



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

**IMPLICACIONES DE LA DOSIS DE UNA FITASA EXÓGENA SOBRE EL
DESEMPEÑO PRODUCTIVO, DIGESTIBILIDAD DE AMINOÁCIDOS Y
MINERALES, HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO FÍTICO EN MOLLEJA, Y CONTENIDO DE
COENZIMA Q10 EN HÍGADO DE GALLINAS BOVANS WHITE ALIMENTADAS
CON DIFERENTES NIVELES DE LISINA DIGESTIBLE**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL**

PRESENTA:

INGRID YOLANI MARTINEZ ROJAS

TUTOR PRINCIPAL

ERNESTO AVILA GONZÁLEZ (FMVZ-UNAM)

COMITÉ TUTORAL:

JOSE ARCE MENOCA (FMVZ-UMSNH)

SERGIO GÓMEZ ROSALES (INIFAP)



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 Gilberto y Virginia, por su amor incondicional.

A mi esposo Miguel, por su complicidad y amor, siempre serás mi regalo del cielo.

A mi hermano Edwin, por su amistad durante todo este tiempo.

A mi familia, por los momentos de felicidad.

A mis amigos, por su apoyo y palabras de ánimo en los momentos más difíciles.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr Carlos López por sus sabios consejos, por su amistad y por creer en mi.

A los Dres Ernesto Ávila y José Arce por sus consejos y por la confianza en el desarrollo del proyecto.

A la Dra Sara Caballero por su apoyo y por la oportunidad de crecer como académico.

Al Ing Pablos Hach por su colaboración en el diseño estadístico del proyecto y por sus palabras de ánimo a romper los esquemas.

Al Dr Edgar Oviedo por la oportunidad de ser parte de un grupo dinámico (Vivi, Santi, Alex, Albarah) y por su apoyo en la lectura de mis escritos.

A la Dra Analia Balderas por su apoyo al realizar los ensayos biológicos y por sus acciones de cooperación desinteresadas. Gracias amiga!

A mis colegas Pedro Juarez, David Ramos, Oscar Galicia, Rebeca Vázquez, Camila Rendón, por su apoyo en las diferentes etapas del proyecto.

A la Dra Clara Aguillón, Mercedes, Alicia, Nidia, Lic. Librado, por su cooperación en el desarrollo de mis estudios de posgrado.

Al personal de AB Vista por sus comentarios y apoyo en el desarrollo del proyecto, en especial a Jorge Rubio, Daniel Camacho y Gilson Gomes.

Al personal de CEIPAv y Laboratorio de Nutrición Animal de la FMVZ en la realización de las pruebas biológicas y análisis de Coenzima Q10, en especial al QA Juan Carlos.

RESUMEN

Muy pocos estudios han abordado el efecto de la dosis de fitasas de tipo exógenas sobre la disponibilidad de nutrientes diferentes al fósforo (P) en la alimentación de gallina de postura. En el presente estudio se evaluó la respuesta en hidrólisis y digestibilidad a dosis incrementales de un fitasa, esperando obtener mayor disponibilidad de lisina con un grado mayor de hidrólisis y por ende mejor producción. De tal manera que se investigó la inclusión de cuatro dosis de una fitasa (0, 300, 1200, y 4800 FTU/kg) en tres niveles de lisina digestible (0.67, 0.77, y 0.87%, de una dieta a base de maíz y pasta de soya baja en P disponible (0.12%). Además de los doce tratamientos correspondientes al arreglo factorial, se incluyó una dieta control con 0.25% de P disponible en el nivel de 0.87% de lisina digestible sin fitasa. Durante 25 semanas se registraron parámetros productivos y se realizaron pruebas de calidad física del huevo. Se emplearon 14 gallinas Bovans White con una edad de inicio de 40 semanas por cada tratamiento, alojadas en jaulas individuales, considerándose cada una como una réplica y alimentándose con 105 g/ave/día. Al concluir la evaluación de parámetros productivos, se seleccionaron 12 aves al azar de cada tratamiento para determinar grasa abdominal, parámetros óseos, digestibilidad en íleon de aminoácidos limitantes, no limitantes, y minerales, hidrólisis del ácido fólico en contenido de molleja y contenido de coenzima Q10 en hígado. Los resultados mostraron que la dosis de 1200 FTU/kg incrementó el porcentaje de postura, resistencia a la ruptura, y contenido de cenizas en hueso, comparado con la no inclusión de la fitasa; así mismo, mantuvo el peso del ave y el contenido de grasa abdominal, y disminuyó el índice de conversión y la incidencia de huevo roto y en fáfara ($P < 0.05$). En la masa de huevo comercializable hubo una interacción entre los niveles de fitasa y lisina digestible, en la que la dosis de 4800 FTU/kg presentó resultados similares a la no inclusión de la fitasa en 0.67 y 0.87% de lisina digestible, mientras que en 0.77%, la masa fue mayor, comparada con 300 FTU/kg ($P = 0.05$). Gallinas alimentadas con la dieta control solamente presentaron mayor peso de huevo ($P = 0.06$). La calidad física en huevo no cambió con los tratamientos ($P > 0.05$). El nivel

de lisina digestible y la dosis de la fitasa cambiaron la digestibilidad de todos los aminoácidos evaluados, siendo que en el nivel de 0.67% de lisina digestible, el incremento gradual de la dosis de la fitasa resultó en un aumento lineal de la digestibilidad, mientras que en 0.77 y 0.87% la respuesta fue de tipo cuadrática ($P < 0.05$). La digestibilidad del P fue mayor a medida que la dosis de la fitasa incrementó, aunque el efecto disminuyó en el nivel de 0.87% de lisina ($P = 0.034$). El coeficiente de digestibilidad del Ca, Zn, Cu, Co, Mn, y Fe no varió con los tratamientos ($P > 0.05$). En los niveles de 0.67 y 0.77% de lisina digestible, al incluir la fitasa se incrementó la digestibilidad del Mg, Na, y K, mientras que en 0.87% se disminuyó ($P < 0.05$). La digestibilidad de minerales y aminoácidos del control positivo no fue diferente de las demás dietas evaluadas ($P < 0.05$). La inclusión de la fitasa en 300, 1200 y 4800 FTU/kg redujo el contenido del éster bajo de inositol (**Ins-P**) 6 en comparación con dietas sin fitasa con 0.12 y 0.25% de P-dis ($P < 0.001$). Las dosis de 1200 y 4800 FTU/kg presentaron menos contenido de Ins-3 y 2P ($P < 0.05$), aunque solo 1200 FTU/kg provocó mayor contenido de inositol libre ($P < 0.01$). La inclusión de la fitasa en 0.67% de lisina digestible no alteró el contenido de coenzima Q10 en hígado, mientras que en 0.87% la enzima produjo una reducción ($P < 0.05$). El contenido de coenzima Q10 se correlacionó negativamente con la masa de huevo producida, el contenido de grasa abdominal, y la digestibilidad de aminoácidos y P ($P < 0.06$).

En el presente estudio se encontró mayor hidrólisis del ácido fítico con el incremento de la dosis de la fitasa, llevando a mayor liberación de nutrientes de su la estructura interna del ácido fítico como el P e inositol. El efecto positivo de la fitasa en la disponibilidad de aminoácidos, Na, y K fue dependiente del nivel de lisina digestible en la dieta, sin tener efecto sobre el Ca, Zn, Cu, y Fe. La inclusión de la fitasa generó una disminución en el requerimiento por la coenzima Q10 en el nivel de 0.87% de lisina digestible. La interacción entre el contenido de fitasa y lisina digestible fue significativa en la producción de huevo comercializable, mientras que en el resto de los parámetros productivos, la dosis de 1200 FTU/kg conllevó a un mejor desempeño

e incremento del inositol libre dietario. La inclusión de P inorgánico en la dieta no mostró diferencia, a pesar del hecho de incrementar el aporte de P en la dieta, posiblemente debido a que la hidrólisis del ácido fítico y la digestibilidad de aminoácidos fue similar a la dieta baja en fósforo disponible. Se concluye que el mayor aporte de la fitasa está dado por el incremento de la disponibilidad de P en la dieta y el restablecimiento del proceso de digestión en general, pero no por una liberación específica de lisina. Se recomienda la adición de 1200 FTU/kg de una 6-fitasa proveniente de *E.coli* y 0.87% de lisina digestible en dietas a base de maíz y pasta de soya con 0.12% P disponible para gallina Bovans White de 40 a 65 semanas de edad.

ABSTRACT

Mechanism behind of exogenous phytase (**Phy**) effect on nutrients above phosphorus (**P**) has had poor attention in egg production in worldwide. Additionally, no concluding information is available about the effect of the dose in Phy action on nutrients above P. The hypothesis of the present study was that increasing Phy dose would allow greater hydrolyses of phytic acid, raising the bioavailability of lysine from based diet. Thus, improvements in productive parameter would be possible and for that a better metabolic status in the laying hen would be got. It was tested the inclusion of four doses of Phy (0, 300, 1200, y 4800 FTU/kg) in three levels of digestible lysine (**dLys**) (0.67, 0.77, y 0.87%) in a corn-soybean meal based-diet low in available P (**avP**) (0.12%). Furthermore, a control diet was included with 0.25% avP in 0.87% dLys without Phy inclusion, for a total of 10 treatments. During 25 weeks, egg production and egg quality were evaluated in 40 weeks-old Bovans White laying hens. Each treatment had 14 hens placed in individual cages and fed 105 g/day, for that 182 layers were tested in total. At the end of the productive evaluation period, 12 hens per treatment were selected and euthanized to assess abdominal fat deposition, bone parameters in tibia, ileal digestibility of amino acids and minerals, degradation of phytic acid in gizzard, and coenzyme Q10 (**CoQ10**) content in liver. Inclusion of 1200 FTU/kg decreased egg production, breaking strength and ash content in bone, maintained body weight and abdominal fat deposition, and decreased broken and soft-shell eggs and FCR compare to non-inclusion of Phy ($P<0.05$). There was an interaction between Phy and dLys levels in marketable egg mass, where 4800 FTU/kg showed similar results than non-Phy inclusion in 0.67 and 0.87% dLys, but in 0.77% this dose was better than 300 FTU/kg ($P=0.05$). The control diet increased egg weight ($P=0.06$), although no significant effect was observed for the other studied variables. There was no effect of treatments in egg quality ($P>0.05$). Amino acid digestibility was affected by Phy dose and dLys level. Thus, incremental doses of Phy fitted lineal response in 0.67%, meanwhile in 0.77 and 0.87% the response was quadratic ($P<0.05$). P digestibility was higher with Phy dose rising, although diminishing in the

response was observed in 0.87% dLys ($P=0.034$). No significance was found for Ca, Zn, Cu, Co, Mn, and Fe ($P>0.05$). In 0.67 and 0.77% dLys, Phy inclusion increased the digestibility of Mg, Na, and K, meanwhile in 0.87% it was decreased ($P<0.05$). The control diet did not show differences regards to other diets ($P<0.05$). Lower presence of low inositol ester (**Ins-P**) 6 was found with the addition of Phy (300, 1200 y 4800 FTU/kg) than non-inclusion of Phy in 0.12 and 0.25% avP diets ($P<0.001$). 1200 and 4800 FTU/kg doses allowed less presence of Ins-3, and 2P ($P<0.05$), and 1200 FTU/kg had the highest concentration of free inositol ($P<0.01$). No changes were observed for CoQ10 content in liver in levels of 0.67% dLys, otherwise in 0.87% dLys, Phy addition decreased the coenzyme concentration ($P<0.05$). Furthermore, CoQ10 concentration was negative correlated with egg mass, abdominal fat deposition, and digestibility of amino acids and P ($P<0.06$). Results obtained in the current study demonstrated that a greater hydrolyses of phytic acid is obtained with incremental doses of Phy, which allowed higher releasing of nutrients from its structure such as P and inositol. Regarding to nutrients above P, the positive effect of Phy on amino acids digestibility, Na, and K was linked with dLys content in diet, resulting in a reduction of the requirement for CoQ10 with Phy addition only in 0.87% dLys. In this way, Phy dose and dLys content influenced the marketable egg production; however, in most of productive variables, 1200 FTU/kg resulted in better performance, that was accord with the increase in dietary inositol availability. Addition of inorganic P did not increase production in spite of P dietary supply, probably due to low hydrolyzes process of phytic acid and no improvements in amino acid digestibilities. In conclusion, most of the action of Phy would impact P bioavailability and would improve digestion process, without specific effect on lysine. It is recommended the use of 1200 FTU/kg of 6-Phy from *E. coli* and 0.87% dLys level in a corn-soybean meal based diet with 0.12% avP in Bovans White laying hens from 40th to 65th week.

TABLA DE CONTENIDO

I. Revisión de literatura	1
I.1 El Ácido Fítico	1
Efecto en proteína	2
Capacidad quelante	4
Propiedades de los Ins-P	7
Inositol	9
Mecanismo fisiológicos para contrarrestar el efecto anti-nutritivo	11
Factores que influyen la hidrólisis del fitato en el tracto digestivo	12
I.2 Las Fitasas	13
Fuente para las aves	15
Vegetales	16
Tracto digestivo	16
Microbiota	17
Exógena	18
Vía metabólica de las fitasas exógenas	22
Dosis	24
I.3 Fisiología en la Digestión de la Proteína	27
Prueba de digestibilidad de aminoácidos	30
I.4 Coenzima Q10	31
I.5 Referencias	37
II. Fase experimental 1	46
II.1 Resumen	46
II.2 Introducción	47
II.3 Materiales y Métodos	50
Aves	50
Dietas y Diseño Experimental	51
Parámetros Productivos	52
Pruebas Físicas en Huevo	52
Parámetros en Hueso y Grasa Abdominal	52
Análisis de Laboratorio en Alimento	53

Análisis Estadísticos	53
II.4 Resultados	53
II.5 Discusión.....	56
II.6 Referencias.....	64
III. Fase experimental 2	78
III.1 Resumen.....	78
III.2 Introducción	79
III.3 Materiales y Métodos.....	83
Prueba de Digestibilidad.....	83
Análisis de Laboratorio	83
Análisis Estadístico	84
III.4 Resultados	84
III.5 Discusión	86
III.6 Conclusión	93
III.7 Referencias.....	94
IV. Fase experimental 3.....	109
IV.1 Resumen.....	109
IV.2 Introducción	110
IV.3 Materiales y Métodos.....	113
Muestreo.....	113
Cuantificación de Ésteres Bajos de Inositol.....	113
Cuantificación de CoQ10.....	113
Análisis Estadístico	114
IV.4 Resultados	114
IV.5 Discusión.....	116
IV.6 Conclusión	123
IV.7 Referencias.....	123
Implicaciones y conclusiones	140

LISTA DE CUADROS

I. REVISIÓN DE LITERATURA

Cuadro 1. Fitasas comerciales disponibles	19
--	----

II. FASE EXPERIMENTAL 1

Cuadro 1. Composición y análisis del contenido nutricional de la dieta base.....	69
---	----

Cuadro 2. Actividad fitásica esperada y cuantificada en muestras de alimento.....	71
--	----

Cuadro 3. Efecto interactivo de la adición de una fitasa y niveles de lisina digestible en la dieta sobre los parámetros productivos y deposición de grasa abdominal en gallinas Bovans White de 40-65 semanas de edad.....	72
--	----

Cuadro 4. Efecto interactivo de la adición de una fitasa y niveles de lisina digestible en la dieta sobre los tipo de huevo producido, masa de huevo comercializable, y pruebas físicas en huevo de gallinas Bovans White de 40-65 semanas de edad.....	74
--	----

Cuadro 5. Efecto interactivo de la adición de una fitasa y niveles de lisina digestible en la dieta sobre parámetros óseos en gallinas Bovans White de 65 semanas de edad..	76
--	----

III. FASE EXPERIMENTAL 2

Cuadro 1. Efecto de la adición de cuatro dosis de una fitasa y tres niveles de lisina digestible sobre los coeficientes de digestibilidad aparente de aminoácidos limitantes en íleon de gallinas Bovans White de 67 semanas de edad.....	99
--	----

Cuadro 2. Coeficientes del análisis de regresión en la digestibilidad aparente de aminoácidos limitantes.....	101
--	-----

Cuadro 3. Efecto de la adición de cuatro dosis de una fitasa y tres niveles de lisina digestible sobre los coeficientes de digestibilidad aparente de aminoácidos no limitantes en íleon de gallinas Bovans White de 67 semanas de edad.....	103
---	-----

Cuadro 4. Coeficientes del análisis de regresión en la digestibilidad aparente de aminoácidos no limitantes..... 105

Cuadro 5. Efecto de la adición de cuatro dosis de una fitasa y tres niveles de lisina digestible sobre los coeficientes de digestibilidad aparente de minerales en íleon de gallinas Bovans White de 67 semanas de edad..... 106

Cuadro 6. Coeficientes del análisis de regresión en la digestibilidad aparente de minerales..... 108

IV. FASE EXPERIMENTAL 3

Cuadro 1. Efecto de la adición de cuatro dosis de una fitasa en tres niveles incrementales de lisina digestible sobre la concentración del ácido fólico y moléculas derivadas, y sobre el contenido de coenzima Q10 en hígado en gallinas Bovans White de 67 semanas de edad..... 135

Cuadro 2. Valores de probabilidad del análisis de regresión en las moléculas de la hidrólisis del ácido fólico y coenzima Q10..... 137

Cuadro 3. Coeficientes de correlación entre el contenido de coenzima Q10 y la digestibilidad de nutrientes y parámetros productivos en gallinas Bovans White de 67 semanas de edad..... 138

LISTA DE FIGURAS

I. REVISIÓN DE LITERATURA

Figura 1 Propiedad quelante del fitato sobre nutrientes. 7

IV. FASE EXPERIMENTAL 3

Figura 1. Cuantificación de los ésteres de inositol fosfato 2 y 4 en la digesta de molleja de tres niveles de lisina digestible y cuatro dosis de fitasa en gallinas Bovans White de 67 semanas de edad..... 139

I. REVISIÓN DE LITERATURA

I.1 El Ácido Fítico

El ácido fítico (**A-F_i**) es un compuesto químico conformado por seis moléculas de ortofosfato (PO_4) unidos a un anillo de myo-inositol por medio de puentes de hidrógeno. El A-F_i es llamado también ácido inositol hexa-fosfórico 1,2,3,4,5,6 con fórmula química $\text{C}_6\text{H}_{28}\text{O}_{24}\text{P}_6$ y cargas negativas en sus grupos fosfatos, convirtiéndolo en una molécula altamente reactiva. En caso que el A-F_i se encuentre unido a metales catiónicos divalentes como el calcio (**Ca**), magnesio (**Mg**), y zinc (**Zn**) formando sales, se le conoce como fitina o fitato, siendo éste último la denominación más avalada (Angel, Tamim *y col.*, 2002) y la que se tomará para el presente escrito. Entre 50 y 80% ó 2/3 del contenido total de fósforo (**P**) en semillas de cereales, legumbres y semillas oleaginosas se encuentra en forma de fitato (Ravindran, 1995;Singh, 2008) y el restante P está en forma libre es decir en forma de grupos fosfatos.

La presencia del A-F_i en la semilla desempeña un papel fundamental en el proceso de latencia, al evitar procesos oxidativos naturales (Graf, Empson *y col.*, 1987). Luego del proceso de germinación, el A-F_i se une a minerales presentes en el medio y de esta manera en forma de fitato se mantiene como reserva para contribuir a la formación de la pared celular. En resumen, en granos la presencia del fitato cumple funciones como: 1) reserva de P y energía, 2) inhibición de la producción de ATP fomentando el proceso de latencia, 3) control de cationes divalentes, y 4) regulación del P disponible (Angel, Tamim *y col.*, 2002).

En avicultura, generalmente una dieta a base de vegetales contiene de 2.5 a 4 ppm de A-F_i (Ravindran, 1995), aunque el contenido varía dependiendo del tipo de vegetal base, y de factores como el estado de maduración del grano, condiciones de cultivo como la cantidad de fertilizante, tipo de suelo, factores climáticos (Reddy, Sathe *y col.*, 1982). En los granos no solo las cantidades y proporciones de fitato respecto al P total varían, sino también su ubicación. En el caso del maíz, el P fítico, es decir el P presente

en el A-Fi, representa de 66 a 85% del total de P y alrededor del 90% de este se encuentra en la porción del germen, mientras que en sus subproductos el contenido aumenta debido a la concentración de nutrientes (Eeckhout y Paepe, 1994). En la soya el contenido es menor comparado con el maíz, siendo de 53-68%, (Selle y Ravindran, 2007); además su distribución no es específica de una estructura particular (Sebastian, Touchburn y *col.*, 1998). Un estudio realizado por Eeckhout, De Paepe (1994) se demostró que el contenido de fitato en arroz, trigo, y avena es mayor, siendo que en el trigo y el arroz, la mayor cantidad del fitato se encuentra en la aleurona y salvado. En el caso del trigo y arroz más del 80% del fitato se encuentra en el salvado (O'Dell, De Boland y *col.*, 1972), mientras que en semillas dicotiledonas incluyendo semillas oleosas (excepto en la soya), el fitato está en forma de globoides localizados en la semilla (Sebastian, Touchburn y *col.*, 1998).

Pese a la importancia de su función biológica en las plantas, el A-Fi en la alimentación de animales monogástricos se considera un antinutriente, y no es tanto debido a la baja disponibilidad del P en su estructura, sino por su capacidad de unión a otras moléculas circundantes en el medio, lo cual crea conglomerados de baja digestibilidad. Es de conocimiento que el A-Fi tiene la capacidad de atraer y unirse a una amplia gama de moléculas cargadas positivamente como minerales (Vohra, Gray y *col.*, 1965), aminoácidos básicos (Prattley, Stanley y *col.*, 1982), carbohidratos (Thompson y Yoon, 1984), y lípidos, estos últimos mediante la formación de conglomerados denominados lipofitinas (lípidos, péptidos, Ca^{+2}/Mg^{+2} - A-Fi) (Cosgrove, 1966), siendo que la afinidad por cada uno de estos nutrientes es diferente.

Efecto en proteína. El A-Fi por sus características químicas y físicas tiene la capacidad de influir en la solubilidad de la proteína, afectando negativamente la digestibilidad de esta y por ende su disponibilidad en el alimento. Selle, Cowieson y *col.* (2012) expusieron dos mecanismos por los cuales el A-Fi altera la digestibilidad de la proteína. El primero debido a la formación de complejos directamente con la proteína y el segundo por cambios en la estructura del agua circundante a la misma, los cuales serán descritos a continuación.

La molécula del A-Fi 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, Glonek y col., 1976), siendo que a un pH como el encontrado en el tracto digestivo y alimentos, el A-Fi y sus productos intermedios de catabolismo conocidos como ésteres bajos de inositol (**Ins-P**) como el Ins-5P, Ins-4P e Ins-3P (Persson, Türk y col., 1998) están cargados negativamente lo que permite la formación de enlaces con moléculas cargadas positivamente. Las uniones pueden ser entre uno o varios grupos fosfatos de una molécula de A-Fi con moléculas presentes en el medio, creando conglomerados que comprometen la disponibilidad de los diferentes sustratos a las enzimas endógenas del tracto digestivo, siendo que tanto la digestibilidad del alimento como el gasto de mantenimiento del animal se ven afectados negativamente (Selle, Cowieson y col., 2012).

En el caso de la proteína, la unión al A-Fi depende del punto isoeléctrico de la misma y del pH del medio. En un pH ácido, la proteína se encuentra con carga positiva en el grupo α -NH₂ y en algunos aminoácidos básicos como la arginina, histidina y lisina, lo cual provoca la unión directa y la formación de complejo binarios. En un pH básico las proteínas tienen carga negativa en los grupos carboxilos de todos los aminoácidos, provocando su unión a cationes divalentes (en el ave es el Ca principalmente), los cuales a su vez se encuentran unidos al A-Fi, generando la formación de complejos terciarios (Cheryan y Rackis, 1980). La unión con el A-Fi, provoca cambios estructurales en la proteína, formando conglomerados que se vuelven insolubles y se precipitan, de tal manera que no pueden ser digeridos por el animal. Kies, De Jonge y col. (2006) al evaluar *in vitro* cinco fuentes de proteína determinaron que la formación de complejo binarios se daba principalmente en pH 3-5, cercano al del tracto digestivo superior en aves, negando la posibilidad de que estos complejos se formaran en el grano. Así mismo, concluyeron que la inclusión de una fitasa (**Fi**) de tipo exógena previene la formación de dichos compuesto y por ende permite la degradación de la proteína de una manera más rápida.

Selle, Cowieson *y col.* (2012) no encontraron una relación estadística entre el contenido de aminoácidos básicos y la reducción de la solubilidad de diferentes tipos de proteína en los datos reportados por Kies, De Jonge *y col.* (2006), cuando se evaluó el fitato de sodio (**Na**) a un pH de 2. Por lo que se postuló la idea de que los grupos fosfato en el A-Fi actuarían como moléculas con capacidad kosmotropica. En este caso, el A-Fi tiene la capacidad de estabilizar la estructura de la proteína al establecer puentes de hidrógeno con el agua circundante a la proteína. Esto, debido a que el grupo fosfato en la estructura del A-Fi está catalogado como un kosmotropo, siendo que la afinidad del agua por éste es mayor que por otras moléculas de agua presentes en una solución.

No obstante, Bye, Cowieson *y col.* (2013) al evaluar el efecto de fitato de Na sobre la solubilidad y estabilidad de la lisozima concluyeron que el fitato podría actuar como kosmotropo en concentraciones mayores a 5mM al estabilizar a la proteína y por debajo de esta concentración la unión entre las cargas negativas del fitato provocaban una desestabilización de la proteína, y por lo tanto baja solubilidad. Estas características químicas indican que el A-Fi influye sobre la disponibilidad de moléculas a sus respectivas enzimas en el tracto digestivo por lo cual el proceso de digestión y absorción de los nutrientes se ve entorpecido, convirtiéndolo al A-Fi en un factor antinutricional presente en dietas vegetales para animales monogástricos. Por tanto las investigaciones relacionadas con el impacto del A-Fi en la disponibilidad de proteína a partir de la dieta para aves de postura son pertinentes, con el fin de conocer los alcances de la hidrólisis del A-Fi por parte de las enzimas.

Capacidad quelante. Como ya se mencionó anteriormente, el A-Fi posee las características químicas estructurales para crear uniones con distintas moléculas dependiendo del pH del medio. Entre estas, ya se describió las uniones a proteína, entre las que enzimas como pepsina, α -amilasa y tripsina también están incluidas. Se ha encontrado *in vitro* que la tripsina es inhibida al incubarse con A-Fi y que a mayor concentración de fitato de Na la inhibición es más fuerte, aunque la ausencia de Ca no

es un factor influyente (Singh y Krikorian, 1982). También se ha encontrado que El A-Fi es capaz de unirse a la carga positiva del grupo amino terminal de la pepsina a un pH ácido (Vaintraub y Bulmaga, 1991) ó por medio de uniones con Ca, formando complejos terciarios (Caldwell, 1992). Por lo tanto, es posible que la acción de enzimas como la tripsina, quimotripsina, elastasas, y α -amilasa se esté afectando dada la estrecha relación de su actividad con la disponibilidad de Ca en el medio (Caldwell, 1992). Bye, Cowieson y col. (2013) basándose en su estudio *in vitro* sobre la solubilidad de la lisozima, tripsina, y quimotripsina en la presencia de fitato, postularon que existía la posibilidad de que el A-Fi se encontrara unido electrostáticamente a una amplia gama de moléculas con cargas positivas bajo un ambiente similar al del estómago, así como para el caso de la tripsina y quimotripsina del duodeno.

No obstante la importancia de la proteína, las interacciones que han sido mas estudiadas son aquellas presentes entre el A-Fi y minerales, siendo que la afinidad del A-Fi depende del tipo de catión. Maddaiah, Kurnick y col. (1964) reportaron la siguiente secuencia en fuerza de quelación: $Zn^{2+} > Cu^{2+} > Co^{2+} > Mn^{3+} > Ca^{2+}$, mientras que Vohra, Gray y col. (1965) encontraron mayor afinidad por parte del cobre (**Cu**) que del Zn. En pollo de engorda incrementos en las cantidades de Cu en forma de sulfato en la dieta, provocaba un efecto deletereo en el desempeño productivo y en la retención de P, cuantificado en excretas, cuando se adicionó 600 FTU/kg de una Fi proveniente de *Aspergillus niger* (Banks, Thompson y col., 2004). De tal manera que es posible que el Cu impidió la acción de la enzima mediante la formación de complejos indigestibles con el A-Fi.

No obstante el mineral que mas ha llamado la atención en cuanto al uso de las Fi a parte del P, ha sido el Zn. En pollo de engorda se encontró que adicionar Fi de *Aspergillus niger* en forma paulatina a 0, 200, 400, y 600 FTU/kg, se incrementaba la retención del Zn en el cuerpo (Brenes, Viveros y col., 2003). Así mismo se ha destacado la capacidad de los Ins-3 y 5P de unirse a éste mineral y al Ca, aunque este efecto va siendo menor a medida que se obtiene InsP más bajos (Xu, Price y col.,

1992). En cerdos, a medida que el contenido de fitato en el ileon es mayor, la concentración de hemoglobina en sangre el Fe es menor, afectando negativamente la incidencia de la anemia (Wilcock y Walk, 2016). Esto puede ser extrapolable a resultados obtenidos *in vitro*, en los cuales el Fe es susceptible de ser quelado tanto por el A-Fi como por Ins-3 y 4P (Yu, Cowieson y col., 2012).

No obstante que el A-Fi muestra mayor afinidad de quelar otros minerales que el Ca, en las dietas de aves de producción las altas cantidades presentes de éste mineral le confieren un enfoque importante en las investigaciones sobre A-Fi (Selle, Cowieson y col., 2009). Por otro lado el Ca tiene la capacidad de formar uniones Ca-Zn-fitato (Byrd y Matrone, 1965), los cuales resultan ser más estables que las formadas por Zn-fitato. De tal manera que se ha postulado que el Ca es el catión con mayor impacto en las interacciones, ya que su exceso en la dieta provoca la formación de complejos poco solubles y no absorbibles entre fitatos y proteínas (Gifford y Clydesdale, 1990). En el caso de la unión del Ca a los carbohidratos, ésta se da por la formación de puentes de hidrógeno con una proteína que va unida al fitato (Thompson y Erdman Jr, 1982). Otro aspecto a tener en cuenta con éste mineral es el efecto buffer que posee, teniendo en cuenta que la formación de compuestos es mayor en pH básicos mientras que en pH ácidos es inhibida (Selle, Cowieson y col., 2009).

El pH del medio es uno de los factores que más influye en la capacidad quelante del A-Fi, ya que la carga de iones hidronios circundante modulan las cargas del A-Fi (Figura 1). Cuando el pH del medio es ácido (1-4), la cantidad de iones hidronios es mayor, lo que permite neutralizar las cargas negativas de los grupos fosfatos en el A-Fi. Ello conlleva a que éste no pueda unirse con otras moléculas cargadas positivamente, y esté susceptible a la hidrólisis por parte de la Fi y se permita una mayor liberación del P de su estructura. En el caso de un pH más básico (5-8), las bajas concentraciones de hidrogenion del medio hacen que el A-Fi conserve sus cargas negativas y sea inestable, uniéndose a moléculas presentes en el medio. Dicha unión puede ser entre fitatos y más moléculas, creando conglomerados de nutrientes de baja digestibilidad (Angel, Tamim y col., 2002; Selle y Ravindran, 2007).

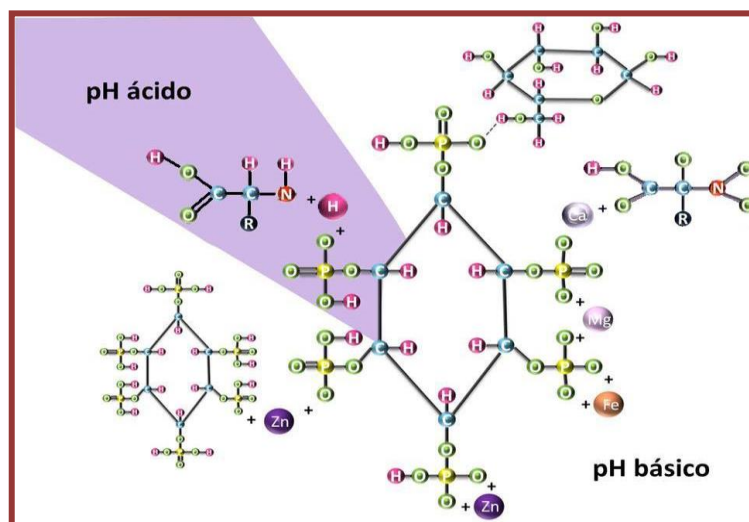


FIGURA 1. Propiedad quelante del fitato sobre nutrientes.

Fuente: Adaptado de Singh *et al.* (2008)

Maenz, Engele-Schaan *y col.* (1999) estudiaron el efecto del pH del medio en la relación molar para la unión entre A-Fi y minerales como Zn^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , y Ca^{2+} , encontrando que al incrementar el pH de 4 a 7.5 la relación molar disminuía significativamente para todos los minerales, excepto para el Fe^{3+} , en el cual la relación mineral:A-Fi, aumentaba. De esta manera se considera que tanto la concentración de nutrientes en el medio como el pH influyen en la capacidad quelante del A-Fi. Así mismo, Pontoppidan, Pettersson *y col.* (2007) al evaluar el efecto del pH en la solubilidad de minerales y proteínas respecto al contenido de A-Fi en dietas a base de maíz y pasta de soya, encontraron que a pH ácido la solubilidad tanto de los minerales como de la proteína era mayor. El ambiente encontrado en el tracto digestivo pueden conjugarse para obtener una respuesta negativa hacia la presencia de A-Fi en relación con un efecto negativo de la absorción de nutrientes mas allá del P, como es el caso de minerales con cargas positivas como el Ca, Zn, Cu, Mn, y Fe.

Propiedades de los Ins-P. Al A-Fi como al Ins-6P se le han clasificado como moléculas antioxidantes, dada su naturaleza de poseer enlaces negativos que les permiten aceptar electrones generados por especies reactivas de oxígeno. Esta propiedad, es la razón de su presencia en los cereales, ya que mantiene en estado

oxidado a los minerales, entre ellos al Fe^{2+} , de tal manera que la semilla se mantiene en un estado latente. Así mismo, esta capacidad antioxidante y de quelación hacia el Fe^{3+} (que es parte de la oxidación de lípidos), le ha conferido propiedades preventivas en patologías como el cáncer de colón, diabetes, y enfermedades coronarias en humanos (Kumar, Sinha *y col.*, 2010).

Los Ins-P mencionados anteriormente, forman parte de una familia de moléculas afines en su estructura, las cuales contienen y proveen de P en forma de fosfatos (PO_3) al metabolismo celular, cumpliendo funciones cruciales como señalización celular y almacenamiento de energía. Dentro de este grupo de moléculas se encuentran los inositoles pirofosfatos que son moléculas que tienen más de seis grupos fosfato unidos al anillo de inositol, siendo el Ins-7P el más abundante en células eucariotas, los cuales requieren para su formación al A-Fi y a las IP6 kinasas (enzimas encargadas de añadir grupos fosfatos). Otro tipo de moléculas son los polifosfatos inorgánicos que son polímeros lineales de grupos fosfato -poliP- formados por endo y exo-fosfatasa; además se encuentran los fosfoinosítidos, es decir los de tipo fosfolípidos. Todas las clases de moléculas anteriormente mencionados están presentes en organismos pluri y unicelulares, desempeñando funciones de señalización celular principalmente (Livermore, Azevedo *y col.*, 2016).

Los inositol pirofosfatos cumplen funciones dentro de las células como moléculas involucradas en procesos de apoptosis, conservación de telómeros, y desarrollo embrionario. Sin embargo, investigaciones recientes destacan una función fundamental: actuar como mensajeros metabólicos y reguladores de la homeostasis celular (Wilson, Livermore *y col.*, 2013). Como un ejemplo, son reguladores del metabolismo del fosfato a nivel celular, ya que los Ins-7P regulan la formación de poliP al parecer por mecanismos relacionados con tráfico vesicular, siendo que los poliP juegan un papel importante en mantener el buffer intracelular y actuar como moléculas de almacenamiento de grupos fosfato indispensables en la formación de ATP, lo que implica un efecto directo en los procesos de energía celular. En levaduras mutantes, el déficit de Ins-7 y 8P produce una disminución en la cantidad de poliP

(Auesukaree, Tochio *y col.*, 2005). En humanos, niveles irregulares de P plasmático ha sido relacionado con un deficiencia genética en la formación de la IP6 kinasa, por lo que se cree que no solo los inositol fosfatos actuarían a nivel celular, si no también en el organismo (Auesukaree, Tochio *y col.*, 2005). Así mismo, a los inositoles pirofosfatos se les ha relacionado con el control del metabolismo en el organismo relacionado con la presencia de insulina y con la incapacidad de la mitocondria para sintetizar ácidos grasos intermedios, en estudios con ratones knock-out de la IP6 kinasa (Bhandari, Juluri *y col.*, 2008). Por lo tanto un resultado positivo en mecanismos que buscan la formación de energía son obtenibles tras la degradación del A-Fi en el tracto digestivo, absorción de los nutrientes en su estructura e inhibición en la formación de complejos indigestibles que incluya directamente lípidos.

Esto hace posible que los InsP provenientes de la hidrólisis del A-Fi tengan repercusiones por sí mismo sobre la generación de energía a través de regulaciones por medio de los pirofosfatos y los poliP sobre la formación del ATP. No obstante la importancia del Ins-3P (3,4,5) como mensajero intracelular en la liberación de Ca, el enfoque que mayor se le ha dado en la nutrición es respecto a su capacidad quelante. Desde hace tiempo ya se había reconocido que dicha capacidad iba disminuyendo conforme se va quitaba grupos fosfatos de su estructura, siendo la secuencia en fuerza de unión: Ins-6P>Ins-5P>Ins-4P>Ins-3P>Ins-2P (Xu, Price *y col.*, 1992). A medida que va sucediendo la hidrólisis del A-Fi en los InsP con menos grupos fosfatos, el fenómeno de quelación va siendo atenuado y por lo tanto se va promoviendo mayor estabilidad de los nutrientes en la dieta, para ser absorbidos y usados por el cuerpo.

Inositol. Es un azúcar de cadena de 6 carbonos que se deriva de la glucosa, y es el núcleo o anillo de los InsP por lo que diferentes uniones de los grupos fosfato a los carbonos y entre si puede generar hasta 64 tipos de moléculas únicas, de las cuales la mayoría ya han sido identificadas en las células eucariotas (York, 2006). El myo-inositol presente en la dieta como A-Fi, fosfolípidos, y myo-inositol libre es altamente

absorbible en el intestino; en humanos el 99.8% es absorbido en el intestino por transportadores de glucosa SMIT2 dependiente de Na y además por HMIT (transportador H⁺/myo-inositol) cuando las concentraciones en plasma son altas (Coady, Wallendorff *y col.*, 2002). El inositol es sintetizado en una amplia gama de tejidos, incluyendo el cerebro, músculo y tejido graso y es excretado por la orina; no obstante, en el riñón se lleva a cabo un proceso de catabolismo fuerte, ya que menos de 1% del inositol es excretado intacto por la orina, siendo convertido a D-xilulosa 5-fosfato y entrando a la vía de los fosfatos pentosas para la formación de glucosa (Holub, 1986).

El inositol es empleado en la regulación del metabolismo energético celular por medio de la formación de InsP por kinasas específicas de fosfoinosítidos, de las cuales el inositol estimula su producción. Las kinasas participan en procesos de absorción de glucógeno, al direccionar el transportador de glucosa GLUT4 en la membrana plasmática en tejidos muscular y graso por medio de la proteína kinasa B (Lee y Bedford, 2016), después de lo cual la síntesis de glicógeno por glucosa se da por medio de la glicógeno sintetasa (Hajduch, Alessi *y col.*, 1998). No obstante es importante tener en cuenta que las aves no poseen el transportador GLUT4 (Tokushima, Takahashi *y col.*, 2005), por lo cual mecanismos similares pudieran estar presentes por medio de otras moléculas. Así mismo, es conocido que el InsP más estudiado, el Ins-3P (3,4,5) está involucrado en mecanismos de comunicación intracelular para la liberación de Ca y en procesos de metabolismo de lípidos, vías metabólicas, procesos inmunológicos, y de osteogénesis. El inositol también afecta el metabolismo lipídico ya que al comparar dietas deficientes en inositol con dietas suplementadas, se encontró una acumulación de triacilglicéridos en hígado, asumiendo que el inositol es una molécula involucrada en el transporte de lipoproteínas y en el uso de éstas para generación de energía en el hígado (Burton y Wells, 1979). Por lo que al inositol se le considera como un nutraceutico disponible a partir de la dieta y que por sí mismo puede traer efectos positivos a los procesos biológicos involucrados en la formación del huevo.

Mecanismos fisiológicos para contrarrestar el efecto anti-nutritivo. La capacidad del A-Fi para actuar como un factor limitante en la disponibilidad de nutrientes a partir de la dieta trae consigo la activación de ciertos mecanismos compensatorios en el tracto digestivo del ave. Uno de dichos cambios se da a nivel de pH gástrico, ya que la presencia del A-Fi provoca alteración en el ambiente electroestático del medio al quelar moléculas, creando conglomerados proteícos que llevan a una mayor secreción de ácido clorhídrico como un intento por activar mayor cantidad de enzimas proteolíticas y poder efectuar la digestión de éstos (Adeola y Sands, 2003). Así mismo, dicha acidificación podría neutralizar las cargas de las moléculas de A-Fi, disminuyendo su capacidad de quelación. En pollo de engorda la inclusión de una Fi provocó una ligera alcalinización del pH en el proventrículo (Walk, Bedford y *col.*, 2012; Amerah, Plumstead y *col.*, 2014), lo cual conlleva un efecto positivo en el gasto de mantenimiento del ave de una manera indirecta. Como consecuencia de la secreción del ácido clorhídrico y de la presencia de los conglomerados con el A-Fi, la producción de mucina aumenta en el intestino para la protección de la mucosa (Selle, Cowieson y *col.*, 2012), lo que lleva a mayor pérdidas de aminoácidos endógenos (principalmente treonina, prolina, serina, y cisteína (Bequette, 2003)), así como de Na, Cl, y K (Selle y Ravindran, 2007) e incrementa el gasto energético de mantenimiento.

Dado que el P presente en el A-Fi no logra ser libre para ser absorbido en el intestino en una amplia proporción, el organismo es capaz de regular la expresión de los tipos de transportadores protéicos en intestino, dependiendo de la concentración de P inorgánico en las células intestinales, los cuales además son dependientes del segmento del tracto digestivo. Huber, Zeller y *col.* (2015) determinaron que mayor presencia de P inorgánico proveniente de fosfato mono-cálcico en el lumen del yeyuno e íleon, estimulaba la expresión de una isoforma del transportador NaPi II (dependiente de Na) de 105 kDa que se caracteriza por su baja afinidad y alta capacidad de transporte por el P, cuando se incluyó 12,500 FTU/kg de 6-Fi. En caso contrario, con baja presencia de P inorgánico, se expresó más una isoforma de 90 kDa

con alta afinidad y baja capacidad de transporte, que presenta características similares a las del transportador PiT1 (dependiente de Na tipo III). Estos transportadores, al parecer, también responden a la presencia de Ins-4 y 5P, dependiendo del segmento del tracto estudiado, siendo que la actividad de la isoforma de 105 kDa se correlacionó negativamente con la presencia de Ins-4P en íleon, mientras que el PiT1 se expresa mejor con Ins-5P en el yeyuno, pero peor con Ins- 4 y 5P en íleon. En el mismo estudio, la presencia en dieta de Ca ionizado (a partir de materias primas como fosfato mono-cálcico) estimuló los canales tipo TRPV6, por lo cual mayor cantidad de Ca proveniente de la dieta es absorbido evitando la formación de complejos Ca:P en el tracto digestivo. Así, más P soluble está disponible para su absorción y por lo tanto la digestibilidad del P es influenciada, no solo de manera directa con la liberación de grupos fosfato de la estructura del A-Fi.

Factores que influyen en la hidrólisis del fitato en el tracto digestivo. Actualmente, con el desarrollo de las técnicas de laboratorio como el HPLC (High Performance Liquid Chromatography) para la cuantificación de moléculas en muestras de origen tisular, se ha empezado a generar información respecto a la hidrólisis lograda en el tracto digestivo por distintas Fi comerciales. Al principio la determinación de los InsP se enfocó en el tracto digestivo superior de aves comerciales en órganos como el proventrículo-ventrículo, ya que son cercanos al buche que es el lugar donde realiza la acción la mayoría de Fi comerciales (Selle y Ravindran, 2007), siempre y cuando no sean recubiertas.

No obstante, existen factores que afectan la acción de las Fi, tales como el tiempo de tránsito intestinal y el pH. Es conocido que el proventrículo y la molleja son los órganos “marcapasos” de retención y paso del alimento del tracto digestivo superior hacia el intestino, siendo que alimentos de granulometría mayores tardan más tiempo en pasar, por la digestión gástrica que requieren. Bajo estas condiciones, el tiempo en el cual la Fi exógena tiene acceso al sustrato se prolonga, permitiendo una mayor hidrólisis del sustrato. Liu, Cadogan y col. (2014) encontraron que existía una interacción entre el tipo de cereal en la dieta y la inclusión de una Fi sobre el tiempo

de retención en intestino en pollo de engorda, observando que en el maíz la inclusión de la Fi reducía el tiempo de tránsito, en el trigo era mayor y en el sorgo no existía un efecto.

Así mismo, en el proventrículo se secreta el ácido clorhídrico, del que procede el mayor cambio de pH en el tracto digestivo, promoviendo pH ácidos en el tracto digestivo superior. Bajo estas condiciones el fitato es más soluble y por ende más susceptible a la hidrólisis (Maenz, Engele-Schaan *y col.*, 1999). Por lo tanto, los InsP que encontramos en molleja son un reflejo directo de la acción de la Fi exógena y de las endógenas propias de los cereales en la dieta, aunque estas últimas presentan menos actividad por el pH propio del tracto digestivo superior solo en el caso de las aves, pero no en los cerdos (Rodehutschord, Faust *y col.*, 1996). De este modo al conocer el estatus de hidrólisis del A-Fi con la adición de enzimas exógenas se puede evaluar la eficacia del proceso de ruptura y dar un panorama de lo que se irá dando en los tramos posteriores del tracto digestivo.

En el caso de estudiar la hidrólisis en las partes del intestino, otros factores como aquellos inherentes a la absorción de nutrientes entran en juego. Entre estos cabe destacar la acción de las enzimas producidas en los enterocitos (Maenz y Classen, 1998) y por la flora microbiana (Zeller, Schollenberger *y col.*, 2016), las interacciones de tipo quelante de los InsP provenientes de la molleja con otras moléculas presentes en la dieta (Persson, Türk *y col.*, 1998), la presencia de transportadores intestinales que afectan directamente sobre el proceso de absorción de los InsP, P, e inositol. De tal modo, aunque lo que sucede en el tracto digestivo superior repercute sobre lo que sucede en el inferior, en éste último la acción de las enzimas exógenas se conjugan con los mecanismos de digestión del organismo, cambiando la perspectiva de las conclusiones de los estudios realizados.

I.2 Las Fitasas

El A-Fi es el sustrato de un grupo de enzimas conocidas como fosfatasas, entre las cuales las Fi son las que poseen mayor afinidad por dicha molécula, siendo éste punto la característica que las diferencia de las demás fosfatasas. Un ejemplo de ello es lo

demostrado por Ullah , Phillipy (1994) en un estudio *in vitro*, donde la Fi proveniente de *Aspergillus ficuum* demostró tener mayor capacidad de hidrólisis de fitato que una fosfatasa, a un pH de 2.5. En el caso de las fosfatasas, éstas pueden obtener grupos orto-fosfato de varios tipos de sustrato, no solo del A-Fi, clasificándose en ácidas y básicas dependiendo del pH en el que actúen. Las fosfatasas ácidas tienen mayor capacidad para degradar el A-Fi, aunque no son específicas de éste sustrato (Vats y Banerjee, 2004) y poseen poca selectividad (Duff, Sarath y col., 1994).

Existe otro tipo de criterio de diferenciación entre las Fi y fosfatasas en general, bajo el cual se afirma que solo la Fi tiene la capacidad de hidrolizar el A-Fi, es decir la molécula myoIns-6P, mientras las fosfatasas pueden iniciar el proceso de degradación a partir de Ins-5P hasta obtener grupos mono-fosfato. Aún falta por definir si en el caso de las enzimas que son producidas internamente en el ave, siendo de tipo fosfatasa, poseen la capacidad de degradar el fitato o si más bien por mecanismos de pH gástrico es que el fitato se hidroliza y ya luego las fosfatasas entran a ejercer su acción de desdoblar a los Ins-5P o si estos procesos de degradación los realiza en mayor proporción la microbiota interna del animal.

Las Fi han sido clasificadas según la Unión internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) en dos grupos: el primero, 3-Fi (EC 3.1.3.8- denominadas 3-D) que hidrolizan preferencialmente el enlace éster de la tercera posición del A-Fi contando en sentido de las manecillas del reloj, produciendo un Ins-5P (1,2,4,5,6) y un grupo fosfato. El segundo grupo son las 6-Fi (EC 3.1.3.26- denominadas L-6 ó D-4) que ataca primero el sexto enlace produciendo el Ins-5P (1,2,3,4,5) y un grupo fosfato (Barrientos, Scott y col., 1994;Vats y Banerjee, 2004); no obstante, las Fi tipo 4 (E.C. 3.1.3.72) también han sido identificadas (Li, Zhao y col., 2010). En general se establece que las 6-Fi se encuentran en vegetales y las 3-Fi en microorganismos, más aún existen algunas excepciones como el caso de la enzima de la soya que es 3-Fi y de la de *Escherichia coli* y *Paramecium* que son Fi tipo 6 (Angel *et al.* , 2002). Las 6-Fi son capaces de desfosforilar el A-Fi hasta obtener Ins-1P como producto final, mientras las 3-Fi alcalina no pueden hidrolizar mas allá de Ins-3P (Wodzinski y Ullah, 1995).

Existe otra clasificación de las Fi teniendo en cuenta sus propiedades catalíticas, es decir las propiedades del sitio activo, que las divide en 4 clases: 1) Fi ácidas dependientes de histidina (HAPhy), 2) las β -hélice (BPPhy), 3) las dependientes de cisteína (Cphy) y 4) las ácido púrpura (PAPhy). A pesar que varias de las Fi provenientes de microorganismos se incluyen dentro del grupo HAPhy, presentan diferencias entre ellas como el caso de dos enzimas provenientes de *Aspergillus niger*, denominadas A y B, las cuales se diferencian por la estructura en el sitio activo donde la A presenta 2 aminoácidos ácidos y 4 básicos y la B solo 2 ácidos. Esta estructura provoca que la fitasa B tenga mayor actividad catalítica en pH de 2.5 que la A, aunque ésta última alcanza mejor actividad en pH de 5.5 y posee mayor amplitud de especificidad por el sustrato (Wyss, Brugger y col., 1999). A éste mismo grupo pertenece la Fi codificada en el gen appA de *Escherichia coli* con un pH óptimo de 2.5 y un clon expresado en *Pichia pastoris*, siendo catalíticamente diferentes (Vats y Banerjee, 2004) y habiendo conseguido mejoras en su termo estabilidad (Rodríguez, Wood y col., 2000). Las de tipo HAPhy no solo se han obtenido de bacterias, sino también en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, que ha sido transformada y expresada en *Aspergillus oryzae*. En el caso de la Fi proveniente de *Bacillus subtilis* se ha incluido en el grupo de las BPPhy y tiene como característica especial el requerimiento de Ca^{+2} para su actividad y estabilidad (Kerovuo, Lauraeus y col., 1998), convirtiéndolas en metaloenzimas. No obstante, otras enzimas del mismo tipo no se reportan como metaloenzimas, como es el caso de la proveniente de *Klebsiella terrigena* y de la *Schwanniomyces castellii* (Vats y Banerjee, 2004).

Fuente para las aves. Las Fi de manera natural están presentes en plantas, organismos pluricelulares, y microorganismos, ya habiéndose referenciado algunos ejemplos de los últimos, los cuales han sido modificados por medio de técnicas de ingeniería genética para su aplicación en la industria, aunque de manera natural se encuentran presentes en el suelo y son considerados entes fundamentales para la continuidad del ciclo del P en su captación por las plantas.

Vegetales. En los vegetales, la presencia de las Fi permiten dar paso al proceso de germinación de la semilla mediante la liberación de minerales, fosfatos e inositol, que sirven como nutrientes a la planta en desarrollo (Greiner, Muzquiz y *col.*, 2005). Su existencia ha sido reportada en varios tipos de cereales como avena, arroz, sorgo, trigo, entre otros, en los cuales el contenido de las Fi así como de fitato, varían según la ubicación en la estructura del grano y poseen propiedades específicas de temperatura y pH (Sebastian, Touchburn y *col.*, 1998).

Al parecer las Fi endógenas de los cereales no tienen efecto en el proceso de hidrólisis del fitato dentro del tracto digestivo del ave por dos razones: 1) el rango de temperatura que toleran es de 40-60°C (Wodzinski y Ullah, 1995) por lo cual son inactivadas durante el proceso de elaboración del alimento o peletizado y 2) son susceptibles a pH ácidos como el presente en el tracto digestivo superior, aunque toleran pH cercanos a 5 similar al intestino. No obstante, a partir de los resultados obtenidos por Zeller, Schollenberger y *col.* (2016), se plantea la posibilidad que exista un sinergismo entre las Fi de cereales y las endógenas del tracto digestivo, ya que al evaluar en pollo de engorda dietas a base de trigo calentadas o no con microondas, adjudicó el inicio de hidrólisis a las enzimas propias del cereal (A-Fi en Ins5-P) y posiblemente a fosfatasas de la microbiota del buche, planteando adicionalmente la posibilidad que la presencia de InsP estimularía la producción de enzimas endógenas.

Tracto digestivo. En pollo de engorda se ha reportado una retención del 60% del P fítico presente en la dieta (Maenz y Classen, 1998), que varía dependiendo de factores como el contenido de A-Fi, la presencia de fitato, el estado fisiológico y edad del ave y condiciones inherentes al ambiente.

La presencia de enzimas capaces de hidrólizar el A-Fi en el tracto digestivo de las aves como fosfatasas y fitasas ha sido reportado desde hace tiempo (Davies, Ritcey y *col.*, 1970; Bitar y Reinhold, 1972); así mismo en un estudio más reciente, Maenz, Classen (1998) identificaron una Fi en la membrana del borde de cepillo de enterocitos y sugieren la presencia de dos fosfatasas a pH de 6: una ácida y no

específica y otra tipo alcalina a pH mayores de 10. En el caso de la Fi, su producción es mayor en el duodeno, seguido del yeyuno e íleon, con una actividad entre pH de 5.5 y 6.5 y un $K_m = 0.160 \pm 0.008 \text{ mM}$ y $V_{max} = 42.5 \pm 1.0 \text{ nmol}$ a un pH de 6. Así mismo, reportaron una capacidad mayor de 35% en la liberación de P/min en gallinas de postura que en pollito, calculandose que bajo las condiciones propias del estudio la actividad de la Fi endógena presente en la membrana del borde de cepillo era capaz de liberar 5.2 y 3.8 mmol P/min en gallina y pollito, respectivamente.

La hidrólisis del Ins-6P disminuye a medida que pasa del duodeno hacia el íleon porque tanto la cantidad de enzimas endógenas disminuye, como existe un incremento en la formación de complejos con el Ca (Truong, Yu y col., 2014). Aunque la presencia de la Fi tiene la capacidad de hidrolisar una porción suficiente del A-Fi para el metabolismo interno, la adición de enzimas exógenas ha tenido éxito dado el mayor aprovechamiento del sustrato por el ave, lo cual a su vez disminuye la necesidad por las Fi endógenas. En un estudio con una dieta a base de maíz en pollo de engorda se concluyó que 39.3% del fitato presente en el tracto digestivo fue degradado por una Fi exógena proveniente de *Buttiauxella spp.* a 1000 FTU/kg, mientras el 23.8% fue hecho por una Fi endógena de la mucosa, para un total de degradación de 63.1% (Truong, Yu y col., 2014).

Existen mecanismos que regulan la producción de las Fi endógenas dependientes del contenido en el tracto digestivo de P inorgánico, Ins-P, e inósitol, en cuyo caso, mayor disponibilidad de éstos sustratos provocan una regulación negativa (Huber, Zeller y col., 2015), o por el contrario existe una regulación positiva ante el suministro de dietas deficientes en fosfato (Davies, Ritcey y col., 1970) o en presencia de moléculas como el colecalciferol (Onyango, Asem y col., 2006).

Microbiota. Otra fuente de enzimas capaces de degradar el A-Fi y los Ins-P en las aves son las provenientes de la flora microbiana innata del tracto intestinal presente en el buche y ciegos, de cuyas enzimas se cree que se obtendría la mayor parte de fitato hidrolizado cuando no existiera la presencia de fitasas exógenas.

Zeller, Schollenberger y *col.* (2016) determinaron que en dietas a base de maíz la acción de Fi y fosfatasa de microorganismos presentes en el buche da como resultado la obtención de Ins-5P (1,2,3,4,5) y de Ins-4P (1,2,4,5), existiendo además un aporte de las enzimas presentes en el cereal. En otro estudio por el mismo autor, encontraron que al someter una dieta a base de trigo a un tratamiento de temperatura por microondas se producía mayor hidrólisis del Ins-6P por la actividad de las enzimas de microorganismos en el íleon (Zeller, Schollenberger y *col.*, 2015). En este caso, la temperatura cambió la estructura del grano permitiendo la exposición del sustrato al ambiente del tracto digestivo y por ende un estímulo a la producción de las enzimas endógenas y de microorganismos, siendo que para éstos últimos la presencia de cierto tipo de sustratos es capaz de modular el crecimiento selectivo de poblaciones bacterianas. Sin embargo, dicho tratamiento térmico no potencializó el efecto de una Fi de origen exógeno, dado que ésta efectuó la hidrólisis de Ins-6P lo suficiente para que las enzimas endógenas no se requirieran.

Según Selle , Ravindran (2007) son pocos los estudios que evalúan el efecto de la Fi generada por la flora microbiana en aves de corral, a pesar de evidencias que señalan que ésta enzima participa en la degradación de fitatos y por ende en la generación de nutrientes disponibles para el ave como P, InsP, Ca, minerales, proteína y hasta carbohidratos y lípidos. Ptak, Bedford y *col.* (2015) encontraron que la inclusión de Fi de origen exógeno modula el crecimiento de poblaciones bacterianas innatas del tracto digestivo, como resultado del incremento de la disponibilidad de ciertos nutrientes como el P y Ca. En tal caso, el P regula los procesos fermentativos de las bacterias, de tal manera que su ausencia provoca la disminución en la producción de los ácidos grasos de cadena corta y la baja disponibilidad de Ca y P, acelerando el crecimiento de bacterias generadoras de lactato mientras disminuye las productoras de butirato, lo que termina por influir en el estado nutricional del animal y en la pobre respuesta que se genera en dietas deficientes en estos minerales.

Exógena. Incluye las enzimas de origen microbiano adicionadas en el alimento, particularmente de las provenientes de bacterias, hongos, y levaduras pertenecientes

al grupo de HAPhy, de tipo 3 y 6- Fi y una de tipo BPPhy de *Bacillus subtilis*, las cuales son enlistadas en la tabla 1. En la industria del alimento existen ciertas características deseables en las Fi, tales como que tengan actividad en un amplio rango de pH, resistencia a la proteólisis por enzimas endógenas del tracto digestivo, termoestabilidad, alta capacidad de hidrólisis del A-Fi e InsP y estabilidad en el almacenamiento en anaquel. Algunos de los factores que afectan la acción de las Fi son: pH del medio, temperatura, procesos proteolíticos, e inhibidores naturales.

Tabla 1. Fitasas comerciales disponibles.

Tipo	Origen Proteico	Expresión	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Nombre Comercial
3	A. niger	A. niger	2; 5-5-5	65	Natuphos®
3	A. niger	A. niger, no recombinante	6.0	-	Allzyme ® SSF
3	A. niger	Trichoderma reesei	2.5	-	Finase ® P/L
6	E. coli	Schizosaccharomyces pombe (ATCC 5233)	4.5	55	Phyzyme ® XP
6	E. coli	Pichia pastoris	4.5	-	Quantum®
6	E. coli	Trichoderma reesei	-	-	Quantum Blue ®
6	E. coli	Pichia pastoris	3.4, 5.0	58	OptiPhos®
6	Peniophora Lycii	Aspergillus oryzae	4-4.5	50-55	Ronozyme®
6	Citrobacter braakii	Aspergillus oryzae	4	-	Ronozyme Hiphos®
6	Buttiauxella spp.	Trichoderma reesei	3.5-4.5	60	Axtra ® PHY

Fuente: (Dersjant-Li, Awati y col., 2015)

El pH afecta directamente la acción enzimática de la Fi, ya que juega un rol fundamental en el estado aniónico de la misma; al igual que las proteínas, las Fi tienen la capacidad de cambiar su carga, especialmente en el componente carboxilo y amino de los aminoácidos constituyentes, que provoca en ésta una desnaturalización e

incapacidad para realizar su función. Por este motivo es que se acepta la existencia de un perfil de pH para cada enzima, siendo una característica elemental deseable para la implementación y diferenciación en la acción de las enzimas (Greiner y Konietzny, 2011).

Como se menciono con anterioridad las principales Fi comerciales pertenecen al grupo de HAPhy, de tal manera que se espera un buen comportamiento en el tracto digestivo, incluso en el caso de las aves que tienen pH más ácidos que otros animales como el cerdo. No obstante, es posible que el pH del medio también influya a los sustratos por medio de cambios estructurales, dado su carga electroestática. Por tanto, se espera que éstas enzimas sean capaces de resistir el pH del tracto digestivo siendo un causante de diferencias en el desempeño, aunque es claro que otros factores internos como la susceptibilidad a las enzimas proteolíticas endógenas en el animal y al ambiente electrostático del medio, también influyan. En un estudio realizado por Ullah, Sethumadhavan y *col.* (2008) encontraron que incluir 0.5 de NaCl al medio, hacia cambiar las características electroestáticas del mismo, la Fi de *A. niger* en pH de 4 y 5 mejoraba sus propiedades catalíticas incluida la constante de afinidad (K_{cat}/K_m), mientras que la de *E. coli* no mostraba cambios en un pH de 2.5 y en uno de 6 era inhibida. A pesar que las dos Fi comparten el mismo heptapéptido en su sitio de unión al sustrato, pudiera ser que existan diferencias en la secuencia de los aa del mismo. Así mismo, se evidencia un rol destacable de las cargas en las moléculas, en el caso específico de nutrientes, que podrían estar influyendo fuertemente en las interacciones con respecto al A-Fi y por lo tanto en los resultados vistos al incluir las Fi.

En general las enzimas son susceptibles a temperaturas altas que provocan desnaturalización en su estructura proteica específicamente la pérdida de su estructura secundaria. Las Fi endógenas de las plantas son inactivadas irreversiblemente a temperaturas de 70 °C mientras que las de origen microbiano la resistencia a temperatura es variable. Simon , Igbasan (2002) encontraron que a temperaturas de 70 °C la enzima proveniente de *A. niger* era levemente más estable

que la de *P. lycii* y aún más que la de *E. coli* y que cuando fueron expuestas al proceso de peletización su respuesta fue similar. No obstante, Nielsen, Nyffenegger y col. (2015) reportaron que la Fi de *P. lycii* no perdió actividad en temperaturas de 60 °C, mientras que la de *C. braakii* disminuyó su nivel de actividad y las de *A. niger*, *E. Coli* y *P. Pastoris* lo disminuyeron aún más; todas las Fi evaluadas en éste estudio, no mostraron pérdida de su actividad a 50 °C por 30 min.

De tal manera que una de las características deseable en una Fi incluida en alimento para animales, es que sea termo-resistente a las temperaturas empleadas en la elaboración del alimento como en el caso de la peletización, que emplea temperaturas de 60 a 95 °C por 3 a 5 minutos y que afectarían la acción de enzimas adicionadas al alimento. Estrategias como recubrir las enzimas o dosificarlas en estado líquido post-peletización han sido cuestionadas en cuánto a su eficacia, teniendo en cuenta que el sitio idóneo para la actividad de la fitasa en el tracto digestivo es el buche y la molleja, más no el intestino y la factibilidad de encontrar una dosificación no uniforme de la enzima con su adición en estado líquido.

Por su estructura proteica, las Fi han mostrado ser sensibles al ataque de enzimas proteolíticas propias del tracto digestivo superior como la pepsina y pancreatina (Nielsen, Nyffenegger y col., 2015). En estudios *in vitro* se demuestra como las más susceptibles a éste proceso son las Fi de las plantas, seguidas de las tipo ácidas de origen fúngico y por último las provenientes de bacterias. En un estudio se encontró que las Fi provenientes de *E. coli*, *Klebsiella spp.* y *Malaysian waste water bacterium* conservaban un 80% de la actividad cuando se expusieron a digestión con pepsina en un pH de 2, mientras que las de *A. niger* y *P. lycii* conservaban el 26-42% y 2.20%, respectivamente. En el caso de la pancreatina, se encontró que a un pH de 7 las Fi bacterianas retuvieron más del 90% de su actividad, mientras la de *A. niger* sostuvo del 23-34% y la proveniente de *P. lycii* fue inactivada (Greiner y Konietzny, 2011). En estudios *in vivo* diferencias en la actividad catalítica también ha sido encontrada: 68% para *B. subtilis*, 60-70% para *A. niger* y 59% para *P.lycii* en molleja, mientras en intestino fue 55-94% para *A. niger* y 85-95% para *P. Lycii* (Greiner y Konietzny, 2011).

En una situación *in vivo* las interacciones entre enzima y sustrato son más complejas y pueden asegurar una reducción en la susceptibilidad de la enzima a la proteólisis en el tracto digestivo, ya que es posible una mayor estabilidad de la Fi exógena con el fitato dada las condiciones del medio y un menor ataque de las enzimas proteolíticas endógenas por la presencia de otros sustratos. Nielsen, Nyffenegger y *col.* (2015) concluyeron en su estudio *in vitro* que la Fi proveniente del trigo no tendría efecto en condiciones propias del estómago puesto que ésta enzima no mostró actividad a un pH de 2 con o sin presencia de pepsina; esto va en contradicción lo reportado por Zeller, Schollenberger y *col.* (2015) en pollo de engorda, quienes aluden un efecto positivo de la Fi del trigo en el desempeño productivo de las aves.

Como todas las enzimas, las Fi presentan moléculas que inhiben su actividad, entre las cuales se encuentra el mismo sustrato (por las cargas que presenta), los InsP, grupos fosfatos y minerales como el Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y Mn^{2+} , de los cuales según un estudio realizado por Santos, Connolly y *col.* (2015) el Fe^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} presentan mayor inhibición que el Mn^{2+} . En casos específicos como la Fi proveniente de *B. Subtilis*, por ser una metaloenzima, el Ca^{2+} es un mineral que limita y modula su acción. Una posibilidad que se plantea al momento de explicar la capacidad de inhibición a las Fi de tipo endógeno por parte del producto, en éste caso los grupos fosfato, es la capacidad que ha mostrado para inhibir a nivel transcripcional la producción de la Fi presente en las plantas (Sartirana y Bianchetti, 1967). De tal manera que cubrir las necesidades de P con fuentes inorgánicas que están disponibles desde el tracto superior, tendría repercusiones en el proceso de absorción de P y por lo tanto podría diferir con lo obtenido tras la acción de una Fi.

Vía metabólica de las fitasas exógenas. Además de la diferencia en el inicio de hidrólisis, los productos resultantes también difieren entre las Fi, por lo que no todas las enzimas producen los mismos InsP (Weaver, Ullah y *col.*, 2009) (aunque esto va a depender de las condiciones bajo las cuales el proceso catalítico se dé). A pesar que las Fi son semejantes entre sí y pertenecen a un mismo grupo, tienen diferencias en la especificidad por los InsP. Un ejemplo de ello son las Fi provenientes de *E. coli* y de

Paramecium, ya que aunque son enzimas bacterianas de tipo 6-Fi, la de *E. coli* tiene como producto final el Ins-1P (2), mientras que en el caso de *Paramecium* es el DIns-2P (2,3), siendo que ésta última enzima es incapaz de obtener Ins-1P (Konietzny y Greiner, 2002).

Greiner, Carlsson y col. (2000) reportaron que la vía de degradación de la Fi P2 proveniente de *E. coli* era diferente a la del Fi del trigo aunque ambas sean de tipo 6-Fi. De tal modo que las provenientes de *E. coli* produce D:L-Ins-5P(1,2,3,4,5), D:L-Ins-4P(2,3,4,5), D:L-Ins-3P (2,4,5) ó D:L-Ins-3P(1,2,4), D:L-Ins-2P(1,2) ó Ins-2P(2,5) ó D:L-Ins-2P(4,5) y finalmente Ins-1P (2) ó Ins-1P (5), mientras que la Fi de trigo inicia su degradación con el isómero D-Ins-5P(1,2,3,5,6). De tal manera que aunque se cataloguen como 6-Fi, el inicio de la degradación no es la misma para ambas y por tanto los productos resultantes tampoco lo serán. En el caso del tipo 3-Fi, Greiner, Silva y col. (2009) reportaron que la vía para una Fi de *A. niger* 11T53A9 era D-Ins-5P(1,2,4,5,6), D-Ins-4P(1,2,5,6), D-Ins-3P 1,2,6), D-Ins-2P(1,2) y finalmente Ins-1P (2).

Diferencias entre las vías de degradación de las Fi se debe a la diversidad de afinidad por los productos subsecuentes producidos en el proceso de hidrólisis del A-Fi, tal como es el caso de la Fi proveniente de *B. subtilis*, cuyos productos finales son los Ins-3P (Konietzny y Greiner, 2002). Al respecto Greiner, Carlsson y col. (2000) afirmaron que la disminución en la degradación de los Ins-P como los de tipo 3, podría darse por la inhibición causada por grupos fosfatos, por la baja especificidad de las enzimas por éstas moléculas o por la combinación de ambos casos.

Por otro lado se ha encontrado que las Fi que poseen mayor repertorio de sustratos, tienden a producir más grupos orto-fosfato sin que se dé la acumulación de Ins-P intermedios, mientras aquellas con alta especificidad por el A-Fi provoca que la mayor producción y acumulación de Ins-3 y 2P, aunque luego siga su degradación hasta obtener mono-fosfato, aunque el proceso se hace más lento (Wyss, Brugger y col., 1999). Es así como, Fi con grandes constantes de afinidad (K_{cat}/K_m) por el A-Fi, tendrían menor capacidad hidrolítica por los InsP, teniendo en cuenta factores

importantes que influyen en la liberación de grupos mono-fosfatos como lo es el tiempo.

Dosis. Las unidad de medida para la dosificación de las Fi es la FTU, que se refiere a la cantidad de Fi necesaria para liberar 1mmol de fosfato inorgánico por minuto a partir de 0.0051 mol L⁻¹ de fitato de sodio a un pH de 5.5 y una temperatura de 37 °C (Dersjant-Li, Awati y *col.*, 2015). Desde el inicio de la aplicación de las Fi en la industria de alimentos, las enzimas eran añadidas en cantidades estándar acorde a la especie doméstica en cuestión. En el caso de la gallina de postura, la dosis que se maneja comúnmente es de 300 FTU/kg. No obstante, en años recientes la inclusión de dosis mayores han ido incursionando en el mercado, bajo conceptos como “superdosis” o “megadosis”. Así mismo, el efecto extra-fosfórico es otro concepto que ha surgido a partir de la acción de las Fi exógenas, ligada con la dosis empleada (Cowieson, Wilcock y *col.*, 2011).

El efecto fosfórico es la respuesta que se obtiene con la Fi en cuanto a la liberación de P a partir de P fítico de la dieta. Este concepto se basa en la capacidad de la enzima de hidrólizar la molécula del A-Fi, liberando los grupos fosfato contenidos en cada molécula, los cuales quedan disponibles para ser utilizados por el animal en el metabolismo interno. Wilcock , Walk (2016) estipulan que en una dieta a base de maíz y pasta de soya con un contenido de P fítico de 0.25% con una dosis de 500 FTU/kg se obtendrá una liberación de 0.10% de P disponible dada una hidrólisis del A-Fi del 40%.

En gallina de postura son numerosos los estudios donde se ha probado la efectividad de la Fi en cuanto a rendimiento productivo, características del hueso y cáscara del huevo. Inicialmente, el primer objetivo que se persiguió con la Fi fue disminuir el contenido de P en excretas dado el impacto negativo que en los mantos acuíferos se causó y se sigue causando a nivel mundial (Vitti y Kebreab, 2010). De tal manera que se espera reducir los niveles de inclusión de P inorgánico en la dieta al adicionar la Fi, sin que ello signifique cambios negativos en la producción. Así, tanto parámetros

productivos como estabilidad en la homeostasis del tejido óseo e impacto ambiental, son variables respuesta que se tienen en cuenta al momento de buscar el efecto fosfórico de la Fi.

Influencia del contenido de P inorgánico y Ca en la dieta, sinérgismo con metabolitos de vitamina D, ácidos orgánicos, entre otros, han sido investigado respecto al efecto de la enzima en el metabolismo de P y Ca e hidrólisis del A-Fi. Los niveles de P inorgánico han mostrado afectar la acción de la Fi exógena sobre parámetros productivos, posiblemente provocado por un mecanismo de retroalimentación negativa en la expresión de enzimas endógenas (Vats y Banerjee, 2004). Así mismo, la relación entre los niveles de P y Ca disponibles en la dieta, puede ser una limitante en la respuesta de la enzima en gallina de postura (Englmaierova, Skrivanova y *col.*, 2014) cuando existe una relación inadecuada de ambos minerales, afectando el proceso de deposición en hueso para su reserva y en la formación de yema y cáscara del huevo.

Los niveles de Ca tienen una gran influencia por tres razones: las cantidades de Ca en el alimento para postura son altas, el Ca es quelado por el A-Fi, y porque posee una relación fisiológica estrecha con el P. Los requerimientos diarios de Ca para la formación de la cáscara son cerca de 3 g por 100 g de alimento consumido ((NRC), 1994), por lo que es el mineral que más está presente en el alimento en forma de ión. Así mismo, debe conservarse de una manera soluble en el tracto digestivo para ser absorbido, como también es el caso del fosfato para la obtención de P internamente. En el caso que el Ca^{2+} y el PO_4^- no estén presentes en un medio diluido y dado la disponibilidad del Ca y la características quelante del PO_4^- , la unión de éstos dos minerales se dá, provocando la inhibición de su absorción y su consecuente excreción. Así mismo, una relación cuantitativa se guarda entre el Ca y P, que para aves y cerdo se ha planteado entre 1:1 y 2:1, mientras que en el caso de gallina de postura llega a ser de 4:1. En la gallina de postura, la relación está fuertemente regulada por mecanismos de regulación inherentes al proceso de deposición de minerales en médula ósea en hueso (dónde la relación es de 2:1) como reserva para la formación de

cáscara y por la regulación de consumo de alimento que varía los niveles en plasma según el momento de formación del huevo (De Vries, Kwakkel *y col.*, 2010).

La molécula $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, conocida como calcitriol es el metabolito activo de la vitamina D que junto con la hormona paratiroidea activan mecanismo en el organismo para aumentar la concentración de Ca y a su vez del P en sangre. Metabolitos del calcitriol como el 25-hidrocoleciferol ($25(\text{OH})\text{D}_3$) se emplea como aditivo para incrementar la retención de P a partir de la dieta; Angel, Saylor *y col.* (2006) reportaron la existencia de sinergismo entre el $25(\text{OH})\text{D}_3$ y una 6-Fi exógena, al provocar mayor retención de P en pollo de engorda, lo que disminuyó las cantidades de P en excreta en dietas bajas en P disponible, sin que existiera un efecto negativo en el rendimiento productivo de los mismos.

Mientras tanto el efecto extra-fosfórico es aquel aludido al uso de las Fi que va más allá por la liberación de P a partir de la dieta, basandose en el hecho de disminuir el efecto anti-nutritivo del A-Fi al mejorar la disponibilidad de los nutrientes presentes en la dieta como es el caso de proteínas, minerales, carbohidratos y hasta lípidos (Selle, Cowieson *y col.*, 2012). Éste efecto de la enzima se ha contemplado, dada la expectativa de inhibir la capacidad quelante del A-Fi sobre una amplia variedad de moléculas adyacentes en el medio, que en el caso del alimento son nutrientes diferentes al P (Angel, Tamim *y col.*, 2002). No obstante, también se ha percibe dicho efecto como una consecuencia de la reconstitución del metabolismo del Na, el cual es un mineral altamente afectado por la presencia del A-Fi. Al respecto, se ha encontrado que en presencia de A-Fi, la alta producción de moco intestinal provoca la pérdida de Na, evitando su uso en los procesos de transporte de glucosa y aminoácidos a nivel intestinal, lo que termina interfiriendo negativamente los procesos metabólicos (Liu, Cadogan *y col.*, 2014).

Dosis que buscan neutralizar el efecto anti-nutritivo del A-Fi en el tracto digestivo y que están por encima de aquellas que cubren el aporte de la enzima respecto al P, es decir las estándar, se denominan como superdosis o megadosis, dependiendo del

productor de la enzima (Cowieson, Wilcock y col., 2011). Éstas dosis fueron descubiertas cuando se pretendía evaluar la inocuidad en el uso de las Fi exógenas de origen microbiano en las aves, resultando que no solo eran inócuas (hasta de 10,000 FTU) sino que al contrario mostraron tener mejor respuesta en rendimiento productivo, convirtiéndose en un tema central de investigación (Wilcock y Walk, 2016). La aplicación de la superdosis según Cowieson, Wilcock y col. (2011) tiene como objetivo tres puntos: mayor liberación de P, con su subsecuente reestablecimiento de la relación Ca:P; disminución de la cantidad de fitato remanente, incrementado las cantidad de los InsP solubles; y liberación de myo-inositol, teniendo repercusiones de tipo lipotrófica. No obstante, Wilcock , Walk (2016) define la superdosis como aquella dosis que logra una hidrólisis >85% del A-Fi contenido en la dieta, obtenida con inclusiones mayores a 1,500 FTU/kg en el caso de la Fi proveniente de *E.coli*. No obstante no se ha establecido la relación entre el efecto fosfórico y extra-fosfórico de la enzima con la dosis estudiada, teniendo en cuenta que el principal enfoque en el empleo de las Fi está relacionado con una mayor disponibilidad del P.

La superdosis lo que se pretende es hidrolizar el A-Fi en una manera más eficaz, es decir en menos tiempo conseguir mayor generación de inositol e InP, partiendo del hecho que las Fi poseen afinidad por algunos InsP (Dersjant-Li, Awati y col., 2015); además que es la reducción del A-Fi a moléculas como el Ins-3P lo que logrará disminuir el fenómeno de quelación de nutrientes en el tracto digestivo (Walk, Bedford y col., 2012) y obtener nutracéuticos como el inositol (Greiner, Carlsson y col., 2000).

I.3 Fisiología en la Digestión de la Proteína

La lisina es un aminoácido considerado limitante en especies productivas como la gallina de postura, puesto que estas no poseen la capacidad de síntesis interna de la cadena de carbón, requiriendo de su suplementación en la dieta. En organismo multicelulares se reconoce la existencia de 20 aminoácidos de los cuales 10 son limitantes (lisina, histidina, leucina, isoleucina, metionina, valina, treonina, triptófano, fenilalanina y arginina), 3 semi-limitantes (tirosina, cisteína e hidroxilisina) y 9 no

limitantes (alanina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, hidroxiprolina, glicina, serina y prolina) (D'mello, 2003). En el caso de los semi-limitantes su condición depende de la demanda en el organismo por el aminoácido al cual dan origen: fenilalanina, metionina y lisina para formar tirosina, cisteína e hidroxilisina, respectivamente. Así mismo, dependiendo de ciertos estados metabólicos como aquellos que se presentan en aves de rápido crecimiento, la glicina y serina podrían considerarse como limitantes.

En la formulación de dietas existe el concepto de proteína ideal o formulación a base de aminoácidos digestibles que busca la elaboración de dietas con mayor precisión a los requerimientos del ave en cierta etapa productiva (Boisen, Hvelplund *y col.*, 2000). De los 20 aminoácidos, los que son tomados en cuenta en éste tipo de formulación son: lisina, metionina, metionina+cisteína, treonina, triptófano, arginina, isoleucina y valina, de los cuales la lisina es el aminoácido de referencia en las aves de producción tanto pollo de engorda como aves de postura, así como en el cerdo, a pesar que en las aves el primer aminoácido limitante es la metionina usado para la formación de plumas y mecanismos internos vitales como la metilación del ADN. No obstante, la lisina se prefirió como el aminoácido de referencia por razones tal como que su análisis químico es menos complicado comparado con la metionina, o porque la lisina es empleada mayoritariamente para la formación de proteína corporal y para deposición en productos como el huevo, siendo poca su participación en otros procesos internos como si sucede con la metionina, lo que provoca su desviación hacia esos procesos. Además, la lisina no tiende a dar origen a otro aminoácido, como pasa con la formación de cisteína a partir de metionina (Lemme, Ravindran *y col.*, 2004).

La lisina igual que los aminoácidos presentes en la dieta, son obtenidos de la proteína de la dieta por una serie de enzimas producidas en el borde de cepillo de los enterocitos en el tracto digestivo como es la tripsina, elastasas, oligopeptidasas, peptidasas y aquellas presentes dentro de los enterocitos, que dejan en forma de aminoácido libre cerca de un 85% de los presentes en la dieta (Krehbiel Jr y Matthews, 1994). De esta lisina libre, según Van Goudoever, Stoll *y col.* (2000) el 60%

se oxida en muchos tejidos, incluyendo el intestino en el cual al parecer es una fuente importante de energía, para dar origen a acetil-coenzima A. En el caso específico de la lisina, el 60% de aporte al proceso de oxidación se mantiene constante independientemente del aporte en la dieta, lo que en otros aminoácidos no se presenta, ya que al bajar el aporte en la dieta, el porcentaje destinado al proceso de oxidación también disminuye. Así mismo, aproximadamente el 1% de la lisina aporta su cadena carbonada para la formación de carnitina, junto al grupo metilo cedido por la metionina, siendo la carnitina la encargada de transportar los ácidos grasos de cadena larga hacia la mitocondria donde se lleva a cabo el proceso de β -oxidación; no obstante, la contribución de lisina a éste proceso si es proporcional al contenido del aminoácido en la dieta.

El requerimiento de lisina en aves de postura en producción varía según la fuente bibliográfica que se consulte, siendo que por ejemplo en el caso de una línea blanca de peso liviano como lo es la Bovans White, su manual referencia maneja un consumo de lisina de 903 mg en una ración diaria de 105 g, mientras que el NRC (1994) lo maneja de 580 a 690 mg en una ración de 100 g. En las tablas brasileñas de Rostagno, Teixeira y col. (2017), va desde 756 mg en aves de 40 semanas de producción hasta 708 mg a las 65 semanas. Silva, Malheiros y col. (2015) demostraron que el punto óptimo biológico para el consumo de lisina es más alto que el punto óptimo económico, ya que por ejemplo para el período de 45 a 48 semanas con 669 mg se logra mejor producción, aunque con 667 mg es más rentable, usando cloruro de lisina. Coon (2002) expone que de los requerimientos de lisina, el 1% va para formación de plumas, 8% para tejido en crecimiento, 19% para mantenimiento y 72% para deposición en huevo, aunque en general se habla que un 40-45% del consumo (Rostagno, Teixeira y col., 2017) es destinado a la formación de huevo. La mayor cantidad de lisina va para yema para un total de 420 mg de lisina por huevo (Marina y Covadonga, 2004), mientras que en el caso de la metionina la mayor cantidad va hacia clara. De tal manera que la búsqueda de precisión en las dietas han ido de la mano con

la evaluación de los requerimientos de lisina, posiblemente influidos por la presencia de Fi exógenas en la dieta tras su impacto en la porción proteica del alimento.

Prueba de digestibilidad de aminoácidos. La evaluación de la disponibilidad de los aminoácidos en el alimento en aves comerciales se hace preferiblemente mediante ensayos de digestibilidad, ya que aunque en los ensayos de crecimiento se evalúan a la vez los procesos de digestión, absorción e incorporación en los procesos internos de los aminoácidos al tomar en cuenta la respuesta en formación de proteína corporal, éstos resultan ser costosos porque requieren mayor tiempo y requieren dietas semi-purificadas o purificadas (Ravindran y Bryden, 1999).

La digestibilidad de un nutriente es la cantidad ingerida que es absorbida por el ave y por ende no excretada (Lemme, Ravindran y *col.*, 2004), suponiendo que aquella cantidad retenida en el tracto digestivo es absorbida y luego empleada por el animal para diversos procesos como la formación del huevo. Ensayos como el uso de gallos caecetomizado alimentados a precisión o el de digestibilidad ileal, permite la evaluación de los aminoácidos corporales en un corto tiempo (limitantes y no limitantes) encontrados en el ave incluida la cisteína (Adedokun, Adeola y *col.*, 2011). No obstante, la digestibilidad aparente no hace una diferenciación entre las fracciones de aminoácidos no absorbido del alimento de aquellos provenientes del cuerpo, siendo que por ejemplo Simon, Żebrowska y *col.* (1983) reportaron que más del 25% de la proteína corporal sintetizada estaría presente en el tracto digestivo, por lo cual la determinación de la digestibilidad estandarizada y verdadera serían más precisas, teniendo en cuenta que en éstas se cuantifica la proporción de aminoácidos internos.

Hay varios factores que pueden afectar el aporte de aminoácidos endógenos como por ejemplo la cantidad producida de moco intestinal, el contenido de proteína o de aminoácidos limitantes en la dieta, así como la porción de fibra y A-Fi de la misma, la salud intestinal y factores inherentes al ensayo como la edad, el tipo de ave comercial a evaluar y el método empleado (Adedokun, Adeola y *col.*, 2011). En el caso de la digestibilidad estandarizada solo se toma en cuenta la pérdida de aminoácidos

endógenos independiente del tipo de dieta y generalmente se usan determinaciones hechas en estudios previos, mientras que la digestibilidad verdadera toma en cuenta tanto las pérdidas independientes como las generadas por las características propias de la dieta, y son estimadas por técnicas como la dilución de isótopos estables y la homo-arginina (Lemme, Ravindran *y col.*, 2004; Kim, 2010).

Puesto que recolectar el contenido total del intestino no es posible con la técnica de digestibilidad ileal (Lemme, Ravindran *y col.*, 2004), se requiere el empleo de marcadores inertes que no sean absorbidos en el tracto digestivo y que nos permitan expresar la digestión proporcionalmente. Aunque existen previos reportes que no adjudican diferencias entre marcadores, evidencia de alta variabilidad y baja repetibilidad en los resultados con el óxido de cromo ha promovido el uso del dióxido de titanio, que además tiene la ventaja de ser mejor cuantificable por método colorimétrico. No obstante un alta proporción de estudios emplean el método gravimétrico de ceniza ácida insoluble (con Celite® o sílica), siendo que con éste tipo de estudio se emplea mayor cantidad del marcador y se ha aludido menor precisión respecto al dióxido de titanio (Adedokun, Adeola *y col.*, 2011). En la búsqueda de determinar lo aprovechable a partir de la dieta se debe tomar en cuenta ensayos de digestibilidad que aclaren la mejora en las propiedades nutritivas de una dieta al incluir por ejemplo la Fi.

I.4 Coenzima Q10

Las coenzimas son moléculas biológicas que apoyan la acción de las enzimas en los procesos catabólicos, y en el caso de la nutrición, son claves en el metabolismo de los alimentos. La coenzima Q (**CoQ10**) o ubiquinona ha sido identificada en una amplia gama de individuos, en diferentes conformaciones químicas como es el caso de la CoQ6 en levaduras (Ayer, Macdonald *y col.*, 2015), la CoQ10 en aves y humanos y la CoQ9 en ratas y ratones (Kamisoyama, Honda *y col.*, 2010), existiendo la posibilidad que todas las versiones pueden estar presentes en un mismo organismo. La diferencia radica en el número de grupos isoprenoídeos que conforman la cadena de poli-

isoprenoides (lo que se denota con el número), más sin embargo el núcleo de benzoquinona es el mismo.

En el caso de la CoQ10 se conocen tres tipos, que son dependientes del estado oxidativo del núcleo de benzoquinona: oxidada ó ubiquinona (CoQ10), reducida ó ubiquinol (CoQ10H₂) y un estado intermedio ó semiquinona (Botham y Mayes, 2012), dentro de las cuales el ubiquinol es la que prevalece. En orgánulos celulares la proporción de ubiquinol varia, siendo mayor en la membrana interna de la mitocondria, seguido de la externa, lisosomas, vesículas de Golgi, membrana plasmáticas y núcleo (Zhang, Turunen *y col.*, 1996). En humanos, el corazón (114 ug/g) es el órgano que más contenido presenta tanto de reducida como de oxidada, seguido por el riñón (67 ug/g), hígado (55 ug/g), músculo (40 ug/g) y glándula tiroides, bazo, cerebro, intestino y las testis (<40 ug/g), aunque la proporción de la CoQ10 reducida varía entre órganos, el páncreas y el hígado son los que mayor proporción poseen (Åberg, Appelkvist *y col.*, 1992).

En los alimentos, el contenido de CoQ10 es variable, siendo que por ejemplo en una dieta común maíz y pasta la cantidad promedio es de 14-26 mg/kg (Pravst, Žmitek *y col.*, 2010), del cual dada la naturaleza lipídica e hidrofóbica de la CoQ10 solo aproximadamente el 2% puede ser absorbida en el tracto digestivo. Esta absorción se da gracias a un proceso de reducción en los enterocitos (Zhang, Åberg *y col.*, 1995), después de lo cual el ubiquinol absorbido es transportado al hígado por lipoproteínas de baja densidad (LDL), es re-empacada y llevada por las LDL y VLDL a la circulación, principalmente por medio del sistema linfático (Ayer, Macdonald *y col.*, 2015). La CoQ10 en el organismo permanece mas que todo en el torrente sanguíneo, aunque también es transportada a los órganos (Ernster y Dallner, 1995). En ratones CoQ10 administrada oralmente a dosis de 12 mmol/100 g de peso corporal llevo a incrementar el contenido en hígado y bazo, pero no en corazón y riñón, siendo que la absorción en órganos al parecer es dependiente de la dosis y del tiempo suministrado (Zhang, Åberg *y col.*, 1995). La excreción de la coenzima se da principalmente por vía

de las sales biliares en las heces y otra parte menor por la orina (Bhagavan y Chopra, 2006).

Por lo tanto la mayoría de la CoQ10 presente en el cuerpo proviene de síntesis interna, iniciando en los peroxisomas con la formación de la cadena de grupos isoprenoides, obtenidos del Acetil-CoA por la vía del mevalonato. Tras ello, el núcleo de benzoquinona, que deriva del aminoácido tirosina, se une con la cadena de isoprenoides en la mitocondria. Se piensa que de la mitocondria la CoQ10 formada pasa al retículo endoplasmático y de allí es transportado a los demás orgánulos por su naturaleza no hidrosoluble (Ayer, Macdonald *y col.*, 2015; Wang y Hekimi, 2016). Debido a esta característica de síntesis interna en la mayoría de células, a la CoQ10 se le dio el nombre de ubiquinona, proveniente de la palabra ubicuo que significa “en todas partes”. A la CoQ10 se le ha adjudicado funciones de importancia biológica por ser un acarreador de electrones en la cadena respiratoria de la membrana interna de la mitocondria, principalmente en los procesos de formación del ATP y como antioxidante interno. También, se le reconoce como señalizador celular y molécula activa en la expresión de genes (Crane, 2001; Bhagavan y Chopra, 2006), siendo que éstas funciones escapan del enfoque del presente estudio.

En la mitocondria se encuentran las enzimas que participan en los procesos fundamentales en la generación de energía como aquellas implicadas en el ciclo del ácido cítrico, la B-oxidación, y la cadena respiratoria que permite llevar a cabo la fosforilación oxidativa. La CoQ10 tiene un rol primordial en la cadena respiratoria, al participar en la oxidación de equivalentes reductores como el NADH y FADH (originados del catabolismo de los carbohidratos, ácidos grasos, y aminoácidos), lo que permite la alimentación de protones hacia el espacio intermembranal en la mitocondria y con ello la formación del ATP por la ATP-sintetasa. En la cadena respiratoria existen cuatro complejos proteicos, de los cuales la CoQ10 participa en la aceptación de electrones a partir del NADH en el complejo I (NADH-Q Oxidoreductasa) y en el complejo II (succinato Q-reductasa), movilizándose hasta el

complejo III (Q cit c- oxidoreductasa) donde se lleva a cabo el ciclo de Q. En dicho ciclo, la CoQ10 pasa por sus 3 estados: ubiquinol, semiquinona y ubiquinona, siendo ésta última la encargada de entregar los electrones a la citocromo C para su reducción a agua, que se lleva a cabo en el complejo IV (Cit c oxidasa) (Botham y Mayes, 2012;Wang y Hekimi, 2016).

La forma reducida de la CoQ10, el ubiquinol se considera como un antioxidante no enzimático de alta eficacia presente en el organismo, dada su capacidad de atenuar especies reactivas del oxígeno (ERO) y de regenerar otras moléculas antioxidantes como el α -tocoferol y el ascorbato (Carocho y Ferreira, 2013). Puesto que la COQ10 está presente en la cadena respiratoria celular, se considera como un antioxidante de primer recurso, ya que es éste proceso uno de los principales generadores de ERO en el organismo (Blokhina, Virolainen *y col.*, 2003). El ubiquinol actúa sobre el radical superóxido y el radical perferril (Pisoschi y Pop, 2015), protegiendo al organismo principalmente de lípidos peroxidados (Estornell, Fato *y col.*, 1992), aunque también previene la oxidación de proteínas y del ADN de una manera directa, o indirectamente a través de la atenuación de la oxidación de lípidos (Zhang y Sevanian, 1991;Forsmark-Andree y Ernster, 1994).

Han sido reiterativos los estudios disponibles sobre la dependencia entre la acción de la CoQ10 y α -tocoferol (el isómero con mayor capacidad antioxidativa de la vitamina E), siendo que aunque la cantidad de CoQ10 es casi de 3 a 30 veces mayor que la del α -tocoferol, éste último es diez veces mas capaz de donar electrones y detener el proceso de lipoxidación (Crane, 2001). Kagan, Fabisiak *y col.* (2000) a partir de estudios *in vitro* concluyeron que el α -tocoferol es reducido activamente por el ubiquinol, permitiendo al organismo contar con un potente antioxidante como es el α -tocoferol, y evitar un efecto prooxidante por parte de la semiquinona (ésta molécula puede desencadenar procesos oxidativos en las células). Así mismo, se cree que la CoQ10 es capaz de prevenir el inicio del proceso de lipoxidación y estabilizar los ácidos grasos en proceso de oxidación, mientras que el α -tocoferol solo participa en el último proceso mencionado (Ernster y Dallner, 1995). Así mismo, la CoQ10 puede

llevar a un estado reducido al ascorbato (antioxidante proveniente de la vitamina C) fuera de la célula, puesto dentro de ésta es el sistema glutatión peroxidasa el encargado de hacerlo (Crane, 2001).

Esta red de trabajo entre antioxidantes en el organismo lleva a interacciones entre las cantidades de los mismos presentes en el organismo, ya que por ejemplo bajo condiciones de estrés oxidativo producido por dietas deficientes en selenio y α -tocoferol, las cantidades de CoQ10 son incrementadas (Navarro, Arroyo y *col.*, 1999); esto también se presenta cuando las cantidades de α -tocoferol son disminuidas al producirse una proliferación peroxisomal (Turunen, Sindelar y *col.*, 1999). De tal modo que la CoQ10 podría ser incluida en el proceso de diagnóstico de efecto oxidativo, como aquel ocurrido tras el consumo con dietas de diferentes perfil nutricional que conlleven a cambios en los procesos metabólicos internos.

El estatus de producción de la CoQ10 en el organismo depende de la demanda interna, principalmente por cambios en el estado oxidativo, siendo que el contenido de CoQ10 en las células está presente como un mecanismo de adaptación. Dado que la absorción de CoQ10 a partir de la dieta está muy limitado por sus características hidrofóbicas y que existe evidencia que aquella absorbida tiene un destino diferente que la sintetizada internamente (Dallner, Brismar y *col.*, 2003), es posible clasificar a la CoQ10 como un antioxidante interno, a diferencia de otros más potentes como los derivados de la vitamina C y E, los cuales si pueden ser obtenidos de la dieta y que son clasificados como externos (Bhagavan y Chopra, 2006). Estudios en ratones demostraron que bajo condiciones de estrés oxidativo provocado por estados fisiológicos como ejercicio, baja temperatura y presencia de hormona tiroidea, el contenido de CoQ10 es aumentado en órganos aeróbicos como el hígado (Ernster y Dallner, 1995).

Así mismo en estado patológicos como de tipo vascular, el contenido de COQ10 está disminuido, por lo que la suplementación de ésta coenzima ha demostrado ser de beneficio, más no sucede lo mismo en pacientes saludables, en los cuales el contenido

de CoQ10 de origen dietario no altera la producción interna (Pisoschi y Pop, 2015). De tal modo que las células son capaces de solventar sus requerimientos propios por la coenzima bajo condiciones normales, ya que cuentan con las enzimas y metabolitos necesarios para la formación y catabolismo de la CoQ10. Dallner, Brismar *y col.* (2003) exponen que el proceso de regulación en la producción interna de CoQ10 no siguen vías generales relacionadas con el metabolismo de mevalonato (sustrato para la formación de colesterol y dolicol), más si tiene que ver los receptores nucleares tipo $RxR\alpha$ relacionados con la síntesis de lípidos.

Desde su descubrimiento hasta hoy en día, la CoQ10 ha servido como una molécula de diagnóstico para evaluar el daño oxidativo en seres humanos (Menke, Niklowitz *y col.*, 2000) y como un agente terapéutico prometedor en patologías cardiovasculares (por ser protector de las lipoproteínas del plasma) y degenerativas de tipo neurológico (enfermedades de Parkinson y Huntington) y neuromusculares (esclerosis lateral amiotrófica), dado su rol fundamental en la mitocondria, así como en la terapia de cáncer y diabetes mediante su rol de antioxidante (Bhagavan y Chopra, 2006). Ello ha desencadenado el uso de la COQ10 como un suplemento alimenticio que promete no solo traer beneficios en estados patológicos, sino también en preservar las células y potencializar procesos fisiológicos normales.

La investigación alrededor del uso de suplementos de la COQ10 en humanos se ha desarrollado en ciencias como la medicina clínica, el deporte y en el cuidado personal referente a la piel y envejecimiento, siendo que en el caso de la medicina veterinaria su efecto como suplemento también ha sido probado en pro de mejorar los parámetros productivos zootécnicos de las aves. En pollo de engorda se ha probado como un aditivo que para reducir los problemas sistémicos relacionados con la ascitis (Geng, Guo *y col.*, 2004; Geng, Guo *y col.*, 2004), mientras que en gallinas solamente un estudio ha abordado su aplicación en dieta para la reducción del contenido de colesterol en huevo (Kamisoyama, Honda *y col.*, 2010). No obstante en el presente estudio referido la CoQ10 será evaluada desde el punto de vista de producción interna

en las células del hígado, con el objetivo de conocer el impacto de las dietas en estudio en procesos oxidativos y de generación de energía llevado a cabo en el ave.

I.5 Referencias

- Åberg F, Appelkvist E-L, Dallner G , Ernster L. Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1992; 295(2): 230-234.
- Adedokun SA, Adeola O, Parsons CM, Lilburn MS , Applegate TJ. Factors affecting endogenous amino acid flow in chickens and the need for consistency in methodology. *Poultry science*. 2011; 90(8): 1737-1748.
- Adeola O , Sands J. Does supplemental dietary microbial phytase improve amino acid utilization? A perspective that it does not. *Journal of Animal Science*. 2003; 81(14_suppl_2): E78-E85.
- Amerah A, Plumstead P, Barnard L , Kumar A. Effect of calcium level and phytase addition on ileal phytate degradation and amino acid digestibility of broilers fed corn-based diets. *Poultry Science*. 2014; 93(4): 906-915.
- Angel R, Saylor W, Mitchell A, Powers W , Applegate T. Effect of dietary phosphorus, phytase, and 25-hydroxycholecalciferol on broiler chicken bone mineralization, litter phosphorus, and processing yields. *Poultry science*. 2006; 85(7): 1200-1211.
- Angel R, Tamim NM, Applegate TJ, Dhandu AS , Ellestad LE. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. *The Journal of Applied Poultry Research*. 2002; 11(4): 471-480.
- Auesukaree C, Tochio H, Shirakawa M, Kaneko Y , Harashima S. Plc1p, Arg82p, and Kcs1p, enzymes involved in inositol pyrophosphate synthesis, are essential for phosphate regulation and polyphosphate accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(26): 25127-25133.
- Ayer A, Macdonald P , Stocker R. CoQ10 Function and Role in Heart Failure and Ischemic Heart Disease. *Annual review of nutrition*. 2015; 35: 175-213.
- Banks K, Thompson K, Jaynes P , Applegate T. The effects of copper on the efficacy of phytase, growth, and phosphorus retention in broiler chicks. *Poultry science*. 2004; 83(8): 1335-1341.
- Barrientos L, Scott JJ , Murthy PP. Specificity of hydrolysis of phytic acid by alkaline phytase from lily pollen. *Plant Physiology*. 1994; 106(4): 1489-1495.
- Bequette BJ (2003). Amino acid metabolism in animals: an overview. *Amino acids in animal nutrition*. D'Mello JPF, CABI.
- Bhagavan HN , Chopra RK. Coenzyme Q10: absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Free radical research*. 2006; 40(5): 445-453.
- Bhandari R, Juluri KR, Resnick AC , Snyder SH. Gene deletion of inositol hexakisphosphate kinase 1 reveals inositol pyrophosphate regulation of insulin secretion, growth, and spermiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008; 105(7): 2349-2353.

Bitar K , Reinhold JG. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosae of rat, chicken, calf, and man. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*. 1972; 268(2): 442-452.

Blokhina O, Virolainen E , Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*. 2003; 91(2): 179-194.

Boisen S, Hvelplund T , Weisbjerg MR. Ideal amino acid profiles as a basis for feed protein evaluation. *Livestock Production Science*. 2000; 64(2): 239-251.

Botham KM , Mayes PA (2012). *La cadena respiratoria y fosforilación oxidativa*. Harper Bioquímica Ilustrada. K MR. México DF, Mc Graw hill. 29.

Brenes An, Viveros An, Arija I, Centeno C, Pizarro M , Bravo C. The effect of citric acid and microbial phytase on mineral utilization in broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology*. 2003; 110(1): 201-219.

Burton LE , Wells WW. Myo-Inositol deficiency: studies on the mechanism of lactation-dependent fatty liver formation in the rat. *The Journal of nutrition*. 1979; 109(8): 1483-1491.

Bye JW, Cowieson NP, Cowieson AJ, Selle PH , Falconer RJ. Dual effects of sodium phytate on the structural stability and solubility of proteins. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013; 61(2): 290-295.

Byrd CA , Matrone G. Investigations of Chemical Basis of Zinc-Calcium-Phytate Interaction in Biological Systems. *Experimental Biology and Medicine*. 1965; 119(2): 347-349.

Caldwell RA. Effect of calcium and phytic acid on the activation of trypsinogen and the stability of trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1992; 40(1): 43-46.

Carocho M , Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*. 2013; 51: 15-25.

Cheryan M , Rackis JJ. Phytic acid interactions in food systems. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*. 1980; 13(4): 297-335.

Coady MJ, Wallendorff B, Gagnon DG , Lapointe J-Y. Identification of a novel Na⁺/myo-inositol cotransporter. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(38): 35219-35224.

Coon CN (2002). *Feeding commercial egg-type layers*. Commercial chicken meat and egg production, Springer. 287-328.

Cosgrove DJ. The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates. *Reviews of Pure and Applied Chemistry* 1966; 16: 209-224.

Costello AJR, Glonek T , Myers TC. 31 P Nuclear magnetic resonance pH titrations of myo-inositol hexaphosphate. *Carbohydrate Research*. 1976; 46(2): 159-171.

Cowieson A, Wilcock P , Bedford M. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World's Poultry Science Journal*. 2011; 67(02): 225-236.

Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q10. *Journal of the American College of Nutrition*. 2001; 20(6): 591-598.

D'mello J. Amino acids as multifunctional molecules. *Amino acids in animal nutrition*. 2003; 2: 1-14.

Dallner G, Brismar K, Chojnacki T , Swiezewska E. Regulation of coenzyme Q biosynthesis and breakdown. *Biofactors*. 2003; 18(1): 11-22.

Davies MI, Ritcey GM , Motzok I. Intestinal phytase and alkaline phosphatase of chicks: Influence of dietary calcium, inorganic and phytate phosphorus and vitamin D3. *Poultry science*. 1970; 49(5): 1280-1286.

De Vries S, Kwakkel R , Dijkstra J. Dynamics of calcium and phosphorus metabolism in laying hens. Phosphorus and calcium utilization and requirements in farm animals (DMSS Vitti and E. Kebreab, Editors). CAB International, Wallingford, UK. 2010: 133-150.

Dersjant - Li Y, Awati A, Schulze H , Partridge G. Phytase in non - ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015; 95(5): 878-896.

Duff SM, Sarath G , Plaxton WC. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiologia Plantarum*. 1994; 90(4): 791-800.

Eeckhout W , De Paepe M. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*. 1994; 47(1): 19-29.

Englmaierova M, Skrivanova V , Skrivan M. The effect of non-phytate phosphorus and phytase levels on performance, egg and tibia quality, and pH of the digestive tract in hens fed higher-calcium-content diets. *Czech Journal of Animal Science*. 2014; 59(3): 107-115.

Ernster L , Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1995; 1271(1): 195-204.

Estornell E, Fato R, Castelluccio C, Cavazzoni M, Castelli GP , Lenaz G. Saturation kinetics of coenzyme Q in NADH and succinate oxidation in beef heart mitochondria. *FEBS letters*. 1992; 311(2): 107-109.

Forsmark-Andree P , Ernster L. Evidence for a protective effect of endogenous ubiquinol against oxidative damage to mitochondrial protein and DNA during lipid peroxidation. *Molecular Aspects of Medicine*. 1994; 15: 73-81.

Geng A, Guo Y , Yang Y. Reduction of ascites mortality in broilers by coenzyme Q10. *Poultry Science*. 2004; 83(9): 1587-1593.

Geng A, Guo Y , Yuan J. Effects of dietary L-carnitine and coenzyme Q10 supplementation on performance and ascites mortality of broilers. *Archives of Animal Nutrition*. 2004; 58(6): 473-482.

Gifford SR , Clydesdale FM. Interactions among calcium, zinc and phytate with three protein sources. *Journal of Food Science*. 1990; 55(6): 1720-1724.

Graf E, Empson KL , Eaton JW. Phytic acid. A natural antioxidant. *Journal of Biological Chemistry*. 1987; 262(24): 11647-11650.

Greiner R, Carlsson N-G , Alminger ML. Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 2000; 84(1): 53-62.

Greiner R , Konietzny U. Phytases: Biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. Bedford, MR, and Partridge, GG, eds. CAB Intl., Oxfordshire, UK. 2011: 96-128.

Greiner R, Muzquiz M, Burbano C, Cuadrado C, Pedrosa MM , Goyoaga C (2005). De novo synthesis of enzymes participating in phytate breakdown during germination of lentils (*Lens culinaris* var. Magda). *Inositol Phosphates in the Soil-Plant-Animal System: Linking Agriculture and Environment*. Proceedings of the Bouyoucos Conference on Inositol Phosphates in the Environment.

Greiner R, Silva LGd , Couri S. Purification and characterisation of an extracellular phytase from *Aspergillus niger* 11T53A9. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009; 40(4): 795-807.

Hajdich E, Alessi DR, Hemmings BA , Hundal HS. Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes*. 1998; 47(7): 1006-1013.

Holub BJ. Metabolism and function of myo-inositol and inositol phospholipids. *Annual Review of Nutrition*. 1986; 6(1): 563-597.

Huber K, Zeller E , Rodehutsord M. Modulation of small intestinal phosphate transporter by dietary supplements of mineral phosphorus and phytase in broilers. *Poultry Science*. 2015; 94(5): 1009-1017.

Kagan V, Fabisiak J , Quinn P. Coenzyme Q and vitamin E need each other as antioxidants. *Protoplasma*. 2000; 214(1-2): 11-18.

Kamisoyama H, Honda K, Kitaguchi K , Hasegawa S. Transfer of dietary coenzyme Q10 into the egg yolk of laying hens. *The Journal of Poultry Science*. 2010; 47(1): 28-33.

Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkkinen N , Apajalahti J. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998; 64(6): 2079-2085.

Kies AK, De Jonge LH, Kemme PA , Jongbloed AW. Interaction between protein, phytate, and microbial phytase. *In vitro* studies. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006; 54(5): 1753-1758.

Kim EJ (2010). Amino acid digestibility of various feedstuffs using different methods, University of Illinois at Urbana-Champaign.

Konietzny U , Greiner R. Molecular and catalytic properties of phytate - degrading enzymes (phytases). *International Journal of Food Science & Technology*. 2002; 37(7): 791-812.

Krehbiel Jr CR , Matthews JC. Absorption of amino acids and peptides. *Principles of Protein Nutrition of Ruminants*. JM Asplund, ed. CRC Press Inc., Boca Raton, USA. 1994: 127-146.

Kumar V, Sinha AK, Makkar HP , Becker K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*. 2010; 120(4): 945-959.

Lee S , Bedford M. Inositol-An effective growth promotor? *World's Poultry Science Journal*. 2016; 72(4): 743-760.

Lemme A, Ravindran V , Bryden WL. Ileal digestibility of amino acids in feed ingredients for broilers. *World's Poultry Science Journal*. 2004; 60(04): 423-438.

Li R, Zhao J, Sun C, Lu W, Guo C , Xiao K. Biochemical properties, molecular characterizations, functions, and application perspectives of phytases. *Frontiers of Agriculture in China*. 2010; 4(2): 195-209.

Liu S, Cadogan D, Péron A, Truong H , Selle P. Effects of phytase supplementation on growth performance, nutrient utilization and digestive dynamics of starch and protein in broiler chickens offered maize-, sorghum-and wheat-based diets. *Animal Feed Science and Technology*. 2014; 197: 164-175.

Livermore TM, Azevedo C, Kolozsvari B, Wilson MS , Saiardi A. Phosphate, inositol and polyphosphates. *Biochemical Society Transactions*. 2016; 44(1): 253-259.

Maddaiah VT, Kurnick AA , Reid BL. Phytic Acid Studies. *Experimental Biology and Medicine*. 1964; 115(2): 391-393.

Maenz DD , Classen HL. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poultry Science*. 1998; 77(4): 557-563.

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 in solution and in a slurry of canola meal. *Animal Feed Science and Technology*. 1999; 81(3): 177-192.

Marina T , Covadonga M. El huevo: mitos, realidades y beneficios. *Hospitalidad ESDAI*. 2004; (5).

Menke T, Niklowitz P, Adam S, Weber M, Schlüter B , Andler W. Simultaneous detection of ubiquinol-10, ubiquinone-10, and tocopherols in human plasma microsamples and macrosamples as a marker of oxidative damage in neonates and infants. *Analytical Biochemistry*. 2000; 282(2): 209-217.

Navarro F, Arroyo A, Martín SF, Bello RI, De Cabo R, Burgess JR, *y col*. Protective role of ubiquinone in vitamin E and selenium - deficient plasma membranes. *Biofactors*. 1999; 9(2): 163-170.

Nielsen AVF, Nyffenegger C , Meyer AS. Performance of microbial phytases for gastric inositol phosphate degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015; 63(3): 943-950.

NRC. *Nutrient Requirements of Poultry* National Academy Press. 1994; 9th edn, Washington, DC.

O'Dell BL, De Boland AR , Koirttyohann SR. Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1972; 20(3): 718-723.

Onyango EM, Asem EK , Adeola O. Dietary cholecalciferol and phosphorus influence intestinal mucosa phytase activity in broiler chicks. *British Poultry Science*. 2006; 47(5): 632-639.

Persson H, Türk M, Nyman M , Sandberg A-S. Binding of Cu²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ to inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998; 46(8): 3194-3200.

Pisoschi AM , Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*. 2015; 97: 55-74.

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. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007; 87(10): 1886-1892.

Prattley C, Stanley D , VOORT F. Protein-phytate interactions in soybeans.II. Mechanism of protein-phytate binding as affected by calcium. *Journal of Food Biochemistry*. 1982; 6(4): 255-272.

Pravst I, Žmitek K , Žmitek J. Coenzyme Q10 contents in foods and fortification strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2010; 50(4): 269-280.

Ptak A, Bedford MR, Świątkiewicz S, Żyła K , Józefiak D. Phytase modulates ileal microbiota and enhances growth performance of the broiler chickens. *PloS One*. 2015; 10(3): e0119770.

Ravindran V (1995). Phytases in poultry nutrition. An overview. 7: 135-139. *Procedures Australian Poultry Science Symposium*.

Ravindran V , Bryden WL. Amino acid availability in poultry—In vitro and in vivo measurements. *Crop and Pasture Science*. 1999; 50(5): 889-908.

Reddy NR, Sathe SK , Salunkhe DK. Phytates in legumes and cereals. *Advance in Food Research*. 1982; 28(1): 92.

Rodehutsord M, Faust M , Lorenz H. Digestibility of phosphorus contained in soybean meal, barley, and different varieties of wheat, without and with supplemental phytase fed to pigs and additivity of digestibility in a wheatsoybean - meal diet. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 1996; 75(1 - 5): 40-48.

Rodriguez E, Wood ZA, Karplus PA , Lei XG. Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2000; 382(1): 105-112.

Rostagno H, Teixeira L, Lopes J, Gomes P, Oliveira R, Lopes D, *y col.* Tablas brasileñas para aves y cerdos. *Composición de Alimentos y Requerimientos Nutricionales*. Universidad Federal de Viçosa. Minas Gerais. Brasil. 2017.

Santos T, Connolly C , Murphy R. Trace element inhibition of phytase activity. *Biological Trace Element Research*. 2015; 163(1-2): 255-265.

Sartirana ML , Bianchetti R. The effects of phosphate on the development of phytase in the wheat embryo. *Physiologia Plantarum*. 1967; 20(4): 1066-1075.

Sebastian S, Touchburn SP , Chavez ER. Implications of phytic acid and supplemental microbial phytase in poultry nutrition: a review. *World's Poultry Science Journal*. 1998; 54(01): 27-47.

Selle PH, Cowieson AJ, Cowieson NP , Ravindran V. Protein–phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. *Nutrition Research Reviews*. 2012; 25(01): 1-17.

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.

Selle PH , Ravindran V. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. 2007; 135(1): 1-41.

Silva E, Malheiros E, Sakomura N, Venturini K, Hauschild L, Dorigam J, *y col.* Lysine requirements of laying hens. *Livestock Science*. 2015; 173: 69-77.

Simon O , Igbasan F. In vitro properties of phytases from various microbial origins. *International journal of food science & technology*. 2002; 37(7): 813-822.

Simon O, Żebrowska T, Bergner H, Münchmeyer R. Investigations on the pancreatic and stomach secretion in pigs by means of continuous infusion of ¹⁴C-amino acids. *Archives of Animal Nutrition*. 1983; 33(1): 9-22.

Singh M, Krikorian AD. Inhibition of trypsin activity in vitro by phytate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1982; 30(4): 799-800.

Singh PK. Significance of phytic acid and supplemental phytase in chicken nutrition: a review. *World's Poultry Science Journal*. 2008; 64(04): 553-580.

Thompson DB, Erdman Jr JW. Structural model for ferric phytate: implications for phytic acid analysis [Soybean extracts]. *Cereal Chemistry (USA)*. 1982.

Thompson LU, Yoon JH. Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. *Journal of Food Science*. 1984; 49(4): 1228-1229.

Tokushima Y, Takahashi K, Sato K, Akiba Y. Glucose uptake in vivo in skeletal muscles of insulin-injected chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2005; 141(1): 43-48.

Truong H, Yu S, Peron A, Cadogan D, Khoddami A, Roberts T, *et al*. Phytase supplementation of maize-, sorghum- and wheat-based broiler diets with identified starch pasting properties influences phytate (IP 6) and sodium jejunal and ileal digestibility. *Animal Feed Science and Technology*. 2014; 198: 248-256.

Turunen M, Sindelar P, Dallner G. Induction of endogenous coenzyme Q biosynthesis by administration of peroxisomal inducers. *Biofactors*. 1999; 9(2 - 4): 131-139.

Ullah AH, Sethumadhavan K, Mullaney EJ. Salt effect on the pH profile and kinetic parameters of microbial phytases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56(9): 3398-3402.

Ullah AHJ, Phillippy BQ. Substrate selectivity in *Aspergillus ficuum* phytase and acid phosphatases using myo-inositol phosphates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1994; 42(2): 423-425.

Vaintraub IA, Bulmaga VP. Effect of phytate on the in vitro activity of digestive proteinases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1991; 39(5): 859-861.

Van Goudoever J, Stoll B, Henry J, Burrin D, Reeds P. Adaptive regulation of intestinal lysine metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000; 97(21): 11620-11625.

Vats P, Banerjee UC. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004; 35(1): 3-14.

Vitti DM, Kebreab E (2010). Phosphorus and calcium utilization and requirements in farm animals, CABI.

Vohra P, Gray GA, Kratzer FH. Phytic acid-metal complexes. *Experimental Biology and Medicine*. 1965; 120(2): 447-449.

Walk C, Bedford M, McElroy A. Influence of limestone and phytase on broiler performance, gastrointestinal pH, and apparent ileal nutrient digestibility. *Poultry Science*. 2012; 91(6): 1371-1378.

Wang Y, Hekimi S. Understanding Ubiquinone. *Trends in Cell Biology*. 2016; 26(5): 367-378.

Weaver JD, Ullah AH, Sethumadhavan K, Mullaney EJ , Lei XG. Impact of assay conditions on activity estimate and kinetics comparison of *Aspergillus niger* PhyA and *Escherichia coli* AppA2 phytases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57(12): 5315-5320.

Wilcock P , Walk CL (2016). Low phytate nutrition - what is the pig and poultry industry doing to counter dietary phytate as an anti-nutrient and how is it being applied? *Phytate Destruction Consequences for Precision Animal Nutrition*. Walk CL, Kuhn I, Stein HH, Kidd MT y Rodehutsord M, Wageningen Academic. 86-106.

Wilson MS, Livermore TM , Saiardi A. Inositol pyrophosphates: between signalling and metabolism. *Biochemical Journal*. 2013; 452(3): 369-379.

Wodzinski RJ , Ullah A. Phytase. *Advances in applied microbiology*. 1995; 42: 263-302.

Wyss M, Brugger R, Kronenberger A, Rémy R, Fimbel R, Oesterhelt G, y col. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999; 65(2): 367-373.

Xu P, Price J, Wise A , Aggett PJ. Interaction of inositol phosphates with calcium, zinc, and histidine. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 1992; 47(2): 119-130.

York JD. Regulation of nuclear processes by inositol polyphosphates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2006; 1761(5): 552-559.

Yu S, Cowieson A, Gilbert C, Plumstead P , Dalsgaard S. Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters (IP) including IP isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin. *Journal of Animal Science*. 2012; 90(6): 1824-1832.

Zeller E, Schollenberger M, Kühn I , Rodehutsord M. Effect of diets containing enzyme supplements and microwave-treated or untreated wheat on inositol phosphates in the small intestine of broilers. *Animal Feed Science and Technology*. 2015; 204: 42-51.

Zeller E, Schollenberger M, Kühn I , Rodehutsord M. Dietary effects on inositol phosphate breakdown in the crop of broilers. *Archives of Animal Nutrition*. 2016; 70(1): 57-71.

Zhang J-R , Sevanian A. Effect of vitamin E on arachidonic acid peroxidation and its binding to Chinese hamster V79 cell DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. 1991; 1085(2): 159-166.

Zhang Y, Aberg F, Appelkvist E-L, Dallner G , Ernster L. Uptake of dietary Coenzyme Q supplement is limited in rats. *The Journal of Nutrition*. 1995; 125: 446-453.

Zhang Y, Turunen M , Appelkvist E-L. Restricted uptake of dietary coenzyme Q is in contrast to the unrestricted uptake of alpha-tocopherol into rat organs and cells. *The Journal of Nutrition*. 1996; 126(9): 2089.

II. FASE EXPERIMENTAL 1

Efecto de la Dosis de una Fitasa en los Parámetros Productivos y Óseos de Gallina de Postura Bovans White Alimentadas con Niveles Crecientes de Lisina Digestible

Versión en español del artículo a ser publicado por la revista Brazilian Journal of Poultry Science

II.1 Resumen

Las fitasas (**Fi**) de origen exógeno pueden influir sobre la disponibilidad de la proteína en la dieta dependiendo de la dosis empleada, como ha sido reportado previamente en el pollo de engorda con dosis mayores a las estándar (500 FTU/kg), siendo desconocido dicho efecto en la gallina de postura. El objetivo del presente estudio fue determinar si el incremento de la dosis de una 6-Fi mejorada pudiera aumentar la digestibilidad de la lisina en la dieta, mediante la evaluación del desempeño productivo y estatus óseo en gallina Bovans White de 39 semanas de edad. Para el estudio se emplearon 182 aves, las cuales fueron alojadas en jaulas individuales y espacio individualizado en comedero. Las aves fueron distribuidas al azar en 13 tratamientos correspondientes a un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial de 3x4, con 3 niveles de lisina digestible (**Lis-d** - 0.67, 0.77, y 0.87%) y 4 dosis de Fi (0, 300, 1200, y 4800 FTU/kg), formulados en una dieta con bajo nivel de fósforo disponible (**P-dis**) (0.12%) para un total de 12 tratamientos; adicionalmente, se incluyó un control positivo con 0.25% de P-dis en el nivel de 0.87% de Lis-d sin Fi. Los parámetros productivos y pruebas de calidad física en huevo fueron evaluados por 25 semanas; después, a 12 aves por tratamiento se les realizó eutanasia para determinar el contenido de grasa abdominal y obtener las tibias para determinar fuerza a la ruptura y contenido de ceniza. Las gallinas que fueron alimentadas con 1200 FTU/kg tuvieron mayor porcentaje de postura, grasa abdominal, fuerza a la ruptura y contenido de ceniza en tibia respecto a las aves sin suplementación de Fi

($P < 0.05$). Así mismo estas aves presentaron menos incidencia de huevos rotos y de tipo fáfara ($P < 0.05$). Existió una interacción entre los niveles de Fi y Lis-d en la masa de huevo y la concentración de ceniza en hueso ($P < 0.05$). El índice de conversión y la pérdida de peso corporal fueron menor con la inclusión de la Fi ($P < 0.05$). No hubo efecto de los tratamientos en los parámetros de calidad de huevo ($P > 0.05$). El aumento del contenido de P inorgánico a 0.25% incrementó el peso del huevo, aunque no mejoró el peso corporal y contenido de grasa abdominal ($P < 0.07$), siendo no significativo en otras variables ($P > 0.05$). En conclusión la dosis de 1200 FTU/kg mejoró el desempeño productivo y preservó la condición corporal y ósea de las aves en comparación con las dosis de 300 y 4800 FTU/kg, aunque el nivel de Lis-d en la dieta hizo que la respuesta hacia la Fi cambiara en variables como la masa de huevo. No se evidenció una equivalencia con la adición de la Fi para el nivel de Lis-d, aún cuando se emplearon dosis altas.

Palabras Claves: Fitasa, superdosis, lisina digestible, desempeño productivo, estatus óseo.

II.2 Introducción

El fósforo fítico representa de un 60 a 80% del contenido total del fósforo (P) en los vegetales (Selle y Ravindran, 2007) dado su rol fundamental en el proceso de germinación, al evitar el desarrollo de procesos oxidativos intrínsecos en la semilla (Doria, Galleschi *y col.*, 2009). No obstante, en la alimentación de animales monogástricos es considerado un antinutriente por su capacidad de quelar minerales, carbohidratos, proteínas (Angel, Saylor *y col.*, 2006), y aminoácidos (Rutherford, Edwards *y col.*, 1997), convirtiéndolos en menos asimilables. Las aves tienen limitada capacidad de producir enzimas endógenas (Truong, Yu *y col.*, 2014) para hidrolizar el ácido fítico (**A-Fi**) y liberar el P de su estructura, lo que ha llevado al uso de fitasas (**Fi**) exógenas de tipo microbiano en las dietas, siendo ésta práctica cada vez más común. La reducción en el contenido de P inorgánico en la dieta con el uso de Fi, ha contribuido en el objetivo de disminuir la excreción de P y disminuir el efecto

contaminante de las excretas (Nahm, 2007). De esta manera el aporte de P por parte de la enzima, conocido como efecto fosfórico, es aceptado a nivel mundial en las producciones de pollo de engorda, gallina de postura, y cerdos, mientras que el aporte de la misma hacia otros nutrientes como la proteína, denominado efecto extra-fosfórico (Cowieson, Wilcock *y col.*, 2011), sigue estando bajo investigación en los últimos años (Dersjant-Li, Awati *y col.*, 2015).

El A-Fi puede afectar negativamente la solubilidad y por tanto la digestión de las proteínas, mediante dos mecanismos, siendo el primero relacionado con procesos de quelación dependiente del punto isoeléctrico de la proteína y del pH del medio. En un pH ácido, el A-Fi es capaz de quelar directamente a la proteína por uniones con cargas positivas del grupo amino o con aminoácidos básicos como la arginina, histidina, y lisina, formando complejos binarios. Por otro lado en un pH básico, las cargas negativas en los grupos carboxilos de todos los aminoácidos se unen a cationes divalentes presentes en el medio, principalmente minerales, que ya han sido quelados por el A-Fi, formando complejos terciarios (Cheryan y Rackis, 1980). El segundo mecanismo se relaciona con la capacidad de los grupos fosfato de actuar como moléculas kosmotrópicas (Selle, Cowieson *y col.*, 2012), al establecer uniones con el hidrógeno del agua presente alrededor de la proteína, de tal manera que la estructura de la misma es modificada. Por lo tanto, la proteína se vuelve más rígida, perdiendo solubilidad, y se convierte en menos digerible en el tracto digestivo. Bye, Cowieson *y col.* (2013) en un estudio *in vitro* concluyeron que la adición de fitato de sodio al medio decrecía la solubilidad y estabilidad de la lisozima, ya que se comportaba como una molécula kosmotrópica a concentraciones mayores que 5mM, mientras que por debajo de éste valor, era capaz de establecer uniones con la proteína causando su desestabilización, por lo que sugiere la ocurrencia de ambos mecanismos.

La lisina es el aminoácido de referencia para la formulación de dietas bajo el concepto de proteína ideal, a pesar de ser el segundo aminoácido limitante en aves, después de la metionina (Boisen, Hvelplund *y col.*, 2000). La decisión se tomó teniendo en cuenta varios aspectos favorables de la lisina, incluyendo su facilidad de análisis en el

laboratorio, su baja desviación hacia otras vías metabólicas más allá de la formación de proteína en huevo y tejidos corporales, y su no conversión hacia otro aminoácido, como sucede con la metionina y cisteína (Lemme, Ravindran *y col.*, 2004). Formular dietas bajo el concepto de proteína ideal busca en primera medida, determinar los requerimientos del animal por la lisina, y a partir de ahí ajustar los demás aminoácidos con proporciones fijas, por medio de la extrapolación (Coon, 2002). En el caso de la gallina de postura, los requerimientos de lisina digestible (**Lis-d**) depende de factores como la edad del ave, el periodo productivo, la línea genética que son capaces de cambiar la respuesta medida en masa de huevo producida y en peso corporal (Silva, Malheiros *y col.*, 2015).

Tomando en consideración el efecto que el A-Fi tendría sobre la solubilidad de la proteína presente en el alimento, existe la posibilidad que la Fi influya sobre los requerimientos nutricionales de aminoácidos de la gallina de postura, aunque dicha respuesta podría ser dependiente de la dosis de la enzima. Se ha encontrado que con dosis mayores a las estándar se mejora la digestibilidad de la proteína en pollo de engorda (Bedford y Walk, 2016), por medio del incremento de la hidrólisis del A-Fi en el tracto digestivo (Truong, Yu *y col.*, 2014; Zeller, Schollenberger *y col.*, 2016). El empleo de estas dosis mayores en pollo de engorda, conocidas como superdosis, ha llevado a la adición de 1500 FTU/kg con el propósito de obtener la hidrólisis de más del 85% del A-Fi presente en el alimento (Wilcock y Walk, 2016), resultando en un mejor desempeño productivo (Cowieson, Wilcock *y col.*, 2011). Por otra parte en el caso de las dosis estándar, Selle, Ravindran *y col.* (2010) indicaron que con inclusiones de 766 FTU/kg se logra el 42% del A-Fi hidrolizado y que con 500 FTU/kg se obtiene 0.12% de P disponible (**P-dis**) a partir de la dieta base, no solo en pollo de engorda, sino también en cerdos, sugiriendo con ello un inicio de la hidrólisis y de aporte de P al adicionar una dosis estándar.

En gallina de postura la mayoría de estudios publicados para la constatación del uso de Fi exógenas, han sido llevados a cabo con dosis de 300 y 400 FTU/kg (Keshavarz,

2003;Lim, Namkung *y col.*, 2003;Francesch, Broz *y col.*, 2005), existiendo una carencia en la información concerniente a dosis mayores. Mellef, Dridi *y col.* (2011) no encontraron diferencias significativas al evaluar 400, 800, y 1200 FTU/kg en gallinas Shaver 2000 de 30 semanas de edad. De manera similar, Silva, Araujo *y col.* (2008) no observaron cambios con inclusiones de 300, 600, y 1200 FTU/kg en gallinas Lohman Brown de 44 semanas de edad. En esta misma línea genética, Agbede, Adebayo *y col.* (2010) no encontraron efectos significativos con 1000 FTU/kg entre las semanas 18 y 22 de vida. Los resultados obtenidos en estos estudios sugieren que a pesar de la diversidad en las condiciones experimentales, dosis incrementales de Fi en gallina de postura no tienden a tener respuestas positivas.

Además de lo anteriormente mencionado, estudios que evalúen en gallina de postura la influencia de la dosis en el efecto extra-fosfórico de la Fi, no se encuentran disponibles, siendo que solamente, el efecto interactivo entre niveles de Fi y de L-dig se ha reportado previamente en la producción de pollo de engorda (Selle y Ravindran, 2007). En el presente estudio se maneja como hipótesis que el incremento en la dosis de una 6-Fi proveniente de *E.coli*, podría aumentar la disponibilidad de la lisina a partir de la dieta base y por tanto podría mejorar el desempeño productivo de gallinas Bovans White. De esta manera, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de 4 dosis de una Fi (0, 300, 1200, y 4800 FTU/kg) y 3 niveles de Lis-d (0.67, 0.77, y 0.87%) sobre los parámetros productivos y estatus óseo de gallinas de 40 a 63 semanas de edad alimentadas con una dieta base de maíz y pasta de soya con bajo contenido de P-dis (0.12%). Además se comparó el efecto de adicionar la enzima versus aumentar el contenido de P inorgánico a 0.25%, en el nivel más alto de L-dig evaluado.

II.3 Materiales y Métodos

Aves. En el estudio se emplearon 182 aves con una edad de inicio de 39 semanas, alojadas en jaulas individuales de 40*47 cm, que representa 1880 cm² de área en superficie disponible para cada una, y con 38 cm de espacio en comedero. Al inicio de

la evaluación, las gallinas fueron seleccionadas por peso corporal, considerando un rango de 1653±135 g equivalentes a una desviación estándar de la población muestreada. Así mismo, durante la primer semana el porcentaje de postura de las aves preseleccionadas fue evaluado y todas aquellas que no tuvieran una postura regular fueron excluidas del ensayo. Se suministró agua *ad libitum* y un consumo máximo de 105 g/ave/día de alimento en presentación harina. El experimento se llevó a cabo en instalaciones a temperatura ambiente con un programa de iluminación de 16L:8N. Todo el manejo de las aves durante el experimento fue aprobado por el comité institucional para el cuidado y uso de animales experimentales (SICUAE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Universidad Nacional Autónoma de México.

Dietas y Diseño Experimental. Cuatro dosis de una Fi exógena fueron incluidas “on top” en el dieta (0, 300, 1200, y 4800 FTU/kg) en tres niveles de Lis-d (0.67, 0.77, 0.87%) como un arreglo factorial de 4x3, en una dieta base con nivel bajo de P-dis (0.12%). Además, se evaluó una dieta control con 0.25% P-dis en el nivel más alto de Lis-d evaluado (0.87%) sin adición de Fi, para un total de 13 tratamientos. Las aves que fueron seleccionadas se incluyeron al azar en los 13 tratamientos para un total de 14 réplicas de un ave cada una. Durante el experimento se empleó una Fi proveniente de *Escherichia coli* y expresada en *Trichoderma reesei*, definiéndose una FTU como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 mol de P inorgánico/min a partir de 0.15 M/dL de fitato de sodio a una temperatura de 37 °C y un pH de 5.5.

Se elaboró una dieta base de maíz y pasta de soya, a partir de la cual se obtuvieron 13 partes iguales, que representan las dietas experimentales; en la dieta base se incluyeron los micro-ingredientes y la enzima necesaria con el objetivo de obtener el perfil nutricional acorde al objetivo experimental (Cuadro 1). El contenido nutricional de las dietas fueron establecidas tomando en cuenta las recomendaciones para línea blanca ligera de gallina de postura del NRC (1994), excepto para la L-dig y el P-dis, los cuales fueron acorde al objetivo del estudio. Todas las dietas contenían 15% de

proteína cruda, 2.8 Mcal/kg, y 3.5% de calcio total, y fueron formuladas a base de aminoácidos digestibles, guardando constante el contenido de metioinina (0.38%), cisteína-metionina (0.65%), y treonina digestible (0.61%). La celulosa fue empleada como material inerte (World Minerals, Lompoc, CA) para preservar el 100% del contenido nutricional en aquellas dietas bajas en cloruro de lisina y Fi, logrando los niveles esperados para las dietas experimentales.

Parámetros Productivos. Durante 25 semanas se registraron los parámetros de producción concernientes a la producción de huevo comercial, las cuales fueron: número de huevo puesto, peso de huevo, y clasificación del mismo en roto, sucio, y en fáfara, registrados diariamente por cada réplica. El consumo fue determinado semanalmente como acumulado, mientras que el peso del ave se tomó al inicio y al final del período experimental. Así mismo se tomó en cuenta la mortalidad cada día, sin que se presentara ninguna pérdida de las aves en el período experimental.

Pruebas Físicas en Huevo. Cada cuatro semanas se seleccionó un huevo por réplica para medir las unidades Haugh y la pigmentación en yema mediante un programa computacional (Technical Services and Supplies, Dunnington, York, UK), así como también para medir el grosor de cascarón sin membranas internas con un microméetro digital (Mitutoyo Corp., Kawasaki, Japan).

Parámetros en Hueso y Grasa Abdominal. Después de la evaluación de parámetros productivos, se seleccionaron 12 aves por tratamiento y se les realizó la eutanasia usando una inyección intravenosa de EUTAFIN® (pentobarbital sódico 390 mg, fenitoína sódica 50 mg y excipientes 1ml) a una dosis de 1 mL/5 kg de peso vivo administrada en la vena radial. En cada ave se obtuvieron ambas tibias, destinando las derechas para determinar la fuerza a la ruptura con un equipo MV-110 Imada (Imada Inc., Northbrook, IL), fijando 3.6 cm de distancia entre las columnas de soporte. Por otro lado las tibias izquierdas fueron limpiadas de remanentes de músculo, articulaciones, tendones, y ligamentos, para ser desengrasadas con éter etílico al 25% en un extractor Soxhlet por 4 horas, secadas a 50 °C por 48 horas y pesadas. Los

huesos deshidratados fueron incinerados a 500 °C por 17 horas para cuantificar el contenido de cenizas. Adicionalmente, en cada ave muestreada se pesó el contenido de grasa abdominal y se determinó su relación respecto al peso corporal como porcentaje.

Análisis de Los Alimentos en el Laboratorio. El contenido de proteína, EM, y de P, Ca y lisina fueron analizados en la dieta base siguiendo las técnicas de AOAC (2006). La actividad de la Fi exógena en las dietas fue cuantificada por el servicio y consulta de enzimas (Ystrad Mynach, UK) de acuerdo a métodos modificados a los propuestos por Engelen, Heeft *y col.* (2001).

Análisis Estadísticos. Los tratamientos incluidos con 0.12% de P-dis fueron analizados estadísticamente como un diseño completamente al azar con arreglo factorial anidado al contenido de P-dis en la dieta, que también fue incluido en el modelo como una fuente de variación en el ANOVA. Tras detectar significancia, las medias de los tratamientos fueron separadas mediante la prueba de Tukey o DMS. Además de la evaluación de los tratamientos bajo el esquema del ANOVA, los datos fueron analizados como regresión lineal, tomándo los niveles de Lis-d y de Fi como variables cuantitativas. Valores de *P* menores a 7% fueron considerados como significativos para ambas evaluaciones en el programa JMP 12®.

II.4 Resultados

La concentración de la enzima en todos los tratamientos estuvo por arriba de los valores esperados, presentando el incremento gradual que era esperado y cercano a las dosis a conseguir. Las dietas sin la adición de la Fi exógena no fueron analizados ya que la técnica empleada para la cuantificación era específica de la enzima microbiana (Cuadro 2). El contenido de Lis-d resultó ser cercano a los niveles establecidos como objetivo (ver nota al pie del cuadro 3).

Gallinas alimentadas con 1200 FTU/kg presentaron mayor porcentaje de postura que aquellas no suplementadas con Fi en niveles de 0.12% de P-dis ($P < 0.05$). Además,

aves alimentadas con 300 y 4800 FTU/kg en el mismo contenido de P-dis o con aquellas del control positivo, no mostraron diferencia de las dietas con 1200 ó 0 FTU/kg. La respuesta en dicha variable con respecto a adiciones incrementales de Fi se ajustaron a un modelo cuadrático, siendo evidente un decline en la producción después de la dosis de 1200 FTU/kg ($P<0.05$). El peso de huevo fue mayor para aves alimentadas con 0.25% de P-dis, comparado con el promedio obtenido en el grupo de aves con 0.12% ($P<0.07$). El consumo de alimento fue menor en gallinas del nivel de 0.67% de Lis-d que aquellas con 0.77%, mientras que 0.87% no fue diferente a los otros dos niveles ($P<0.05$), aunque existió una tendencia de los datos tipo lineal positivo ($P<0.05$) (Cuadro 3).

Hubo una interacción entre los niveles de Fi y de Lis-d en la masa de huevo ($P=0.05$), en la cual gallinas alimentadas con 300 y 1200 de Fi mostraron un incremento en la masa de huevo respecto a 4800 FTU/kg o a la no adición de Fi en dietas con 0.67 y 0.87% de Lis-d, mientras que en 0.77%, 4800 FTU/kg fue la dosis con mejor producción. Por otro lado, la media de masa de huevo en los tratamientos del arreglo factorial fue similar a la obtenida en la dieta control ($P>0.05$). La masa de huevo respondió de manera lineal y cuadrática a los incrementos del contenido de Lis-d y Fi, respectivamente ($P=0.067$ y 0.071). La inclusión de Fi en la dieta redujo el índice de conversión en comparación a dietas con 0.12% de P-dis sin adición de Fi, mientras que el nivel de 0.25% mostró índices intermedios ($P<0.05$).

Al inicio del experimento el promedio de peso corporal fue similar entre las aves ($P>0.05$), mientras que al final del periodo, una alta significancia fue encontrada ($P<0.001$). Gallinas alimentadas con 300 y 1200 FTU/kg de Fi tuvieron un peso mayor que aquellas no suplementadas con Fi en el nivel de 0.12% P-dis, mientras que con dosis de 4800 FTU/kg o con 0.25% de P-dis los pesos fueron intermedios ($P<0.01$). Gallinas no suplementadas con Fi presentaron mayor pérdida de peso, ya que dietas conteniendo 0.12% de P-dis perdieron 5.4% y en la dieta con 0.25% la pérdida fue de 7.4% en promedio. Por otra parte, aves alimentadas con 300, 1200, y 4800 FTU/kg de

Fi presentaron un peso menor de 2.5, 1.3, y 2.2%, respectivamente ($P<0.001$)(Cuadro 3). El peso corporal final y pérdida de peso fueron altamente significativos a un ajuste con un modelo cuadrático al incremento de la dosis de la Fi hasta 1200 FTU/kg, por arriba de la cual la respuesta positiva cayó ($P<0.001$). Aves alimentadas con 0.25% de P-dis sin Fi presentaron el menor contenido de grasa abdominal comparado con aquellas suplementadas con 1200 FTU/kg en el nivel de 0.12% de P-dis ($P=0.060$). En cuanto al efecto del P-dis, gallinas alimentadas con la dieta de 0.25% de P-dis tuvieron menor contenido de grasa abdominal que aquellas con 0.12% de P-dis ($P<0.05$)(Cuadro 3).

Aves suplementadas con 1200 o con 4800 FTU/kg de Fi presentaron menos postura de huevo roto que aquellas no suplementadas con Fi en dietas con 0.12% de P-dis. No obstante, dicha diferencia no se presentó con 300 FTU/kg de Fi y con la dieta control ($P<0.05$). Resultados similares fueron obtenidos para huevos tipo fáfara, aunque las gallinas suplementadas con 4800 FTU/kg no mostraron menos postura que la dieta sin Fi en 0.12% de P-dis ($P<0.05$). La respuesta en porcentaje de huevos roto ($P=0.063$) y en fáfara ($P<0.05$) fue ajustado a un modelo cuadrático con el incremento de la dosis de la Fi, con una mínima presentación de éste tipo de huevo en la inclusión de 1200 FTU/kg. Así mismo, en el caso del huevo tipo fáfara la respuesta fue tipo lineal con el al aumento de los niveles de Lis-d ($P<0.05$). En huevo sucio no existió efecto de los tratamientos, ni tampoco significancia de los modelos lineales evaluados ($P>0.05$) (Cuadro 4).

Una interacción significativa fue obtenida para los niveles de Lis-d y Fi en la variable de masa de huevo comercializable (aquellos huevos producidos, menos los rotos y tipo fáfara) ($P=0.056$), siendo que en el nivel de 0.67% de Lis-d, la adición de la Fi significó una mejora en la producción, mientras que en el de 0.77% fue la dosis de 4800 FTU/kg la que presentó la mayor masa, y en 0.87% lo hizo las dosis de 300 y 1200 FTU/kg. No obstante, esta variable de huevo comercializable fue altamente influenciada por el incremento de la dosis de la Fi, lo que resultó en ajuste de los datos

a un modelo cuadrático con incremento positivo hasta 1200 FTU/kg ($P=0.006$). En la misma variable, el contenido de 0.25% de P-dis resultó en menos producción que en promedio el grupo de 0.12% ($P=0.070$). No hubo efecto en el grosor del cascarón y la pigmentación en yema ($P>0.05$). En relación a las unidades Haugh, las gallinas alimentadas con 0.12% de P-dis presentaron un promedio más alto que aquellas alimentadas con 0.25% de P-dis ($P=0.057$) (Cuadro 4).

Tanto la fuerza a la ruptura ($P=0.006$) como el peso en ceniza ($P=0.015$) en tibia, fueron mayores en aves alimentadas con 1200 FTU/kg de Fi en comparación con aves sin adición de Fi en el nivel de 0.12% de P-dis. Además, se encontró una interacción entre la Lis-d y la Fi en el peso deshidratado del hueso y en la concentración de cenizas ($P<0.001$), en la cual en el nivel de 0.87%, las dosis de 1200 y 4800 FTU/kg presentaron mayor promedio, pero en 0.77% el efecto fue contrario. No se encontraron cambios en los parámetros examinados en el hueso, cuando se evaluó el nivel de P-dis ($P>0.05$) (Cuadro 5).

II.5 Discusión

La cuantificación de la actividad de la Fi en las dietas mostró que la concentración de la enzima fue semejante a la dosis esperada en cada tratamiento, constatando la presencia de la misma así como su incremento gradual. Existen diversos factores que pueden afectar la cuantificación de la Fi exógena en alimento, los cuales son inherentes a las condiciones de muestreo en laboratorio o en la granja y/o al momento de cuantificar la actividad enzimática en el laboratorio (Weaver *et al.*, 2009). A pesar de que los valores cuantificados fueron más altos que los esperados, la interpretación de los resultados de éste estudio se basará en las dosis propuestas inicialmente con el objetivo de no cometer una interpretación errónea a partir de ellos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que existe un efecto positivo en la producción de huevo cuando la Fi se incluyó en la dieta, aunque la intensidad de la respuesta estuvo relacionada con la dosis empleada. En este caso,

sólo 1200 FTU/kg incrementó el porcentaje de producción en comparación con la no inclusión de la Fi, mientras que las dosis de 300 y 4800 FTU/kg no lograron una mejora en la producción en los tres niveles de Lis-d probados, resultando en un efecto cuadrático. Mellef, Dridi y col. (2011) reportaron que inclusiones de 1200 FTU/kg llevo a una mayor producción de huevo en comparación con 800 FTU/kg; mientras tanto, 800 FTU/kg fue mejor que 400 FTU/kg en gallina de la línea Hy-Line W-36 al probar una 6-Fi proveniente de *A. oryzae*. Por el contrario, Silva, Araujo y col. (2008) no encontraron ninguna diferencia al evaluar 300, 600, y 1200 FTU/kg de una 3-Fi proveniente de *A. niger*, por lo que recomendaron el empleo de la dosis de 300 FTU/kg para mejorar el índice de conversión en gallinas Lohman Brown. La variabilidad en los resultados reportados al evaluar dosis de Fi pudiera estar relacionado con diferencias en la actividad catalítica de las enzimas, dado su origen proteico. Estudios *in vitro* han demostrado que un mismo efecto puede darse con distintas cantidades de Fi, tomando en cuenta las propiedades catalíticas intrínsecas de cada enzima (Weaver, Ullah y col., 2009;Nielsen, Nyffenegger y col., 2015). En condiciones *in vivo*, Onyango, Bedford y col. (2005) reportaron una mayor actividad residual al probar 1000 FTU/kg de una 6-Fi proveniente de *E. coli* que de una Fi del mismo tipo producida por *P. Lyci*, cuando las enzimas fueron medidas en la digesta de molleja, yeyuno, e íleon en pollos de 7 días de edad.

En el presente estudio, a pesar de haberse mejorado el porcentaje de producción, el peso del huevo permaneció similar entre los tratamientos, aún cuando tanto la adición de Fi y el nivel de Lis-d en la dieta han sido reportados como factores que pueden influir el peso (Novak, Yakout y col., 2004;Silversides, Scott y col., 2006). Solamente la suplementación con P inorgánico en la dieta alteró éste parámetro, siendo similar a lo reportado por Ceylan, Scheideler y col. (2003) y Englmaierová, Dlouhá y col. (2012), pero diferente de los reportes de Augspurger, Webel y col. (2007), Lim, Namkung y col. (2003), y Viana, Albino y col. (2009). A pesar que el peso del huevo no se afectó por los tratamientos, cuando ésta variable fue considerada junto con el número de huevos producidos en la masa de huevo, la interacción entre los factores produjo que

en el nivel de 0.77% de Lis-d, las superdosis de 1200 y 4800 FTU/kg presentaron mayor producción que 300 FTU/kg, contrastando con los otros niveles de L-dis (0.67 y 0.87%), en los que 4800 FTU/kg resultó en un efecto negativo. A pesar de dicho efecto interactivo, la evidencia de una tendencia cuadrática de los datos, no solo en ésta variable sino también en producción de huevo, resalta el efecto adverso hacia la dosis de 4800 FTU/kg. Por otro lado, el incremento del nivel del Lis-d en la dieta significó un respuesta lineal positiva en la masa de huevo, resaltando la influencia que puede tener la Lis-d en el desempeño productivo, lo que en el presente ensayo fue mayor en el nivel de 0.87%.

En la literatura las recomendaciones de los niveles de Lis-d en la dieta son inciertas para la gallina de postura de línea ligera; el manual de manejo de Bovans aconseja el uso de 903 mg/d para una óptima producción (Hendrix Genetics Company, 2009), mientras que el NRC va más abajo hasta 580 mg/d o 690 mg/d en el caso de tener una dieta de 2900 kcal (NRC, 1994). Rostagno, Albino *y col.* (2017) recomendaron valores medios cercanos a 756 mg/d para aves de 40 semanas y de 708 mg/d para aquellas de 65 semanas. Además, de la falta de uniformidad en las recomendaciones, las evaluaciones publicadas acerca del tema son pocas. Silva, Malheiros *y col.* (2015) estimaron que consumos de 707, 660, y 669 mg/ave/d de Lis-d son los óptimos para la masa de huevo en gallinas Dekalb White de 37-40, 41-44, y 45-48 semanas de edad, respectivamente, los cuales son cercanos al nivel considerado en éste estudio como bajo, el cual fue de 692 mg/d.

Por otro lado el nivel de Lis-d en la dieta afectó el consumo de alimento, siendo más bajo en el nivel de 0.67%, lo que indica un aporte insuficiente. Las gallinas de postura son capaces de modular su consumo dependiendo del contenido nutricional de la dieta, principalmente por el aporte energético (Scanes, Campbell *y col.*, 1987), o por deficiencias en minerales (Barkley, Miller *y col.*, 2004), siendo que en el caso del contenido de lisina la relación aún no es clara. Torii, Yokawa *y col.* (1996) encontraron en ratas que restringir L-lisina en la dieta causaba bajo consumo y conllevaba a anorexia y retardo en el crecimiento, siendo remediada esta condición con el

suministro de lisina por sangre. En el mismo estudio, los autores demostraron que la porción ventromedial del hipotálamo y el área hipotalámica en el cerebro eran los responsables de regular los niveles de lisina corporales, demostrando el rol del sistema nervioso central sobre el apetito por la lisina. Por lo tanto, es probable que debido a la disminución en el consumo con el nivel de 0.67% de Lis-d, se produjera una subsecuente baja en la actividad metabólica y por lo tanto una reducción en el desempeño productivo, lo cual fue parcialmente resuelto por la adición de la Fi.

A pesar del efecto de la Lis-d en el consumo de alimento, el efecto principal de la Fi presente en otros parámetros como producción de huevo, se extendió al índice de conversión, lo que contrasta con estudios previos. Augspurger, Webel *y col.* (2007) encontraron que dosis de 150, 300, y 10000 FTU/kg de una 6-Fi de *E. coli* expresada en *A. niger* no afectaban los resultados obtenidos en el índice de conversión de gallinas tipo White Leghorn alimentadas con dieta con 0.10% de P-dis. Silversides, Scott *y col.* (2006) reportaron resultados similares con dosis de 300, 500, y 700 FTU/kg de una 6-Fi de *E. coli* expresada en *S. pombe* en aves ISA-white de 34 a 40 semanas de edad. En el presente estudio, el control ejercido en la cantidad de alimento a consumir pudo haber sido un factor limitante para no darse un cambio en el peso del huevo; sin embargo, permitió dar énfasis en el efecto de la Fi sobre la liberación de nutrientes a partir de la dieta. En éste sentido, la inclusión de la Fi aumentó los nutrientes asimilables a partir de la dieta, puesto que ofreciendo una misma cantidad de alimento, mejores rendimientos productivos se produjeron con la inclusión de la enzima (300, 1200, y 4800 FTU/kg), incluyendo el índice de conversión.

La disminución del efecto antinutricional del A-Fi presente en la dieta por la adición de una Fi exógena fue evidente en las tres dosis evaluadas en el presente estudio, aunque con 1200 FTU/kg la respuesta fue mayor. Mediante una mayor hidrólisis del A-Fi obtenida con dosis altas de Fi, se libera más P a partir de la dieta (Van der Klis, Versteegh *y col.*, 1997; Shirley y Edwards, 2003; Zeller, Schollenberger *y col.*, 2015) y se reduce el impacto quelante del A-Fi por disminuir la cantidad de moléculas intactas y

de derivados como los ésteres bajos de inositol. De esta manera se pudo dar una mayor disponibilidad de nutrientes diferentes al P como es el caso de la proteína (Prattley, Stanley *y col.*, 1982) y carbohidratos (Thompson y Yoon, 1984), permitiendo una mejora en la producción y menor uso de las reservas corporales de las aves. Silversides, Scott *y col.* (2006) encontraron que solo con el uso de 700 FTU/kg se daba un cambio positivo en el peso corporal, al evaluar dosis de 300, 500, y 700 FTU/kg. Scott, Kampen *y col.* (2000) demostraron que inclusiones de 250 y 500 FTU/kg de una 3-Fi originada de *A. niger* evitaba la pérdida de peso corporal de una manera proporcional, sin que cambios en el contenido de P y Ca de la dieta afectara la respuesta, demostrando la capacidad que tiene la Fi para sostener la producción sin hacer uso de las reservas corporales de las gallinas. No obstante, ambigüedad en los resultados también son encontrados, en los cuales no se ha demostrado un efecto significativo con el incremento en la dosis de la Fi (Augspurger, Webel *y col.*, 2007; Yildiz, Olgun *y col.*, 2010). Francesch, Broz *y col.* (2005) observaron una ganancia en el peso del ave con inclusiones de 300 y 500 FTU/kg, siendo que con el incremento del P inorgánico en la dieta (1.1 vs 3.2 g/kg de P no fítico) o con el uso de 150 FTU/kg el efecto no se presentó. En el presente estudio, suplementar la dieta con P inorgánico resultó en una pérdida de peso más pronunciada, lo cual también da soporte a la idea de un efecto adicional de Fi al aporte de P. No obstante, la evidencia de pérdida de peso durante el período experimental en la mayoría de las aves resulta ser similar a lo encontrado por Keshavarz (2003) al evaluar la inclusión de la vitamina D3, la 25-OH-D3, y 300 FTU/kg de Fi.

Una mejor obtención de nutrientes a partir de la dieta fue obtenida en gallinas alimentadas con 1200 FTU/kg de Fi al conservar las reservas de grasa abdominal, lo que no fue posible obtener con 300 FTU/kg. La adición de la Fi conservó las reservas energéticas en la gallina, lo que puede ser explicado por el aporte de inositol a partir del A-Fi que tiene la superdosis, afectando el transporte de lipoproteínas en el hígado para la síntesis de triglicéridos (Burton y Wells, 1979), o al evitar el efecto negativo sobre los lípidos por quelación del A-Fi (Cosgrove, 1966). Adicionalmente, la

incapacidad de permitir un mejor desempeño productivo y mantener las reservas corporales con la suplementación de P inorgánico fue evidente, así como también el mejoramiento alcanzado por 1200 FTU/kg de Fi, lo que a su vez se proyecta como una estrategia en la búsqueda de prolongar el ciclo de postura y mejorar la rentabilidad en la producción.

Tomando en consideración los resultados obtenidos en la clasificación del huevo, se observa que las dosis de 1200 y 4800 FTU/kg permitieron mejores condiciones para la formación de un cascarón resistente, por una mayor disponibilidad de minerales a partir de la dieta, lo que terminó en disminuir la incidencia de huevo roto. Hassanien, Sanaa (2011) encontraron que adicionar 1000 FTU/kg causaba una mayor resistencia a la ruptura en comparación con 700 FTU/kg, y a su vez esta dosis era mejor que inclusiones de 500 y 0 FTU/kg. En el mismo estudio, los resultados observados en ruptura de cascarón fueron semejantes a aquellos obtenidos para los niveles en sangre de P, Ca, y Mg. Mientras tanto en el presente estudio, fue evidente que 4800 FTU/kg no disminuyó la presencia de huevo en fáfara de la misma manera que 1200 FTU/kg, lo que tampoco fue obtenido por la dosis de 300 FTU/kg. Esto indica que el efecto de la dosis en cuanto a parámetros en cáscara puede causar diferente estatus en la formación de la misma, lo que a su vez influye en el potencial comercializable del huevo.

La lisina hace parte de la matrix proteica en los cuerpos mamilares presentes en el cascarón (Hincke, Nys y col., 2012); por tanto es posible que la disponibilidad de este aminoácido a partir de la dieta altera el proceso de deposición mineral durante la formación del cascarón, dejando defectos en su micro-estructura (Solomon, 2010). En el presente estudio, la lisina influyó el incremento en la incidencia de huevos en fáfara, sin que se viera afectado el grosor del cascarón, reforzando la idea de una mayor influencia de la micro-estructura que la macro-estructura en la resistencia del cascarón, ya que la disposición y el tamaño de los cristales de los minerales en el mismo cambia sus propiedades mecánicas (Hernández-Hernández, Vidal y col., 2008). Un importante punto a tener en cuenta fue que el diseño del experimento se llevó a

cabo en un sistema de jaula individual, permitiéndolo una mayor influencia dietaria en la ruptura de la cáscara, al anular aquella derivada de la limitación del espacio en jaula.

Cuando el efecto de los tratamientos sobre los huevos no vendibles (rotos y en fáfara) fue combinado con el de la masa de huevo, en la variable de huevos comercializables, el efecto del nivel de Lis-d sobre la acción de la Fi fue más significativo. Al respecto, solo un estudio ha sido publicado acerca de la implicación del efecto combinado o aislado de la dosis de la Fi y el nivel de lisina en la dieta. Selle, Ravindran y *col.* (2007) encontraron que la adición de 500 FTU/kg de una 3-Fi originada a partir de *A. niger* en pollo de engorda de 7 a 28 días de edad tuvo un mejor desempeño en una dieta con nivel de L-dig considerado como deficiente (10.0 g/kg) en comparación con un nivel adecuado (11.8 g/kg). Por otra parte en el presente estudio, la limitación de lisina del nivel de 0.67% indujo un bajo metabolismo reflejado en un bajo consumo de alimento, lo que disminuyó el uso de nutrientes liberados por la Fi, resultando en una ligera respuesta a la superdosis. Adicionalmente, en el nivel de 0.87%, en la dieta sin Fi, el bajo aporte de P pero alto contenido de lisina produjo un desbalance que impactó negativamente el desempeño productivo; sin embargo, el equilibrio de los nutrientes en la dieta fue logrado con la adición de 300 y 1200 FTU/kg, pero no con 4800 FTU/kg. En el nivel medio de Lis-d (0.77%), 300 FTU/kg no obtuvo una producción de masa de huevo como el alcanzado por la superdosis con inclusiones de 1200 y 4800 FTU/kg. En general, 300 FTU/kg de Fi no fue suficiente para cubrir los requerimientos de nutrientes en la producción y a la par evitar el uso de las reservas energéticas en el cuerpo. Esta situación fue remediada incluyendo la dosis de 1200 FTU/kg, lo que resultó en una acción más uniforme de la enzima en los tres niveles de Lis-d evaluados, resultando en una frecuente diferenciación estadística de ésta dosis respecto a la no inclusión de la enzima.

La fuerza a la ruptura, que es un importante parámetro del estatus óseo, es incrementado al existir una mayor disponibilidad de P a partir de la dieta (Shaw, Blake y *col.*, 2010), siendo que con 1200 FTU/kg fue la dosis de Fi más adecuada para

lograrlo, comparado con 300 y 4800 FTU/kg, que condujo la presencia hasta de un efecto cuadrático. El mismo patron de resultados fue observado en peso de ceniza, concordando con la correlación establecido por Kim, Donalson y *col.* (2004) para la fuerza a la ruptura y ceniza, lo que indica que existe una mayor liberación de P de la dieta para sostener el estatus óseo por parte de la superdosis que por parte de dosis estándar. Éste hecho también tiene soporte en los hallazgos de Adeola, Walk (2013) en pollo de engorda, en los que la utilización del P proveniente de la acción de la Fi para la mineralización ósea está cerca de 87.4 y 92.8% con el uso de 5 y 6 g de Ca altamente soluble, respectivamente.

Por otra parte, la adición de P inorgánico a las dietas resultó en resistencia a la ruptura en hueso y peso de cenizas similar a las inclusiones de Fi de 300 y 4800 FTU/kg, dejando entre ver que un mayor efecto fosfórico de la enzima es obtenido también con superdosis, siendo que en el caso de gallina de postura la inclusión de 1200 FTU/kg pudiera ser considerada para lograr tal efecto. Por otra parte, los cambios obtenidos en la concentración de ceniza dependiente del nivel de Lis-d en la dieta, pudiera ser consecuencia de alteraciones en el componente proteico del hueso o como un efecto colateral del cambio metabólico por el nivel de Lis-d de la dieta. En niveles de 0.67 y 0.77% la concentración de ceniza fue reducida con el incremento de la dosis de la Fi, pero en 0.87% la respuesta fue contraria. A diferencia, Ravindran, Selle y *col.* (2001), no encontraron cambios en el contenido de ceniza al incrementar los niveles de lisina en pollo de engorda de 28 días de edad.

Es probable que la inclusión de 4800 FTU/kg tuviera mayor hidrólisis del A-Fi y por tanto aumentara la disponibilidad de nutrientes en la dieta. No obstante, dicha dosis causó una depresión del desempeño productivo y no mostró beneficios para el estatus óseo de gallinas alimentadas con 0.67 y 0.87% de Lis-d, al compararse con la dosis de 1200 FTU/kg. Una posible explicación está dada por un consecuente desbalance de nutrientes, ya que al aumentar el contenido de P con la Fi, la relación de Ca:P, por ejemplo, se habría roto. Li, Angel y *col.* (2015) encontraron que al incrementar el nivel de P-dis en la dieta, se disminuía el Ca total e ionizado en sangre de pollitos,

concluyendo que con cierto exceso o deficiencia en estos minerales, su homeostasis se afectaría y por tanto el desempeño productivo y composición ósea del ave. Pocos estudios se han llevado a cabo con altas inclusiones de Fi en gallina de postura, y contrario a lo observado en el presente estudio donde 4800 produjo un cambio positivo en la producción de huevo solo en el nivel de 0.77% de Lis-d, Meyer , Parsons (2011) no encontraron cambios en la respuesta al evaluar 150, 250, y 15000 FTU/kg de una 6-Fi proveniente de *E.coli* en gallina Hy-line W-36, similar a los resultados de Augspurger, Webel y col. (2007) con 250, 500, 1000, y 10000 FTU/kg de una 6-Fi en aves de la línea Single-Comb White Leghorn.

En conclusión, la suplementación de 1200 FTU/kg de una Fi derivada de *E.coli*, mejoró el desempeño productivo mientras preservó las reservas corporales y el tejido óseo en gallina Bovans white, lo cual no fue logrado con inclusiones de 300 y 4800 FTU/kg o con la suplementación de P inorgánico. Parece ser que la Fi tiene implicaciones en la disponibilidad de nutrientes más allá del P y que además un mayor efecto fosfórico y extra-fosfórico de la enzima es obtenido con el uso de la superdosis. Por otra parte, la acción de la Fi sobre parámetros productivos y estatus óseo en la gallina, fue dependiente de los niveles de Lis-d en la dieta, sin que se presentará una equivalencia de la Fi sobre dichos niveles.

II.6 Referencias

- Adeola, O., and C. Walk. 2013. Linking ileal digestible phosphorus and bone mineralization in broiler chickens fed diets supplemented with phytase and highly soluble calcium. *Poult. Sci.* 92:2109-2117.
- Agbede, J., I. Adebayo, I. Osho, and O. Bankole. 2010. Influence of microbial phytase on amino acid digestibility of caectomised laying hens fed marginally low methionine-based diet. *Adv. Anim. Biosci.* 1:453-454.
- Angel, R., N. M. Tamim, T. J. Applegate, A. S. Dhandu, and L. E. Ellestad. 2002. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. *The J. Appli. Poult. Res.* 11:471-480.
- AOAC. 2006. Official Methods of Analysis. ed. Assoc., Washington, DC.
- Augspurger, N., D. Webel, and D. Baker. 2007. An phytase expressed in yeast effectively replaces inorganic phosphorus for finishing pigs and laying hens. *J. Anim. Sci.* 85:1192-1198.

- Barkley, G., H. Miller, and J. Forbes. 2004. The ability of laying hens to regulate phosphorus intake when offered two feeds containing different levels of phosphorus. *Br. J. Nutr.* 92:233-240.
- Bedford, M., and C. Walk. 2016. Reduction of phytate to tetrakisphosphate (IP₄) to triphosphate (IP₃), or perhaps even lower, does not remove its antinutritive properties. Pages 45-49 in *Phytate destruction consequences for precision animal nutrition*. C. Walk, I. Kuhn, S. HN, M. Kidd, and R. M eds. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.
- Boisen, S., T. Hvelplund, and M. R. Weisbjerg. 2000. Ideal amino acid profiles as a basis for feed protein evaluation. *Live. Prod. Sci.* 64:239-251.
- Burton, L. E., and W. W. Wells. 1979. myo-Inositol deficiency: studies on the mechanism of lactation-dependent fatty liver formation in the rat. *The J. Nutr.* 109:1483-1491.
- Bye, J. W., N. P. Cowieson, A. J. Cowieson, P. H. Selle, and R. J. Falconer. 2013. Dual effects of sodium phytate on the structural stability and solubility of proteins. *J Agric. Food. Chem.* 61:290-295.
- Ceylan, N., S. Scheideler, and H. Stilborn. 2003. High available phosphorus corn and phytase in layer diets. *Poult. Sci.* 82:789-795.
- Cheryan, M., and J. J. Rackis. 1980. Phytic acid interactions in food systems. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 13:297-335.
- Coon, C. N. 2002. Feeding commercial egg-type layers. Pages 287-328 in *Commercial chicken meat and egg production*. Springer.
- Cosgrove, D. J. 1966. The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates. *Rev. Pure Appli. Chem.* 16:209-224.
- Cowieson, A., P. Wilcock, and M. Bedford. 2011. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World. Poult. Sci. J.* 67:225-236.
- D'mello, J. 2003. Amino acids as multifunctional molecules. *Amino acids in animal nutrition* 2:1-14.
- Dersjant-Li, Y., A. Awati, H. Schulze, and G. Partridge. 2015. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *J. Sci. Food. Agric.* 95:878-896.
- Doria, E., L. Galleschi, L. Calucci, C. Pinzino, R. Pilu, E. Cassani, and E. Nielsen. 2009. Phytic acid prevents oxidative stress in seeds: evidence from a maize (*Zea mays* L.) low phytic acid mutant. *J. Exp. Bot.*:345.
- Engelen, A. J., F. C. Heeft, P. H. G. Randsdorp, W. A. C. Somers, J. Schaefer, and B. J. C. van der Vat. 2001. Determination of phytase activity in feed by a colorimetric enzymatic method: collaborative interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 84:629-633.
- Englmaierová, M., G. Dlouhá, M. Marounek, and M. Skřivan. 2012. Efficacy of contrast levels of non-phytate phosphorus and *Aspergillus niger* phytase in hens fed wheat-maize-based diets. *Czech J. Anim. Sci.* 57:499-505.
- Francesch, M., J. Broz, and J. Brufau. 2005. 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.* 46:340-348.

Hassanien, H., and H. Sanaa. 2011. Comparison difference levels of phytase enzyme supplementation on laying hen performance, egg quality and some blood parameters. *Asian J. Poult. Sci.* 5:77-85.

Hendrix Genetics Company. 2009. *Bovans Nutrition Management Guide*.

Hernández-Hernández, A., M. L. Vidal, J. Gómez-Morales, A. B. Rodríguez-Navarro, V. Labas, J. Gautron, Y. Nys, and J. M. G. Ruiz. 2008. Influence of eggshell matrix proteins on the precipitation of calcium carbonate (CaCO₃). *J. Crystal. Growth.* 310:1754-1759.

Hincke, M. T., Y. Nys, J. Gautron, K. Mann, A. B. Rodríguez-Navarro, and M. D. McKee. 2012. The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front. Biosci.* 17:1266-1280.

Keshavarz, K. 2003a. A comparison between cholecalciferol and 25-OH-cholecalciferol on performance and eggshell quality of hens fed different levels of calcium and phosphorus. *Poult. Sci.* 82:1415-1422.

Keshavarz, K. 2003b. The effect of different levels of nonphytate phosphorus with and without phytase on the performance of four strains of laying hens. *Poult. Sci.* 82:71-91.

Kim, W. K., L. M. Donalson, P. Herrera, C. L. Woodward, L. F. Kubena, D. J. Nisbet, and S. C. Ricke. 2004. Research note: Effects of different bone preparation methods (fresh, dry, and fat-free dry) on bone parameters and the correlations between bone breaking strength and the other bone parameters. *Poult. Sci.* 83:1663-1666.

Lemme, A., V. Ravindran, and W. L. Bryden. 2004. Ileal digestibility of amino acids in feed ingredients for broilers. *World. Poult. Sci. J.* 60:423-438.

Li, W., R. Angel, S.-W. Kim, E. Jiménez-Moreno, M. Proszkowiec-Weglarz, and P. Plumstead. 2015. Age and adaptation to Ca and P deficiencies: 2. Impacts on amino acid digestibility and phytase efficacy in broilers. *Poult. Sci.* 94:2917-31.

Lim, H., H. Namkung, and I. Paik. 2003. Effects of phytase supplementation on the performance, egg quality, and phosphorous excretion of laying hens fed different levels of dietary calcium and nonphytate phosphorous. *Poult. Sci.* 82:92-99.

Mellef, J., A. Dridi, A. Agrebi, and O. Belhaj. 2011. Effets de l'ajout de phytase dans la ration alimentaire sur les performances de ponte des poules pondeuses. *R. Med. Vet.* 162:304.

Meyer, E., and C. Parsons. 2011. The efficacy of a phytase enzyme fed to Hy-Line W-36 laying hens from 32 to 62 weeks of age. *The J. Appli. Poult. Res.* 20:136-142.

Nahm, K. 2007. Efficient phosphorus utilization in poultry feeding to lessen the environmental impact of excreta. *World. Poult. Sci. J.* 63:625-654.

Nielsen, A. V. F., C. Nyffenegger, and A. S. Meyer. 2015. Performance of microbial phytases for gastric inositol phosphate degradation. *J. Agric. Food. Chem.* 63:943-950.

Novak, C., H. Yakout, and S. Scheideler. 2004. The combined effects of dietary lysine and total sulfur amino acid level on egg production parameters and egg components in Dekalb Delta laying hens. *Poult. Sci.* 83:977-984.

NRC. 1994. *Nutrient Requirements of Poultry* National Academy Press, . Washington, DC. USA.

- Onyango, E., M. Bedford, and O. Adeola. 2005. Phytase activity along the digestive tract of the broiler chick: A comparative study of an *Escherichia coli*-derived and *Peniophora lycii* phytase. *Can. J. Anim. Sci.* 85:61-68.
- Prattley, C., D. Stanley, and F. VOORT. 1982. Protein-phytate interactions in soybeans. II. Mechanism of protein-phytate binding as affected by calcium. *J. Food. Biochem.* 6:255-272.
- Ravindran, V., P. Selle, G. Ravindran, P. Morel, A. Kies, and W. Bryden. 2001. Microbial phytase improves performance, apparent metabolizable energy, and ileal amino acid digestibility of broilers fed a lysine-deficient diet. *Poult. Sci.* 80:338-344.
- Rutherford, S. M., A. C. Edwards, and P. H. Selle. Effect of phytase on lysine-rice pollard complexes. *Manipulating Pig Production VI. Australasian Pig Science Association (1997):* 248.
- Rostagno, H., L. Albino, J. Donzele, P. Gomes, R. Oliveira, D. Lopes, A. Ferreira, S. Barreto, and R. Euclides. 2017. *Composição de alimentos e exigências nutricionais (Tabelas brasileiras para aves e suínos)*. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa.
- Scanes, C. G., R. Campbell, and P. Griminger. 1987. Control of energy balance during egg production in the laying hen. *The J. Nutr.* 117:605-611.
- Scott, T., R. Kampen, and F. Silversides. 2000. The effect of phosphorus, phytase enzyme, and calcium on the performance of layers fed wheat-based diets. *Can. J. Anim. Sci.* 80:183-190.
- Selle, P., V. Ravindran, A. Cowieson, and M. Bedford. 2010. Phytate and phytase. *Enzyme. Farm. Anim. Nutr.:*160-205.
- Selle, P. H., A. J. Cowieson, N. P. Cowieson, and V. Ravindran. 2012. Protein-phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. *Nutr. Res. Rev.* 25:1-17.
- Selle, P. H., and V. Ravindran. 2007a. Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 135:1-41.
- Selle, P. H., V. Ravindran, G. Ravindran, and W. L. Bryden. 2007b. Effects of dietary lysine and microbial phytase on growth performance and nutrient utilisation of broiler chickens. *Asian. Austr. J. Anim. Sci.* 20:1100-1113.
- Shaw, A., J. Blake, and E. Moran. 2010. Effects of flesh attachment on bone breaking and of phosphorus concentration on performance of broilers hatched from young and old flocks. *Poult. Sci.* 89:295-302.
- Shirley, R. B., and H. M. Edwards. 2003. Graded levels of phytase past industry standards improves broiler performance. *Poult. Sci.* 82:671-680.
- Silva, E. P., E. B. Malheiros, N. K. Sakomura, K. S. Venturini, L. Hauschild, J. C. P. Dorigam, and J. B. K. Fernandes. 2015. Lysine requirements of laying hens. *Livestock. Sci.* 173:69-77.
- Silva, J. H. V. d., J. A. d. Araujo, C. d. C. Goulart, F. G. P. Costa, N. K. Sakomura, and D. A. Furtado. 2008. Influência da interação fósforo disponível× fitase da dieta sobre o desempenho, os níveis plasmáticos de fósforo e os parâmetros ósseos de poedeiras comerciais. *Rev. Bras. Zootec.:*2157-2165.

- Silversides, F. G., T. A. Scott, D. R. Korver, M. Afsharmanesh, and M. Hruby. 2006. 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.* 85:297-305.
- Solomon, S. 2010. The eggshell: strength, structure and function. *Bri. Poult. Sci.* 51:52-59.
- Thompson, L. U., and J. H. Yoon. 1984. Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. *J. Food. Sci.* 49:1228-1229.
- Torii, K., T. Yokawa, E. Tabuchi, R. Hawkins, M. Mori, T. Kondoh, and T. Ono. 1996. Recognition of deficient nutrient intake in the brain of rat with l-lysine deficiency monitored by functional magnetic resonance imaging, electrophysiologically and behaviorally. *Amino. Acids.* 10:73-81.
- Truong, H. H., S. Yu, A. Peron, D. J. Cadogan, A. Khoddami, T. H. Roberts, S. Y. Liu, and P. H. Selle. 2014. Phytase supplementation of maize-, sorghum- and wheat-based broiler diets with identified starch pasting properties influences phytate (IP 6) and sodium jejunal and ileal digestibility. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 198:248-256.
- Van der Klis, J., H. Versteegh, P. Simons, and A. Kies. 1997. The efficacy of phytase in corn-soybean meal-based diets for laying hens. *Poult. Sci.* 76:1535-1542.
- Viana, M. T. d. S., L. F. T. Albino, H. S. Rostagno, S. L. d. T. Barreto, E. A. d. U. Silva, and W. M. U. Florentino. 2009. Efeito da suplementação de enzima fitase sobre o metabolismo de nutrientes e o desempenho de poedeiras. *Rev. Bras. Zoot.*
- Weaver, J. D., A. H. J. Ullah, K. Sethumadhavan, E. J. Mullaney, and X. G. Lei. 2009. Impact of assay conditions on activity estimate and kinetics comparison of *Aspergillus niger* PhyA and *Escherichia coli* AppA2 phytases. *J. Agri. Food. Chem.* 57:5315-5320.
- Wilcock, P., and C. L. Walk. 2016. Low phytate nutrition - what is the pig and poultry industry doing to counter dietary phytate as an anti-nutrient and how is it being applied? Pages 86-106 in *Phytate destruction consequences for precision animal nutrition*. C. L. Walk, I. Kuhn, H. H. Stein, M. T. Kidd, and M. Rodehutschord eds. Wageningen Academic.
- Yildiz, A. O., O. Olgun, and Y. Cufadar. 2010. The effect of manganese and phytase in the diet for laying hens on performance traits and eggshell quality. *J. Anim. Vet. Adv.* 9:32-36.
- Zeller, E., M. Schollenberger, I. Kühn, and M. Rodehutschord. 2016. Dietary effects on inositol phosphate breakdown in the crop of broilers. *Arch. Anim. Nutr.* 70:57-71.
- Zeller, E., M. Schollenberger, M. Witzig, Y. Shastak, I. Kühn, L. E. Hoelzle, and M. Rodehutschord. 2015. Interactions between supplemented mineral phosphorus and phytase on phytate hydrolysis and inositol phosphates in the small intestine of broilers. *Poult. Sci.* 94:1018-1029.

Cuadro 1. Composición y análisis del contenido nutricional de la dieta base

Ingrediente	Kilogramos
Maíz amarillo (8%)	690.0
Pasta de soya (48%)	199.5
Carbonato de calcio	94.3
Sal (NaCl)	4.0
Celulosa	3.0
Vitaminas y minerales ¹	2.4
DL- metionina 84%	1.6
Ortofosfato 18:21	1.3
Pigmento amarillo 15 g/Kg (<i>Tagetes erecta</i>)	1.0
Pigmento rojo 5 g/Kg (<i>Capsicum annuum</i>)	0.8
Cloruro de colina 60%	0.8
BMD-100 ²	0.5
Cyromazine 1%	0.5
Antioxidante ²	0.2

L- Lisina 76.4%	0.0
<i>Escherichia coli</i> - Fitasa	0.0
Contenido Nutricional	
Proteína cruda (%) [†]	15.10
Energía metabolizable (Mcal/kg) [†]	2.80
Metionina y cisteína digestible (%) ^{††}	0.65
Metionina digestible (%) ^{††}	0.38
Lisina digestible (%) ^{††}	0.67
Treonina digestible (%) ^{††}	0.61
Calcio total (%) [†]	3.5
Fósforo total (%) [†]	0.34
Fósforo disponible (%) [†]	0.12

†Valor analizado; ††Valor calculado.¹Premezcla vitamínica provee: 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, Acido 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; Vehículos c.b.p 1,000,000g por kg de dieta.² BHA (hidroxibutilanisol) 1.2%, BHT (butil hidroxitolueno) 9.0%, Etoxiquina 4.8%, Agentes quelantes 10%.

Cuadro 2. Actividad fitásica esperada y cuantificada en muestras de alimento¹

Esperada (FTU²/kg)	Lisina Digestible (%)	Analizada (FTU/kg)	Recuperada (%)	CV (%)
300		485	162	14
1200	0.67	1340	112	6
4800		5345	111	8
300		402	134	7
1200	0.77	1400	117	5
4800		5498	115	9
300		390	130	13
1200	0.87	1600	133	4
4800		5780	120	7

¹ Muestras de alimento analizadas por Enzyme Services and Consultancy Ltd.- Ystrad Mynach, UK, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

² Una FTU es definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de P inorgánico por minuto a partir de 0.15M/dl de fitato de sodio a 37°C y pH 5.

Cuadro 3. Efecto interactivo de la adición de una fitasa y niveles de lisina digestible en la dieta sobre los parámetros productivos y deposición de grasa abdominal en gallinas Bovans White de 40-65 semanas de edad

P-Dis (%)	Fitasa (FTU/kg)	Lisina dig. (%)	Producción de huevo (%)	Peso de huevo (g)	Consumo de alimento (g/ave/día)	Masa de huevo (g)	IC (g/g)	Peso corporal (g)			Deposición de grasa abdominal (%)
								Inicial (g)	Final (g)	Pérdida (%)	
0.12	0	0.67 ¹	85.9	58.7	102.5	50.3 ^b	2.04	1,620	1,531	5.2	1.94
	300		87.1	62.0	103.2	53.8 ^{ab}	1.92	1,660	1,620	2.3	1.80
	1200		88.7	60.0	104.0	53.2 ^{ab}	1.96	1,652	1,634	2.8	2.13
	4800		88.3	59.2	103.1	52.2 ^{ab}	1.98	1,641	1,606	2.7	2.17
	0	0.77 ²	88.2	60.8	104.7	53.7 ^{ab}	1.96	1,664	1,527	5.7	1.70
	300		86.2	60.8	104.6	52.4 ^{ab}	2.01	1,626	1,582	2.5	2.00
	1200		89.6	59.8	103.6	53.4 ^{ab}	1.95	1,653	1,636	1.0	2.00
	4800		90.3	60.8	104.2	54.8 ^a	1.90	1,641	1,614	2.1	1.58
	0	0.87 ³	84.1	60.9	104.9	51.2 ^{ab}	2.06	1,662	1,596	5.3	1.30
	300		90.1	60.2	103.9	54.1 ^{ab}	1.92	1,669	1,628	2.7	1.94
	1200		90.2	60.3	105.0	54.3 ^{ab}	1.94	1,670	1,653	0.2	2.29
	4800		88.3	58.9	103.0	52.0 ^{ab}	1.99	1,670	1,589	1.7	2.47
0.25	0		84.5	61.9	103.8	52.2 ^{ab}	2.01	1,680	1,571	6.9	1.34
		SEM	0.828	0.506	0.343	0.530	0.021	13.32	15.31	0.551	0.140
Promedio de Efectos Principales											
0.12	0		86.1 ^b	60.1	104.0	51.7 ^b	2.021 ^a	1,654	1,551 ^b	5.4 ^a	1.65 ^{ab}
	300		87.8 ^{ab}	61.0	103.9	53.4 ^a	1.953 ^b	1,652	1,610 ^a	2.5 ^b	1.91 ^{ab}
	1200		89.4 ^a	60.1	104.2	53.6 ^a	1.949 ^b	1,663	1,641 ^a	1.3 ^b	2.14 ^a
	4800		89.0 ^{ab}	59.6	103.4	53.0 ^{ab}	1.957 ^b	1,651	1,603 ^{ab}	2.9 ^b	2.07 ^{ab}
0.25	0		86.2 ^{ab}	61.9	103.8	53.2 ^{ab}	1.958 ^{ab}	1,678	1,560 ^{ab}	6.9 ^a	1.34 ^b

0.12	0.67	87.5	60.0	103.2 ^b	52.4	1.976	1,657	1,598	3.2	2.01
	0.77	88.6	60.5	104.3 ^a	53.6	1.956	1,665	1,590	2.8	1.82
0.25	0.87	88.2	60.1	104.2 ^{ab}	52.9	1.978	1,672	1,616	2.5	2.00
		86.2	61.9	103.8 ^{ab}	53.2	1.958	1,678	1,560	6.9	1.34
0.12		88.1	60.2 ^b	103.4	53.0	1.970	1,655	1,601	2.9 ^b	1.94 ^a
0.25		86.2	61.9 ^a	103.8	53.2	1.958	1,678	1,603	6.9 ^a	1.34 ^b
Valores-P (Significancia del Efecto)										
Fitasa		0.019* C	0.282	0.425	0.044* C	0.045*	0.719	0.001** C	<.0001** C	0.060* C
Lisina		0.533	0.604	0.012* L	0.176 L	0.644	0.575	0.328	0.525	0.442
Lisina*fitasa		0.168	0.200	0.121	0.051*	0.106	0.913	0.570	0.741	0.111
P-Dis		0.217	0.068	0.911	0.768	0.750	0.457	0.144	<.0001***	0.017*

Significancia estadística * $P \leq 0.07$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. ^{a-b} Muestran diferencia significativa entre las medias.

L, Efecto lineal y C, Cuadrático.

¹Valores analizados en orden son: 0.69, 0.67, 0.68, y 0.70.

²Valores analizados en orden son: 0.80, 0.76, 0.79, y 0.78.

³Valores analizados en orden son: 0.86, 0.87, 0.87, 0.89, y 0.83.

Cuadro 4. Efecto interactivo de la adición de una fitasa y niveles de lisina digestible en la dieta sobre los tipo de huevo producido, masa de huevo comercializable, y pruebas físicas en huevo de gallinas Bovans White de 40-65 semanas de edad

P-Dis (%)	Fitasa (FTU/kg)	Lisina dig. (%)	Huevo producido (%)			Masa de huevo comercializable (%)	Prueba física en huevo		
			Roto	Fárfara	Sucio		Grosor de cascarón (mm)	Unidades Haugh	Pigmentación
0.12	0	0.67	0.59	0.63	0.70	42.5 ^{cd}	317	95.1	9.2
	300		0.43	0.67	0.45	46.3 ^{abc}	323	92.3	9.6
	1200		0.20	0.37	1.25	46.3 ^{abc}	316	91.1	9.5
	4800		0.25	0.94	1.07	45.1 ^{abcd}	314	91.7	9.4
	0	0.77	0.58	1.13	0.62	46.5 ^{abc}	308	89.9	9.2
	300		0.61	1.02	1.26	43.9 ^{bcd}	318	93.1	9.4
	1200		0.25	0.31	1.16	47.2 ^{ab}	318	92.3	9.2
	4800		0.29	0.61	0.76	48.8 ^a	315	94.2	9.4
	0	0.87	1.14	2.25	0.57	41.6 ^d	310	89.6	9.2
	300		0.56	0.80	0.72	47.9 ^{ab}	313	92.0	9.1
	1200		0.16	0.64	0.89	48.2 ^a	320	92.4	9.3
	4800		0.30	0.56	1.21	45.1 ^{abcd}	313	93.9	9.2
0.25	0		0.39	1.55	1.39	43.0 ^{cd}	314	89.3	9.2
		SEM	0.156	0.243	0.196	0.868	3.332	0.893	0.111
Promedio de Efectos Principales									
0.25	0		0.77 ^a	1.39 ^a	0.64	43.5 ^a	312	91.5	9.2
	300		0.55 ^{ab}	0.78 ^{ab}	0.81	46.0 ^{ab}	318	92.5	9.4
	1200		0.20 ^b	0.24 ^b	1.05	47.2 ^b	318	91.9	9.3
	4800		0.28 ^b	0.43 ^{ab}	1.01	46.3 ^{ab}	314	93.3	9.33
	0		0.39 ^{ab}	1.52 ^{ab}	1.39	43.0 ^{ab}	314	89.2	9.20

	0.67	0.37	0.65	0.83	45.1	318	92.6	9.43
	0.77	0.43	0.76	0.95	46.6	315	92.4	9.25
	0.87	0.54	1.06	0.85	45.7	314	92.1	9.21
0.25	0.87	0.39	1.52	1.39	43.0	314	89.2	9.20
0.12		0.45	0.82	0.88	45.8 ^b	316	92.4 ^b	9.30
0.25		0.39	1.52	1.39	43.0 ^a	314	89.2 ^a	9.20
Valores-P (Significancia del Efecto)								
Fitasa		0.037*C	0.037*C	0.392	0.017* C	0.402	0.569	0.274
Lisina		0.656	0.335 L	0.865	0.337	0.647	0.878 L	0.226
Lisina*fitasa		0.873	0.381	0.646	0.056*	0.881	0.121	0.416
P-Dis		0.368	0.118	0.153	0.070*	0.826	0.057*	0.629

Significancia estadística * $P \leq 0.07$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. ^{a-b} Muestran diferencia significativa entre las medias.

L, Efecto lineal y C, Cuadrático.

Cuadro 5. Efecto interactivo de la adición de una fitasa y niveles de lisina digestible en la dieta sobre parámetros óseos en gallinas Bovans White de 65 semanas de edad

P-Dis (%)	Fitasa (FTU/kg)	Lisina dig. (%)	Fuerza a la ruptura (kg/cm²)	Peso de hueso deshidratado (g)	Concentración de ceniza (%)	Peso de ceniza (g)
	0		16.1	4.26 ^b	48.2 ^{bc}	2.05
	300	0.67	17.4	4.49 ^{ab}	49.3 ^{bc}	2.21
	1200		18.9	5.11 ^a	47.3 ^c	2.42
	4800		18.3	4.61 ^{ab}	48.0 ^{bc}	2.20
	0		16.0	4.01 ^b	49.6 ^{bc}	1.98
0.12	300	0.77	18.6	4.43 ^{ab}	51.0 ^{ab}	2.26
	1200		19.0	4.78 ^{ab}	48.8 ^{bc}	2.33
	4800		16.7	4.49 ^{ab}	48.6 ^{bc}	2.18
	0		17.3	4.41 ^{ab}	50.1 ^{abc}	2.21
	300		17.8	4.78 ^{ab}	48.3 ^{bc}	2.30
	1200	0.87	18.2	3.99 ^b	53.7 ^a	2.14
	4800		18.7	4.04 ^b	53.4 ^a	2.16
0.25	0		18.5	4.64 ^{ab}	49.4 ^{bc}	2.29
		SEM	0.463	0.100	0.458	0.051
Promedio de Efectos Principales						
	0		16.5 ^b	4.23 ^b	49.3	2.08 ^b
0.12	300		17.9 ^{ab}	4.56 ^{ab}	49.5	2.26 ^{ab}
	1200		18.7 ^a	4.63 ^a	49.9	2.30 ^a
	4800		17.9 ^{ab}	4.38 ^{ab}	50.0	2.18 ^{ab}
0.25	0		18.5 ^{ab}	4.64 ^{ab}	49.4	2.29 ^{ab}
0.12		0.67	17.6	4.62 ^a	48.2 ^b	2.22

	0.77	17.6	4.43 ^{ab}	49.1 ^b	2.19
		18.0	4.31 ^b	51.3 ^a	2.20
0.25	0.87	18.5	4.64 ^{ab}	49.4 ^{ab}	2.29
0.12		17.7	4.47	49.6	2.21
0.25		18.5	4.64	49.4	2.29
Valores-P (Significancia del Efecto)					
Fitasa		0.006** C	0.019* L	0.649 C	0.015* C
Lisina		0.722	0.035* L	<.0001	0.847
Lisina*fitasa		0.354	<.0001	<.0001	0.148
P-Dis		0.340	0.280	0.687	0.315

Significancia estadística * $P \leq 0.07$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. ^{a-b} Muestran diferencia significativa entre las medias.

L, Efecto lineal y C, Cuadrático.

III. FASE EXPERIMENTAL 2

Efecto de la Superdosis de una Fitasa en la Digestibilidad Ileal de Amino Ácidos y Minerales Dependiendo del Nivel de Lisina Digestible en Dieta para Gallina Bovans White

III.1 Resumen

El empleo de altas dosis de fitasa (**Fi**) de tipo exógena puede permitir mayor disponibilidad de nutrientes limitantes en la dieta, como es el caso de la lisina, mediante una hidrólisis más profunda del ácido fólico y por ende una disminución de su capacidad quelante. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de diferentes dosis de una Fi en dietas con niveles crecientes de lisina digestible (**Lis-d**), sobre la digestibilidad de aminoácidos (**AA**) y minerales. Para ello se evaluaron cuatro dosis de Fi (0, 300, 1200, y 4800 FTU/kg) en tres niveles de Lis-d (0.67, 0.77, y 0.87%) de una dieta base de maíz y pasta de soya baja en fósforo disponible (0.12% - **Pdis**). Se incluyó un tratamiento adicional con 0.25% de Pdis en el nivel de 0.87% de Lis-d sin Fi. El dióxido de titanio fue suministrado en la dieta como marcador indigestible por dos semanas a una dosis de 5 g/kg, tras ser alimentadas por 25 semanas con las dietas experimentales. Se emplearon 182 gallinas de la línea Bovans White de 40 semanas de edad, de las cuales tras realizar eutanasia, se obtuvo el contenido del íleon posterior de tres aves, el cual fue mezclado en un pool, para obtener un total de cuatro muestras por tratamiento. Se cuantificó el contenido de AA limitantes (excepto Trp), no limitantes, P, Ca, Zn, Cu, Co, Mn, Mg, Fe, K, y Na en la digesta del íleon y de determinó el coeficiente aparente de digestibilidad para cada nutriente. Fue significativa la interacción entre las dosis de la Fi y los niveles de Lis-d para todos los AA ($P < 0.05$), siendo que en el nivel de 0.67% de Lis-d, la digestibilidad se ajustó a un modelo lineal con el incremento de la dosis de la Fi, mientras que en 0.77 y 0.87% el ajuste fue de tipo cuadrático ($P < 0.05$). La digestibilidad del P fue mayor cuando se incrementó la dosis de la Fi, aunque la respuesta a la enzima fue más leve en el nivel de 0.87% de

Lis-d ($P=0.034$). No hubo diferencia entre los tratamientos para la digestibilidad de Ca, Zn, Cu, Co, Mn, y Fe ($P>0.05$). La adición de la Fi en la dieta mejoró la digestibilidad de Mg, Na, y K en los niveles de 0.67% (excepto para la dosis de 300 FTU/kg) y 0.77% de Lis-d. No obstante, la adición gradual de la Fi afectó negativamente la digestibilidad de Mg y Na en el nivel de 0.87% de Lis-d ($P<0.05$). El contenido de Lis-d en la dieta influyó significativamente la respuesta obtenida hacia la Fi en la digestibilidad de los AA evaluados, P y Mg. Sin embargo, la dosis de 1200 FTU/kg resultó en el incremento de la digestibilidad de los AA y P en comparación con la no inclusión de la enzima o con la dosis de 300 FTU/kg. Por otra parte, el aporte de P con un nivel de Pdis de 0.25% no fue similar a aquel observado con la inclusión de la Fi.

Palabras Claves: Superdosis de fitasa, digestibilidad aparente en ileón, digestibilidad de aminoácidos, digestibilidad de minerales, gallina de postura.

III.2 Introducción

El ácido fítico (**A-Fi**) ha sido un importante punto de investigación en la nutrición de aves comerciales, con mayor relevancia sobre la disponibilidad de nutrientes en el alimento más allá del P. El A-Fi posee 12 protones intercambiables, que poseen la capacidad de formar uniones de tipo di o tri valentes con cationes presentes en el medio (Cheryan y Rackis, 1980; Angel, Tamim y *col.*, 2002). En el caso del tracto digestivo, la formación de complejos entre el A-Fi y moléculas del medio afecta negativamente la disponibilidad de los mismos para ser absorbidos y posteriormente ser utilizados en el metabolismo (Selle y Ravindran, 2007). No obstante, existen condiciones que pueden modular las interacciones entre el A-Fi y los nutrientes, tal como la fuerza de unión y la relación molar entre los mismos (Maenz, Engele-Schaan y *col.*, 1999). Referente a la fuerza de unión, Maddaiah, Kurnick y *col.* (1964) reportaron que el Zn^{2+} posee más afinidad para ser quelado por el A-Fi seguido del Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{3+} y por último el Ca^{2+} ; no obstante, Vohra, Gray y *col.* (1965) detectaron una mayor capacidad por parte del Cu^{2+} . A pesar que el Ca tiene más baja afinidad que otros minerales, este catión ha sido altamente contemplado como un factor influyente en la

formación de los complejos, teniendo en cuenta las altas cantidades de Ca empleadas en las dietas de aves (Selle, Cowieson *y col.*, 2009).

El efecto anti-nutritivo anteriormente mencionado del A-Fi es remediado al quebrar su estructura en los componente bases que lo componen, mediante la ruptura de los enlaces covalentes entre los grupos fosfato y el anillo de inositol. Este proceso es efectuado en el organismo por enzimas conocidas como fosfatasas, entre las cuales se encuentran las fitasas (**Fi**), las cuales son específicas del A-Fi (Vats y Banerjee, 2004; Greiner y Konietzny, 2011), y son capaces de producir como productos finales ésteres bajos de inositol (**Ins-P**), mono-fosfatos, y/o inositol libre (Konietzny y Greiner, 2002). La cantidad de enzima puede afectar el efecto hidrolítico de la Fi (Cowieson, Wilcock *y col.*, 2011), como ha sido encontrado por Walk, Santos *y col.* (2014) con la adición de 1500 FTU/kg de Fi, que redujó en 33% la concentración de Ins-5P, Ins-4P, e Ins-3P respecto a dosis de 500 FTU/kg, siendo que dosis bajas de Fi pudieran incrementar o sostener la presencia de moléculas con capacidad quelante como los Ins-5, 4, y 3P (Persson, Türk *y col.*, 1998). Por lo tanto, la dosis estándar no obtienen los beneficios en la absorción de nutrientes presentes en la dieta base, como es el caso de dosis más altas conocidas como superdosis (Bedford y Walk, 2016). El uso de superdosis trae consigo tres ventajas: mejor relación entre las cantidades disponibles de P y Ca en el tracto digestivo, atenuación de la capacidad quelante del A-Fi e Ins-P (principalmente Ins-5, 4, y 3P), y mayor disponibilidad de inositol libre a partir de la dieta (Cowieson, Wilcock *y col.*, 2011).

La capacidad quelante del A-Fi puede no solo limita el uso de la proteína en el alimento (Kies, De Jonge *y col.*, 2006), sino también la actividad de moléculas con estructura proteíca como son las enzimas de tipo endógeno presentes en el tracto digestivo. Bye, Cowieson *y col.* (2013) estudiaron *in vitro* la solubilidad de la lisozima, tripsina, y quimotripsina al adicionar fitato de Na, encontrando que la actividad de las tres enzimas fue negativamente afectada al incrementar la concentración del fitato. En el caso específico de la pepsina, se ha reportado que el A-Fi tiene la capacidad de formar enlaces directos con el grupo amino en su estructura (Vaintraub y Bulmaga,

1991), o mediante la unión con Ca^{2+} , la cual es más común (Caldwell, 1992). Yu, Cowieson y col. (2012) observaron *in vitro* que la inhibición de la pepsina se detenía cuando se degradaba el A-Fi más allá del Ins-4P. De tal manera que el A-Fi o incluso los Ins-P pueden afectar negativamente la absorción de la proteína al limitar la solubilidad de aquella presente en el alimento o al bloquear las enzimas intrínsecas del tracto digestivo que efectúan a la digestión de la misma (Cowieson, Ravindran y col., 2008).

La presencia de complejos indigestibles en el tracto gastro-intestinal desencadena mecanismos internos que modifican la homeostasis en los mecanismos digestivos y por lo tanto llevan a un balance negativo en la absorción de nutrientes. Una de estas modificaciones está dada por la producción del ácido clorhídrico, la cual se incrementa como un intento para hacer el medio más hidrosoluble y obtener la digestión de los compuestos quelados. En pollo de engorda y gallina de postura se ha encontrado que la inclusión de una Fi microbiana alcaliniza el pH de la molleja (Morgan, Walk y col., 2014; Martínez Rojas, Ávila González y col., 2017), explicado en la formación de menos compuestos indigestibles. Dada la producción de ácido clorhídrico, más mucina es requerida para proteger la mucosa intestinal, llevando a una consecuente pérdida de aminoácidos (AA) endógenos (Cowieson, Acamovic y col., 2004). Además de la mucina, más bicarbonato de sodio es secretado a partir del páncreas, hígado, y estómago para llevar el pH a un rango más alcalino, alterando los niveles de Na interno y consecuentemente la vía dependiente de éste mineral para el transporte de nutrientes en el intestino (Selle, Cowieson y col., 2012). Liu, Ru y col. (2008) detectaron una mayor expresión de la proteína del transportador dependiente de Na en el intestino con la adición de una Fi exógena en la dieta, lo cual sugiere mejoras en la absorción de nutrientes más allá del P, tal y como fue reportado por Liu, Ru y col. (2008) con almidón y proteína.

Existen algunas características específicas del metabolismo de la lisina (**Lis**) que la hace distinguirse de los demás AA limitantes, como por ejemplo, que su destino principal en el cuerpo es la formación de proteína. Benevenga, Blemings (2007)

postularon que una de las razones por las cuales la Lis es usada directamente para la formación de proteína está basada en su única interacción con las enzimas catabólicas presentes dentro de la célula, independiente de la disponibilidad de Lis a partir de la dieta. Otras características de la Lis, es su aporte constante hacia los procesos oxidativos en el cuerpo y su capacidad de ser almacenada en los tejidos biológicos. Van Goudoever, Stoll *y col.* (2000) mostraron que en cerdos alimentados con dietas bajas en proteína durante cuatro días, como el tiempo iba pasando, el sistema de órganos compuesto por estómago, intestino, páncreas, y bazo cambió de una fuente de Lis corporal a un aporte combinado de reservas corporales y proveniente de la dieta, sin que la tasa de oxidación dejara de ser del 60% proveniente de la dieta.

Recientemente, los requerimientos de Lis en gallina de postura han sido evaluados (Novak, Yakout *y col.*, 2004; Santos, Geraldo *y col.*, 2014; De Carvalho, Stringhini *y col.*, 2015; Silva, Malheiros *y col.*, 2015), sin tomar en cuenta su impacto en la digestibilidad de otros nutrientes. Por otro lado, la información disponible sobre el efecto de la Fi en la digestibilidad de nutrientes más allá del P es limitada en gallina de postura (Snow, Douglas *y col.*, 2003; Hughes, Dahiya *y col.*, 2009), siendo nula la evaluación de superdosis con niveles variables en dieta de Lis digestible (**Lis-d**). En el presente estudio se hipotetizó que mediante el incremento en la dosis de una Fi exógena, la digestibilidad de AA limitantes y no limitantes se mejoraría, cubriendo en parte los requerimientos de Lis. Así mismo, se esperaba que la disponibilidad de Zn, Fe, Mg, Cu, Mn, Ca, Na, y K fuera mayor con la adición de la Fi, y más aún con la aplicación de la superdosis. Para ello, se evaluó el efecto de cuatro dosis de una Fi exógena (0, 300, 1200, y 4800 FTU/kg) en tres niveles de Lis-d (0.67, 0.77, y 0.87%) sobre la digestibilidad de AA limitantes (excepto Trp), no limitantes, Zn, Fe, Mg, Cu, Mn, Ca, Na, y K en gallinas Bovans White alimentadas con una dieta a base de maíz y pasta de soya baja en P disponible (**Pdis** – 0.12%) por 25 semanas. Adicionalmente, se evaluaron las implicaciones sobre la digestibilidad al incluir P inorgánico (0.25% de Pdis) en la dieta con 0.87% de Lis-d sin presencia de Fi.

III.3 Materiales y Métodos

Prueba de Digestibilidad. Las aves que fueron evaluadas en parámetros productivos, se alimentaron por dos semanas con las correspondientes dietas experimentales conteniendo dióxido de titanio (TiO_2) como marcador indigestible a una dosis de 5 g/kg. Al finalizar éste período, 12 aves por tratamiento fueron seleccionadas al azar y se les realizó la eutanasia con EUTAFIN® (pentobarbital sódico 390 mg, fenitoína sódica 50 mg y excipientes 1ml), el cual se suministró en la vena radial a una dosis de 1 mL/5 kg de peso vivo. La cavidad abdominal fue expuesta y el íleon fue diseccionado como la porción del intestino desde el diverticulum de Meckel hasta 2 cm antes de la valvula ileo-cecal, tras lo cual se obtuvo la mitad posterior. El contenido del íleon terminal fue lavado con 5 ml de agua deionizada, evitando causar presión en la mucosa intestinal, mezclándose el lavado obtenido de cuatro aves; la muestra fue congelada a $-18^{\circ}C$ y liofilizada durante 72 horas para su almacenaje y posterior análisis.

Análisis de Laboratorio. Los AA limitantes (con excepción del Trp) y no limitantes fueron cuantificados en las dietas y en las muestras de íleon. En resumen, 1 gramo de muestra fue oxidada usando una solución de peróxido de hidrógeno, ácido fórmico, y fenol; posteriormente, se hidrolizó con ácido clorhídrico a 6M por 24 horas a $110^{\circ}C$. Los AA fueron separados usando cromatografía de intercambio iónico con cuantificación post-columna a una lectura de 570 nm de ninhidrina (en el caso de Pro fue de 440 nm). El dióxido de titanio fue analizado de acuerdo al método descrito por Short, Gorton y *col.* (1996).

Para el análisis de los minerales, las muestras fueron incineradas a $500^{\circ}C$ durante 8 horas. En las cenizas se cuantificó el contenido de P, Ca, Zn, Cu, Co, Mn, Mg, Fe, K, y Na por espectrofotometría de absorción atómica, siguiendo los procedimientos descritos por el AOAC (2006). El coeficiente de digestibilidad ileal aparente (CDIA) fue calculado usando la siguiente fórmula para cada AA y mineral:

$$CDIA = [(nutriente/TiO_2) \text{ dieta} - (nutriente/ TiO_2) \text{ íleon}]/(nutriente/ TiO_2) \text{ dieta.}$$

Análisis Estadístico. Los tratamientos con 0.12% de contenido de Pdis fueron analizados como un diseño completamente al azar con arreglo factorial anidado al contenido de Pdis en la dieta, por lo tanto el nivel de Pdis se incluyó en el modelo como una fuente de variación. Las medias fueron separadas con la prueba de Tukey, incluyendo aquellas con interacción significativa de los niveles de Fi y Lis-d. El modelo estadístico que describe el análisis es el siguiente:

$$Y = \mu + \gamma_i + [\alpha_m + \beta_n + \alpha\beta_{mn}]_{j(i)k} + \varepsilon_{(ij)k}$$

En el cual, μ es la media general, γ es el i^{th} nivel del contenido de Pdis, α es el efecto del m^{th} nivel de Lis-d, β es el efecto de la n^{th} dosis de Fi, y ε es el error experimental.

Adicionalmente, los datos fueron analizados por medio de regresión lineal, tomando los niveles de Fi y Lis-d como variables cuantitativas, por medio de la opción de ajuste de modelo en el programa JMP® versión 12, el cual fue empleado para el análisis también del ANOVA con una significancia del 5% o menos.

III.4 Resultados

La interacción entre los niveles de Lis-d y la dosis de Fi fue significativa en el análisis ANOVA para la digestibilidad de AA limitantes y no limitantes ($P < 0.05$) (Cuadros 1 y 3). Además, la digestibilidad de Asp e His disminuyó con el incremento del contenido de Pdis a 0.25%, mientras que en el caso de la Tyr fue incrementada ($P < 0.05$) (Cuadros 1 y 3).

En el análisis de regresión de los datos de AA limitantes, se encontró que dependiendo del AA evaluado, el contenido de Lis-d afectó la respuesta a la adición de Fi ($P < 0.05$). En el nivel del 0.67% de Lis-d, al incrementar la dosis de la Fi, el comportamiento de los datos fue de tipo lineal en la mayoría de AA limitantes, a excepción de la Thr. En 0.77% de Lis-d, se presentó una tendencia lineal para Arg, His, Ile, Lys, y Val, y una tendencia cuadrática para Leu y Met, sin que la Cys y Phe presentaran algún tipo de ajuste. En el nivel más alto de Lis-d evaluado, es decir en 0.87%, menos significancia estadística fue encontrada, ya que solo Arg, Cys, Ile, y Val

fueron significativos para el modelo cuadrático. Por otro lado, la digestibilidad de la Thr fue significativa para el efecto principal de Fi y Lis-d ($P<0.05$), siendo de tipo positiva lineal hacia el incremento del contenido de Lis-d y de tipo cuadrático con las dosis de Fi (Cuadro 2).

En el caso de AA no limitantes, la respuesta a la inclusión gradual de la Fi fue de tipo lineal en el nivel de 0.67% de Lis-d para Ala, Asp, Glu, Gly, Ser, y Pro, siendo similar para el nivel de 0.77%, aunque el ajuste no fue significativo para la Pro. En 0.87% de Lis-d el efecto a la dosis de la Fi fue descrito por una función cuadrática para Asp, Glu, Gly, y Ser, pero no para Ala y Pro ($P<0.001$). La digestibilidad obtenida para la Tyr no se ajustó a ningún modelo lineal ($P>0.05$)(Cuadro 4).

La digestibilidad de P fue mayor con el incremento de la dosis de la Fi en los niveles de 0.67 y 0.77% de Lis-d, mientras que en 0.87% el efecto de Fi dependió de la dosis de la Fi evaluada ($P=0.062$). De esta manera, 4800 FTU/kg de Fi incrementó la digestibilidad del P en comparación con la no inclusión de la enzima y con la dosis de 300 FTU/kg en el nivel de 0.12% de Pdis, así también respecto a la dieta con 0.25% de Pdis. Adicionalmente en el efecto principal de la enzima, la dosis de 1200 FTU/kg mostró una mayor digestibilidad que 0 FTU/kg con 0.12% de Pdis ($P=<.0001$). La Fi influyó la digestibilidad de Mg dependiendo del nivel de Lis-d en la dieta: en todos los niveles se incrementó, aunque el efecto fue más acentuado en el nivel de 0.67% y fue disminuyendo en 0.77% y más en el nivel de 0.87% ($P<0.05$). De manera similar, el incremento en el contenido de Lis-d de 0.67% ó 0.77% a 0.87% redujo la respuesta positiva a la inclusión de la Fi en la digestibilidad de K y Na ($P<0.05$)(Cuadro 5), provocando en el Na una respuesta de tipo lineal y cuadrática, para los niveles de 0.67 y 0.77% de Lis-d, respectivamente (Cuadro 6). La inclusión de P inorgánico para alcanzar un nivel de 0.25% de Pdis en la dieta aumentó los coeficientes de digestibilidad en el Ca, Zn, Cu, Fe, K, y Na con referencia al grupo de aves alimentadas con 0.12% de P-dis; por otro lado, en el caso del Mg el coeficiente fue reducido ($P>0.05$)(Cuadro 5).

III.5 Discusión

Los niveles de AA limitantes en la dieta provocaron cambios fisiológicos dirigidos a preservar el rango biológico dentro del organismo, por medio de modificaciones que abarcan incluso el patrón del consumo de alimento (Gietzen, Hao y *col.*, 2007). Recientemente, los AA han sido considerados como moléculas de señalización intercelular con la capacidad de reprimir la tasa de transcripción general en una célula, lo que termina por disminuir la síntesis de proteína en general cuando hay alguna limitación en la disponibilidad de un AA (Kilberg, Pan y *col.*, 2005). Así mismo, bajos niveles de AA dentro del organismo puede inducir el arresto del ciclo celular en la etapa G₀, es decir en la etapa de cero actividad celular, como un mecanismo de protección (Sherr y Roberts, 1995). En el presente estudio, el nivel de 0.67% de Lis-d en la dieta no fue suficiente para cubrir los requerimientos del ave por éste AA y mantener un metabolismo normal, resultando en una reducción en el consumo y por lo tanto menor capacidad de obtenerlo a partir de la dieta. No obstante, las gallinas alimentadas con dicho nivel no mostraron un mayor detrimento en su desempeño, posiblemente porque la deficiencia del nivel de Lis en la dieta es menos impactante en el organismo, si es comparado con otros AA como la Leu (Said y Hegsted, 1970), y la capacidad de almacenarlo en el cuerpo.

El ajuste lineal negativo de los datos al incremento gradual de la dosis de la Fi en el nivel más bajo de Lis-d (0.67%) sugiere una reducción del efecto adverso del A-Fi al incrementar su hidrólisis, con un consecuente incremento en la disponibilidad de AA para ser absorbidos. Ravindran, Selle y *col.* (2001) encontraron en pollitos que adiciones graduales de una Fi en una dieta con 1.00% de Lis-d (la cual era deficiente) incrementaba de manera global la digestibilidad de los AA en una manera lineal, siendo que 500 FTU/kg de Fi mejoró la digestibilidad en 3.4%. A pesar que el diseño experimental del presente estudio fue planeado para demostrar sí con la inclusión de la Fi, la suplementación de Lis sintética podría ser menor, la presencia de la Fi en 0.67% de Lis-d no fue suficiente para obtener resultados equiparables al aporte hecho por 0.77%, el cual tampoco resultó ser similar al nivel de 0.87%. Estos resultados

podieron ser consecuencia no solo de la respuesta única hacia la liberación por la enzima en cada condición de la dieta con los diferentes niveles, tales como lo obtenido en la formación de complejos quelados binarios y terciarios (Adeola y Sands, 2003), sino también dado el resultado positivo general en la disponibilidad de muchos nutrientes, no solo la Lis. Es importante destacar que el consumo de alimento en el nivel de 0.67% de Lis-d presentó un leve incremento con la adición de la Fi, resultando en una alteración en la digestibilidad de los AA, tal y como ha sido mencionado por Selle, Cowieson y *col.* (2012).

Un efecto extra-fosfórico de la Fi es obtenido a través de mejoras en la digestibilidad de AA, tal y como ha sido reportado en pollo de engorda (Gehring, Bedford y *col.*, 2013; Amerah, Plumstead y *col.*, 2014); sin embargo, los estudios en gallina de postura son limitados y los resultados obtenidos de ellos son contradictorios. Jalal, Scheideler y *col.* (1999) observaron un incremento significativo en la digestibilidad de Met, Cys, Ala, y Glu con el uso de 250 y 300 FTU/kg en una dieta base de maíz y pasta de soya. Por el contrario, Agbede, Kluth y *col.* (2009) no encontraron ninguna evidencia de aumento en la digestibilidad de los AA usando 1500 FTU/kg de una Fi derivada de *P. Lycii* incluida en una dieta a base de harina de girasol y de colza con dos niveles de P no fítico (8.0 y 4.0 g/kg). Este mismo grupo de investigación, no observó ningún resultado positivo usando 5000 FTU/kg de la misma Fi y el mismo tipo de dieta evaluada, así esta fuera deficiente en Met (Agbede, Adebayo y *col.*, 2010). No obstante, en ninguno de los estudios se describe la metodología empleada para obtener la muestra intestinal, de tal manera que es posible incurrir en algunos errores al momento de hacer la evaluación de la digestibilidad y de detectar diferencia significativa, como sí fue posible en el presente estudio. En primera medida, la sección de intestino a muestrear influye en la determinación de la digestibilidad como consecuencia de la presencia de procesos digestivos y absorción. Rezvani, Kluth y *col.* (2008) recomendaron obtener la digesta de las secciones central y terminal del íleon entre el divertículo de Meckel y la unión ileo-cecal en la gallina de postura dado que en esta sección, casi todo el componente proteico de la dieta ha sido absorbido y la

actividad microbiana es baja. Así mismo, la manera de obtener la digesta puede enmascarar el efecto de la dieta, dada la contribución de los AA endógenos en la muestra; así, Adedokun, Adeola *y col.* (2011) advierten que el uso del lavado con agua deionizada es preferido sobre estrujar el tejido. Finalmente, el tipo de marcador indigestible puede llevar a variabilidad, ya que estudios con óxido de cromo no han mostrado resultados positivos, mientras que con el dióxido de titanio y la técnica de ceniza ácida insoluble para medir concentración de moléculas son catalogadas como más precisas (Selle, Cowieson *y col.*, 2012).

La respuesta a la Fi decreció cuando el nivel de Lis-d fue incrementado al adicionar cloruro de Lis. De manera similar, Selle, Ravindran *y col.* (2007) reportaron que dosis de 500 FTU/kg de Fi llevó a un mejor desempeño productivo en una dieta con 10.0 g/kg de Lis que con 11.8 g/kg, concluyéndose que existió una acción favorable sobre la digestibilidad de Arg, Lys, Phe, Asp, Glu, Gli, y Ser por la dosis de la Fi y el contenido de Lis menor, en pollos de engorda de 7-28 días de edad. En el mismo estudio un efecto principal de la Lis fue hallado sobre Iso, Met, Phe, Val, Asp, Glu, y Tyr, el cual fue adjudicado al estímulo de la Lis sobre los transportadores epiteliales en el intestino tal como el sistema $b^{0,+}$ que asimila AA básicos, α -AA dipolares, y Cys. He, Yang *y col.* (2013) encontraron que cerdos alimentados con una dieta a base de maíz, incrementaron la expresión de transportadores uniporte tipo CAT-1 presentes en las zonas de base, apical y baso lateral en intestino, con una dieta sin adición de Lis. Así mismo, la inclusión de éste AA aumentó la expresión de varios transportadores (básicos $b^{0,+}$ -AT, neutro, de ornitina, y⁺ catiónico dependiente de Na, y de tipo LAT-1). De tal manera que la activación de transportadores proteícos en membrana puede ser regulada por la disponibilidad de un solo AA, aún cuando éste no es un substrato para el transportador (Handlogten, Kilberg *y col.*, 1982), lo que termina por alterar la absorción y por tanto la presencia de otros AA en el organismo.

Además, la Lis posee un fuerte efecto sobre los requerimientos de otros AA limitantes en la síntesis de proteína, al ser el AA de referencia en el concepto de

proteína ideal (Boisen, Hvelplund y col., 2000). Consecuentemente, los cambios producidos en las cantidades absorbidas de Lis en el tracto digestivo tiene efecto sobre las cantidades requeridas por otros AA dentro del organismo, mediante el cambio en la relación molar con la Lis, y de esta manera tener un impacto en el proceso de absorción de todos los AA. Por lo tanto, dicho rol fisiológico de la Lis, es la razón para establecer en primer medida su nivel óptimo en la dieta y a partir de allí, definir las cantidades relativas de los demás AA limitantes (Lemme, Ravindran y col., 2004). Además, un efecto de Fi y Lis-d sobre los AA no limitantes fue observado en el presente estudio producto de la estrecha relación entre los AA limitantes y no limitantes en la síntesis de proteína (Heger, 2003).

Las dietas experimentales no cambiaron la digestibilidad de la Met a pesar de ser el primer AA limitante en aves, incluso cuando la dosis de la Fi fue modificada. En cuanto a los AA no limitantes, la Pro presentó menor significancia de efecto y junto con la Met fueron los únicos AA sin ajuste a un modelo lineal. Esto es similar a los resultados reportados por Hughes, Dahiya y col. (2009) cuando una Fi exógena fue evaluada en dosis de 0, 200, 400, y 600 FTU/kg. Contrariamente, la Arg fue el AA limitante con mayor respuesta, probablemente debido al efecto adverso que presenta la Arg con un mayor contenido de Lys en la dieta (D'Mello, 2003).

Hughes, Dahiya y col. (2009) encontraron que con dosis incrementales de una 6-Fi proveniente de *E.coli* (0, 200, 400, y 600 FTU/kg), la digestibilidad de AA se reducía en dietas con 0.25% de Pdis, mientras que aquellas con 0.15% ningún efecto fue observado para la enzima en gallinas de las líneas Shaver White y Bovans con 42 semanas de edad. En el mismo estudio se concluyó que un nivel de P por arriba de los requerimientos de la gallina, reducía la digestibilidad de la proteína y AA, tomando en consideración que la retención de proteína en heces en niveles de 0.25% de Pdis fue mayor que con 0.35%, y que éste último nivel tuvo menor retención que con el uso de 0.15% de Pdis. La presencia de P en el tracto digestivo es uno de los factores más influyentes en la hidrólisis del A-Fi, ya que impacta negativamente la producción de

enzimas endógenas complementarias a la acción de una Fi exógena sobre la liberación del P dietario (Shastak, Zeller *y col.*, 2014). Por lo tanto, en el presente estudio fue posible que dado el menor contenido de P inorgánico en la dieta (0.12%), se diera un efecto más significativo de la Fi sobre la digestibilidad de AA, parecido a lo reportado por Van der Klis, Versteegh *y col.* (1997) al evaluar dosis de 0, 250, y 500 FTU/kg en 0.77% de Lis-d. No obstante, a pesar de que otros estudios han dado al Ca mayor capacidad de impactar la acción de la Fi sobre la digestibilidad general de los AA (Li, Angel *y col.*, 2015), en este estudio éste efecto fue no significativo tomándo en cuenta que el contenido dietario del Ca fue el mismo para todos los tratamientos y cubria los requerimientos del mismo.

Siendo que la dosis de la Fi y la hidrólisis del A-Fi están relacionados directamente, las superdosis como 1200 y 4800 FTU/kg pudieron mitigar en mayor medida el efecto antinutritivo del A-Fi a través de generar más Ins-P con menos capacidad quelante (Shirley y Edwards, 2003;Walk, Santos *y col.*, 2014), y por lo tanto generar más nutrientes libres. Por ello, puede ser considerado que en altos niveles de Lis-d, la disponibilidad de AA a partir de 4800 FTU/kg estuvo por encima de la cantidad necesaria para el organismo, llevando en un mal balance de nutrientes y a una respuesta negativa, especialmente en la digestibilidad de Arg, Cys, Ile, y Val. Gehring, Bedford *y col.* (2013) encontraron un efecto positivo lineal sobre la digestibilidad de AA evaluando 0, 500, 1000, y 2000 FTU/kg en pollo de engorda de 32 días de edad; no obstante, en el mismo reporte los datos no se ajustaron a ningún modelo de regresión, incluyendo el cuadrático con evaluación de 0, 1000, 2000, 4000, 8000, y hasta 16000 FTU/kg.

Liu, Liu *y col.* (2007) encontraron que la absorción de AA incrementó en un 2% con la adición de 300 FTU/g de tres Fi diferentes: dos provenientes de *E.coli* y una de *A. niger*, al ser comparadas con una dieta de 0.15% de P no fítico y 3.18% de Ca total, en gallina Hy-Line Brown de 28 semanas de edad. En el mismo estudio, la digestibilidad mejoró con el incremento del P no fítico en la dieta a 0.28% y del Ca a 3.30%. El

porcentaje de aumento en la digestibilidad de los AA visto en el estudio de Liu, fue cercano al obtenido por 1200 FTU/kg en el presente estudio, ya que 300, 1200 y 4800 FTU/kg modificaron la digestibilidad en -0.11%, 2.46%, y 3.24%, respectivamente. El resultado global recopilado para la dosis de 300 FTU/kg fue una consecuencia del marcado efecto negativo sobre ésta dosis del nivel de 0.67% de Lis-d, sugiriendo una continuidad del efecto antinutricional del A-Fi con dosis estándar de la Fi, probablemente debido a la presencia de Ins-P con capacidad quelante (Bedford y Walk, 2016).

En la presente fase del estudio fue evidente un aumento en la liberación de P por parte de la Fi, dada la mayor absorción del mismo en el intestino, por lo que el nivel de P interno probablemente incrementó, tal y como lo encontrado en plasma sanguíneo por Silva, Araujo y *col.* (2008) con 300, 600, y 1200 FTU/kg de Fi. Estudios previos en gallina de postura han reportado que el empleo de 250 y 500 FTU/kg de una 3-Fi lleva a un 50 y 66% en la hidrólisis del A-Fi (Van der Klis, Versteegh y *col.*, 1997), así como a un incremento de 39.0%, 44.6%, y 51.3% en la digestibilidad de P en íleon probando dosis de 150, 300, y 450 FTU/kg, respectivamente (Francesch, Broz y *col.*, 2005). Los resultados del presente estudio sugieren que el P liberado por la superdosis es aún requerido y usado por el organismo de la gallina, no solo destinándolo a la producción de huevo sino también a la mejora del estatus óseo, contrastando con el insuficiente aporte de la dosis estándar. Por otro lado, Liu, Liu y *col.* (2007) encontraron una mayor digestibilidad del P con un contenido de 0.28% Pdis (58.63%) que con 300 FTU/kg de una Fi (41.67%) en gallinas Hy-line Brown alimentadas con 0.58% de Lis-d. En contraste a éstos resultados, en el presente estudio la suplementación de P inorgánico llevó a un menor coeficiente de digestibilidad en el P (56%) que con el uso de dosis de 300 FTU/kg (58%) o con las superdosis (66 y 74%), aún con la disminución del efecto de la enzima en el nivel de 0.87% de Lis-d.

Van der Klis, Versteegh y *col.* (1997) detectaron una reducción del 12% en la degradación del P fítico cuando el contenido de Ca en la dieta fue aumentado de 30 a

40 g/kg probando 250 FTU/kg en gallinas White Leghorn. Hallazgos similares han sido obtenidos en estudios en pollo de engorda (Adeola y Walk, 2013; Li, Angel y col., 2015), resaltando la estrecha relación que existe entre el Ca y el P, en la hidrólisis del A-Fi, siendo similar a aquella presente en los procesos metabólicos. En este estudio la digestibilidad de Ca no fue afectada por la adición de la Fi, a pesar que se esperaba una mayor absorción de Ca como un intento en mantener el balance interno, resultado del aumento en la biodisponibilidad y absorción del P por la acción de la Fi. No obstante, la retención de Ca fue menor cuando se adicionó 1200 FTU/kg en la dieta con 0.67% de Lis-d y con 300 FTU/kg en 0.87% de Lis-d, llevando a una reducción en el promedio y consecuentemente a un efecto no estadísticamente significativo para éstas dosis. Agbede, Kluth y col. (2009) concluyeron que el aumento en la digestibilidad de AA observada con una 6-Fi de *P. Lycii*, era reducida de 1.9% a 0.6%, cuando se disminuía el contenido de Ca total de 4.49% a 3.85%, en gallinas Lohman Brown caeectomizadas. Estos resultados resaltan la complejidad de las interacciones entre los nutrientes dentro del proceso digestivo, parte de los cuales el Ca cumple un alto impacto en la respuesta hacia la adición de Fi exógenas. No obstante, en el caso que se presentara un exceso de Ca como consecuencia de la limitación en el aporte de P dietario, éste sería excretado (Bar, 2009) y no conservado, para mantener la relación de P y Ca en los procesos biológicos presentes en la formación de huevo (Barkley, Miller y col., 2004). Por lo tanto, no es posible considerar la falta en el aporte de Ca como una causa del efecto negativo observado en la dosis de 4800 FTU/kg.

Tomando en consideración la capacidad del A-Fi para quelar cationes como Zn, Cu, Co, Mn, Mg, y Fe (Angel, Tamim y col., 2002), se esperaba que la Fi pudiera impactar la absorción en el tracto digestivo de éstos minerales como ha sido previamente reportado en pollo de engorda (Brenes, Viveros y col., 2003). No obstante, solo se encontró un efecto de Fi sobre la digestibilidad de Mg, pero ningún posible aporte extra de los minerales por parte del A-Fi fue usado, probablemente porque el contenido de minerales por la premezcla pudo haber cubierto las necesidades de las aves. En cuanto a la significancia en la interacción por los niveles de Fi y Lis-d para el

Mg, pudo ser una consecuencia del efecto de la Lis en el metabolismo general como se mencionó anteriormente para los AA, ya que no es posible una influencia directa en el transporte epitelial en el intestino como se preseta en el caso de complejo para Zn-bis-Gly, dado las propiedades de AA básico de la Lys (Ashmead, 2012). Por otro lado, el efecto significativo principal de la Fi solo sobre el Mg no era esperado, teniendo en cuanto que se ha demostrado una mayor fuerza de unión del A-Fi hacia otros minerales como el Zn y el Cu (Maddaiah, Kurnick *y col.*, 1964).

Uno de los nutrientes mayormente impactado por la mitigación del efecto anti-nutritivo del A-Fi es el Na (Truong, Yu *y col.*, 2014), puesto que la presencia del A-Fi incrementa la producción de moco intestinal, como un mecanismo de compensación hacia aconglomerados de moléculas indigestibles, resultando en una mayor pérdida de los componentes endógenos como es el Na (Selle, Cowieson *y col.*, 2012). Por esta razón, cuando la Fi exógena fue incluida en la dieta, se obtuvo un resultado directo en la homeostasis de Na, mejorando la digestibilidad, aunque fue dependiente de la dosis empleada. Dosis de 1200 y 4800 FTU/kg incrementaron el coeficiente de digestibilidad en un 13.4% y 3.5%, respectivamente y con 300 FTU/kg éste fue reducido en un 22.7%. Cowieson, Acamovic *y col.* (2004) observaron que con dosis de 1000 FTU/kg se evitaba el efecto negativo del A-Fi sobre la excreción de Na en pollo de engorda, aunque no se obtuvo ningún cambio en cuanto al Zn, Fe, Mg, Mn, y Cu. Además, teniendo en cuenta el efecto de los niveles de Lis-d y de Fi sobre el balance de Na y K, y de estos mismo sobre la bomba Na/K, pudo haber existido una alteración en la absorción global de los AA y nutrientes diferentes al P, con la evaluación de dichos factores (Liu, Ru *y col.*, 2008).

III.6 Conclusión

Existe evidencia que la Fi tiene un efecto extra-fosfórico al influir en la disponibilidad de AA limitantes y no limitantes a partir de la dieta, lo cual es dependiente de la dosis de la enzima que se emplee, puesto que es mayor con dosis altas. No obstante, la superdosis de la Fi también llevo a una mayor disponibilidad de P en comparación con

la dosis estándar, y por lo tanto la superdosis también mejora el efecto fosfórico de la enzima. El nivel de Lis-d influyó la respuesta en la digestibilidad de AA y minerales de la Fi, posiblemente mediante la alteración en los requerimientos por dichos nutrientes, pero no debido a la liberación específica de Lis por la enzima.

III.7 Referencias

- Adedokun, S., O. Adeola, C. Parsons, M. Lilburn, and T. Applegate. 2011. Factors affecting endogenous amino acid flow in chickens and the need for consistency in methodology. *Poult. Sci.* 90:1737-1748.
- Adeola, O., and J. Sands. 2003. Does supplemental dietary microbial phytase improve amino acid utilization? A perspective that it does not. *J. Anim. Sci.* 81:78-85.
- Adeola, O., and C. Walk. 2013. Linking ileal digestible phosphorus and bone mineralization in broiler chickens fed diets supplemented with phytase and highly soluble calcium. *Poult. Sci.* 92:2109-2117.
- Agbede, J., I. Adebayo, I. Osho, and O. Bankole. 2010. Influence of microbial phytase on amino acid digestibility of caecectomised laying hens fed marginally low methionine-based diet. *Adv. Anim. Bio.* 1:453-454.
- Agbede, J., H. Kluth, and M. Rodehutschord. 2009. Amino acid digestibility and energy metabolisability as affected by dietary calcium and supplemented phytase in caecectomised laying hens. *Archi Für Geflügelkunde* 73:73-79.
- Amerah, A. M., P. W. Plumstead, L. P. Barnard, and A. Kumar. 2014. Effect of calcium level and phytase addition on ileal phytate degradation and amino acid digestibility of broilers fed corn-based diets. *Poult. Sci.* 93:906-915.
- Angel, R., N. M. Tamim, T. J. Applegate, A. S. Dhandu, and L. E. Ellestad. 2002. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. *J. Appli. Poult. Res.* 11:471-480.
- AOAC. 2006. *Official Methods of Analysis*. ed. Assoc., Washington, DC.
- Ashmead, H. D. 2012. *Amino acid chelation in human and animal nutrition*. CRC Press.
- Bar, A. 2009. Calcium transport in strongly calcifying laying birds: mechanisms and regulation. *Comp. Bioch. Phy. Part A: Mol. Int. Phy.* 152:447-469.
- Barkley, G., H. Miller, and J. Forbes. 2004. The ability of laying hens to regulate phosphorus intake when offered two feeds containing different levels of phosphorus. *Br. J. Nutr.* 92:233-240.
- Bedford, M., and C. Walk. 2016. Reduction of phytate to tetrakisphosphate (IP₄) to triphosphate (IP₃), or perhaps even lower, does not remove its antinutritive properties. Pages 45-49 in *Phytate destruction consequences for precision animal nutrition*. C. Walk, I. Kuhn, S. HN, M. Kidd, and R. M eds. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.
- Benevenga, N. J., and K. P. Blemings. 2007. Unique aspects of lysine nutrition and metabolism. *J. Nutr.* 137:1610S-1615S.
- Boisen, S., T. Hvelplund, and M. R. Weisbjerg. 2000. Ideal amino acid profiles as a basis for feed protein evaluation. *Livestock. Pro. Sci.* 64:239-251.

Brenes, A. n., A. n. Viveros, I. Arija, C. Centeno, M. Pizarro, and C. Bravo. 2003. The effect of citric acid and microbial phytase on mineral utilization in broiler chicks. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 110:201-219.

Bye, J. W., N. P. Cowieson, A. J. Cowieson, P. H. Selle, and R. J. Falconer. 2013. Dual effects of sodium phytate on the structural stability and solubility of proteins. *J. Agri. Food. Chem.* 61:290-295.

Caldwell, R. A. 1992. Effect of calcium and phytic acid on the activation of trypsinogen and the stability of trypsin. *J. Agri. Food. Chem.* 40:43-46.

Cheryan, M., and J. J. Rackis. 1980. Phytic acid interactions in food systems. *Cri. Rev. Food. Sci. Nutr.* 13:297-335.

Cowieson, A., T. Acamovic, and M. Bedford. 2004. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 45:101-108.

Cowieson, A., V. Ravindran, and P. Selle. 2008. Influence of dietary phytic acid and source of microbial phytase on ileal endogenous amino acid flows in broiler chickens. *Poult. Sci.* 87:2287-2299.

Cowieson, A., P. Wilcock, and M. Bedford. 2011. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World. Poult. Sci. J.* 67:225-236.

D'Mello, J. F. 2003. Averse Effects of Amino Acids. Pages 132-134 in *Amino acids in animal nutrition* CABI publishing.

De Carvalho, F., J. Stringhini, M. Matos, M. Café, N. Leandro, N. Gomes, E. Santana, and R. Jardim Filho. 2015. Egg quality of hens fed different digestible lysine and arginine levels. *Rev. Bra. Ciên. Avíc.* 17:63-68.

Francesch, M., J. Broz, and J. Brufau. 2005. 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.* 46:340-348.

Gehring, C., M. Bedford, and W. Dozier. 2013. Extra-phosphoric effects of phytase with and without xylanase in corn-soybean meal-based diets fed to broilers. *Poult. Sci.* 92:979-991.

Gietzen, D. W., S. Hao, and T. G. Anthony. 2007. Mechanisms of food intake repression in indispensable amino acid deficiency. *Annu. Rev. Nutr.* 27:63-78.

Greiner, R., and U. Konietzny. 2011. Phytases: Biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. Bedford, MR, and Partridge, GG, eds. CAB Intl., Oxfordshire, UK:96-128.

Handlogten, M., M. Kilberg, and H. Christensen. 1982. Incomplete correspondence between repressive and substrate action by amino acids on transport systems A and N in monolayered rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 257:345-348.

He, L., H. Yang, Y. Hou, T. Li, J. Fang, X. Zhou, Y. Yin, L. Wu, M. Nyachoti, and G. Wu. 2013. Effects of dietary L-lysine intake on the intestinal mucosa and expression of CAT genes in weaned piglets. *Amino. Acids.* 45:383-391.

Heger, J. 2003. Essential to non-essential amino acid ratios in *Amino acids in animal nutrition*. J. F. D'Mello ed. CABI publishing.

- Hughes, A., J. Dahiya, C. Wyatt, and H. Classen. 2009. Effect of Quantum phytase on nutrient digestibility and bone ash in White Leghorn laying hens fed corn-soybean meal-based diets. *Poult. Sci.* 88:1191-1198.
- Jalal, M. A., S. E. Scheideler, and C. Wyatt. 1999. Effect of phytase supplementation on egg production parameters and amino acid digestibility. *Poult. Sci.* 45:123-125.
- Kies, A. K., L. H. De Jonge, P. A. Kemme, and A. W. Jongbloed. 2006. Interaction between protein, phytate, and microbial phytase. In vitro studies. *J. Agri. Food. Chem.* 54:1753-1758.
- Kilberg, M., Y.-X. Pan, H. Chen, and V. Leung-Pineda. 2005. Nutritional control of gene expression: how mammalian cells respond to amino acid limitation. *Annu. Rev. Nutr.* 25:59-85.
- Konietzny, U., and R. Greiner. 2002. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food. Sci. Tech.* 37:791-812.
- Lemme, A., V. Ravindran, and W. Bryden. 2004. Ileal digestibility of amino acids in feed ingredients for broilers. *World. Poult. Sci. J.* 60:423-438.
- Li, W., R. Angel, S.-W. Kim, E. Jiménez-Moreno, M. Proszkowiec-Weglarz, and P. Plumstead. 2015. Age and adaptation to Ca and P deficiencies: 2. Impacts on amino acid digestibility and phytase efficacy in broilers. *Poult. Sci.* 94:273-279.
- Liu, N., G. Liu, F. Li, J. Sands, S. Zhang, A. Zheng, and Y. Ru. 2007. Efficacy of phytases on egg production and nutrient digestibility in layers fed reduced phosphorus diets. *Poult. Sci.* 86:2337-2342.
- Liu, N., Y. Ru, F. Li, and A. Cowieson. 2008. Effect of diet containing phytate and phytase on the activity and messenger ribonucleic acid expression of carbohydrase and transporter in chickens. *J. Anim. Sci.* 86:3432-3439.
- Liu, S., D. Cadogan, A. Péron, H. Truong, and P. Selle. 2014. Effects of phytase supplementation on growth performance, nutrient utilization and digestive dynamics of starch and protein in broiler chickens offered maize-, sorghum- and wheat-based diets. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 197:164-175.
- Maddaiah, V. T., A. A. Kurnick, and B. L. Reid. 1964. Phytic Acid Studies. *Exp. Biol. Med.* 115:391-393.
- Maenz, D. D., C. M. Engele-Schaan, R. W. Newkirk, and H. L. Classen. 1999. The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 81:177-192.
- Martinez Rojas, I., E. Ávila González, J. Arce Menocal, T. Dos Santos, J. Rubio Arguello, and C. López Coello. 2017. Assessment of a phytase included with lactic acid on productive parameters and on deposition of phosphorus, calcium, and zinc in laying hens fed with sorghum–soybean-meal-based diets. *J. Appli. Anim. Res.*:1-8.
- Morgan, N., C. Walk, M. Bedford, and E. Burton. 2014. In vitro versus in situ evaluation of the effect of phytase supplementation on calcium and phosphorus solubility in soya bean and rapeseed meal broiler diets. *Br. Poult. Sci.* 55:238-245.
- Novak, C., H. Yakout, and S. Scheideler. 2004. The combined effects of dietary lysine and total sulfur amino acid level on egg production parameters and egg components in Dekalb Delta laying hens. *Poult. Sci.* 83:977-984.

- Persson, H., M. Türk, M. Nyman, and A.-S. Sandberg. 1998. Binding of Cu²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ to inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates. *J. Agri. Food. Chem.* 46:3194-3200.
- Ravindran, V., P. Selle, G. Ravindran, P. Morel, A. Kies, and W. Bryden. 2001. Microbial phytase improves performance, apparent metabolizable energy, and ileal amino acid digestibility of broilers fed a lysine-deficient diet. *Poult. Sci.* 80:338-344.
- Rezvani, M., H. Kluth, C. Elwert, and M. Rodehutschord. 2008. Effect of ileum segment and protein sources on net disappearance of crude protein and amino acids in laying hens. *Br. Poult. Sci.* 49:28-36.
- Said, A., and D. Hegsted. 1970. Response of adult rats to low dietary levels of essential amino acids. *J. Nutr.* 100:1363-1375.
- Santos, T. A. d., A. Geraldo, L. C. Machado, K. Pelícia, S. D. Simão, and J. A. Vieira Filho. 2014. Digestible lysine levels for laying hens and their effects on egg quality. *Acta. Sci. Anim.* 36:41-47.
- Selle, P. H., A. J. Cowieson, N. P. Cowieson, and V. Ravindran. 2012. Protein-phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. *Nutr. Res. Rev.* 25:1-17.
- Selle, P. H., A. J. Cowieson, and V. Ravindran. 2009. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. *Livestock. Sci.* 124:126-141.
- Selle, P. H., and V. Ravindran. 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 135:1-41.
- Selle, P. H., V. Ravindran, G. Ravindran, and W. L. Bryden. 2007. Effects of dietary lysine and microbial phytase on growth performance and nutrient utilisation of broiler chickens. *Asian. Australasian. J. Anim. Sci.* 20:1100-1113.
- Shastak, Y., E. Zeller, M. Witzig, M. Schollenberger, and M. Rodehutschord. 2014. Effects of the composition of the basal diet on the evaluation of mineral phosphorus sources and interactions with phytate hydrolysis in broilers. *Poult. Sci.* 93:2548-2559.
- Sherr, C. J., and J. M. Roberts. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Gen. Dev.* 9:1149-1163.
- Shirley, R. B., and H. M. Edwards. 2003. Graded levels of phytase past industry standards improves broiler performance. *Poult. Sci.* 82:671-680.
- Short, F., P. Gorton, J. Wiseman, and K. Boorman. 1996. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 59:215-221.
- Silva, E., E. Malheiros, N. Sakomura, K. Venturini, L. Hauschild, J. Dorigam, and J. Fernandes. 2015. Lysine requirements of laying hens. *Livestock. Sci.* 173:69-77.
- Silva, J. H. V. d., J. A. d. Araujo, C. d. C. Goulart, F. G. P. Costa, N. K. Sakomura, and D. A. Furtado. 2008. Influência da interação fósforo disponível × fitase da dieta sobre o desempenho, os níveis plasmáticos de fósforo e os parâmetros ósseos de poedeiras comerciais. *Rev. Bras. Zoot.* 37:2157-2165.
- Snow, J., M. Douglas, and C. Parsons. 2003. Phytase effects on amino acid digestibility in molted laying hens. *Poult. Sci.* 82:474-477.
- Truong, H. H., S. Yu, A. Peron, D. J. Cadogan, A. Khoddami, T. H. Roberts, S. Y. Liu, and P. H. Selle. 2014. Phytase supplementation of maize-, sorghum- and wheat-based broiler

diets with identified starch pasting properties influences phytate (IP 6) and sodium jejunal and ileal digestibility. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 198:248-256.

Vaintraub, I. A., and V. P. Bulmaga. 1991. Effect of phytate on the in vitro activity of digestive proteinases. *J. Agri. Food. Chem.* 39:859-861.

Van der Klis, J., H. Versteegh, P. Simons, and A. Kies. 1997. The efficacy of phytase in corn-soybean meal-based diets for laying hens. *Poult. Sci.* 76:1535-1542.

Van Goudoever, J. B., B. Stoll, J. F. Henry, D. G. Burrin, and P. J. Reeds. 2000. Adaptive regulation of intestinal lysine metabolism. *Proc. Nat. Aca. Sci.* 97:11620-11625.

Vats, P., and U. C. Banerjee. 2004. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enz. Micro. Tech.* 35:3-14.

Vohra, P., G. A. Gray, and F. H. Kratzer. 1965. Phytic acid-metal complexes. *Exp. Biol. Med.* 120:447-449.

Walk, C. L., T. T. Santos, and M. R. Bedford. 2014. Influence of superdoses of a novel microbial phytase on growth performance, tibia ash, and gizzard phytate and inositol in young broilers. *Poult. Sci.* 93:1172-1177.

Yu, S., A. Cowieson, C. Gilbert, P. Plumstead, and S. Dalsgaard. 2012. Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters (IP) including IP isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin. *J. Anim. Sci.* 90:1824-1832.

Cuadro 1. Efecto de la adición de cuatro dosis de una fitasa y tres niveles de lisina digestible sobre los coeficientes de digestibilidad aparente de aminoácidos limitantes en íleon de gallinas Bovans White de 67 semanas de edad

P-Dis (%)	Fitasa (FTU/kg)	Lisina dig. (%)	Arg	Cys	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Val
	0	0.67	0.880 ^d	0.688 ^{ab}	0.857 ^{ab}	0.834 ^{abc}	0.858 ^{ab}	0.836 ^b	0.896 ^{ab}	0.861 ^{abc}	0.750 ^{ab}	0.807 ^{ab}
	300		0.837 ^e	0.643 ^b	0.795 ^c	0.778 ^c	0.827 ^b	0.768 ^c	0.875 ^b	0.823 ^c	0.667 ^b	0.758 ^b
	1200		0.902 ^{abcd}	0.729 ^{ab}	0.863 ^{ab}	0.855 ^{ab}	0.880 ^a	0.862 ^{ab}	0.910 ^{ab}	0.871 ^{abc}	0.769 ^a	0.830 ^{ab}
	4800		0.923 ^a	0.786 ^a	0.900 ^a	0.891 ^a	0.908 ^a	0.898 ^a	0.935 ^a	0.907 ^a	0.816 ^a	0.871 ^a
0.12	0	0.77	0.904 ^{abcd}	0.729 ^{ab}	0.870 ^{ab}	0.853 ^{ab}	0.876 ^{ab}	0.888 ^{ab}	0.908 ^{ab}	0.875 ^{abc}	0.773 ^a	0.828 ^{ab}
	300		0.908 ^{abc}	0.767 ^a	0.870 ^{ab}	0.858 ^{ab}	0.875 ^{ab}	0.871 ^{ab}	0.918 ^{ab}	0.880 ^{abc}	0.791 ^a	0.838 ^a
	1200		0.917 ^{abc}	0.780 ^a	0.883 ^{ab}	0.875 ^{ab}	0.904 ^a	0.893 ^{ab}	0.932 ^a	0.894 ^{ab}	0.797 ^a	0.857 ^a
	4800		0.922 ^a	0.763 ^a	0.890 ^{ab}	0.883 ^{ab}	0.901 ^a	0.906 ^a	0.930 ^a	0.879 ^{abc}	0.803 ^a	0.878 ^{ab}
0.25	0	0.87	0.892 ^{cd}	0.711 ^{ab}	0.873 ^{ab}	0.832 ^{abc}	0.861 ^{ab}	0.883 ^{ab}	0.912 ^{ab}	0.830 ^{bc}	0.744 ^{ab}	0.811 ^{ab}
	300		0.918 ^{ab}	0.760 ^a	0.894 ^{ab}	0.869 ^{ab}	0.886 ^a	0.897 ^{ab}	0.924 ^{ab}	0.865 ^{abc}	0.785 ^a	0.850 ^a
	1200		0.914 ^{abc}	0.771 ^a	0.870 ^{ab}	0.863 ^{ab}	0.886 ^a	0.895 ^{ab}	0.917 ^{ab}	0.874 ^{abc}	0.780 ^a	0.849 ^a
	4800		0.896 ^{bcd}	0.721 ^{ab}	0.842 ^{bc}	0.827 ^{bc}	0.859 ^{ab}	0.870 ^{ab}	0.898 ^{ab}	0.858 ^{abc}	0.754 ^a	0.807 ^{ab}
		SEM	0.005	0.012	0.006	0.007	0.006	0.007	0.006	0.008	0.010	0.009
Promedio de Efectos Principales												
0.12	0		0.892 ^{bc}	0.709 ^b	0.867 ^{ab}	0.840 ^{ab}	0.865 ^b	0.869 ^{ab}	0.905	0.855 ^b	0.756 ^{ab}	0.816 ^b
	300		0.887 ^c	0.723 ^{ab}	0.853 ^b	0.835 ^b	0.863 ^b	0.845 ^b	0.906	0.856 ^b	0.747 ^b	0.815 ^b
	1200		0.911 ^{ab}	0.760 ^a	0.872 ^a	0.864 ^a	0.890 ^a	0.883 ^a	0.920	0.880 ^a	0.782 ^{ab}	0.845 ^{ab}
	4800		0.913 ^a	0.756 ^{ab}	0.877 ^a	0.867 ^a	0.889 ^a	0.891 ^a	0.921	0.884 ^a	0.791 ^a	0.852 ^a
0.25	0		0.893 ^{abc}	0.748 ^{ab}	0.846 ^b	0.830 ^{ab}	0.870 ^{ab}	0.872 ^a	0.912	0.862 ^{ab}	0.751 ^{ab}	0.824 ^{ab}

0.12	0.67	0.885 ^b	0.711 ^b	0.854 ^b	0.839 ^b	0.868 ^b	0.841 ^b	0.904 ^b	0.865 ^{ab}	0.750 ^b	0.816 ^b
	0.77	0.912 ^a	0.760 ^a	0.878 ^a	0.867 ^a	0.889 ^a	0.889 ^a	0.922 ^a	0.882 ^a	0.791 ^a	0.850 ^a
0.25	0.87	0.905 ^a	0.741 ^{ab}	0.870 ^{ab}	0.848 ^{ab}	0.873 ^{ab}	0.886 ^a	0.913 ^{ab}	0.856 ^b	0.765 ^{ab}	0.829 ^{ab}
		0.893 ^{ab}	0.748 ^{ab}	0.846 ^b	0.830 ^{ab}	0.870 ^{ab}	0.872 ^{ab}	0.912 ^{ab}	0.862 ^{ab}	0.751 ^{ab}	0.824 ^{ab}
0.12		0.901	0.737	0.867 ^b	0.851	0.877	0.872	0.913	0.868	0.769	0.832 ^b
0.25		0.893	0.748	0.846 ^a	0.830	0.870	0.872	0.912	0.862	0.751	0.824 ^a
Valores-P (Significancia del Efecto)											
Fitasa		0.001	0.011*	0.048*	0.004**	0.002**	<.001	0.088	0.019*	0.009**	0.004**
Lisina		0.001	0.008**	0.008**	0.010*	0.017*	<.001	0.037*	0.026*	0.007**	0.009**
Lisina*fitasa		<.001	0.006**	<.001	<.001	0.001	<.001	0.008*	0.018*	<.001	0.001
P-Dis		0.353	0.620	0.063*	0.112	0.513	0.974	0.936	0.666	0.323	0.582

Significancia estadística * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. ^{a-b} Muestran diferencia significativa entre las medias.

Cuadro 2. Coeficientes del análisis de regresión en la digestibilidad aparente de aminoácidos limitantes

Variable	Lis	Fi	Fi C	Lis * Fi
Arg	0.0002	0.0001	0.0310	0.0014
0.67	L	= 0.8654677 + 1.256e-5*Fi		
0.77	L	= 0.9071855 + 3.2552e-6* Fi		
0.87	C	= 0.897319 + 2.3559e-5* Fi - 4.9966e-9* Fi ^2		
Cys	0.0003	<.0001	0.0191	0.0011
0.67	L	= 0.6725 + 2.4444e-5* Fi		
0.87	C	= 0.7338209 + 4.7042e-5* Fi - 1.0387e-8* Fi ^2		
His	0.0011	0.0002	0.2820	0.0002
0.67	L	= 0.830371 + 1.4685e-5* Fi		
0.77	L	= 0.8716935 + 4.0438e-6* Fi		
Ile	0.0086	<.0001	0.0354	0.0007
0.67	L	= 0.8125726 + 1.6859e-5* Fi		
0.77	L	= 0.8583952 + 5.6618e-6* Fi		
0.87	C	= 0.8382141 + 3.5778e-5* Fi - 7.9762e-9* Fi ^2		
Leu	0.0046	<.0001	0.0118	0.0003
0.67	L	= 0.8472903 + 1.3149e-5* Fi		
0.77	C	= 0.8718636 + 3.1669e-5* Fi - 5.3509e-9* Fi ^2		
Lys	<.0001	0.0002	0.1679	0.0005
0.67	L	= 0.8112823 + 1.8868e-5* Fi		
0.77	L	= 0.8807661 + 5.4263e-6* Fi		

Met	0.0012	0.0001	0.0916	0.0004
0.67	L	= 0.8880242 + 9.9846e-6* Fi		
0.77	C	= 0.909223 + 2.4731e-5* Fi - 4.2409e-9* Fi ^2		
Phe	0.4008	0.0054	0.0873	0.0308
0.67	L	= 0.8445484 + 0.0000131* Fi		
Thr	0.0128	0.0012	0.0051	0.1258
Lis	= 0.7286459 + 0.0497629*Lis			
Fi	= 0.7489468 + 2.9688e-5* Fi - 4.3672e-9* Fi ^2			
Val	0.0023	<.0001	0.0006	0.0497
0.67	L	= 0.7886935 + 1.7615e-5* Fi		
0.77	L	= 0.8352419 + 9.3702e-6* Fi		
0.87	C	= 0.8232552 + 3.5855e-5* Fi - 8.1975e-9* Fi ^2		

L, Efecto lineal y C, Efecto cuadrático.

Cuadro 3. Efecto de la adición de cuatro dosis de una fitasa y tres niveles de lisina digestible sobre los coeficientes de digestibilidad aparente de aminoácidos no limitantes en ñeón de gallinas Bovans White de 67 semanas de edad

P-Dis (%)	Fitasa (FTU/kg)	Lisina dig. (%)	Ala	Asp	Glu	Gly	Pro	Ser	Tyr	
0.12	0	0.67	0.829 ^{abcd}	0.820 ^{abc}	0.868 ^{ab}	0.777 ^{ab}	0.828 ^{ab}	0.805 ^{ab}	0.853 ^{ab}	
	300		0.794 ^d	0.771 ^c	0.846 ^b	0.712 ^b	0.804 ^b	0.749 ^b	0.822 ^{ab}	
	1200		0.849 ^{abcd}	0.843 ^{ab}	0.888 ^{ab}	0.791 ^{ab}	0.849 ^{ab}	0.828 ^a	0.841 ^{ab}	
	4800		0.895 ^a	0.875 ^a	0.919 ^a	0.844 ^{ab}	0.886 ^a	0.863 ^a	0.891 ^a	
	0	0.77	0.842 ^{abcd}	0.839 ^{ab}	0.884 ^{ab}	0.797 ^a	0.847 ^{ab}	0.825 ^a	0.858 ^{ab}	
	300		0.841 ^{abcd}	0.849 ^{ab}	0.895 ^{ab}	0.800 ^a	0.871 ^a	0.838 ^a	0.874 ^a	
	1200		0.871 ^{abc}	0.864 ^{ab}	0.909 ^a	0.825 ^a	0.879 ^a	0.856 ^a	0.872 ^a	
	4800		0.883 ^{ab}	0.872 ^{ab}	0.913 ^a	0.838 ^a	0.876 ^a	0.858 ^a	0.842 ^{ab}	
	0.25	0	0.87	0.810 ^{cd}	0.821 ^{abc}	0.869 ^{ab}	0.774 ^{ab}	0.833 ^{ab}	0.810 ^{ab}	0.798 ^b
		300		0.856 ^{abcd}	0.862 ^{ab}	0.899 ^a	0.820 ^a	0.856 ^{ab}	0.844 ^a	0.827 ^{ab}
		1200		0.859 ^{abcd}	0.854 ^{ab}	0.898 ^a	0.813 ^a	0.868 ^a	0.846 ^a	0.868 ^{ab}
		4800		0.824 ^{bcd}	0.822 ^{abc}	0.875 ^{ab}	0.767 ^a	0.851 ^{ab}	0.819 ^a	0.856 ^{ab}
		SEM	0.008	0.007	0.006	0.010	0.008	0.008	0.008	
Promedio de Efectos Principales										
0.12	0		0.827 ^c	0.827 ^{ab}	0.880 ^b	0.783 ^{ab}	0.836 ^b	0.813 ^{bc}	0.836 ^b	
	300		0.830 ^{bc}	0.827 ^{ab}	0.900 ^{ab}	0.777 ^b	0.844 ^{ab}	0.810 ^c	0.841 ^b	
	1200		0.860 ^{ab}	0.854 ^a	0.885 ^{ab}	0.810 ^{ab}	0.866 ^{ab}	0.843 ^{ab}	0.860 ^{ab}	

	4800		0.867 ^a	0.856 ^a	0.872 ^a	0.816 ^a	0.871 ^a	0.847 ^a	0.863 ^{ab}
0.25	0		0.845 ^{abc}	0.811 ^b	0.874 ^a	0.782 ^{ab}	0.848 ^{ab}	0.815 ^{abc}	0.891 ^a
		0.67	0.841 ^{ab}	0.827 ^b	0.880 ^b	0.781 ^b	0.842 ^{ab}	0.811 ^b	0.852 ^b
0.12		0.77	0.859 ^a	0.856 ^a	0.898 ^a	0.815 ^a	0.868 ^{ab}	0.844 ^a	0.861 ^{ab}
		0.87	0.837 ^b	0.840 ^{ab}	0.903 ^{ab}	0.794 ^{ab}	0.852 ^a	0.829 ^{ab}	0.837 ^{ab}
0.25			0.845 ^{ab}	0.811 ^b	0.872 ^{ab}	0.782 ^{ab}	0.848 ^b	0.815 ^{ab}	0.891 ^a
0.12			0.846	0.841 ^a	0.889	0.796	0.854	0.828	0.850 ^b
0.25			0.845	0.811 ^b	0.872	0.782	0.848	0.815	0.891 ^a
<i>Valores-P (Significancia del Efecto)</i>									
Fitasa			0.001 ^{***}	0.007 ^{**}	0.003 ^{***}	0.012 [*]	0.004 ^{***}	0.001 ^{***}	0.059 [*]
Lisina			0.069 [*]	0.011 [*]	0.025 [*]	0.019 [*]	0.020 [*]	0.003 ^{***}	0.063 [*]
Lisina*fitasa			0.003 ^{**}	0.0003 ^{***}	0.005 ^{***}	0.001 ^{***}	0.049 [*]	0.001 ^{***}	0.005 ^{**}
P-Dis			0.961	0.028 [*]	0.128	0.406	0.633	0.332	0.008 ^{**}

Significancia estadística * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. a-b Muestran diferencia significativa entre las medias.

Cuadro 4. Coeficientes del análisis de regresión en la digestibilidad aparente de aminoácidos no limitantes

Variable	Lis	Fi	Fi C	Lis * Fi
Ala	0.029*	<.0001	0.041*	0.001***
0.67	L	= 0.8143952 + 1.717e-5*Fi		
0.77	L	= 0.8461694 + 8.3052e-6* Fi		
Asp	0.013*	0.001***	0.022*	0.003***
0.67	L	= 0.802371 + 1.5717e-5* Fi		
0.77	L	= 0.8469677 + 5.7348e-6* Fi		
0.87	C	= 0.8245131 + 4.218e-5* Fi - 8.9356e-9* Fi ^2		
Glu	0.017*	<.0001	0.018*	0.002***
0.67	L	= 0.8600968 + 1.2716e-5* Fi		
0.77	L	= 0.8925887 + 4.8643e-6* Fi		
0.87	C	= 0.8756396 + 2.9827e-5* Fi - 6.252e-9* Fi ^2		
Gly	0.004***	0.001***	0.081	0.001***
0.67	L	= 0.7491855 + 0.00002* Fi		
0.77	L	= 0.8020726 + 8.0492e-6* Fi		
0.87	C	= 0.7862187 + 3.9423e-5* Fi - 9.0846e-9* Fi ^2		
Pro	0.012*	0.001***	0.030*	0.011*
0.67	L	= 0.8192097 + 1.4272e-5* Fi		
0.77	C	= 0.8533443 + 3.0388e-5* Fi - 5.3754e-9* Fi ^2		
Ser	0.002***	0.001***	0.022	0.003***
0.67	L	= 0.7840161 + 1.7133e-5* Fi		
0.77	L	= 0.8358871 + 5.3891e-6* Fi		
0.87	C	= 0.8178959 + 3.6082e-5* Fi - 7.4906e-9* Fi ^2		
Tyr	0.624	0.183	0.531	0.270

L, Efecto lineal y C, Efecto cuadrático.

Cuadro 5. Efecto de la adición de cuatro dosis de una fitasa y tres niveles de lisina digestible sobre los coeficientes de digestibilidad aparente de minerales en íleon de gallinas Bovans White de 67 semanas de edad

P-Dis (%)	Fitasa (FTU/kg)	Lisina dig. (%)	P	Ca	Zn	Fe	Mg	Mn	Cu	K	Na
	0	0.67	0.463 ^b	0.374	0.248	0.149	0.434 ^{abc}	0.060	0.489	0.786 ^{ab}	-0.246 ^{cd}
	300		0.440 ^b	0.524	0.354	0.054	0.363 ^{bcd}	-0.026	0.293	0.717 ^{ab}	-0.530 ^d
	1200		0.566 ^{ab}	0.349	0.090	0.336	0.420 ^{abc}	-0.175	0.091	0.776 ^{ab}	-0.016 ^{abc}
	4800		0.725 ^a	0.514	0.218	0.162	0.445 ^{ab}	0.035	0.546	0.857 ^a	0.102 ^{abc}
0.12	0	0.77	0.450 ^b	0.402	0.244	0.213	0.408 ^{abcd}	0.033	0.497	0.784 ^{ab}	-0.185 ^{cd}
	300		0.602 ^{ab}	0.657	0.355	0.369	0.483 ^a	0.203	0.395	0.821 ^{ab}	-0.225 ^{abc}
	1200		0.713 ^a	0.653	0.385	0.246	0.450 ^{ab}	0.098	0.324	0.837 ^{ab}	0.268 ^{ab}
	4800		0.752 ^a	0.676	0.405	0.211	0.456 ^{ab}	0.054	0.442	0.836 ^{ab}	0.045 ^{abc}
0.25	0	0.87	0.591 ^{ab}	0.472	0.409	0.255	0.512 ^a	0.162	0.415	0.811 ^{ab}	0.147 ^{abc}
	300		0.721 ^a	0.311	0.202	0.046	0.473 ^{ab}	-0.025	0.189	0.818 ^{ab}	0.045 ^{cd}
	1200		0.714 ^a	0.621	0.435	0.310	0.409 ^{abcd}	0.164	0.381	0.816 ^{ab}	0.106 ^{abc}
	4800		0.730 ^a	0.612	0.388	0.272	0.321 ^{cd}	0.228	0.294	0.749 ^{ab}	-0.087 ^{bc}
	0		0.564 ^{ab}	0.729	0.498	0.484	0.311 ^d	0.192	0.532	0.716 ^b	0.391 ^a
		SEM	0.027	0.063	0.052	0.051	0.024	0.066	0.036	0.015	0.049
Promedio de Efectos Principales											
0.12	0		0.501 ^c	0.416	0.300	0.206	0.451	0.085	0.466 ^a	0.793	-0.015 ^{cd}
	300		0.588 ^{bc}	0.497	0.304	0.156	0.440	0.051	0.191 ^b	0.785	-0.242 ^d
	1200		0.664 ^{ab}	0.541	0.303	0.297	0.426	0.029	0.367 ^a	0.810	0.119 ^b
	4800		0.736 ^a	0.600	0.337	0.215	0.407	0.106	0.427 ^a	0.814	0.020 ^{bc}
0.25	0		0.564 ^{bc}	0.729	0.498	0.484	0.311	0.192	0.532 ^a	0.716	0.391 ^a
0.12		0.67	0.549 ^b	0.440	0.228 ^b	0.175	0.416	-0.027	0.362	0.784	-0.172 ^c

	0.77	0.629 ^{ab}	0.597	0.347 ^{ab}	0.260	0.449	0.097	0.407	0.819	0.039 ^b
	0.87	0.689 ^a	0.504	0.358 ^a	0.221	0.429	0.132	0.320	0.798	-0.015 ^b
0.25		0.564 ^{ab}	0.729	0.498 ^a	0.484	0.311	0.192	0.532	0.716	0.391 ^a
0.12		0.622	0.513 ^b	0.311 ^b	0.218 ^b	0.431 ^a	0.067	0.363 ^b	0.800 ^a	-0.049 ^b
0.25		0.564	0.729 ^a	0.498 ^a	0.484 ^a	0.311 ^b	0.192	0.532 ^a	0.716 ^b	0.391 ^a
Valores-P (Significancia del Efecto)										
Fitasa		<.0001	0.204	0.951	0.277	0.579	0.844	<.0001	0.483	<.0001
Lisina		0.001 ^{***}	0.131	0.079	0.401	0.503	0.129	0.145	0.155	0.002 ^{**}
Lisina*fitasa		0.062 [*]	0.393	0.131	0.201	0.035 [*]	0.452	0.093	0.008 ^{**}	0.001 ^{***}
P-Dis		0.226	0.059 [*]	0.048 [*]	0.006 ^{**}	0.006 ^{**}	0.298	0.011 [*]	0.003 ^{**}	<.0001

Significancia estadística * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. a-b Muestran diferencia significativa entre las medias.

Cuadro 6. Coeficientes del análisis de regresión en la digestibilidad aparente de minerales

Variable	Lis	Fi	Fi C	Lis * Fi
P	<.0001	0.001***	0.002**	0.031*
0.67	L	= 0.4588226 + 5.7057e-5*Fi		
0.77	C	= 0.4825624 + 0.0002538* Fi - 4.1211e-8* Fi ^2		
0.87	C	= 0.6045351 + 0.0001393* Fi - 2.3656e-8* Fi ^2		
Ca	0.125	0.964	0.925	0.764
Zn	0.090	0.596	0.654	0.654
Fe	0.187	0.175	0.165	0.022*
Mg	0.438	0.080	0.059*	0.645
Fi	L	= 0.4180849 - 3.233e-6* Fi		
Mn	0.149	0.443	0.399	0.639
Cu	0.175	0.187	0.165	0.022*
K	0.111	0.003**	0.161	0.010*
0.67	L	= 0.7494032 + 0.0000218* Fi		
Na	<.0001	0.001***	0.071	0.001***
0.67	L	= -0.322266 + 9.5367e-5* Fi		
0.77	C	= -0.151911 + 0.0004687* Fi - 8.9152e-8* Fi^2		

L, Efecto lineal y C, Efecto cuadrático.

IV. FASE EXPERIMENTAL 3

Evaluando el Nivel de Lisina Digestible Sobre el Efecto de la Dosis de una Fitasa en Hidrólisis del Ácido Fítico y síntesis de Coenzima Q10

IV.1 Resumen

La superdosis de la fitasa (**Fi**) conlleva a una mayor hidrólisis del ácido fítico (**A-Fi**) e incrementa la síntesis de coenzima Q10 (**CoQ10**) en el hígado de pollo de engorda, sin que exista ningún reporte previo en gallina de postura. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de cuatro dosis de una Fi (0, 300, 1200, y 4800 FTU/kg) en tres niveles de Lis-d (0.67, 0.77, y 0.87%) sobre la hidrólisis del A-Fi en la digesta de molleja de gallinas de postura alimentadas con 0.12% de P disponible (**Pdis**). Adicionalmente, se evaluó una dieta con 0.25% de Pdis en el nivel de 0.87% sin adición de la Fi. El contenido de CoQ10 en hígado se cuantificó en las primeras tres dosis de la enzima y en el menor y mayor nivel de Lis-d evaluado, así como en la dieta con 0.25% de Pdis. La inclusión de la enzima redujó el contenido de A-Fi en dietas con 0.12 y 0.25% de Pdis ($P<0.001$). Las dosis de 1200 y 4800 FTU/kg mostraron menor contenido de ésteres bajos de inositol (**Ins-P**) que la dosis de 300 FTU/kg ($P<0.05$). El contenido de Ins-4 y 2P aumentó al incluir la Fi en cantidades decrecientes de Lis-d ($P<0.05$). La cantidad de inositol fue mayor con dosis de 1200 FTU/kg ($P<0.01$). No existió diferencia entre niveles de 0.25% y 0.12% de Pdis para la hidrólisis inicial del A-Fi y contenido del inositol, aunque con 0.25% Pdis la concentración de Ins- 5 y 4P fue menor ($P<0.05$). La cantidad de CoQ10 fue similar entre las dosis de la Fi en el nivel de 0.67% de Lis-d, mientras que en 0.87% la adición de la Fi redujó la concentración de la coenzima en hígado ($P<0.05$). Se observó una correlación negativa para el contenido de CoQ10 y el desempeño productivo, así como para la digestibilidad de aminoácidos y minerales ($P<0.06$). La superdosis permitió una mayor hidrólisis del A-Fi que las dosis estándar en gallina de postura, mientras que la adición de la Fi mejoró el estatus metabólico.

Palabras Claves: Lisina digestible en dieta, dosis de fitasa, hidrólisis del ácido fítico, coenzima Q10 en hígado.

IV.2 Introducción

El ácido fítico (**A-Fi**) es una molécula formada por seis grupos fosfatos unidos a un anillo base de inositol (Angel, Tamim *y col.*, 2002). Las fitasas (**Fi**) y las fosfatasa son enzimas capaces de acelerar el rompimiento de los enlaces covalentes de la estructura interna del A-Fi (Cosgrove, 1966; Greiner y Konietzny, 2011), pudiendo obtener grupos fosfato libres y/o ésteres bajos de inositol (**Ins-P**), dependiendo de la enzima usada (Greiner, Carlsson *y col.*, 2000). Dentro de la clasificación de las Fi, las de tipo fosfatasa ácido histidina pueden obtener Ins-1P y cinco grupos fosfato (Wyss, Pasamontes *y col.*, 1999; Konietzny y Greiner, 2002), mientras que el último grupo es liberado por fosfatasa originados en los enterocitos (Maenz y Classen, 1998) y en la microbiota (Ptak, Bedford *y col.*, 2015) del tracto digestivo. La superdosis de Fi, que son dosis más altas que las estándar, son capaces de obtener una mayor hidrólisis del A-Fi presente en el alimento (Shirley y Edwards, 2003; Zeller, Schollenberger *y col.*, 2015), mayor cantidad de Ins-P e inositol libre (Lee y Bedford, 2016), lo cual ha sido relacionado con resultados positivos en el desempeño productivo de pollos de engorda (Morgan, Walk *y col.*, 2014; Zeller, Schollenberger *y col.*, 2016).

Cuando se produce una mayor hidrólisis del A-Fi, por una parte se reduce el impacto del proceso de quelación (Cheryan y Rackis, 1980), y por otra parte se libera mayor cantidad de P (Chung, Rutherford *y col.*, 2013). La implementación de la superdosis impacta en su mayoría la disponibilidad de los nutrientes a partir de la dieta base, afianzando el efecto fosfórico de la Fi y consiguiendo una marcada acción extra-fosfórica de la misma (Cowieson, Wilcock *y col.*, 2011), relacionada principalmente con procesos metabólicos de proteína y minerales (Selle, Cowieson *y col.*, 2012). Así, el efecto extra-fosfórico implica modificaciones en las vías metabólicas que puede llevar a alteraciones en el sistema de moléculas participantes, incluidas las coenzimas (Karadas, Pirgozliev *y col.*, 2010).

La coenzima Q10 (**CoQ10**) es un componente crucial en el proceso de producción de energía celular y como un antioxidante endógeno presente en las membranas celulares (Pisoschi y Pop, 2015); también participa en otras funciones bioquímicas como regulación de expresión de genes y señales celulares (Crane, 2001). En la membrana interna de la mitocondria, la CoQ10 es un acarreador de electrones de la cadena respiratoria en la formación de ATP. En el complejo III de la cadena respiratoria, la CoQ10 está presente en tres formas dependiendo de su estado oxidativo: ubiquinona (forma oxidada-CoQ10), ubisemiquinona, y ubiquinol (forma reducida y acarreador de electrones-CoQ10H₂) (Botham y Mayes, 2012). El ubiquinol protege las membranas del daño oxidativo (Menke, Niklowitz *y col.*, 2000) y regenera otros antioxidantes como el α -tocoferol y el ascorbato (Wang y Hekimi, 2016). *In vitro*, se ha demostrado que la propiedad antioxidantes de la CoQ10 permite menor oxidación de la proteína y peroxidación de los lípidos (Ernster, Forsmark *y col.*, 1992; Forsmark-André, Dallner *y col.*, 1995).

El contenido de CoQ10 en el cuerpo proviene principalmente de la síntesis interna, siendo solo cerca del 2% el obtenido a partir la dieta, dada la baja solubilidad de la CoQ10 en las condiciones del tracto gastro-intestinal (Zhang, Aberg *y col.*, 1995). No todas las membranas celulares poseen las enzimas para la biosíntesis de la CoQ10, pero en aquellas que si, la coenzima es sintetizada a partir de la unión del núcleo de benzoquinona con diez grupos isoprenoides. El núcleo de benzoquinona se deriva de la tirosina y fenilalanina y la cola de isoprenoides de la vía del mevalonato de la coenzima A (Ayer, Macdonald *y col.*, 2015). Los órganos con mayor contenido de CoQ10 son el corazón (114 ug/g), el riñón (67 ug/g), y el hígado (55 ug/g), aunque el páncreas (100%), el hígado (95%), y los intestinos (93%) presentan mayor proporción de ubiquinol, que resulta ser la forma más común presente en el cuerpo (Åberg, Appelkvist *y col.*, 1992).

Karadas, Pirgozliev *y col.* (2010) encontraron que el contenido de CoQ10 en el hígado fue mayor con la inclusión de dosis altas (12500 FTU/kg) de un 6-Fi proveniente de *E.coli* o con el aumento a 0.45% del contenido de Pdis, en comparación con el nivel de

0.25% de Pdis con o sin la adición de 250 FTU/kg de una Fi, en pollo de engorda de 21 días. En otro estudio, Karadas, Pappas *y col.* (2005) reportaron que la concentración de CoQ10 incrementó en el hígado de pollo de engorda de 35 semanas de edad alimentados con 500 y 250 FTU/kg de una Fi comparado con la no inclusión de la enzima en la dieta. Así mismo en pavos, mayor concentración de CoQ10 fue observada con la adición de 500 FTU/kg a los 35 días de edad, pero no a los 21 días (Karadas, Pirgozliev *y col.*, 2005).

La degradación del A-Fi puede ser influenciada por muchos factores presentes en la dieta tal y como el contenido de P. Hughes, Dahiya *y col.* (2009) encontraron una respuesta lineal negativa en la digestibilidad en el íleon del fitato evaluando 200, 400, y 600 FTU/kg de Fi en una dieta a base de maíz y pasta de soya con 0.25% de Pdis. En el mismo estudio la disminución de Pdis a 0.15% no ajustó los datos a un modelo de regresión, aunque en éste nivel de Pdis la dosis de 500 FTU/kg llevó a mayor digestibilidad de fitato que con el contenido de 0.35% de Pdis. Agbede, Kluth *y col.* (2009) encontraron que la inclusión de 1000 FTU/kg incrementó el contenido de Ins-5 y 3P, y disminuyó el del Ins-6P en íleon; además, el nivel de 0.8% del P total presentó mayor contenido de Ins-6P que el nivel de 0.4%. Van der Klis, Versteegh *y col.* (1997) reportaron más degradación de fitato, usando 500 y 250 FTU/kg en la dieta que cuando no se incluyó la Fi.

En la gallina de postura, los estudios que se han realizado acerca de las implicaciones con la inclusión de dosis altas de Fi sobre los mecanismos metabólicos son escasos. Adicionalmente, para la CoQ10 no existen previos reportes disponibles en gallina de postura bajo el concepto de superdosis. En el presente estudio se hipotetizó que la aplicación de la superdosis de una Fi pudiera llevar a una mayor hidrólisis del A-Fi en la molleja y a mayor contenido de CoQ10 en hígado que una dosis estándar, como una respuesta positiva en general del metabolismo a aporte de la Fi. De tal manera que se evaluaron cuatro dosis de una Fi (0, 300, 1200, y 4800 FTU/kg) en tres niveles de Lis-d (0.67, 0.77, y 0.87%) sobre la concentración de Ins-P; así mismo, se determinó el efecto de las tres primeras dosis de la Fi (0, 300, y 1200 FTU/kg) en el menor y mayor

contenido de Lis-d (0.67% y 0.87%) sobre el contenido de CoQ10 en hígado de gallinas de postura Bovans White alimentadas con 0.12% de Pdis. Además se analizó el impacto del contenido de Pdis sobre la hidrólisis del A-Fi y concentración de CoQ10, incluyendo un tratamiento adicional con 0.25% de Pdis en el nivel de 0.87% de Lis-d.

IV.3 Materiales y Métodos

Muestreo. En las gallinas de postura seleccionadas para obtener el contenido de íleon y la tibias, se muestreo la digesta presente en la molleja, manteniendo los mismos grupo hechos para los análisis de AA y minerales. La digesta de las tres gallinas fue homogenizada, congelada a -4°C, y liofilizad por 72 horas, siendo en total cuatro muestras por tratamiento y 52 muestras en total. El hígado de cada ave fue diseccionado y congelado a -40 °C para su posterior análisis de laboratorio. Tomando en cuenta los resultados obtenidos en la producción, se decidió analizar solo los hígados correspondientes a los tratamientos con 0, 300, y 1200 FTU/kg de Fi en el niveles de 0.67 y 0.87% de Lis-d, así como de la dieta control con 0.25% de Pdis para la cuantificación de CoQ10.

Cuantificación de Ésteres Bajos de Inositol. Los ésteres bajos de inositol fueron determinados mediante la técnica de cromatografía de intercambio iónico siguiendo la metodología descrita por Blaabjerg *y col.* (2010).

Cuantificación de CoQ10. Fue cuantificada en el pool de tres hígados, siguiendo los grupos de muestreo usados durante los análisis de la hidrólisis y digestibilidad, para un total de 28 muestras. La extracción de la CoQ10 se realizó siguiendo la metodología descrita por Karadas, Pirgozliev *y col.* (2010) y la cuantificación tomando la metodología de Mattila , Kumpulainen (2001). En resumen, cada pool de hígados fue licuado y mezclado con 5% (p/v en H₂O) de una solución salina de NaCl (0.7 ml) y etanol (1 ml) con el fin de obtener la coenzima en la fase del hexano. La extracción fue hecha dos veces y la fase de hexano fue combinada, evaporada, y reconstituida en una mezcla de metanol/etanol (1:1, v/v). La CoQ10 fue cuantificada con HPLC usando el equipo

Hewlett-Packard 1100 y una columna Vydac 201TP54 (5 μ m, 250 X 4.6 mm, The Separations Goup, U.S.A). Para la fase móvil se usó metanol/2-propanol/etanol (70:15:15, v/v/v) y una tasa de flujo 0.8 ml/min, empleándose una inyección de volumen de 50 μ L. La instrumentación fue controlada por el programa computacional HP 3D Chem Station, Rev. A. 06.01 y el reactivo de la coenzima empleado fue el #C9538-1G obtenido de Sigma Chemicals Co., U.S.A.

Análisis Estadístico. Los tratamientos con 0.12% de Pdis fueron analizados como un diseño completamente al azar con arreglo factorial con efectos principales e interacciones, anidadas al nivel de Pdis en la dieta, el cual además fue incluido como una fuente de variación del ANOVA. Las medias fueron separadas usando la prueba de Tukey o la DMS. Además se realizó un análisis de regresión a los datos tomándo los niveles de Fi y Lis-d como variables cuantitativas. El contenido de CoQ10 fue evaluado con una correlación bivariada respecto a los coeficientes de digestibilidad de AA limitantes y no limitantes, P, Ca y las principales variables de producción, usando el coeficiente de Pearson. Los datos fueron analizados con el programa JMP 12® y los valores de P significativos fueron tomados como aquellos menores a 0.07.

IV.4 Resultados

La inclusión de la Fi redujó significativamente la concentración de Ins-6P en las dosis de 300, 1200, y 4800 FTU/kg de Fi respecto a las dietas sin la enzima en los dos niveles de Pdis (0.12 y 0.25%). Adicionalmente, la dosis de 4800 FTU/kg tuvo menos concentración de Ins-6P que la de 300 FTU/kg, aunque, 1200 FTU/kg no fue diferente de 300 y 4800 FTU/kg ($P < 0.001$). La dieta con 0.25% de Pdis en el nivel de 0.87% de Lis-d incrementó la cantidad presente de Ins-6P en comparación con las dietas con 0.12% de Pdis en los niveles de 0.67 y 0.77% de Lis-d ($P < 0.05$), resultando en un efecto significativo del nivel de Pdis ($P < 0.001$). La concentración de Ins-5P en la dieta control fue mayor que en la dieta con 0.12% sin la Fi en el nivel de 0.87% de Lis-d. Por otro lado, la inclusión de la Fi redujó el contenido de Ins-5P comparada con la dieta control. Las dosis de 1200 y 4800 FTU/kg presentaron menor contenido de Ins-5P

que la no inclusión de Fi en 0.12% de Pdis, y la dosis 300 FTU/kg lo redujó respecto a la dieta con 0.25% de Pdis ($P<0.001$). Además, en los niveles de 0.67 y 0.77% de Lis-d, el contenido de Ins-5P fue menor que en 0.87%, siendo ésta última de menor concentración que el nivel de 0.25% de Pdis ($P<0.05$) (Cuadro 1). Existió una interacción entre las dosis de la Fi y los niveles de Lis-d en la concentración de Ins-4P. En este caso, solamente en 0.87% de Lis-d, la no adición de la Fi incrementó el contenido de Ins-4P, sin embargo inclusiones incrementales de la enzima llevó a una reducción gradual de la concentración en los tres niveles de Lis-d ($P<0.001$) (figura 1a). No hubo efecto del nivel de Pdis para la cuantificación de los Ins-4P ($P=0.392$)(Cuadro 1).

El contenido de los Ins-3P fue mayor sin la presencia de la Fi respecto a dosis de 1200 y 4800 FTU/kg en 0.12% de Pdis y respecto a la dieta control. Además, las dosis de 1200 y 4800 FTU/kg resultaron en una disminución de la concentración, que la dosis de 300 FTU/kg ($P<0.001$). Aves alimentadas con 0.77% de Lis-d tuvieron menor concentración de Ins-3P que aquellas con 0.67% y que 0.87 % de Lis-d en 0.12% de Pdis pero no respecto a las de 0.87% de Lis-d en 0.25% de Pdis. En la cuantificación de Ins-2P, existió una interacción para los niveles de Fi y Lis-d, siendo que en el nivel de 0.67% de Lis-d la inclusión gradual de la enzima disminuyó el contenido de Ins-2P, mientras que en 0.77% y 0.87% la concentración fue mayor (Figura 1b). Además, la dieta control presentó más cantidad de Ins-2P que el promedio de los tratamientos con 0.12% de Pdis ($P<0.001$) (Cuadro 1). Las aves alimentadas con 1200 FTU/kg tuvieron mayor concentración de inositol que la no inclusión de la Fi en dietas con 0.12 y 0.25% de Pdis. Así mismo, el nivel de 0.25% de Pdis presentó menor contenido que la dosis de 4800 FTU/kg, resultando en un menor concentración en general del nivel de 0.25% que del 0.12% de Pdis ($P<0.05$)(Cuadro 1). En el análisis de regresión, la respuesta al incremento de la dosis de Fi se ajustó a un modelo cuadrático en la evaluación de los Ins-6, 5, 3P, e inositol ($P<0.05$). Por otra parte, en el Ins-4P el efecto de la Fi fue de tipo lineal ($P=0.07$) y en el Ins-2P no fue significativo ($P=0.130$). Niveles

incrementales de Lis-d resultaron en una respuesta de tipo lineal, solamente en los Ins-4 y 2P ($P<0.001$)(Cuadro 2).

Se presentó una interacción en el contenido de CoQ10 en el hígado para los niveles de Lis-d y Fi. En el nivel de 0.67% de Lis-d, no existió diferencia en la concentración de la coenzima entre las dosis de Fi, mientras que en 0.87%, no adicionar la enzima resultó en un mayor contenido que con el uso de 300 y 1200 FTU/kg. Por otro lado, incluir 1200 FTU/kg en 0.87% de Lis-d resultó en una reducción de la CoQ10 en comparación con dosis de la Fi de 0, 300, y 1200 FTU/kg en el nivel de 0.67% de Lis-d, y también en comparación con la dieta control ($P<0.001$). Además, 0.25% de Pdis presentó menor contenido de la coenzima que el promedio del grupo con 0.12% ($P=0.001$)(Cuadro 1). El contenido de CoQ10 en hígado fue correlacionado negativamente con la digestibilidad de AA limitantes, no limitantes (incluyendo la tirosina), P, la producción de masa de huevo y el contenido de grasa abdominal. Contrariamente, se presentó una correlación positiva entre el contenido de CoQ10 y la pérdida de peso (Cuadro 4).

IV.5 Discusión

Estudios previos han mostrado una mayor degradación del A-Fi con el incremento de la dosis de la Fi en pollo de engorda (Van der Klis, Versteegh *y col.*, 1997;Walk, Santos *y col.*, 2014), existiendo evidencia de una relación lineal positiva con niveles graduales de la enzima (Shirley y Edwards, 2003), incluso en el caso de la gallina de postura (Hughes, Dahiya *y col.*, 2009). En el presente estudio, el grado de hidrólisis del A-Fi fue dependiente de la dosis de la Fi empleada, ya que 300 FTU/kg fue más efectiva al reducir el contenido de Ins-6P en la digesta, mientras que las dosis de 1200 y 4800 FTU/kg llevaron la hidrólisis más allá de la molécula inicial, al incrementar la concentración de Ins-5, 4, y 3P, e incluso la dosis de 1200 FTU/kg dejó más inositol libre. De ello se deduce en primera medida que existe una efectividad de la dosis estándar para iniciar la ruptura del A-Fi, con bajo alcance de degradación total, y en

segunda, que 1200 FTU/kg lleva a mayor disponibilidad del inositol, en el caso de la gallina de postura.

Recientemente, Wilcock, Walk (2016) describen como principal objetivo en el empleo de superdosis de 1500 FTU/kg en pollo de engorda, el obtener una hidrólisis de más del 85% del A-Fi. Siendo que con el empleo de dosis estándar como la de 500 FTU/kg, la degradación conseguida es de 29.3% (Camden, Morel *y col.*, 2001) o 33.5% (Tamim, Angel *y col.*, 2004), reportándose una desaparición del 58 y 95% del P fítico en íleon, con la adición de 750 y 12000 FTU/kg de Fi (Shirley y Edwards, 2003). En el presente estudio, la adición de 4800, 1200, y 300 FTU/kg resultó en una reducción de 77.9, 60.9, y 40.9% del contenido de Ins-6P en molleja, indicando una reducción gradual de la cantidad presente de moléculas intactas del A-Fi cuando la Fi fue adicionada en una manera incremental. Por lo tanto, la ocurrencia del proceso de quelación en la digesta fue disminuido con altas dosis de la enzima, al evitar la presencia de Ins-6P que es la molécula de mayor capacidad quelante con moléculas circundantes.

Persson, Türk *y col.* (1998) reportaron una menor fuerza de unión para los Ins-4 y 3P con el Cu, Zn, y Cd, en comparación a los Ins-6 y 5P, lo cual no fue asociado a una pérdida de la capacidad de unión de los grupos fosfato que permanecen ligados. Yu, Cowieson *y col.* (2012) *in vitro*, encontraron mayor actividad de la pepsina cuando se redujo la concentración de los Ins-6 y 5P. Adicionalmente, Xu, Price *y col.* (1992) observaron un incremento en la solubilidad del Ca y del Zn cuando el A-Fi fue degradado hasta obtener Ins-3P, *in vitro*. De esta manera, dosis altas de Fi puede generar más Ins-P con subsecuente menor fuerza de unión covalente, promoviendo la homeostasis en el proceso de digestión e incrementando la disponibilidad de nutrientes, que de otra manera son susceptibles a ser quelados por el A-Fi.

La superdosis no solo resultó en menor presencia de los Ins-6, 5, y 4P, sino también en mayor disponibilidad del inositol, mejorando el perfil nutricional de la dieta. De hecho, el inositol es categorizado como un nutracéutico, teniendo en cuenta su impacto en la formación de energía (Lee y Bedford, 2016) y en el metabolismo de

lípidos (Burton y Wells, 1979). Así mismo, el inositol se conoce como la estructura base para la síntesis de inositol pirofosfato y polifosfatos inorgánicos, los cuales recientemente han sido catalogados como mensajeros metabólicos y moléculas claves en la homeostasis celular (Wilson, Livermore *y col.*, 2013). Dichas moléculas son parte fundamental de procesos biológicos como el almacenamiento en la célula de P (Auesukaree, Tochio *y col.*, 2005), liberación de insulina, y formación de ácidos grasos en la mitocondria (Bhandari, Juluri *y col.*, 2008). Żyła, Mika *y col.* (2012) investigaron el efecto de incluir 0.1% de inositol oral purificado en la producción de huevo, concluyendo que la suplementación de inositol sintético causó un detrimento en el desempeño productivo comparado con la inclusión de 300 FTU/kg de dos Fi comerciales, sugiriendo una mejor disponibilidad del inositol liberado por la enzima. En el presente estudio las dosis de 1200 y 4800 FTU/kg incrementaron la disponibilidad del inositol dietario en la molleja, y una vez presente en el intesino, fue absorbido, siendo una de las principales razones del efecto positivo.

Un importante resultado a discutir en éste estudio fue el hecho que el nivel de Lis-d influyera la degradación del A-Fi, posiblemente dado a la fenómenos de interacciones entre moléculas. Kaup , Greger (1990) investigaron el impacto del tipo de sal de cloruro sobre la absorción en intestino, deposición en hueso, y excreción del P, Ca, y Mg en ratas, encontraron que el cloruro de Lis causaba mayor excreción de Ca, y cuando el Ca y la Lis eran suplementados en la dieta, la absorción de P y Mg en el intestino, y la deposición de Mg en el hueso eran afectados negativamente, siendo posible que aniones como el cloruro podrían afectar el proceso de digestión. Bye, Cowieson *y col.* (2013) concluyeron que el NaCl cambia la estabilidad de las moléculas de agua alrededor del fitato, mitigando el impacto negativo del mismo sobre la solubilidad de mioglobina y sero albumina humana, en estudios *in vitro*. Por otra parte, Xu, Price *y col.* (1992) notaron que la adición de NaCl incrementaba la fuerza de unión de los Ins-6 y 5P, provocando que la solubilidad del Zn incrementara. En el caso del Ins-4P, el NaCl disminuyó la solubilidad de Zn en concentraciones de 0.05 M, pero la incrementó cuando la concentración aumentó a 0.15M, mientras que los Ins-3P redujó

su fuerza de unión cuando el NaCl de sodio fue adicionado a la solución. De esta manera se evidencia la capacidad del ión cloruro para desencadenar cambios electrostáticos dependientes del tipo de Ins-P presente, siendo que en el presente estudio resultó en una interacción entre la Fi y los niveles de Lis-d dietario, solamente para el caso de los Ins-4 y 2P.

Tomando en cuenta lo mencionado anteriormente, la adición de cloruro de Lis en la dieta pudo haber alterado la solubilidad del A-Fi y con ello el proceso de hidrólisis en molleja, resultando en un efecto principal e interactivo del nivel de Lis-d en la dieta. Un comportamiento similar ha sido reportado para el Cu; Banks, Thompson *y col.* (2004) observaron una reducción en la retención del P en intestino al incrementar la concentración de Cu de 125 a 250 ppm, manteniéndose la tendencia con contenidos hasta 375 ppm pero no con 10 y 62.5 ppm. En el estudio de Banks, el Cu fue adicionado en forma de sulfato a una dieta a base de maíz y pasta de soya con un nivel constante de Ca de 0.70%. Wilcock, Walk (2016) adjudican que el efecto observado del Cu sobre la solubilidad de los complejos Cu-fitato está condicionado por la fuente de la molécula, ya que el sulfato, cloruro, y cloruro tribásico provoca mayor insolubilidad al Cu que el citrato y tipos de Lis en un pH de 5.5. Esto refuerza la idea que la composición de las moléculas circundantes en el medio influyen en la estabilidad del A-Fi y por lo tanto su susceptibilidad a la acción de la Fi. No obstante, ningún efecto en minerales como el Zn ha sido encontrado previamente (Walk, 2014), probablemente porque las fuentes disponibles actualmente del Zn no cambian la interacción electrostática entre el A-Fi y los moléculas circundantes en el medio.

Las aves como el pollo de engorda y la gallina de postura pueden producir enzimas endógenas en el tracto digestivo capaces de hidrolizar el A-Fi hasta obtener grupos fosfato e inositol libre (Maenz y Classen, 1998; Morgan, Walk *y col.*, 2015). Adicionalmente, las aves también tienen un sistema de enzimas efectivas basado en fosfatasas y Fi en hígado y sangre para regular la cantidad disponible de P (Cowieson, Wilcock *y col.*, 2011), de tal modo que los tratamientos sin Fi mostraron una degradación parcial del A-Fi en este estudio. Sin embargo, la extensión de hidrólisis

del A-Fi no fue suficiente para cubrir los requerimientos de P, incluso en el caso de la gallina de postura que posee un 35% más capacidad de degradación del A-Fi que el pollo de engorda (Maenz y Classen, 1998), y mucho menos para obtener un beneficio más allá de este mineral. Truong, Yu y *col.* (2014) reportaron que del 63.1% de la hidrólisis del fitato, el 23.8% correspondía a la acción de las enzimas endógenas del tracto digestivo y el 39.3% a la adición de 1000 FTU/kg de una Fi exógena, resaltando la importancia de incluir una enzima exógena con mayor capacidad hidrolítica.

La falta de aporte de P a partir de la dieta base es remediada comúnmente con la adición de una fuente inorgánica; no obstante, la presencia del P puede inhibir la acción de Fi exógenas. Shastak, Zeller y *col.* (2014) reportaron una reducción en el porcentaje de hidrólisis de Ins-6P en la digesta del ileon y en la excreción, cuando el nivel de P inorgánico fue aumentado de 0.075 a 0.15% usando fosfato monocalcico monohidratado. En el mismo estudio, efectos similares fueron observados con una dieta semi-sintética con maíz y pasta de soya, suplementada con niveles graduales de 0.05, 0.10, y 0.15% de fosfato monosódico anhídrico. Además, un incremento significativo de los isómeros Ins-5 y 4P fueron obtenidos para ambas fuentes de P inorgánico, en pollo de engorda de 20-24 días de edad. De manera similar, Li, Angel y *col.* (2016) atribuyeron el incremento de los Ins-6P a un mayor contenido de P no fítico con 0.45% comparado con 0.28% en la digesta del proventrículo y molleja de pollo de engorda de 13 días de edad, alimentados con una dieta base mixta que incluía fosfato monocálcico como P inorgánico. En el presente estudio la adición de 0.12% de fosfato monocálcico llevó a un mayor contenido de Ins-6 y 5P lo que pudo haber propiciado menor disponibilidad de los nutrientes, y también un decrecimiento en las cantidades de Ins-2P e inositol, con lo que ningún beneficio extra-fosfórico con la adición de P inorgánico fue observado.

El contenido de CoQ10 en la célula es un indicador del estatus oxidativo del organismo, siendo que altas concentraciones de CoQ10 sugieren un incremento en la necesidad de atenuar especies reactivas de oxígeno (Pisoschi y Pop, 2015), como aquellos productos del catabolismo de lípidos, carbohidratos, y proteínas (Ernster y

Dallner, 1995;Ayer, Macdonald *y col.*, 2015). Estudios en ratón han indicado que bajo condiciones de estrés oxidativo desencadenado por el ejercicio, bajas temperaturas, y alteración de la hormona tiroide, una mayor síntesis de CoQ10 está presente en órganos aeróbicos como el hígado (Ernster y Dallner, 1995), siendo factible que procesos fisiológicos similares pasaran en el nivel de 0.87% de Lis, puesto que presentó mas concentración de la coenzima. En este caso, la no adición de la Fi conllevaba a un desequilibrio en el contenido de la dieta que era baja en P, y por lo tanto mayor tasa de catabolismo para lidiar con el contenido extra del aminoácido, incluyendo procesos como el ciclo del ácido cítrico, en el que la CoQ10 es una molécula clave (Botham y Mayes, 2012). No obstante en el nivel de 0.67% de Lis-d, la concentración fue menor debido a una menor tasa de metabolismo, y reflejado en una disminución en el consumo del alimento. Por otra parte, la CoQ10 presente en el alimento se descarta como un factor que variara la respuesta al contenido en el hígado puesto que la CoQ10 presente en la dieta base fue la misma para todos los tratamientos, y solo habría sido posible que el 2-3% fuera absorbido (Pravst, Žmitek *y col.*, 2010;Ayer, Macdonald *y col.*, 2015).

Existen otras moléculas más consideradas para la evaluación del estatus oxidativo del organismo tales como el α -tocoferol y ascorbato, los cuales son categorizados como antioxidantes externos dada la fuerte influencia del contenido en dieta sobre su concentración en el organismo, mientras que en el caso de la CoQ10 es considerado como un antioxidante endógeno (Zhang, Turunen *y col.*, 1996;Pisoschi y Pop, 2015). Por lo tanto, la evaluación del contenido de CoQ10 en forma de ubiquinol, solo considera procesos inherentes a las vías metabólicas en el organismo y siendo su evaluación en un órgano activo como el hígado, permite una mejor idea de dichos procesos al tener en cuenta que la forma reducida está más presente que la oxidada (Dallner, Brismar *y col.*, 2003;Ayer, Macdonald *y col.*, 2015). Por otra parte, en el caso de evaluar el estatus oxidativo por métodos indirectos como los TBARS o directos como la enzima glutatión peroxidasa (Pisoschi y Pop, 2015), no se se estaría teniendo

en cuenta cambios en el proceso de fosforilación oxidativa que es esencial para la producción de energía, lo que da una idea del efecto extra-fosfórico de la Fi exógena.

El contenido de CoQ10 mostró menos variación con la evaluación de la dosis estándar y de la superdosis de Fi en el nivel de Lis-d de 0.67% que en 0.87%. Esto sugiere que el nivel de 0.67% no aportó suficientes nutrientes para mantener una tasa metabólica. Siendo que la disponibilidad de P incrementó con la adición de la Fi, esto compenso parcialmente la falta de balance de los nutrientes en la dieta, pero no de una forma suficiente para regular el nivel de Lis-d, resultando pequeños cambios en la concentración de CoQ10. Contrariamente, en 0.87% de Lis-d, la adición de P inorgánico decreció la concentración de CoQ10 en un 58%, como también fue hecho por la adición de la Fi, y aún más con la dosis de 1200 FTU/kg. Además tomando en consideración la existencia de una correlación negativa entre la concentración de la CoQ10 con un desempeño positivo en la producción de huevo y la digestibilidad de AA y P, la dosis de 1200 FTU/kg permitió un equilibrio mayor en los procesos metabólicos en las gallinas que dosis de 300 FTU/kg.

Contrario a los resultados obtenidos en el presente estudio, Karadas, Pirgozliev *y col.* (2010) en pollo de engorda, encontraron mayor contenido de CoQ10 en hígado en pollo de engorda con mejor desempeño productivo, es decir aquellos alimentados con 500 FTU/kg (99.95 ug/g) y 12500 FTU/kg (119.7 ug/g) de Fi en comparación con 250 FTU/kg (63.86 ug/g). Además, Karadas no reportó cambios en el contenido de la coenzima usando 12500 FTU/kg respecto a la suplementación de P inorgánico (129.9 y 119.7 ug/g, respectivamente). Los autores mencionados anteriormente asumen que altas concentraciones de CoQ10 potencializa el estatus oxidativo de la membranas celulares en el hígado y permite un mayor desempeño productivo. Los resultados contradictorios en nuestro estudio probablemente son causados por las características de la edad y de los procesos de crecimiento de los tejidos corporales propios de la gallina en un período final del ciclo de postura. Desafortunadamente, no existen estudios previos respecto al efecto de la dieta en el estatus de la CoQ10 en el hígado en la producción de huevo. El único trabajo publicado al respecto investigó las

implicaciones de la suplementación de CoQ10 en la dieta, encontrando que niveles de 0.8% de coQ10, incrementaba el contenido de la coenzima en hígado sin permitir mejoras en la producción de huevo o en su perfil nutricional (Kamisoyama, Honda y *col.*, 2010).

IV.6 Conclusión

La inclusión en dosis estándar de una 6-Fi en la dieta fue capaz de iniciar el proceso de degradación del A-Fi, aunque la superdosis llevó a una hidrólisis más profunda dado el aumento en la presencia de Ins-P e inositol libre en molleja. El nivel de 0.87% de Lis-d incrementó la tasa de degradación del A-Fi, siendo su causante un punto a clarificar en futuras investigaciones. No obstante, la adición de P inorgánico no afectó la hidrólisis del A-Fi, aunque estabilizó la síntesis de CoQ10 al regular el contenido de P en la dieta base. La inclusión de la Fi llevó a un contenido equitativo de CoQ10 en el nivel de 0.67% de Lis-d, mientras que en 0.87% la Fi redujó las necesidades de síntesis de la CoQ10 con dosis estándar y superdosis.

IV.7 Referencias

- Åberg F, Appelkvist E-L, Dallner G , Ernster L. Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues. *Arc. Bioch. Biophys.* 1992; 295(2): 230-234.
- Adedokun S, Adeola O, Parsons C, Lilburn M , Applegate T. Factors affecting endogenous amino acid flow in chickens and the need for consistency in methodology. *Poult. Sci.* 2011; 90(8): 1737-1748.
- Adeola O , Sands J. Does supplemental dietary microbial phytase improve amino acid utilization? A perspective that it does not. *J. Anim. Sci.* 2003; 81(14_suppl_2): 78-85.
- Adeola O , Walk C. Linking ileal digestible phosphorus and bone mineralization in broiler chickens fed diets supplemented with phytase and highly soluble calcium. *Poult. Sci.* 2013; 92(8): 2109-2117.
- Agbede J, Adebayo I, Osho I , Bankole O. Influence of microbial phytase on amino acid digestibility of caectomised laying hens fed marginally low methionine-based diet. *Adv. Anim. Biosci.* 2010; 1(02): 453-454.
- Agbede J, Adebayo I, Osho I , Bankole O. Influence of microbial phytase on amino acid digestibility of caectomised laying hens fed marginally low methionine-based diet. *Adv. Anim. Bio.* 2010; 1(02): 453-454.

Agbede J, Kluth H , Rodehutschord M. Amino acid digestibility and energy metabolisability as affected by dietary calcium and supplemented phytase in caeectomised laying hens. *Archi Für Geflügelkunde*. 2009; 73(2): 73-79.

Agbede JO, Kluth H , Rodehutschord M. Studies on the effects of microbial phytase on amino acid digestibility and energy metabolisability in caeectomised laying hens and the interaction with the dietary phosphorus level. *British poultry science*. 2009; 50(5): 583-591.

Amerah AM, Plumstead PW, Barnard LP , Kumar A. Effect of calcium level and phytase addition on ileal phytate degradation and amino acid digestibility of broilers fed corn-based diets. *Poult. Sci*. 2014; 93(4): 906-915.

Angel R, Saylor W, Mitchell A, Powers W , Applegate T. Effect of dietary phosphorus, phytase, and 25-hydroxycholecalciferol on broiler chicken bone mineralization, litter phosphorus, and processing yields. *Poult. Sci*. 2006; 85(7): 1200-1211.

Angel R, Tamim NM, Applegate TJ, Dhandu AS , Ellestad LE. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. *J. Appli. Poult. Res*. 2002; 11(4): 471-480.

Angel R, Tamim NM, Applegate TJ, Dhandu AS , Ellestad LE. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. *J. Appl. Poult. Res*. 2002; 11(4): 471-480.

AOAC (2006). *Official Methods of Analysis*. Washington, DC., ed. Assoc.

AOAC (2006). *Official Methods of Analysis*. Washington, DC., ed. Assoc.

Ashmead HD (2012). *Amino acid chelation in human and animal nutrition*, CRC Press.

Auesukaree C, Tochio H, Shirakawa M, Kaneko Y , Harashima S. Plc1p, Arg82p, and Kcs1p, enzymes involved in inositol pyrophosphate synthesis, are essential for phosphate regulation and polyphosphate accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol. Chem*. 2005; 280(26): 25127-25133.

Augspurger N, Webel D , Baker D. An phytase expressed in yeast effectively replaces inorganic phosphorus for finishing pigs and laying hens. *Journal of animal science*. 2007; 85(5): 1192-1198.

Augspurger NR, Webel DM , Baker DH. An phytase expressed in yeast effectively replaces inorganic phosphorus for finishing pigs and laying hens. *J. Anim. Sci*. 2007; 85(5): 1192-1198.

Ayer A, Macdonald P , Stocker R. CoQ10 Function and Role in Heart Failure and Ischemic Heart Disease. *Ann. Rev. Nut*. 2015; 35: 175-213.

Banks K, Thompson K, Jaynes P , Applegate T. The effects of copper on the efficacy of phytase, growth, and phosphorus retention in broiler chicks. *Poul. Sci*. 2004; 83(8): 1335-1341.

Bar A. Calcium transport in strongly calcifying laying birds: mechanisms and regulation. *Comp. Bioch. Phy. Part A: Mol. Int. Phy*. 2009; 152(4): 447-469.

Barkley G, Miller H , Forbes J. The ability of laying hens to regulate phosphorus intake when offered two feeds containing different levels of phosphorus. *Br. J. Nutr*. 2004; 92(02): 233-240.

Bedford M , Walk C (2016). Reduction of phytate to tetrakisphosphate (IP4) to triphosphate (IP3), or perhaps even lower, does not remove its antinutritive

properties. Phytate destruction consequences for precision animal nutrition. Walk C, Kuhn I, HN S, Kidd M y M R. The Netherlands, Wageningen Academic Publishers. 45-49.

Benevenga NJ , Blemings KP. Unique aspects of lysine nutrition and metabolism. *J. Nutr.* 2007; 137(6): 1610S-1615S.

Bhandari R, Juluri KR, Resnick AC , Snyder SH. Gene deletion of inositol hexakisphosphate kinase 1 reveals inositol pyrophosphate regulation of insulin secretion, growth, and spermiogenesis. *Pro. Nat. Aca. Sci.* 2008; 105(7): 2349-2353.

Boisen S, Hvelplund T , Weisbjerg MR. Ideal amino acid profiles as a basis for feed protein evaluation. *Livestock. Pro. Sci.* 2000; 64(2): 239-251.

Boisen S, Hvelplund T , Weisbjerg MR. Ideal amino acid profiles as a basis for feed protein evaluation. *Live. Prod. Sci.* 2000; 64(2): 239-251.

Botham KM , Mayes PA (2012). La cadena respiratoria y fosforilación oxidativa. *Harper Bioquímica Ilustrada.* K MR. México DF, Mc Graw hill. 29.

Brenes An, Viveros An, 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. Tech.* 2003; 110(1): 201-219.

Burton LE , Wells WW. myo-Inositol deficiency: studies on the mechanism of lactation-dependent fatty liver formation in the rat. *The J. Nutr.* 1979; 109(8): 1483-1491.

Burton LE , Wells WW. Myo-Inositol deficiency: studies on the mechanism of lactation-dependent fatty liver formation in the rat. *The J. Nut.* 1979; 109(8): 1483-1491.

Bye JW, Cowieson NP, Cowieson AJ, Selle PH , Falconer RJ. Dual effects of sodium phytate on the structural stability and solubility of proteins. *J. Agri. Food. Chem.* 2013; 61(2): 290-295.

Bye JW, Cowieson NP, Cowieson AJ, Selle PH , Falconer RJ. Dual effects of sodium phytate on the structural stability and solubility of proteins. *J Agri. Food. Chem.* 2013; 61(2): 290-295.

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.

Caldwell RA. Effect of calcium and phytic acid on the activation of trypsinogen and the stability of trypsin. *J. Agri. Food. Chem.* 1992; 40(1): 43-46.

Camden B, Morel P, Thomas D, Ravindran V , Bedford M. Effectiveness of exogenous microbial phytase in improving the bioavailabilities of phosphorus and other nutrients in maize-soya-bean meal diets for broilers. *Anim. Sci.* 2001; 73(02): 289-297.

Ceylan N, Scheideler S , Stilborn H. High available phosphorus corn and phytase in layer diets. *Poult. Sci.* 2003; 82(5): 789-795.

Cheryan M , Rackis JJ. Phytic acid interactions in food systems. *Cri. Rev. Food. Sci. Nutr.* 1980; 13(4): 297-335.

Cheryan M , Rackis JJ. Phytic acid interactions in food systems. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 1980; 13(4): 297-335.

Cheryan M , Rackis JJ. Phytic acid interactions in food systems. *Cri. Rev. Food. Sci. Nut.* 1980; 13(4): 297-335.

Chung TK, Rutherford SM, Thomas DV , Moughan PJ. Effect of two microbial phytases on mineral availability and retention and bone mineral density in low-phosphorus diets for broilers. *Br. Poul. Sci.* 2013; 54(3): 362-373.

Coon CN (2002). Feeding commercial egg-type layers. *Commercial chicken meat and egg production*, Springer. 287-328.

Cosgrove DJ. The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates. *Rev. Pure. Appl. Chem.* 1966; 16: 209-224.

Cosgrove DJ. The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates. *Rev. Pure Appli. Chem.* 1966; 16: 209-224.

Cowieson A, Acamovic T , Bedford M. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 2004; 45(1): 101-108.

Cowieson A, Ravindran V , Selle P. Influence of dietary phytic acid and source of microbial phytase on ileal endogenous amino acid flows in broiler chickens. *Poult. Sci.* 2008; 87(11): 2287-2299.

Cowieson A, Wilcock P , Bedford M. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World. Poult. Sci. J.* 2011; 67(02): 225-236.

Cowieson A, Wilcock P , Bedford M. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World. Poult. Sci. J.* 2011; 67(02): 225-236.

Cowieson AJ, Wilcock P , Bedford MR. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World's Poult. Sci. J.* 2011; 67(02): 225-236.

Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Ame. Col. Nut.* 2001; 20(6): 591-598.

D'Mello JF (2003). *Adeverse Effects of Amino Acids. Amino acids in animal nutrition*, CABI publishing. 132-134.

Dallner G, Brismar K, Chojnacki T , Swiezewska E. Regulation of coenzyme Q biosynthesis and breakdown. *Biofactors.* 2003; 18(1-4): 11-22.

De Carvalho F, Stringhini J, Matos M, Café M, Leandro N, Gomes N, *y col.* Egg quality of hens fed different digestible lysine and arginine levels. *Rev. Bra. Ciên. Avíc.* 2015; 17(1): 63-68.

Dersjant-Li Y, Awati A, Schulze H , Partridge G. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *J. Sci. Food. Agric.* 2015; 95(5): 878-896.

Doria E, Galleschi L, Calucci L, Pinzino C, Pilu R, Cassani E, *y col.* Phytic acid prevents oxidative stress in seeds: evidence from a maize (*Zea mays L.*) low phytic acid mutant. *J. Exp. Bot.* 2009: 345.

Engelen AJ, Heeft FC, Randsdorp PHG, Somers WAC, Schaefer J , van der Vat BJC. Determination of phytase activity in feed by a colorimetric enzymatic method: collaborative interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 2001; 84(3): 629-633.

Englmaierová M, Dlouhá G, Marounek M , Skřivan M. Efficacy of contrast levels of non-phytate phosphorus and *Aspergillus niger* phytase in hens fed wheat-maize-based diets. *Czech J. Anim. Sci.* 2012; 57(11): 499-505.

Ernster L , Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Bioc. Biop. Acta (BBA)-Mol. Bas. Dis.* 1995; 1271(1): 195-204.

Ernster L, Forsmark P , Nordenbrand K. The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes. Relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles. *J Nut. Sci. Vit.* 1992; 38(Special): 548-551.

Forsmark-André P, Dallner G , Ernster L. Endogenous ubiquinol prevents protein modification accompanying lipid peroxidation in beef heart submitochondrial particles. *Free. Rad. Biol. Med.* 1995; 19(6): 749-757.

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.

Gehring C, Bedford M , Dozier W. Extra-phosphoric effects of phytase with and without xylanase in corn-soybean meal-based diets fed to broilers. *Poult. Sci.* 2013; 92(4): 979-991.

Gehring CK, Bedford MR , Dozier WA. Extra-phosphoric effects of phytase with and without xylanase in corn-soybean meal-based diets fed to broilers. *Poultry science.* 2013; 92(4): 979-991.

Gietzen DW, Hao S , Anthony TG. Mechanisms of food intake repression in indispensable amino acid deficiency. *Annu. Rev. Nutr.* 2007; 27: 63-78.

Greiner R, Carlsson N-G , Alminger ML. Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*. *J. Biot.* 2000; 84(1): 53-62.

Greiner R , Konietzny U. Phytases: Biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use. *Enz. Farm. Anim. Nut.* Bedford, MR, and Partridge, GG, eds. CAB Intl., Oxfordshire, UK. 2011: 96-128.

Greiner R , Konietzny U. Phytases: Biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use. *Enzymes in Farm Animal Nutrition.* Bedford, MR, and Partridge, GG, eds. CAB Intl., Oxfordshire, UK. 2011: 96-128.

Handlogten M, Kilberg M , Christensen H. Incomplete correspondence between repressive and substrate action by amino acids on transport systems A and N in monolayered rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 1982; 257(1): 345-348.

Hassanien HHM , Sanaa HME. Comparison difference levels of phytase enzyme supplementation on laying hen performance, egg quality and some blood parameters. *Asian. J. Poult. Sci.* 2011; 5: 77-85.

He L, Yang H, Hou Y, Li T, Fang J, Zhou X, *et al.* Effects of dietary L-lysine intake on the intestinal mucosa and expression of CAT genes in weaned piglets. *Amino. Acids.* 2013; 45(2): 383-391.

Heger J (2003). Essential to non-essential amino acid ratios. *Amino acids in animal nutrition.* D'Mello JF, CABI publishing.

Hendrix Genetics Company. *Bovans Nutrition Management Guide.* 2009.

Hernández-Hernández A, Vidal ML, Gómez-Morales J, Rodríguez-Navarro AB, Labas V, Gautron J, *et al.* Influence of eggshell matrix proteins on the precipitation of calcium carbonate (CaCO₃). *J. Crystal. Growth.* 2008; 310(7): 1754-1759.

Hincke MT, Nys Y, Gautron J, Mann K, Rodriguez-Navarro AB , McKee MD. The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front. Biosci.* 2012; 17: 1266-1280.

Hughes A, Dahiya J, Wyatt C , Classen H. Effect of Quantum phytase on nutrient digestibility and bone ash in White Leghorn laying hens fed corn-soybean meal-based diets. *Poult. Sci.* 2009; 88(6): 1191-1198.

Jalal MA, Scheideler SE , Wyatt C. Effect of phytase supplementation on egg production parameters and amino acid digestibility. *Poult. Sci.* 1999; 45: 123-125.

Kamisoyama H, Honda K, Kitaguchi K , Hasegawa S. Transfer of dietary coenzyme Q10 into the egg yolk of laying hens. *The J Poul. Sci.* 2010; 47(1): 28-33.

Karadas F, Pappas AC, Surai PF , Speake BK. The maternal effects of carotenoids (PX Agro) on the post hatch status of Carotenoids, Vitamin E and Coenzyme Q10 in the chicken. Abstract of the papers presented at the international symposium on carotenoids. 2005; *Carotenoid Science* 9: 158.

Karadas F, Pirgozliev V, Acamovic T , Bedford MR. The effects of dietary phytase activity on the concentration of Coenzyme Q10 in the liver of young turkeys and broilers. *Br. Poul. Abst.* . 2005; 1: 1-2.

Karadas F, Pirgozliev V, Pappas AC, Acamovic T , Bedford MR. Effects of different dietary phytase activities on the concentration of antioxidants in the liver of growing broilers. *J Anim. Phy. Anim. Nut.* 2010; 94(4): 519-526.

Kaup SM , Greger J. Effect of various chloride salts on the utilization of phosphorus, calcium, and magnesium. *The J Nut. Bioc.* 1990; 1(10): 542-548.

Keshavarz K. The effect of different levels of nonphytate phosphorus with and without phytase on the performance of four strains of laying hens. *Poult. Sci.* 2003; 82(1): 71-91.

Kies AK, De Jonge LH, Kemme PA , Jongbloed AW. Interaction between protein, phytate, and microbial phytase. In vitro studies. *J. Agri. Food. Chem.* 2006; 54(5): 1753-1758.

Kilberg M, Pan Y-X, Chen H , Leung-Pineda V. Nutritional control of gene expression: how mammalian cells respond to amino acid limitation. *Annu. Rev. Nutr.* 2005; 25: 59-85.

Kim W, Donalson L, Herrera P, Woodward C, Kubena L, Nisbet D, *et al.* Research note: Effects of different bone preparation methods (fresh, dry, and fat-free dry) on bone parameters and the correlations between bone breaking strength and the other bone parameters. *Poult. Sci.* 2004; 83(10): 1663-1666.

Konietzny U , Greiner R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *International Journal of Food Science & Technology.* 2002; 37(7): 791-812.

Konietzny U , Greiner R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food. Sci. Tech.* 2002; 37(7): 791-812.

Lee S , Bedford M. Inositol-An effective growth promotor? *World's Poult. Sci. J.* 2016; 72(4): 743-760.

Lemme A, Ravindran V , Bryden W. Ileal digestibility of amino acids in feed ingredients for broilers. *World. Poult. Sci. J.* 2004; 60(04): 423-438.

Lemme A, Ravindran V , Bryden WL. Ileal digestibility of amino acids in feed ingredients for broilers. *World. Poult. Sci. J.* 2004; 60(04): 423-438.

Li W, Angel R, Kim S-W, Brady K, Yu S , Plumstead P. Impacts of dietary calcium, phytate, and nonphytate phosphorus concentrations in the presence or absence of phytase on inositol hexakisphosphate (IP6) degradation in different segments of broilers digestive tract. *Poultry science.* 2016; 95(3): 581-589.

Li W, Angel R, Kim S-W, Jiménez-Moreno E, Proszkowiec-Weglarz M , Plumstead P. Age and adaptation to Ca and P deficiencies: 2. Impacts on amino acid digestibility and phytase efficacy in broilers. *Poultry science.* 2015; 94(12): 2917-2931.

Li W, Angel R, Kim S-W, Jiménez-Moreno E, Proszkowiec-Weglarz M , Plumstead P. Age and adaptation to Ca and P deficiencies: 2. Impacts on amino acid digestibility and phytase efficacy in broilers. *Poult. Sci.* 2015; 94: 273-279.

Lim H, Namkung H , Paik I. 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.

Lim H, Namkung H , Paik I. Effects of phytase supplementation on the performance, egg quality, and phosphorous excretion of laying hens fed different levels of dietary calcium and nonphytate phosphorous. *Poultry Science.* 2003; 82(1): 92-99.

Liu N, Liu G, Li F, Sands J, Zhang S, Zheng A, *et al.* Efficacy of phytases on egg production and nutrient digestibility in layers fed reduced phosphorus diets. *Poult. Sci.* 2007; 86(11): 2337-2342.

Liu N, Ru Y, Li F , Cowieson A. Effect of diet containing phytate and phytase on the activity and messenger ribonucleic acid expression of carbohydrase and transporter in chickens. *J. Anim. Sci.* 2008; 86(12): 3432-3439.

Maddaiah VT, Kurnick AA , Reid BL. Phytic Acid Studies. *Exp. Biol. Med.* 1964; 115(2): 391-393.

Maenz DD , Classen HL. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poult. Sci.* 1998; 77(4): 557-563.

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 in solution and in a slurry of canola meal. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 1999; 81(3): 177-192.

Martinez Rojas I, Ávila González E, Arce Menocal J, Dos Santos T, Rubio Arguello J , López Coello C. Assessment of a phytase included with lactic acid on productive parameters and on deposition of phosphorus, calcium, and zinc in laying hens fed with sorghum–soybean-meal-based diets. *J. Appli. Anim. Res.* 2017: 1-8.

Mattila P , Kumpulainen J. Coenzymes Q 9 and Q 10: Contents in foods and dietary intake. *J Food. Comp. Anal.* 2001; 14(4): 409-417.

Mellef J, Dridi A, Agrebi A , Belhaj O. Effets de l'ajout de phytase dans la ration alimentaire sur les performances de ponte des poules pondeuses. *R. Med. Vet.* 2011; 162(6): 304.

Menke T, Niklowitz P, Adam S, Weber M, Schlüter B , Andler W. Simultaneous detection of ubiquinol-10, ubiquinone-10, and tocopherols in human plasma

microsamples and macrosamples as a marker of oxidative damage in neonates and infants. *Anal. Bioc.* 2000; 282(2): 209-217.

Meyer E , Parsons C. The efficacy of a phytase enzyme fed to Hy-Line W-36 laying hens from 32 to 62 weeks of age. *The J. Appli. Poult. Res.* 2011; 20(2): 136-142.

Morgan N, Walk C, Bedford M , Burton E. In vitro versus in situ evaluation of the effect of phytase supplementation on calcium and phosphorus solubility in soya bean and rapeseed meal broiler diets. *Br. Poult. Sci.* 2014; 55(2): 238-245.

Morgan N, Walk C, Bedford M , Burton E. Contribution of intestinal-and cereal-derived phytase activity on phytate degradation in young broilers. *Poultry science.* 2015: pev108.

Nahm K. Efficient phosphorus utilization in poultry feeding to lessen the environmental impact of excreta. *World. Poult. Sci. J.* 2007; 63(04): 625-654.

Nielsen AVF, Nyffenegger C , Meyer AS. Performance of microbial phytases for gastric inositol phosphate degradation. *J. Agric. Food. Chem.* 2015; 63(3): 943-950.

Novak C, Yakout H , Scheideler S. The combined effects of dietary lysine and total sulfur amino acid level on egg production parameters and egg components in Dekalb Delta laying hens. *Poultry Science.* 2004; 83(6): 977-984.

Novak C, Yakout H , Scheideler S. The combined effects of dietary lysine and total sulfur amino acid level on egg production parameters and egg components in Dekalb Delta laying hens. *Poult. Sci.* 2004; 83(6): 977-984.

NRC (1994). *Nutrient Requirements of Poultry* National Academy Press, . Washington, DC. USA.

Onyango E, Bedford M , Adeola O. Phytase activity along the digestive tract of the broiler chick: A comparative study of an Escherichia coli-derived and Peniophora lycii phytase. *Can. J. Anim. Sci.* 2005; 85(1): 61-68.

Persson H, Türk M, Nyman M , Sandberg A-S. Binding of Cu²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ to inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates. *J. Agri. Food. Chem.* 1998; 46(8): 3194-3200.

Persson H, Türk M, Nyman M , Sandberg A-S. Binding of Cu²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ to inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates. *J Agr. Food. Chem.* 1998; 46(8): 3194-3200.

Pisoschi AM , Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry.* 2015; 97: 55-74.

Prattley C, Stanley D , VOORT F. Protein-phytate interactions in soybeans. II. Mechanism of protein-phytate binding as affected by calcium. *J. Food. Biochem.* 1982; 6(4): 255-272.

Pravst I, Žmitek K , Žmitek J. Coenzyme Q10 contents in foods and fortification strategies. *Critical Rev. Food. Sci. Nut.* 2010; 50(4): 269-280.

Ptak A, Bedford MR, Świątkiewicz S, Żyła K , Józefiak D. Phytase modulates ileal microbiota and enhances growth performance of the broiler chickens. *PloS One.* 2015; 10(3): e0119770.

Ravindran V, Selle P, Ravindran G, Morel P, Kies A , Bryden W. Microbial phytase improves performance, apparent metabolizable energy, and ileal amino acid digestibility of broilers fed a lysine-deficient diet. *Poult. Sci.* 2001; 80(3): 338-344.

Rezvani M, Kluth H, Elwert C , Rodehutschord M. Effect of ileum segment and protein sources on net disappearance of crude protein and amino acids in laying hens. *Br. Poult. Sci.* 2008; 49(1): 28-36.

Rostagno H, Albino L, Donzele J, Gomes P, Oliveira R, Lopes D, *y col.* Composição de alimentos e exigências nutricionais (Tabelas brasileiras para aves e suínos). Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. 2017.

Rutherford SM, Edwards AC , Selle PH. Effect of phytase on lysine-rice pollard complexes. *Manipulating Pig Production VI.* Australasian Pig Science Association. 1997: 248.

Said A , Hegsted D. Response of adult rats to low dietary levels of essential amino acids. *J. Nutr.* 1970; 100: 1363-1375.

Santos TAd, Geraldo A, Machado LC, Pelícia K, Simão SD , Vieira Filho JA. Digestible lysine levels for laying hens and their effects on egg quality. *Acta. Sci. Anim.* . 2014; 36(1): 41-47.

Scanes CG, Campbell R , Griminger P. Control of energy balance during egg production in the laying hen. *The J. Nutr.* 1987; 117(3): 605-611.

Scott T, Kampen R , Silversides F. The effect of phosphorus, phytase enzyme, and calcium on the performance of layers fed wheat-based diets. *Can. J. Anim. Sci.* 2000; 80(1): 183-190.

Selle P, Ravindran V, Cowieson A , Bedford M. Phytate and phytase. *Enzyme. Farm. Anim. Nutr.* 2010: 160-205.

Selle PH, Cowieson AJ, Cowieson NP , Ravindran V. Protein-phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. *Nutr. Res. Rev.* 2012; 25(01): 1-17.

Selle PH, Cowieson AJ, Cowieson NP , Ravindran V. Protein-phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. *Nutrition research reviews.* 2012; 25(01): 1-17.

Selle PH, Cowieson AJ , Ravindran V. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. *Livestock. Sci.* 2009; 124(1): 126-141.

Selle PH , Ravindran V. Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 2007; 135(1): 1-41.

Selle PH, Ravindran V, Ravindran G , Bryden WL. Effects of dietary lysine and microbial phytase on growth performance and nutrient utilisation of broiler chickens. *Asian. Australasian. J. Anim. Sci.* 2007; 20(7): 1100-1113.

Selle PH, Ravindran V, Ravindran G , Bryden WL. Effects of dietary lysine and microbial phytase on growth performance and nutrient utilisation of broiler chickens. *Asian Austr. J. Anim. Sci.* 2007; 20(7): 1100-1113.

Shastak Y, Zeller E, Witzig M, Schollenberger M , Rodehutschord M. Effects of the composition of the basal diet on the evaluation of mineral phosphorus sources and interactions with phytate hydrolysis in broilers. *Poult. Sci.* 2014; 93(10): 2548-2559.

Shaw A, Blake J , Moran E. Effects of flesh attachment on bone breaking and of phosphorus concentration on performance of broilers hatched from young and old flocks. *Poult. Sci.* 2010; 89(2): 295-302.

Sherr CJ , Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Gen. Dev.* 1995; 9(10): 1149-1163.

Shirley RB , Edwards HM. Graded levels of phytase past industry standards improves broiler performance. *Poult. Sci.* 2003; 82(4): 671-680.

Short F, Gorton P, Wiseman J , Boorman K. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 1996; 59(4): 215-221.

Silva E, Malheiros E, Sakomura N, Venturini K, Hauschild L, Dorigam J, *y col.* Lysine requirements of laying hens. *Livestock. Sci.* 2015; 173: 69-77.

Silva EP, Malheiros EB, Sakomura NK, Venturini KS, Hauschild L, Dorigam JCP, *y col.* Lysine requirements of laying hens. *Livestock Sci.* 2015; 173: 69-77.

Silva JHVd, Araujo JAd, Goulart CdC, Costa FGP, Sakomura NK , Furtado DA. Influência da interação fósforo disponível × fitase da dieta sobre o desempenho, os níveis plasmáticos de fósforo e os parâmetros ósseos de poedeiras comerciais. *Rev. Bras. Zoot.* 2008; 37: 2157-2165.

Silva JHVd, Araujo JAd, Goulart CdC, Costa FGP, Sakomura NK , Furtado DA. Influência da interação fósforo disponível× fitase da dieta sobre o desempenho, os níveis plasmáticos de fósforo e os parâmetros ósseos de poedeiras comerciais. *Rev. Bras. Zootec.* 2008: 2157-2165.

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.

Snow J, Douglas M , Parsons C. Phytase effects on amino acid digestibility in molted laying hens. *Poult. Sci.* 2003; 82(3): 474-477.

Solomon S. The eggshell: strength, structure and function. *Bri. Poult. Sci.* 2010; 51(sup1): 52-59.

Tamim N, Angel R , Christman M. Influence of dietary calcium and phytase on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chickens. *Poult. Sci.* 2004; 83(8): 1358-1367.

Thompson L , Yoon J. Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. *Journal of Food Science.* 1984; 49(4): 1228-1229.

Torii K, Yokawa T, Tabuchi E, Hawkins RL, Mori M, Kondoh T, *y col.* Recognition of deficient nutrient intake in the brain of rat with lysine deficiency monitored by functional magnetic resonance imaging, electrophysiologically and behaviorally. *Amino Acids.* 1996; 10(1): 73-81.

Truong H, Yu S, Peron A, Cadogan D, Khoddami A, Roberts T, *y col.* Phytase supplementation of maize-, sorghum-and wheat-based broiler diets with identified starch pasting properties influences phytate (IP 6) and sodium jejunal and ileal digestibility. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 2014; 198: 248-256.

Truong HH, Yu S, Peron A, Cadogan DJ, Khoddami A, Roberts TH, *y col.* Phytase supplementation of maize-, sorghum-and wheat-based broiler diets with identified starch pasting properties influences phytate (IP 6) and sodium jejunal and ileal digestibility. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 2014; 198: 248-256.

Vaintraub IA , Bulmaga VP. Effect of phytate on the in vitro activity of digestive proteinases. *J. Agri. Food. Chem.* 1991; 39(5): 859-861.

Van der Klis J, Versteegh H, Simons P , Kies A. The efficacy of phytase in corn-soybean meal-based diets for laying hens. *Poult. Sci.* 1997; 76(11): 1535-1542.

Van der Klis J, Versteegh H, Simons P, Kies A. The efficacy of phytase in corn-soybean meal-based diets for laying hens. *Poultry Science*. 1997; 76(11): 1535-1542.

Van Goudoever JB, Stoll B, Henry JF, Burrin DG, Reeds PJ. Adaptive regulation of intestinal lysine metabolism. *Proc. Nat. Aca. Sci.* 2000; 97(21): 11620-11625.

Vats P, Banerjee UC. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enz. Micro. Tech.* 2004; 35(1): 3-14.

Viana MTdS, Albino LFT, Rostagno HS, Barreto SLdT, Silva EAdU, Florentino WMU. Efeito da suplementação de enzima fitase sobre o metabolismo de nutrientes eo desempenho de poedeiras. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2009.

Vohra P, Gray GA, Kratzer FH. Phytic acid-metal complexes. *Exp. Biol. Med.* 1965; 120(2): 447-449.

Walk C (2014). Influence of the zinc to phytate ratio and superdoses of phytase on piglet growth performance. ADSA-ASAS Midwest Meeting, Asas.

Walk C, Santos T, Bedford M. Influence of superdoses of a novel microbial phytase on growth performance, tibia ash, and gizzard phytate and inositol in young broilers. *Poult. Sci.* 2014; 93(5): 1172-1177.

Walk CL, Santos TT, Bedford MR. Influence of superdoses of a novel microbial phytase on growth performance, tibia ash, and gizzard phytate and inositol in young broilers. *Poult. Sci.* 2014; 93(5): 1172-1177.

Wang Y, Hekimi S. Understanding Ubiquinone. *Tren. Cell Biol.* 2016; 26(5): 367-378.

Weaver JD, Ullah AHJ, Sethumadhavan K, Mullaney EJ, Lei XG. Impact of assay conditions on activity estimate and kinetics comparison of *Aspergillus niger* PhyA and *Escherichia coli* AppA2 phytases. *J. Agri. Food. Chem.* 2009; 57(12): 5315-5320.

Wilcock P, Walk CL (2016). Low phytate nutriion - what is the pig and poultry industry doing to counter dietary phytate as an anti-nutrient and how is it being applied? Phytate Destruction Consequencres for Precision Animal Nutrition. Walk CL, Kuhn I, Stein HH, Kidd MT y Rodehutscond M, Wageningen Academic. 86-106.

Wilson MS, Livermore TM, Saiardi A. Inositol pyrophosphates: between signalling and metabolism. *Bioch. J.* 2013; 452(3): 369-379.

Wyss M, Pasamontes L, Friedlein A, Rémy R, Tessier M, Kronenberger A, y col. Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999; 65(2): 359-366.

Xu P, Price J, Wise A, Aggett PJ. Interaction of inositol phosphates with calcium, zinc, and histidine. *Journal of inorganic biochemistry*. 1992; 47(2): 119-130.

Yildiz AO, Olgun O, Cufadar Y. The effect of manganese and phytase in the diet for laying hens on performance traits and eggshell quality. *J. Anim. Vet. Adv.* 2010; 9(1): 32-36.

Yu S, Cowieson A, Gilbert C, Plumstead P, Dalsgaard S. Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters (IP) including IP isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin. *J Anim. Sci.* 2012; 90(6): 1824-1832.

Yu S, Cowieson A, Gilbert C, Plumstead P , Dalsgaard S. Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters (IP) including IP isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin. *J. Anim. Sci.* 2012; 90(6): 1824-1832.

Zeller E, Schollenberger M, Kühn I , Rodehutscord M. Dietary effects on inositol phosphate breakdown in the crop of broilers. *Arch. Anim. Nutr.* 2016; 70(1): 57-71.

Zeller E, Schollenberger M, Kühn I , Rodehutscord M. Dietary effects on inositol phosphate breakdown in the crop of broilers. *Arc. Ani.Nut.* 2016; 70(1): 57-71.

Zeller E, Schollenberger M, Witzig M, Shastak Y, Kühn I, Hoelzle LE, *et al.* Interactions between supplemented mineral phosphorus and phytase on phytate hydrolysis and inositol phosphates in the small intestine of broilers. *Poult. Sci.* 2015; 94(5): 1018-1029.

Zhang Y, Aberg F, Appelkvist E-L, Dallner G , Ernster L. Uptake of dietary Coenzyme Q supplement is limited in rats. *J. Nutr.* 1995; 125: 446-453.

Zhang Y, Turunen M , Appelkvist E-L. Restricted uptake of dietary coenzyme Q is in contrast to the unrestricted uptake of alpha-tocopherol into rat organs and cells. *The J Nut.* 1996; 126(9): 2089.

Żyła K, Mika M, Duliński R, Świątkiewicz S, Koreleski J, Pustkowiak H, *et al.* Effects of inositol, inositol-generating phytase B applied alone, and in combination with 6-phytase A to phosphorus-deficient diets on laying performance, eggshell quality, yolk cholesterol, and fatty acid deposition in laying hens. *Poult. Sci.* 2012; 91(8): 1915-1927.

Cuadro 1. Efecto de la adición de cuatro dosis de una fitasa en tres niveles incrementales de lisina digestible sobre la concentración del ácido fólico y moléculas derivadas, y sobre el contenido de coenzima Q10 en hígado en gallinas Bovans White de 67 semanas de edad

P-Dis (%)	Fitasa (FTU/kg)	Lisina dig. (%)	Ins6P ^c	Ins5P	Ins4P	Ins3P	Ins2P	Inositol	CoQ10 ^b
0.12	0	0.67	4159	400	3 ^d	557	167 ^d	656	392.9 ^b
	300		2108	259	93 ^{cd}	554	546 ^b	871	338.8 ^{bc}
	1200		1859	205	45 ^{cd}	383	394 ^{bcd}	103	380.2 ^b
	4800		489	43	15 ^d	328	207 ^{cd}	629	---
	0	0.77	2991	362	49 ^{cd}	411	321 ^{bcd}	293	---
	300		1627	192	83 ^{cd}	380	373 ^{bcd}	450	---
	1200		701	78	34 ^{cd}	318	493 ^{bc}	78	---
	4800		326	43	5 ^d	303	452 ^{bcd}	841	---
	0	0.87	3260	640	769 ^a	648	921 ^a	441	607.5 ^a
	300		2424	428	334 ^b	511	911 ^a	572	300.5 ^{bcd}
	1200		1511	252	260 ^{bc}	376	963 ^a	1078	217.5 ^d
	4800		1480	283	123 ^{bcd}	350	1034 ^a	1145	---
0.25	0		4187	827	192 ^{bcd}	364	882 ^a	119	257.0 ^{cd}
		SEM	253.5	44.07	26.80	26.70	37.27	103.5	25.51
Promedio de Efectos Principales									
0.12	0		3470 ^a	467 ^b	273 ^a	539 ^a	470 ^b	463 ^{bc}	500.2 ^a
	300		2053 ^b	293 ^{bc}	170 ^{ab}	482 ^{ab}	610 ^b	631 ^{abc}	319.7 ^b
	1200		1357 ^{bc}	178 ^c	113 ^{bc}	359 ^c	617 ^b	963 ^a	298.8 ^b
	4800		765 ^c	123 ^c	48 ^c	327 ^c	564 ^b	871 ^{ab}	---
0.25	0		4187 ^a	827 ^a	192 ^{abc}	364 ^{bc}	882 ^a	119 ^c	257.0 ^b

0.12	0.67	2154 ^b	227 ^c	39 ^c	456 ^a	329 ^b	797	370.6
	0.77	1411 ^b	169 ^c	43 ^c	353 ^b	410 ^b	591	---
	0.87	2169 ^b	401 ^b	372 ^a	471 ^a	957 ^a	809	375.1
0.25		4187 ^a	827 ^a	192 ^b	364 ^{ab}	882 ^a	119	257.0
0.12		1911 ^b	265 ^b	151	427	565 ^b	732 ^a	372.9 ^a
0.25		4187 ^a	827 ^a	192	364	882 ^a	119 ^b	257.0 ^b
Valores-P (Significancia del Efecto)								
Phytase		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.025*	0.005**	<.0001
Lysine		0.025*	0.001	<.0001	0.001	<.0001	0.156	0.831
Lysine*Phytase		0.469	0.879	<.0001	0.289	0.011*	0.314	<.0001
AvP		<.0001	<.0001	0.392	0.191	<.0001	0.002**	0.001

^aEl contenido de CoQ10 es reportada en tres dosis de fitasa (0, 300, y 1200 FTU/kg) y dos niveles de lisina digestible (0.67 y 0.87%) en la dieta

^bCoenzima Q10

^cÉsteres bajos de inositol

Significancia estadística * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. ^{a-b} Muestran diferencia significativa entre las medias

Cuadro 2. Valores de probabilidad del análisis de regresión en las moléculas de la hidrólisis del ácido fólico y coenzima Q10

Variable	Lis	Fi	Fi C	Lis * Fi
Ins-6P	0.521	<.0001	<.0001	0.266
Fi	C	= 3317- 2.2201*Fi+ 0.0003522* Fi ^2		
Ins-5P^b	0.001***	<.0001	0.001***	0.692
Fi	C	= 502- 0.3696* Fi + 6.0625e-5* Fi ^2		
Ins-4P	<.0001	0.066*	0.375	0.038*
Lis	L	= -1038 + 1533.386*Lis		
Fi	L	= 206- 0.0361* Fi		
Ins-3P	0.649	0.001***	0.018*	0.539
Fi	C	= 504- 0.1431* Fi + 0.0000221* Fi ^2		
Ins-2P	<.0001	0.130	0.140	0.150
Lis	L	= -1857+ 3145.8509*Lis		
Inositol	0.671	<.0001	0.001***	0.006**
Fi	C	= 405 + 0.6058* Fi - 0.000106* Fi ^2		
Coenzim Q10^a	0.454	0.036*	---	0.059*
Fi	L	= 394.99152 - 0.0901973* Fi		

^aEl contenido de CoQ10 es reportada en tres dosis de fitasa (0, 300, y 1200 FTU/kg) y dos niveles de lisina digestible (0.67 y 0.87%) en la dieta

^bÉsteres bajos de inositol

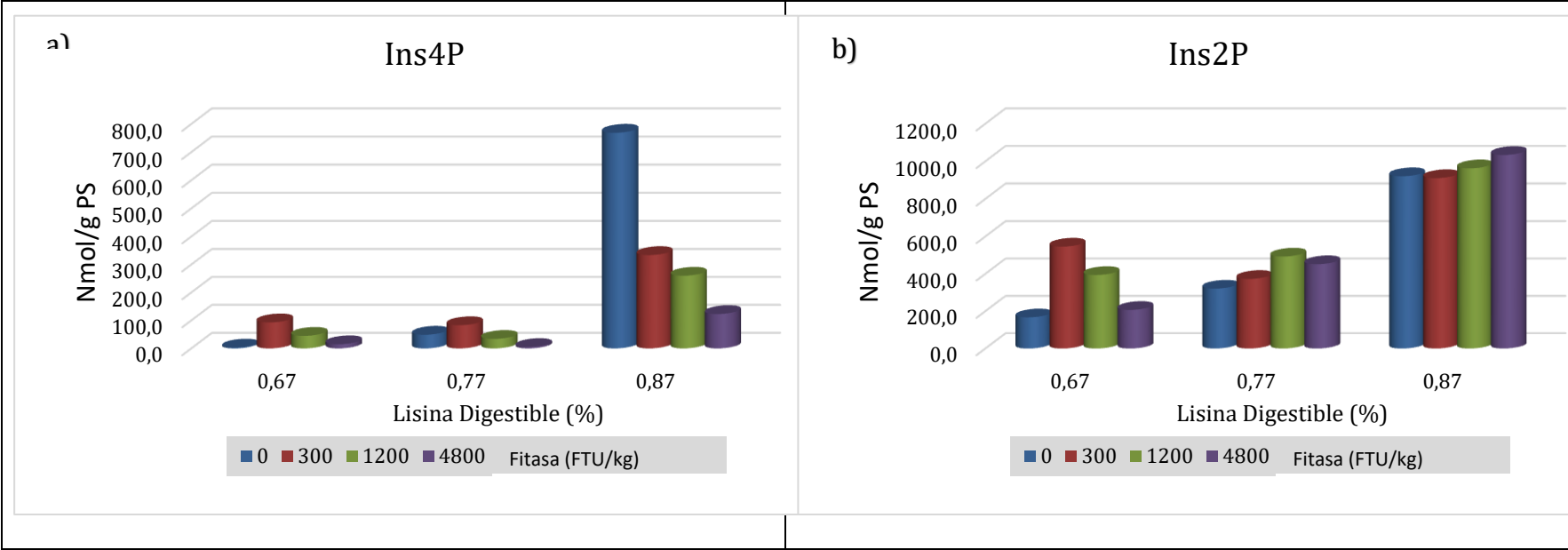
Cuadro 3. Coeficientes de correlación entre el contenido de coenzima Q10 y la digestibilidad de nutrientes y parámetros productivos en gallinas Bovans White de 67 semanas de edad

Variable	<i>p</i> value	Coefficiente de Pearson
Digestibilidad de Ca	NS	
Digestibilidad de P	0.064	-0.355
Digestibilidad de Lysine	NS	
Digestibilidad de Tyrosine	0.007	-0.496
Digestibilidad de AA Limitantes ¹	0.012	-0.469
Digestibilidad de AA no Limitantes ²	0.005	-0.518
Pérdida de Peso Corporal (%)	0.021	0.434
Grasa Abdominal (%)	0.059	-0.362
Consumo de Alimento (g)	NS	
Masa de Huevo (g)	0.070	-0.347
Ruptura en Hueso (kg/cm ³)	NS	

¹ Aminoácidos limitantes incluyen la arginina, cisteína, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, y valina.

² Aminoácidos no limitantes incluyen la alanina, asparagina, glutamato, glicina, prolina, serina, y tirosina.

Figura 1. Cuantificación de los ésteres de inositol fosfato 2 y 4 en la digesta de molleja de tres niveles de lisina digestible y cuatro dosis de fitasa en gallinas Bovans White de 67 semanas de edad



IMPPLICACIONES Y CONCLUSIONES

Con inclusiones de dosis altas de fitasa, es decir de superdosis, que en el caso de la gallina de postura corresponden a 1200 y 4800 FTU/kg, se obtuvo una mayor hidrólisis del ácido fólico con mayor contenido de ésteres bajos de inositol tipo 2 y 3 en molleja. Por lo tanto, se esperaba que el efecto negativo del ácido fólico sobre la disponibilidad de aminoácidos y minerales cationes positivos fuera atenuado. Por otra parte, el contenido de lisina digestible en la dieta influyó en el proceso de degradación del ácido fólico, sin que el alcance del presente estudio permitiera conocer la razón de este resultado. No obstante, teniendo en cuenta el lugar de muestreo y la naturaleza quelante del ácido fólico, podría pensarse en un efecto del catión cloruro de la lisina sintética sobre la solubilidad del ácido fólico, y por tanto cambiar su susceptibilidad a la fitasa. Por lo tanto, las futuras investigaciones *in vivo* deben estar encaminadas hacia la evaluación de dicho efecto de la lisina sobre el proceso hidrolítico del ácido fólico y su impacto en los procesos de digestión y absorción de nutrientes.

Aunque el efecto extra-fosfórico de la fitasa fue observado en la digestibilidad de aminoácidos, el contenido de lisina digestible de la dieta resultó ser un factor más influyente sobre la digestibilidad, así como también sobre el efecto de la dosis de la enzima. Por otro lado, el empleo en el organismo de la lisina a partir de la acción de la fitasa, está condicionado a la relación de éste aminoácido con las cantidades de los demás, por lo que no se puede tener solo en cuenta la liberación de lisina específicamente. Por lo tanto, en el presente estudio no fue posible obtener una equivalencia en el nivel de lisina con el uso de la fitasa, inclusive cuando se incluyó las superdosis. Es importante resaltar que el nivel de lisina digestible con mejor perfil nutritivo fue el máximo planteado, es decir de 0.87%, el cual es cercano al recomendado por la guía de manejo de la línea genética.

La inclusión de la fitasa permitió mejorar el intercambio de los iones Na y K en el intestino, aunque similar a lo ocurrido en los aminoácidos, el alcance del resultado positivo fue dependiente del nivel de lisina digestible en la dieta. Sí se tiene en cuenta

el rol destacado que el Na tiene en el proceso de absorción de nutrientes, estos resultados sugieren mejor desarrollo del proceso de digestión con la inclusión de la enzima. No obstante, en el caso de la gallina de postura el efecto positivo no pudo ser alcanzado por la dosis de 300 FTU/kg, ni con la inclusión de 4800 FTU/kg, en cuyo caso la presencia excesiva de nutrientes disponibles a partir de la dieta generó un desbalance en el proceso de absorción y por lo tanto una pérdida de dichos iones.

Así mismo, el uso de la superdosis también llevó a mayor disponibilidad de P, que fue absorbido y utilizado en procesos internos como formación de tejido óseo y mayor resistencia a la ruptura en tibia, sin ser notorio dicho efecto en el contenido de ceniza. Por lo tanto, el efecto fosfórico de la fitasa se incrementó con la superdosis, en comparación con la dosis estándar (300 FTU/kg), mismo que resultó ser similar a la disponibilidad obtenida con la adición de P inorgánico. Sí se toma en cuenta que existió mayor disponibilidad de inositol con la superdosis, específicamente con 1200 FTU/kg, es posible que en el caso de la gallina de postura, el mejor desempeño de esta dosis se deba a un incremento en la liberación de los nutrientes contenidos en la estructura del ácido fítico.

Por otro lado, a pesar que se esperaba un efecto positivo con la fitasa en la digestibilidad de minerales como el Zn, Fe, Cu, este no resultó ser significativo, posiblemente porque el contenido en la dieta ya cubría sus requerimientos. En el caso del Ca, que es mineral de gran importancia para la industria del huevo, no fue visto un efecto de la fitasa a pesar del marcado efecto de la enzima en la disponibilidad del P, lo cual hubiera afectado la absorción del Ca, teniendo en cuenta la estrecha relación de éste mineral con el P. Es posible que al igual que los demás minerales, los requerimientos del Ca ya fueran cubiertos por el aporte inorgánico de éste mineral en la dieta con el nivel de 3.5% de Ca total.

En parámetros productivos, el efecto del nivel de lisina sobre la acción de la fitasa solo se observó en la masa de huevo comercializable; teniendo en cuenta, que dicha variable condensa los resultados obtenidos en la cantidad producida de huevo como

la calidad del mismo, es importante considerar las interacciones de la fitasa con los niveles de lisina digestible. No obstante, las dietas con 1200 FTU/kg mostraron resultados positivos en la cantidad producida de huevo y en la preservación de las reservas corporales incluyendo la grasa abdominal, que resultaron ser de mayor significancia estadística. Por lo tanto, a pesar que la dieta suministrada era baja en P disponible, la inclusión de la superdosis permitió una producción de huevo eficiente sin necesidad de hacer uso de las reservas corporales, lo cual también sugiere un efecto más allá del P, dependiente de la dosis de la enzima usada. Por otro lado, la no significancia de la enzima en el peso de huevo pudo ser consecuencia del consumo máximo de alimento permitido, el cual también llevo a que el comportamiento del índice de conversión se viera positivamente influenciado por la adición de la fitasa. El efecto negativo en general evidenciado para la dosis de 4800 FTU/kg en la producción difiere con lo reportado en pollo de engorda, ya que con inclusiones hasta de 12000 FTU/kg no hay ningún efecto negativo, por lo que no es conveniente extrapolar información generada en la producción de carne hacia la producción de huevo.

Evidencia de condiciones más acorde a las necesidades biológicas fueron logradas con el uso de la fitasa, en particular con 1200 FTU/kg y también con el uso de 0.87% de lisina digestible, las cuales permitieron rangos más cercanos a la homeostasis en los procesos metabólicos en la gallina, lo que se vio reflejado en una menor necesidad en la síntesis de coenzima Q10 en hígado. Una vez más, esto resulta opuesto a lo reportado en pollo de engorda, y por tanto resalta la marcada diferencia entre las producciones y la necesidad de realizar investigación propia para el estatus fisiológico intrínseco de la gallina de postura, en una búsqueda constante hacia la eficiencia en la formación del huevo.