of Leghorns. *Poult sci* 2003; 82 (9): 1444-1456.
90. FRANCESCH M, BROZ J, BRUFAU J. Effects of an experimental phytase on performance, egg quality, tibia ash content and phosphorus bioavailability in laying hens fed on maize- or barley-based diets. *Br Poult Sci* 2005; 46 (3): 340-348.
91. SILVERSIDES FG, SCOTT TA, KORVER DR, AFSHARMANESH M, HRUBY M. A study on the interaction of xylanase and phytase enzymes in wheat-based diets fed to commercial white and brown egg laying hens. *Poult Sci* 2006; 85 (2): 297-305.
92. JALALM MA, SCHEIDELER SE. Effect of supplementation of two different sources of phytase on egg production parameters in laying hens and nutrient digestibility. *Poult Sci* 2001; 80 (10): 1463-1471.
93. PANDA AK, RAO SV RAMA, RAJU MVLN, BHANJA SK. Effect of microbial phytase on production performance of White Leghorn layers fed on a diet low in non-phytate phosphorus. *Br Poult Sci* 2005; 46 (4): 464-469.
94. DIBNER JJ, BUTTIN P. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *J Appl Poult Res* 2002; 11 (4): 453-463.
95. DESAI DN, PATWARDHAN DS, RANADE AS, LÜCKSTÄDT C. Acidifiers in poultry diets and poultry production In: Lückstädt C, editores. *Acidifiers in animal nutrition: a guide for feed preservation and acidification to promote animal performance* CAB Direct, 2007: 63-69.
96. AYDIN A, PEKEL AY, ISSA G, DEMIREL G, PATTERSON PH. Effects of dietary copper, citric acid, and microbial phytase on digesta pH and ileal and carcass microbiota of broiler chickens fed a low available phosphorus diet. *J Appl Poult Res* 2010; 19 (4): 422-431.
97. BYRD JA, HARGIS BM, CALDWELL DJ, BAILEY RH, HERRON KL, MCREYNOLDS JL E et al. Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on salmonella and campylobacter contamination of broilers. *Poult Scie* 2001; 80: 278-283.
98. ADIL S, BANDAY T, BHAT GA, MIR MS, REHMAN M. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, and serum biochemistry of broiler chicken. *Vet Med Int* 2010; 2010: 1-7.
99. SUTTLE NF. *Mineral nutrition of livestock*. 4thed. Cambridge: CABI, 2010.
100. BRENES A, VIVEROS A, ARIJA I, CENTENO C, PIZARRO M, BRAVO C. The effect of citric acid and microbial phytase on mineral utilization in broiler chicks. *Anim Feed Sci Technol* 2003; 110 (1): 201-219.
101. ADIL S, TUFAIL B, GULAM AB, MASOOD SM, MANZOOR R. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, and serum biochemistry of broiler chicken. *Vet Med Int* 2010; 2010: 1-7.

102. CEYLAN N, SCHEIDELER SE, STILBORN HL. High available phosphorus corn and phytase in layer diets. *Poult Sci* 2003; 82 (5): 789-795.
103. GORDON RW, ROLAND DA. Performance of commercial laying hens fed various phosphorus levels, with and without supplemental phytase. *Poult Scie* 1997; 76: 1172-1177.
104. PUNNA S, ROLAND DA. Influence of supplemental phytase on calcium and phosphorus utilization in laying hens. *Poult Sci* 1998; 77: 290-294.
105. PUNNA S, ROLAND DA. Influence of supplemental microbial phytase on first laying hens fed phosphorus-deficient diets from day one of age. *Poult Sci* 1999; 78 1407-1411.
106. SCOTT TA, KAMPEN R, SILVERSIDES FG. The effect of phosphorus, phytase enzyme and calcium on the performance of layers fed wheat-based diets. *J Anim Sci* 2000; 80: 183-190.
107. CARLOS AB, EDWARDS HM. The effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and phytase on the natural phytate phosphorus utilization by laying hens. *Poult Sci* 1998; 77 (6): 850-858.
108. MCANENA L. Lessons in human mineral nutrition: what can we learn? In: Taylor-Pickard JA, Tucker LA, editores. *Re-defining mineral nutrition*. UK: Nottingham university press, 2005: 127-146.
109. AKYUREK H, OZDUVEN ML, OKUR AA, KOC F, SAMLI HE. The effects of supplementing an organic acid blend and/or microbial phytase to a corn-soybean based diet fed to broiler chickens. *Afr Jour Agri Res* 2011; 6 (3): 642-649.
110. SOHAIL SS, ROLAND DA. Influence of fitasa on calcium utilization in commercial layers. *J ApplPoultry Res* 2000; 9: 81-87.
111. SMULIKOWSKA S, CZERWIN SKI, MIECZKOWSKA A. Effect of an organic acid blend and phytase added to a rapeseed cake containing diet on performance, intestinal morphology, caecal microflora activity and thyroid status of broiler chickens. *J Anim Phys Anim Nut* 2008; 94 (1): 15-23.
112. HUMPHREY TJ, BASKERVILLE A, WHITEHEAD A, ROWE B, HENLEY A. Influence of feeding patterns on the artificial infection of laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. *Vet Rec* 1993; 132 (16): 407-409.
113. CORRIER DE, BYRD JA, HARGIS BM, HUME ME, BAILEY RH, STANKER LH. Survival of *Salmonella* in the crop contents of market-age broilers during feed withdrawal. *Avian Dis.* 1999; 43: 453-460.
114. SHAW AL, BLAKE JP, GORDON RW. Evaluation of commercial phytase enzymes on performance and tibia-breaking strength of male broiler chicks. *J Appl Poult Res* 2010; 19 (4): 415-421.
115. KESHAVARZ K. Reevaluation of nonphytate phosphorus requirement of growing pullets with and without phytase. *Poult Sci* 2000; 70: 1143-1153.
116. LEESON S, NAMKUNG H, COTTRILL M, FORSBERG CW. Efficacy of new bacterial phytase in poultry diets. *Can J Anim Sci* 2000; 80 (3): 527-528.
117. UM JS, PAIK IK. Effects of microbial phytase supplementation on egg production, eggshell quality, and mineral retention of laying hens fed different levels of phosphorus. *Poult Sci* 1999; 78 (1): 75-79.

118. SUGIYAMA T, KUSUHARA S. Avian calcium metabolism and bone function. *Asian-australas J Anim Sci* 2001; 14: 82-90.
119. DACKE CG, ARKLE S, COOK DJ, WORMSTONE IM, JONES S, ZAIDI M E et al. Medullary bone and avian calcium regulation. *J Exp Biol* 1993; 184: 63-88.
120. KIM WK, BLOOMFIELD SA, SUGIYAMA T, RICKE SC. Concepts and methods for understanding bone metabolism in laying hens. *Worlds Poult Sci J* 2012; 68 (1): 71-82.
121. RODRÍGUEZ LV, HERRERA J, MORALES E, SUÁREZ ME, GONZÁLEZ M, GARCÍA C. Ácido cítrico y fitasa microbiana en el comportamiento productivo y excreción de fósforo, calcio y nitrógeno en gallinas de postura. *Tec Pec Méx* 2002; 40 (2): 169-180
122. RICHARDS MP. Trace mineral metabolism in the avian embryo. *Poult sci* 1997; 76 (1): 152-164.
123. RICHARDS MP, PACKARD MJ. Mineral metabolism in avian embryos. *Poult Avian Biol Rev* 1996; 7: 143-161.
124. DIBNER JJ, RICHARDS JD. Mineral metabolism and chelated minerals for hatchlings. In: Garnsworthy PC, Wiseman J, editores. *Recent Advances in Animal Nutrition UK: Nottingham Univ. Press*, 2005 51-72
125. ANGEL R. Metabolic disorders: limitations to growth of and mineral deposition into the broiler skeleton after hatch and potential implications for leg problems. *J Appl Poult Res* 2007; 16 (1): 138-149.
126. NABER EC. The effect of nutrition on the composition of the egg. *Poult Sci* 1979; 58: 518-528.
127. YAIR R, UNI Z. Content and uptake of minerals in the yolk of broiler embryos during incubation and effect of nutrient enrichment. *Poult Sci* 2011; 90 (7): 1523-1531.
128. KIENHOLZ EW, SUNDE ML, HOEKSTRA WG. Influences of dietary zinc, calcium and vitamin D for hens on zinc content of tissues and eggs and on bone composition. *Poult Sci* 1964; 43: 667-675.
129. STAHL JL, COOK ME, GREGER JL. Zinc, iron and copper contents of eggs from hens fed varying levels of zinc. *J Food Comp Anal* 1988; 1 (4): 309-315.
130. SIMONS PC, VERSTEEGH HAJ, JONGBLOED AW, KEMME PA. Improvement of phosphorus availability by broiler and pigs. *Br Poult Sci* 1990; 64 (2): 525-540.
131. ŻYŁA K, KORELESKI J, ŚWIĄTKIEWICZ S, LEDOUX DR, PIIRONEN J. Influence of supplemental enzymes on the performance and phosphorus excretion of broilers fed wheat-based diets to 6 weeks of age. *Anim Feed Sci Technol* 2001; 89 (1): 113-118.
132. PAIK I. Application of phytase, microbial or plant origin, to reduce phosphorus excretion in poultry production. *Asian-australas J Anim Sci* 2003; 16 (1): 24-135.
133. LI YC, LEDOUX DR, VEUM TL, RABOY V, ERTL DS. Effects of low phytic acid corn on phosphorus utilization, performance, and bone mineralization in broiler chicks. *Poult Sci* 2000; 79 (10): 1444-1450.
134. SEBASTIAN S, TOUCHBURN SP, CHAVEZ ER, LAGUE PC. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and utilization of dietary calcium, phosphorus, copper, and zinc in broiler chickens fed corn-soyabean diets. *Poult Sci* 1996; 75 (6): 729-736.

135. FERNANDES JIM, LIMA FR, CX MENDONCA JR, MABE I, ALBUQUERQUE R, LEAL PM. Relative bioavailability of phosphorus in feed and agricultural phosphates for poultry. *Poult Sci* 1999; 78 (12): 1729–1736.
136. BRUERTON KI. Novel approaches to improving poultry meat production: do organic minerals have a role? . In: Taylor-Pickard JA, Tucker LA, editores. *Re-defining mineral nutrition*. UK: Nottingham university press, 2005: 179-186.
137. RYSSEN JBJ VAN. Trace elements in poultry litter: prevalence and risks. In: Schlegel P, Durosoy S, Jongbloed AW, editores. *Trace Elements in Animal Production Systems* Wageningen Academic Publishers, 2008: 101-113.

CUADROS

CUADRO 4. Contenido nutricional calculado de las dietas experimentales.

Ingrediente (%)	CP	CN	CN+AL	CN+F	CN+AL+F
Sorgo	692.50	699.17	679.17	699.17	679.17
Pasta de Soya (48%)	183.40	182.96	158.96	182.96	158.96
Carbonato de Calcio	91.42	94.16	94.16	94.16	94.16
Ortofosfato	7.30	1.10	1.10	1.10	1.10
Aceite vegetal	11.71	9.44	9.44	9.44	9.44
Sal (NaCl)	4.40	4.40	4.40	4.40	4.40
DL- Metionina	2.14	2.14	2.14	2.14	2.14
L-lisina	1.49	1.52	1.52	1.52	1.52
L-treonina	0.41	0.42	0.42	0.42	0.42
Avelut Polvo (Pigmento)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Avired (Pigmento)	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Cloruro de colina	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Vitaminas y Minerales*	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
BMD-100	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Free. Dox	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Ácido láctico	0	0	50	0	50
Fitasa	0.00	0.00	0.00	0.27	0.27
Contenido Calculado					
Proteína Cruda (%)	15.25	15.25	15.25	15.25	15.25
Energía Metabolizable (Mcal/kg)	2.83	2.83	2.83	2.83	2.83
Metionina y Cisteína Digestible (%)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Metionina (%)	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
Lisina Digestible (%)	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Treonina Digestible (%)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Calcio Total (%)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Fósforo Disponible	0.25	0.12	0.12	0.12	0.12

*Vitamina A 10,000,000 UI; Vitamina D3 2,500,000 UI; Vitamina E 6,000 UI; Vitamina K 2.5g; Tiamina 1.6g; Riboflavina 5 g; Cianocobalamina 0.10g, Ácido Fólico 0.50 g; Piridoxina 1.5 g; Pantotenato de calcio 10 g; Niacina 30g; Cloruro de colina 60% 200 g, Hierro 80g; Manganeso 60g; Cobre 10g; Yodo 0.3g; Cinc 50g; Selenio 0.30g; Antioxidante 125g; Vehículo C.b.p 1.000.00g.

CP= Control Positivo; CN= Control Negativo; CN+AL= Control Negativo + Ácido Láctico; CN+F= Control Negativo + Fitasa; CN+AL+F= Control Negativo + Ácido Láctico + Fitasa

CUADRO 5. Contenido de ácido fítico, fitato y fitasa en sorgo y dietas en experimentación.

Muestra	Ácido Fítico (g/100g)	Fitato		Fitato Susceptible		Fitasa (FTU/kg)		
	Promedio	Promedio	% del ácido fítico	Promedio.	% del fitato	1	2	3
Sorgo	0.87	0.25	28.51	0.13	51.61	--	--	--
CP	0.87	0.26	30.08	0.14	53.67	--	--	--
CN	0.96	0.25	26.44	0.15	58.70	--	--	--
CN+AL	0.96	0.29	30.32	0.19	64.36	--	--	--
CN+F	0.96	0.25	26.04	0.14	57.35	1900	328	458
CN+AL+F	0.97	0.28	28.76	0.17	61.09	945	475	568

CP= Control Positivo; CN= Control Negativo; CN+AL= Control Negativo + Ácido Láctico; CN+F= Control Negativo + Fitasa; CN+AL+F= Control Negativo + Ácido Láctico + Fitasa

CUADRO 6. Parámetros productivos obtenidos en catorce semanas de experimentación.

Parámetros Productivos									
TRATAMIENTOS ¹	% Postura	Peso Huevo (g)	Consumo (g/ave/día)	IC (g / g)	Masa de Huevo (g)	Huevo Defectuoso(%)			
						Roto	Fárfara	Sucio	Total
CP	77.96 ^a	62.92 ^a	88.10 ^a	1.86 ^b	49.01 ^{ab}	0.24 ^b	0.14 ^b	0.48	0.86 ^a
CN	70.61 ^b	61.10 ^b	84.29 ^b	2.07 ^a	43.48 ^c	3.80 ^a	3.20 ^a	1.47	8.46 ^b
CN+AL	76.74 ^a	62.10 ^{ab}	86.83 ^a	1.95 ^{ab}	47.53 ^b	2.05 ^{ab}	2.53 ^{ab}	1.70	6.28 ^b
CN+F	79.90 ^a	63.11 ^a	88.25 ^a	1.79 ^b	50.33 ^a	1.06 ^b	0.10 ^b	0.76	1.92 ^a
CN+AL+F	77.96 ^a	62.50 ^a	89.97 ^a	1.90 ^b	48.72 ^{ab}	0.52 ^b	0.52 ^b	1.26	2.31 ^a
EEM	0.548	0.136	0.229	0.023	0.348	0.24	0.258	0.22	0.238
Probabilidad									
Tratamiento	0.001*	0.001*	0.001*	0.001*	0.001*	0.001*	0.001*	0.396	0.001*
Semana	0.001*	0.999	0.951	0.001*	0.001*	0.007*	0.029*	0.043	0.001*
Semana X Tratamiento	0.881	0.991	0.850	0.518	0.533	0.049*	0.114	0.491	0.023*

^{a,b} Diferencia estadística significativa entre las medias de los tratamientos ($p < 0.001$).

¹ Tratamientos: CP= Control Positivo; CN= Control Negativo; CN+AL= Control Negativo + Ácido Láctico; CN+F= Control Negativo + Fitasa; CN+AL+F= Control Negativo + Ácido Láctico + Fitasa

EEM: Error estándar de la media

CUADRO 7. Resultados en peso del ave, pruebas de calidad de huevo y prueba de resistencia a la ruptura en tibia.

TRATAMIENTOS ¹	Peso del Ave (g)		Calidad de Huevo			Resistencia a la ruptura en tibia (kg/g)
	Inicial	Final	Pigmentación	Unidades Haugh	Grosor Cascarón	
CP	1495.60	1459.0 ^a	9.20	91.13	309.57	1.44
CN	1461.50	1346.9 ^b	9.00	91.84	326.57	1.34
CN+AL	1467.50	1351.5 ^b	9.07	93.73	330.40	1.30
CN+F	1489.00	1455.10 ^a	9.00	95.03	328.50	1.35
CN+AL+F	1484.50	1436.3 ^a	8.83	87.28	320.40	1.33
p	0.975	0.042*	0.552	0.076	0.551	0.624
EEM	42.28	33.60	0.16	1.82	9.35	0.027
Contrastes						
CP Vs. CN+AL;CN+F;CN+AL+F	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CN Vs. CN+AL;CN+F;CN+AL+F	NS	0.07	NS	NS	NS	NS
CN+AL Vs. CN+F	NS	0.03*	NS	NS	NS	NS
CN+AL Vs. CN+AL+F	NS	0.07	NS	0.02*	NS	NS
CN+F Vs. CN+AL+F	NS	NS	NS	0.01*	NS	NS

^{a,b} Diferencia estadística significativa entre las medias de los tratamientos * (p<0.05)

¹ Tratamientos: CP= Control Positivo; CN= Control Negativo; CN+AL= Control Negativo + Ácido Láctico; CN+F= Control Negativo + Fitasa; CN+AL+F= Control Negativo + Ácido Láctico + Fitasa

EEM: Error estándar de la media

CUADRO 8. Resultados en prueba de pH gastrointestinal.

TRATAMIENTOS ¹	pH del Contenido Gastrointestinal					
	Buche	Proventrículo	Ventrículo	Duodeno	Yeyuno	Íleon
CP	4.76 ^a	4.649 ^a	4.143 ^a	5.40	5.88	6.26
CN	4.96 ^{ab}	4.81 ^{ab}	4.36 ^a	5.32	5.54	5.95
CN+AL	4.89 ^{ab}	4.93 ^{ab}	4.71 ^{ab}	5.33	5.63	6.19
CN+F	5.67 ^b	5.66 ^{bc}	4.64 ^{ab}	5.34	5.70	6.22
CN+AL+F	5.63 ^{ab}	5.89 ^c	5.06 ^b	5.51	5.74	6.13
p	0.030 [*]	0.001 ^{**}	0.001 ^{**}	0.853	0.265	0.285
EEM	0.122	0.115	0.078	0.059	0.050	0.047
Contrastes						
CP Vs. CN+AL;CN+F;CN+AL+F	0.03 [*]	0.00 ^{**}	0.00 ^{**}	NS	NS	NS
CN Vs. CN+AL;CN+F;CN+AL+F	NS	0.01 [*]	0.01 [*]	NS	NS	0.06
CN+AL Vs. CN+F	0.03 [*]	0.02 [*]	NS	NS	NS	NS
CN+AL Vs. CN+AL+F	0.04 [*]	0.00 ^{**}	NS	NS	NS	NS
CN+F Vs. CN+AL+F	NS	NS	0.05	NS	NS	NS

^{a,b} Diferencia estadística significativa entre las medias de los tratamientos * (p<0.05)

¹ Tratamientos: CP= Control Positivo; CN= Control Negativo; CN+AL= Control Negativo + Ácido Láctico; CN+F= Control Negativo + Fitasa; CN+AL+F= Control Negativo + Ácido Láctico + Fitasa

EEM: Error estándar de la media

CUADRO 9. Resultados del contenido de fósforo, calcio y cinc en hueso compacto y médula ósea.

TRATAMIENTOS ¹	Hueso Compacto					Médula Ósea			
	Deshidratado (gramos)	Cenizas (g/hueso)	Fósforo (mg/hueso)	Calcio (mg/hueso)	Cinc	Deshidratada (gramos)	Fósforo (mg/médula)	Calcio (mg/médula)	Cinc
CP	4.04 ^b	2.04	379.56	437.46	0.515 ^{ab}	0.54 ^{ab}	25.04 ^{ab}	22.18 ^{ab}	0.080 ^{ab}
CN	3.82 ^a	2.06	355.47	419.37	0.478 ^a	0.39 ^a	18.56 ^a	17.93 ^a	0.055 ^a
CN+AL	4.09 ^b	2.23	385.09	434.32	0.485 ^a	0.39 ^a	19.52 ^{ab}	24.60 ^{abc}	0.053 ^a
CN+F	4.31 ^b	2.20	405.17	463.49	0.556 ^{ab}	0.51 ^{ab}	30.05 ^b	35.83 ^c	0.098 ^b
CN+AL+F	4.26 ^b	2.19	405.17	466.16	0.597 ^b	0.61 ^b	29.71 ^{ab}	34.04 ^{bc}	0.119 ^b
p	0.020 [*]	0.358	0.329	0.239	0.002 ^{**}	0.001 ^{**}	0.001 ^{**}	0.001 ^{**}	0.001 ^{**}
EEM	0.073	0.037	7.364	7.637	0.011	0.021	1.395	1.704	0.005
Contrastes									
CP Vs. CN+AL;CN+F;CN+AL+F	NS	0.09	NS	NS	NS	NS	NS	0.02 [*]	NS
CN Vs. CN+AL;CN+F;CN+AL+F	0.04 [*]	NS	0.06	0.08	0.01 [*]	0.02 [*]	0.02 [*]	0.00 ^{**}	0.01 [*]
CN+AL Vs. CN+F	NS	NS	NS	NS	0.03 [*]	0.05	0.01 [*]	0.02 [*]	0.00 ^{**}
CN+AL Vs. CN+AL+F	NS	NS	NS	NS	0.00 ^{**}	0.00 ^{**}	NS	0.05	0.00 ^{**}
CN+F Vs. CN+AL+F	NS	NS	NS	NS	NS	0.07	NS	NS	NS

^{a,b} Diferencia estadística significativa entre las medias de los tratamientos ^{*}(p<0.05); ^{**} (p<0.01)

¹ Tratamientos: CP= Control Positivo; CN= Control Negativo; CN+AL= Control Negativo + Ácido Láctico; CN+F= Control Negativo + Fitasa; CN+AL+F= Control Negativo + Ácido Láctico + Fitasa
EEM: Error estándar de la media

CUADRO 10. Resultados del contenido de fósforo, calcio, cinc y hierro en yema de huevo y de fósforo, calcio y cinc en excretas.

TRATAMIENTOS ¹	Yema de Huevo				Excretas				
	Fósforo	Calcio	Cinc	Hierro	g MS / Ave / Día	Cenizas (g/MS)	Fósforo	Calcio	Cinc
	(mg/18 g)						(mg/MS Diaria)		
CP	198.00	54.36 ^c	1.48	2.14 ^b	7.26 ^a	2.28	116.81 ^b	427.70	25.92 ^a
CN	199.26	49.68 ^{ab}	1.55	1.60 ^a	8.60 ^{ab}	2.77	109.53 ^{ab}	565.81	31.23 ^b
CN+AL	194.58	47.16 ^a	1.51	1.48 ^a	9.07 ^b	2.94	103.20 ^{ab}	599.29	26.12 ^{ab}
CN+F	196.38	53.64 ^{bc}	1.56	2.01 ^b	7.83 ^{ab}	2.43	86.72 ^a	485.56	25.44 ^a
CN+AL+F	196.02	51.48 ^{abc}	1.50	2.10 ^b	8.41 ^{ab}	2.64	90.13 ^a	529.07	30.20 ^{ab}
p	0.492	0.001 ^{**}	0.707	0.001 ^{**}	0.015 [*]	0.06	0.01 [*]	0.07	0.046 [*]
EEM	2.754	0.003	1.163	0.005	0.185	0.079	3.100	20.694	0.800
Contrastes									
CP Vs. CN+AL;CN+F;CN+AL+F	NS	0.01 [*]	NS	0.00 ^{**}	0.01 [*]	0.048 [*]	0.00 ^{**}	0.03 [*]	NS
CN Vs. CN+AL;CN+F;CN+AL+F	NS	NS	NS	0.00 ^{**}	NS	NS	0.04 [*]	NS	0.02 [*]
CN+AL Vs. CN+F	NS	0.00 ^{**}	NS	0.00 ^{**}	0.03 [*]	NS	0.07	0.07	NS
CN+AL Vs. CN+AL+F	NS	0.01 [*]	NS	0.00 ^{**}	NS	NS	NS	NS	0.09
CN+F Vs. CN+AL+F	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.03 [*]

^{a,b} Diferencia estadística significativa entre las medias de los tratamientos *(p<0.05); ** (p<0.01)

¹ Tratamientos: CP= Control Positivo; CN= Control Negativo; CN+AL= Control Negativo + Ácido Láctico; CN+F= Control Negativo + Fitasa; CN+AL+F= Control Negativo + Ácido Láctico + Fitasa
EEM: Error estándar de la media

CUADRO 11. Análisis de regresión lineal entre la secuencia de tratamientos en la toma de muestra y tiempo transcurrido de la misma para la prueba de determinación de pH gastrointestinal.

Órgano	R ²	EE	p
Buche	0.174	0.789	0.003
Proventrículo	0.348	0.664	0.001
ventrículo	0.291	0.472	0.001
Duodeno	0.002	0.424	0.739
Yeyuno	0.004	0.360	0.684
íleon	0.001	0.337	0.898

EE: Error estándar

CUADRO 12. Correlación entre las pruebas de resistencia a la ruptura, cenizas y contenido mineral en hueso compacto.

		Cenizas	Fósforo	Calcio	Cinc
		(g/hueso)	(mg/hueso compacto)		
Resistencia a la ruptura en tibia (kg/g)	Coef. Pearson	-0.214	-0.083	-0.171	-0.230
	p	0.135	0.568	0.234	0.109
Cenizas g/hueso	Coef. Pearson	1	0.815	0.745	0.621
	p	0.001	0.001	0.001	0.001

REPORTE DE RESULTADOS PARCIALES



Trial Report

Quantum Blue improves performance of layers fed low P diets, with no interaction with lactic acid

Research Site: Leading Research University, Mexico

- Quantum Blue improves performance of layers fed low P diets. Lactic acid inclusion partially recovered performance but no additive effect was obtained when including lactic acid with Quantum Blue

Trial design

Phytate is more soluble at acid pH, and thus keeping gut pH lower for a longer period of time by acidifying the diet may improve phytate solubility and phytase activity. A total of 50 Hy-Line W36 laying hens at 40 weeks of age were placed in individual cages and allocated to five diets (10 replicate each). Treatments included a control diet with moderate non-phytate P content (PC), a negative control (NC) diet low in non-phytate P, and the NC with inclusion of 0.5% lactic acid, 300 FTU/kg Quantum Blue or 0.5% lactic acid + 300 FTU/kg Quantum Blue. Egg production rate, egg weight, egg mass, feed intake and feed conversion ratio were measured weekly. Shellless, broken and dirty eggs were separated and total unsellable eggs calculated as the sum of these, while birds were weighted at the beginning and end of the trial (14 weeks).

Results (40-54 wks of age)

Layer weight

Treatment	PC	NC	NC+Acid	NC+Quantum Blue	NC+Acid+Quantum Blue
Initial weigh, g	1496	1462	1468	1489	1485
Final weight, g	1459 ^a	1347 ^b	1352 ^b	1455 ^a	1436 ^a

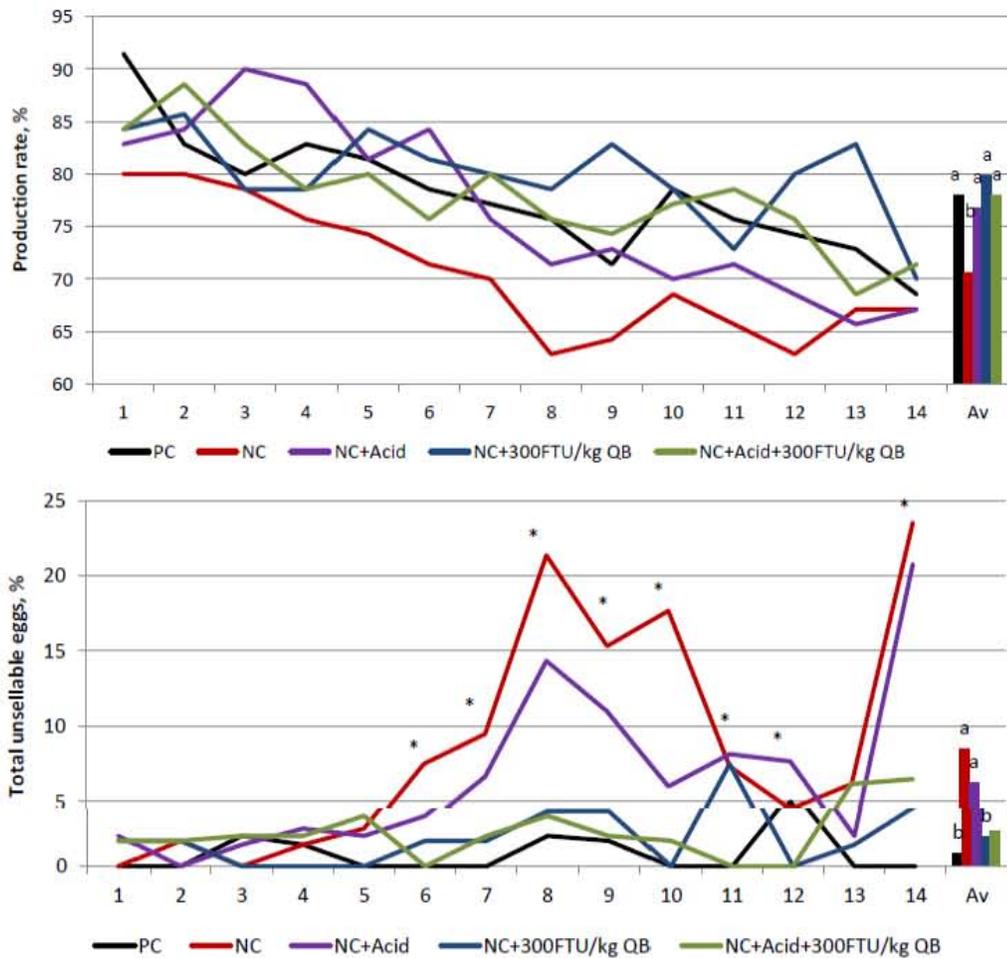
^{a,b} P<0.05

Performance

Treatment	Production rate %	Egg weight g	Egg mass g/day	Feed intake g/day	FCR g/g
PC	78.0 ^a	62.9 ^a	49.0 ^{a,b}	88 ^a	1.86 ^b
NC	70.6 ^b	61.1 ^b	43.5 ^c	84 ^c	2.13 ^a
NC+Acid	76.7 ^a	62.1 ^{a,b}	47.5 ^b	87 ^b	1.95 ^{a,b}
NC+Quantum Blue	79.9 ^a	63.1 ^a	50.3 ^a	88 ^{a,b}	1.79 ^b
NC+Acid+Quantum Blue	78.0 ^a	62.5 ^a	48.7 ^{a,b}	90 ^a	1.90 ^b
P					
Week	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Treatment	0.001	0.999	0.001	0.951	0.001
Week x Treatment	0.881	0.991	0.533	0.850	0.518

Unsellable eggs

Treatment	Shellless %	Broken %	Dirty %	Total %
PC	0.14 ^b	0.24 ^b	0.48	0.86 ^b
NC	3.20 ^a	3.80 ^a	1.47	8.46 ^a
NC+Acid	2.53 ^{a,b}	2.05 ^{a,b}	1.70	6.28 ^a
NC+Quantum Blue	0.10 ^b	1.06 ^b	0.76	1.92 ^b
NC+Acid+Quantum Blue	0.52 ^b	0.52 ^b	1.26	2.31 ^b
P				
Week	0.001	0.001	0.396	0.001
Treatment	0.029	0.007	0.043	0.001
Week x Treatment	0.114	0.049	0.491	0.023



Conclusions / Implications

Layers fed diets with lower avP levels reduced performance, had higher weight loss and higher percentage of unsellable eggs when compared with animals fed diets with regular avP levels. The percentage of broken and total unsellable eggs increased in the latter stages of the trial, what may be related to a cumulative effect and reduction of internal reserves of the layers, as suggested by the greater weight loss of this group of animals. Layers fed diets with lactic acid inclusion had intermediate results, recovering overall production to levels similar to the PC diet but with greater weight loss and number of unsellable eggs. Inclusion of 300 FTU/kg Quantum Blue recovered performance and sellable eggs to levels similar to that of layers fed PC diets, with numerical improvement in performance parameters. These data show that 300 FTU/kg Quantum Blue can be used to substitute other sources of avP in layers diets. Inclusion of lactic acid on top of 300 FTU/kg Quantum Blue did not further improved performance, possibly because Quantum Blue inclusion by itself was already sufficient to support the avP requirement of the birds.



3 Woodstock Court, Blenheim Road,
Marlborough Business Park, Marlborough,
Wiltshire, SN8 4AN, United Kingdom
T +44(0)1672 517650 F +44(0)1672 517660
E W www.ab-vista.com

The information given in this publication is, to the best of our knowledge, true and accurate. However, since conditions of use are beyond our control, no warranty or representation is given or implied in respect of any recommendations or suggestions set out herein, or that any use of the product will not infringe any intellectual property.



Control Diets

Ingredient	Control	Negative Control
Sorghum, %	69.20	69.92
Soybean meal 48, %	18.44	18.30
Limestone, %	9.15	9.42
Vegetable Oil, %	1.17	0.94
Salt, %	0.44	0.44
Dicalcium phosphate, %	0.73	0.11
DL Methionine, %	0.21	0.21
Lysine HCl, %	0.15	0.15
L-Threonine, %	0.04	0.04
Others, %	0.47	0.47
Nutrients		
ME, kcal/kg	2830	2830
Crude Protein, %	15.0	15.0
Ca, %	3.50	3.50
Available P, %	0.25	0.12
Na, %	0.18	0.18
Lysine, %	0.80	0.80
Met + Cys, %	0.60	0.60



3 Woodstock Court, Blenheim Road,
Marlborough Business Park, Marlborough,
Wiltshire, SN8 4AN, United Kingdom
T +44(0)1672 517650 F +44(0)1672 517660
E W www.ab-vista.com

The information given in this publication is, to the best of our knowledge, true and accurate. However, since conditions of use are beyond our control, no warranty or representation is given or implied in respect of any recommendations or suggestions set out herein, or that any use of the product will not infringe any intellectual property.

