

## **RESUM / SUMMARY**



El principal objectiu d'aquest treball és estudiar els efectes que l'addició de fitasa microbiana en diferents tipus de dietes per a aus produeix tant en el seu valor nutritiu, com en els rendiments productius de les aus, i en el seu impacte mediambiental.

En l'assaig 1, es van avaluar i comparar els efectes de l'addició de fitasa microbiana sobre les millores del creixement, energia de la dieta i retenció mineral en dietes de morenc i blat. Un objectiu addicional va ser definir el nivell òptim de l'enzim per usar en dietes de blat. Es van assajar dietes amb dos cereals diferents (morenc o blat), amb dos nivells de fòsfor (4.5 i 2.7 g FNF/kg de pinso) i amb diferents nivells d'enzim fitasa aplicat en la dieta deficient de fòsfor. En dietes deficientes de fòsfor de morenc la inclusió de fitasa incrementà el pes final, consum mig diari i la concentració de cendres dels dits, i també augmentà la retenció de fòsfor total i retenció de calci. En dietes de blat, l'addició de fitasa microbiana a dietes deficientes de fòsfor va augmentar la concentració de cendres dels dits, i el coeficient de retenció aparent de fòsfor total des de 0.53 en dietes normal de fòsfor fins a 0.69-0.73 en dietes deficientes; en canvi, la retenció de calci no va variar. L'addició de fitasa no va fer variar l'excreció mineral en cap de les dietes estudiades. Basat en els valors més grans de  $R^2$ , els valors de pes final i de cendres dels dits van ser els indicadors més sensibles per avaluar la disponibilitat de P. Es van utilitzar equacions lineals per calcular els valors d'equivalència de P per FNF. Utilitzant la funció mitjana de P alliberat per fitasa microbiana a un nivell de FNF de 2.7 g/kg, va trobar-se que 605 U de fitasa podrien ser equivalents a 1 g de P.

En l'assaig 2, es van avaluar els efectes d'una fitasa microbiana en la millora del creixement, energia de la dieta i la retenció de minerals en dietes d'ordi sense o amb fitasa endògena. Els tractaments es diferenciaven per tenir dues concentracions diferents de FNF (4.5 i 2.7 g/kg de dieta), per l'ús d'ordi tractat o no, i per l'addició o no de 500 U/kg de pinso de fitasa microbiana en les dietes deficientes de P. La reducció de FNF en dietes de pollastres d'engreix va produir una disminució de la ingestió diària de pinso i del consum d'aigua i una reducció del creixement animal que va ser millorat per la inclusió de l'enzim fitasa en aquests pinsos. Els animals que menjaren pinsos contenint 4.5g FNF/kg o dietes de només 2.7g FNF/kg més 500 U enzim fitasa/kg van tenir

un creixement similar. La concentració de cendres del dit del peu, bon indicador de la retenció de fòsfor, va variar depenent el contingut de fòsfor de la dieta i la presència o no de l'enzim fitasa microbiana. La concentració de fòsfor i calci en el plasma també fou influïda per la concentració de fòsfor de la dieta i la presència o no de fitasa endògena. La inclusió de fitasa a dietes amb una concentració baixa de FNF incrementà els coeficients de retenció de fòsfor i reduí la presència d'aquest element en l'excreta del pollastre en més d'un 45%, indicant un efecte mediambiental favorable. En general, no s'observaren efectes per la presència o no de fitasa endògena de l'ordi.

En l'assaig 3, es van avaluar els efectes en la biodisponibilitat de fòsfor i altres minerals per l'addició de fitasa exògena a dietes de morenc i soja amb segó de blat, depenent de la presència o no d'activitat fitàsica endògena del segó de blat. Els tractaments van variar en funció del segó de blat utilitzat (tractat o no per l'autoclau), el nivell de inclusió del segó en la dieta (0, 5 o 10%) i la quantitat de fitasa exògena (500 U per kg de pinso). L'addició de fitasa microbiana va permetre millorar els paràmetres productius, sense que hi hagués variacions en la viscositat del contingut intestinal. Els valors energètics de les dietes augmentaren per l'addició de fitasa, no havent variacions importants en la digestibilitat de nutrients. La fitasa microbiana va fer augmentar la concentració en plasma de fòsfor no fític i la mineralització dels ossos, tal com ho demostra l'augment en la quantitat de fòsfor total en les cendres dels dits, encara que no es modifiquessin ni la retenció aparent ni l'excreció d'aquest mineral. L'eliminació de la fitasa endògena del segó de blat present en dietes de morenc-soja deficientes de fòsfor va suposar un menor consum de pinso i creixement dels animals i, també, una disminució en el fòsfor no fític en plasma. Les digestibilitats de nutrients i retencions minerals no variaren per l'eliminació de la fitasa endògena.

L'assaig 4 tenia com a principals objectius l'avaluació del creixement dels animals i de la biodisponibilitat de fòsfor i altres minerals depenent de la presència o no d'activitat fitàsica endògena en blat. També es va estudiar els efectes de diferents nivells de fitasa exògena, alguns més alts dels habituals. Els tractaments variaven en el blat emprat (tractat o no per l'autoclau), el nivell de FNF (4.5 i 2.7 g per kg de pinso) i el nivell de fitasa exògena (0, 500 i 5000 U per kg de pinso).

L'addició de fitasa exògena en dietes de blat deficitàries en fòsfor, i una elevada activitat fitàsica endògena, produeix unes millores en el creixement dels animals sense tenir una incidència sobre la retenció de minerals. Per altra banda, la eliminació de fitasa endògena produeix unes lleugeres reduccions en el creixement sense influir en la retenció ni excreció de minerals. La presència de la fitasa endògena del blat va produir un creixement major dels pollastres i un major consum de pinso i minerals, sense repercutir en l'energia de la dieta ni en la retenció aparent ni en l'excreció de fòsfor. L'addició d'una dosi superior a la d'ús habitual de fitasa no va influenciar el creixement dels pollastres. En canvi, sí que va tenir efectes en l'energia de les dietes i en una major concentració en plasma de fòsfor no fític.

En l'assaig 5, es van estudiar els efectes de la fitasa microbiana i d'enzims carbohidrasa, i les seves interaccions, en els valors energètics i la digestibilitat de nutrients en dietes riques en polisacàrids no amilacis (PNA) amb tres assaigs factorials 2×2 utilitzant broilers que menjaren dietes de moresc, blat o ordi. Les dietes contenien o no fitasa, amb o sense enzims carbohidrasa ( $\alpha$ -galactosidasa, xilanasa o  $\beta$ -glucanasa per les dietes de moresc, blat i ordi, respectivament). Les carbohidrases disminuïren la viscositat intestinal, mentre que la fitasa incrementava aquest paràmetre en les dietes de moresc. La fitasa augmentà l'EMA en les dietes de moresc, mentre que la  $\beta$ -glucanasa en dietes d'ordi millorava l'EMA i l'EMAn i la digestibilitat de matèria seca, midó,  $\beta$ -glucans i lípids. La xilanasa en dietes de blat millorà la digestibilitat de matèria seca i midó. La fitasa augmentà la retenció de fòsfor total en totes les dietes, i es van detectar interaccions significatives entre els enzims carbohidrasa i la fitasa en dietes de blat i ordi. La fitasa disminuï l'excreció de fòsfor en dietes de moresc i ordi, mentre que l' $\alpha$ -galactosidasa incrementava l'excreció de fòsfor en dietes de moresc. La retenció de calci va augmentar per l'addició de fitasa a les dietes de moresc i per la  $\beta$ -glucanasa en les d'ordi i, com a conseqüència, l'excreció de calci va disminuir per l'acció de la fitasa en les dietes de moresc i per la  $\beta$ -glucanasa en les d'ordi; la inclusió de xilanasa va disminuir la retenció de calci en les dietes de blat. Es va trobar una interacció entre la fitasa i la  $\beta$ -glucanasa en dietes d'ordi, reduint-se l'excreció de calci. En general, no es trobaren interaccions negatives

entre la fitasa i els enzims carbohidrasa, indicant que ambdós tipus d'enzims poden ser usats junts en pinsos de morenc, blat o ordi.

La sisena part d'aquesta memòria té com a objectiu confirmar la determinació de fosfats d'inositol mitjançant la tècnica de la ressonància magnètica nuclear (RMN) de fòsfor ( $P^{31}$ ). Les mostres analitzades corresponien als pinsos i als continguts intestinals dels cinc assaigs anteriors, mentre que en el segon assaig també s'analitzaren els continguts del pap, pedrer i cloaca, ja que un dels objectius va ser analitzar l'evolució dels fosfats d'inositol en quatre trams diferents del tub digestiu. Els resultats obtinguts mostraren que el RMN de  $P^{31}$  és una bona tècnica per a la determinació de fosfats d'inositol amb un nombre elevat de grups fosfats. Els fosfats d'inositol amb un nombre menor de grups fosfats no es pogueren determinar per la poca presència en les mostres. Pel que fa a la hidròlisi del fosfat d'inositol dins el tracte digestiu, s'ha pogut observar com va disminuint la concentració de l'hexafosfat d'inositol a compostos menors, encara que no s'observen fosfats d'inositol amb menys de quatre grups fosfats, i com, en general, hi ha un aprofitament molt elevat del fòsfor no fític obtingut a partir de la hidròlisi.

En general, la presència de fitasa microbiana en dietes deficientes de fòsfor ha mostrat un increment en la retenció de fòsfor i calci i, en conseqüència una disminució de la seva excreció, així com un augment en el creixement de l'animal, especialment en dietes que contenien morenc i en les d'ordi.

L'increment de la retenció de fòsfor per la fitasa microbiana, deguda al trencament de l'àcid fític, queda corroborada en els espectres de RMN. En aquest estudi, i mitjançant el RMN, hem pogut observar com la retenció de fòsfor no fític roman constant, essent la major retenció del fòsfor fític la que fa augmentar la del fòsfor total.

L'eliminació de la fitasa endògena no ha repercutit en el creixement dels animals o en la digestibilitat i retenció de nutrients pels pollastres d'engreix que menjaren dietes deficientes de fòsfor. Sembla que en el tub digestiu de l'animal és més eficaç la fitasa microbiana que no pas la fitasa vegetal, segons la poca activitat observada d'aquesta darrera.

En dietes riques en polisacàrids no amilacis i deficientes de fòsfor no s'han observat interaccions negatives entre l'acció de la fitasa i els enzims carbohidrasa. S'han observat interaccions positives relacionades amb la retenció i excreció de minerals en alguns casos, només observant-se una interacció negativa per l'índex de transformació de les dietes de moresc. Per tant, aquests dos tipus d'enzims poden combinar-se sense efectes en productivitat o la salut de l'animal.

The main objective of the present study is to evaluate the effects on nutritive value and bird performance of microbial phytase supplementation in different types of poultry diets, and its impact in the environment.

The aim of trial 1 was to evaluate and compare the effects of addition of microbial phytase on the improvement of performance, energy of diet and mineral retention in wheat- and corn-based diets. An additional objective was to define the optimum level of enzyme to be used in wheat-based diets. Treatments were based on two different cereals (corn or wheat), two concentrations of NPP (4.5 and 2.7 g NPP/kg of diet), and different levels of phytase on phosphorus deficient diets. In phosphorus deficient corn-based diets, inclusion of phytase increased final body weight, average daily feed consumption, and toe ash concentration, and also increased total phosphorus and calcium retention. In wheat diets, phytase supplementation to P-deficient diets increased toe ash concentration, and coefficient of apparent total phosphorus retention increased from 0.53 in P normal diets to 0.69-0.73 in P deficient diets, but not calcium retention. Phytase supplementation did not vary mineral excretion in any studied diet. Based on the higher  $R^2$  values, final body weight and toe ash value were the most sensitive indicators to assess P availability. Linear equations were used to calculate P equivalency values of phytase for non-phytate P. Using the average function of released P by microbial phytase derived at NPP level of 2.7 g/kg, 605 U of phytase could be equivalent to 1 g of P.

In trial 2, broilers were used to evaluate the effects of a microbial phytase on the improvement of performance, dietary energy and mineral retention, in barley diets with or without endogenous phytase. Treatments were based on two different concentrations of non-phytate P (4.5 g/kg and 2.7 g/kg), use of untreated or autoclaved barley, and addition or not of 500 U/kg feed of microbial phytase to the P-deficient diets. The reduction of NPP in broiler diets produced a decrease of daily feed intake and water consumption and a reduction of animal growth that was overcome by the inclusion of phytase enzyme in these feeds. Similar broiler performance was obtained feeding the animals with diets containing 4.5 g NPP/kg or with diets containing only 2.7 g NPP/kg plus 500 U



phytase enzyme/kg. The concentration of toe ash, a good indicator of phosphorus deposition, varied according to the dietary content of phosphorus and the presence or not of microbial phytase enzyme. Plasma concentrations of phosphorus and calcium were also influenced by dietary P concentrations and the presence or not of exogenous phytase. The inclusion of phytase enzyme to diets with a low concentration of NPP increased the coefficient of phosphorus retention and reduced the presence of this element in broiler excreta by up to 45%, thus indicating a favourable environmental effect. In general, no effects were observed due to the presence or not of endogenous barley phytase.

In trial 3, we studied the effects on phosphorus and other minerals bioavailability by addition of exogenous phytase in diets based on corn-soy bean plus wheat bran, according to the presence or not of endogenous phytase activity in wheat bran. Treatments varied in accordance with the wheat bran used (non treated or autoclaved), the concentration of wheat bran included in diet (0, 5 or 10%), and the amount of exogenous phytase (500 U per kilo of feed). Microbial phytase supplementation improved the productive parameters, although intestinal viscosity was not changed. Energetic values of diets increased with the addition of phytase, but no important variations in nutrient digestibility were found. Microbial phytase increased plasmatic concentration of phosphorus and bone mineralization, which is reflected in an augment in the concentration of total phosphorus in toe ash, even though apparent retention and excretion of this mineral were not modified. Elimination of endogenous phytase from the wheat bran present in phosphorus deficient corn-based diets implied a lesser food intake and bird performance, and, also, a decrease in the NPP in plasma. Nutrient digestibilities and mineral retentions were not changed by elimination of endogenous phytase.

The aim of trial 4 was to evaluate the animal performance and bioavailability of phosphorus and other minerals according to the presence or not of endogenous phytase activity from wheat. The effects of some levels of exogenous phytase higher than usual were also studied. Treatments differed in wheat used (non treated or autoclaved), concentration of non-phytate phosphorus (4.5

and 2.7 g of NPP/kg of feed) and the concentration of exogenous phytase (0, 500 and 5000 U/kg of feed). Exogenous phytase supplementation in phosphorus deficient wheat-based diets and high endogenous phytase activity produced improvements in broiler performance with no effect on mineral retention and excretion. On the other hand, elimination of endogenous phytase produced some slight reductions in growth without influence in mineral retention. Presence of wheat phytase produced a better broiler performance and a higher feed and mineral intake, with effect neither in diet energy nor in phosphorus apparent retention and excretion. Addition of a higher dose of phytase did not influence broiler performance, but the effects were present in diet energy and in a bigger plasmatic concentration of NPP.

The effects of microbial phytase and glycosidase enzymes, and their interactions, on energy values and nutrient digestibility in diets rich in non-starch polysaccharides (NSP) were studied in trial 5, designed as a three 2×2 factorial assays. Phytase was added or not to diets, with or without glycosidase enzymes ( $\alpha$ -galactosidase, xylanase, or  $\beta$ -glucanase for corn-, wheat- and barley-based diets, respectively). Glycosidases decreased intestinal viscosity, whereas phytase increased this parameter in corn diets. Phytase increased AME in corn diets, whereas  $\beta$ -glucanase in barley diets improved AME and AMEn, and digestibility of dry matter, starch,  $\beta$ -glucans, and lipid. Xylanase in wheat diets improved dry matter and starch digestibilities. Phytase increased total phosphorus retention in all diets, and significant interactions between glycosidase enzymes and phytase were detected in wheat and barley diets. Phytase decreased phosphorus excretion in corn and barley diets, whereas  $\alpha$ -galactosidase increased phosphorus excretion in corn diets. Calcium retention increased by phytase in corn diets and by  $\beta$ -glucanase in barley diets, and, consequently, calcium excretion decreased by phytase in corn-based diets and by  $\beta$ -glucanase in barley-based diets; xylanase inclusion decreased calcium retention in wheat diets. An interaction was detected between phytase and  $\beta$ -glucanase in barley diets, in which calcium excretion was reduced. In general, no negative interactions between phytase and glycosidase enzymes were found, indicating that both types of enzymes may be used together in feeds based on corn, wheat or barley.

The aim of the part six of the work was to confirm the determination of inositol phosphates by nuclear magnetic resonance (NMR) of phosphorus ( $P^{31}$ ). The analysed samples correspond to the feed and intestinal contents of the five previous trials, while in trial 2 contents of crop, gizzard, and cloaca were also studied, since one of the aim was to assess the evolution of inositol phosphates in four sections of the digestive system. The obtained results showed that NMR of  $P^{31}$  was a good method to determine inositol phosphates with a high number of phosphates groups. The inositol phosphates with a lesser phosphate groups were not determined due to their very low concentration in samples. With the study of the hydrolysis of inositol phosphate through digestive system, a decrease in the concentration of inositol hexaphosphate to lower components could be observed, although the compounds with less than four phosphates groups were no observed. In general, there is a bigger profit of non-phytate phosphorus as a result of the hydrolysis.

In general, microbial phytase added to phosphorus deficient diets showed an increment in retention of phosphorus and calcium, and, in consequence, a decrease in their excretion. An increment of animal performance has also observed, especially in diets with corn or barley.

The increment in phosphorus retention by microbial phytase, due to the release of phytic acid, is corroborated in the spectra of NMR. In this work, and by NMR, we could observe as non-phytate phosphorus keep on constant, being a higher phytate phosphorus retention that permits the increase of total phosphorus retention.

Elimination of endogenous phytase has not influenced animal performance or digestibility and retention of nutrients for broilers chickens that consumed phosphorus deficient diets. Microbial phytase seemed to be more efficient than vegetal phytase in digestive tract, according to the low activity observed in vegetal phytase.

No negative interactions between phytase and carbohydrase enzymes in phosphorus deficient and non-starch polysaccharides rich-diets have been observed. Positive interactions related to mineral retention and excretion were found in some cases, and only a negative interaction for feed to gain

ratio in corn diets was observed. So, this two class of enzymes could be combined with no effects on performance or health of birds.

**ÍNDIX DE CONTINGUTS**

<b>1. ESTAT DE LA QÜESTIÓ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1. Fòsfor .....	5
2.2. Calci .....	8
2.3. Fòsfor fític .....	9
2.3.1. Determinació de fòsfor fític .....	12
2.3.1.1. Cromatografia .....	12
2.3.1.2. Isotacoforèsi per capil laritat .....	14
2.3.1.3. Mètodes espectrefotomètrics .....	14
2.3.1.4. Espectroscòpia d'infraroig proper (NIRS) .....	15
2.3.1.5. Ressonància magnètica nuclear (RMN) .....	15
2.4 Fitasa .....	17
2.4.1. Fonts de fitasa .....	18
2.4.1.1. Fitases intestinals endògenes dels animals .....	18
2.4.1.2. Fitases endògenes contingudes en els ingredients de la dieta .....	18
2.4.1.3. Fitases d'origen microbià produïda per la flora digestiva .....	19
2.4.1.4. Fitases d'origen microbià de producció industrial .....	19
2.4.2. Classificació de les fitases .....	21
2.4.2.1. Histidina fitases o fosfatasa àcida histidina (HAP) .....	23
2.4.2.2. Fitases metalo-depenents .....	24
2.4.3. Producció i purificació de fitases .....	24
2.4.3.1. Fitases vegetals .....	24
2.4.3.2. Fitases de microorganismes .....	24
2.4.4. Mecanisme de reacció .....	25
2.4.5. Estabilitat tèrmica .....	28
2.4.6. Estudis de l'aplicació de fitasa en nutrició .....	29
2.4.6.1. Nutrició humana .....	29
2.4.6.2. Nutrició animal .....	31
2.4.6.2.1. Remugants .....	31
2.4.6.2.2. Pors .....	31
2.5 Cereals .....	44
2.5.1. Moresc .....	45
2.5.2. Blat .....	46
2.5.3. Ordi .....	46
2.6 Polisacàrids no amilacis (PNA) i enzims degradadors .....	50
2.6.1. $\beta$ -Glucans .....	52
2.6.2. Arabinxilans .....	53
2.6.3. $\alpha$ -Galactòsids .....	54
2.7 Utilització de la fitasa en la nutrició avícola .....	54
2.7.1. Efectes de la fitasa en els paràmetres productius .....	54
2.7.2. Efectes de la fitasa sobre la disponibilitat de proteïna i aminoàcids .....	55
2.7.3. Efectes de la fitasa sobre la disponibilitat de fòsfor .....	56
2.7.4. Efectes de la fitasa sobre la disponibilitat de minerals .....	57
2.8 Referències bibliogràfiques .....	70
<b>3. OBJECTIUS .....</b>	<b>91</b>

<b>4. EFECTES DE L'ADDICIÓ DE FITASA MICROBIANA EN EL CREIXEMENT DE BROILERS I BIODISPONIBILITAT I EXCRECIÓ MINERAL SEGONS EL TIPUS DE DIETA .....</b>	<b>97</b>
4.1. Introducció .....	99
4.2. Materials i mètodes .....	100
4.2.1. Maneig dels animals .....	100
4.2.2. Tractaments i disseny experimental .....	100
4.2.3. Fabricació del pinso i composició de les dietes .....	100
4.2.4. Anàlisis químiques .....	101
4.2.5. Paràmetres productius .....	101
4.2.6. Assaig de balanç .....	101
4.2.7. Estudis sobre la retenció de minerals .....	102
4.2.8. Càlculs .....	102
4.2.9. Anàlisi estadística .....	102
4.3. Resultats .....	103
4.3.1. Matèries primeres i pinsos .....	103
4.3.2. Paràmetres productius .....	103
4.3.3. Valors energètics i retenció mineral .....	104
4.4. Discussió .....	106
4.5. Referències bibliogràfiques .....	116
<b>5. EFECTE DE LA FITASA MICROBIANA EN BROILERS QUE MENJAREN DIETES D'ORDI EN PRESENCIA O NO DE FITASA ENDÒGENA .....</b>	<b>121</b>
5.1. Introducció .....	123
5.2. Materials i mètodes .....	124
5.2.1. Maneig dels animals .....	124
5.2.2. Tractaments i disseny experimental .....	124
5.2.3. Fabricació del pinso i composició nutricional de les dietes .....	124
5.2.4. Anàlisis químiques .....	125
5.2.5. Paràmetres productius .....	125
5.2.6. Prova de balanç .....	126
5.2.7. Estudis de retenció mineral .....	128
5.2.8. Cura dels animals .....	127
5.2.9. Càlculs .....	127
5.2.10. Anàlisi estadística .....	127
5.3. Resultats i discussió .....	128
5.3.1. Matèries primeres i pinsos .....	128
5.3.2. Paràmetres productius .....	128
5.3.3. Estudis de retenció mineral .....	130
5.4. Referències bibliogràfiques .....	140
<b>6. EFECTE DE L'ADDICIÓ DE FITASA MICROBIANA A DIETES BASEDES EN SUBPRODUCTES EN PRESENCIA O NO DE FITASA ENDÒGENA .....</b>	<b>145</b>
6.1. Introducció .....	147
6.2. Materials i mètodes .....	148
6.2.1. Maneig dels animals .....	148
6.2.2. Tractaments i disseny experimental .....	149
6.2.3. Fabricació del pinso i composició nutritiva de les dietes .....	149
6.2.4. Anàlisi química .....	149
6.2.5. Paràmetres productius i assaig de balanç .....	150

6.2.6. Estudis sobre la retenció de minerals .....	150
6.2.7. Cura dels animals .....	151
6.2.8. Càlculs .....	151
6.2.9. Anàlisi estadística .....	151
6.3. Resultats .....	152
6.3.1. Tractament del segó de blat .....	152
6.3.2. Paràmetres productius .....	152
6.3.3. Viscositat intestinal .....	153
6.3.4. Valors energètics i digestibilitat de nutrients .....	153
6.3.5. Efectes sobre la disponibilitat de minerals .....	154
6.4. Discussió .....	156
6.5. Referències bibliogràfiques .....	167
<b>7. EFECTE DE L'ADDICIÓ DE DIFERENTS NIVELLS DE FITASA MICROBIANA EN DIETES DE BLAT EN PRESENCIA O NO DE FITASA ENDÒGENA .....</b>	<b>173</b>
7.1. Introducció .....	175
7.2. Materials i mètodes .....	176
7.2.1. Maneig dels animals .....	176
7.2.2. Tractaments i disseny experimental .....	176
7.2.3. Fabricació del pinso i composició nutritiva de les dietes .....	177
7.2.4. Anàlisi química .....	177
7.2.5. Paràmetres productius i assaig de balanç .....	177
7.2.6. Estudis sobre la retenció de minerals .....	178
7.2.7. Cura dels animals .....	178
7.2.8. Càlculs .....	178
7.2.9. Anàlisi estadística .....	179
7.3. Resultats. ....	180
7.3.1. Paràmetres productius .....	180
7.3.2. Valors energètics .....	182
7.3.3. Efectes sobre la retenció de minerals .....	182
7.4. Discussió .....	185
7.5. Referències bibliogràfiques .....	197
<b>8. AVALUACIÓ DE LES POTENCIALS INTERACCIONS ENTRE L'ADDICIÓ DE FITASA I ENZIMS CARBOHIDRASA SOBRE LA DIGESTIBILITAT DE NUTRIENTS EN BROILERS .....</b>	<b>201</b>
8.1. Introducció .....	203
8.2. Materials i mètodes .....	204
8.2.1. Maneig dels animals .....	204
8.2.2. Tractaments i disseny experimental .....	204
8.2.3. Fabricació del pinso i composició nutricional de les dietes .....	204
8.2.4. Anàlisis químiques .....	205
8.2.5. Assaig de balanç .....	205
8.2.6. Càlculs .....	206
8.2.7. Anàlisi estadística .....	207
8.3. Resultats. ....	207
8.3.1. Paràmetres productius .....	207
8.3.2. Viscositat intestinal .....	208
8.3.3. Valors energètics .....	208
8.3.4. Digestibilitat de nutrients .....	208

8.3.5. Retenció de minerals .....	209
8.3.6. Avaluació de les interaccions entre enzims .....	210
8.4. Discussió .....	210
8.5. Referències bibliogràfiques .....	227
<b>9. DETERMINACIÓ DELS FOSFATS D'INOSITOL MITJANÇANT ESPECTROSCÒPIA DE RESONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR DE P<sup>31</sup>. RETENCIÓ DE FITAT EN EL TRACTE GASTROINTESTINAL DE BROILERS .....</b>	<b>233</b>
9.1. Introducció .....	235
9.2. Materials i mètodes .....	236
9.2.1. Materials .....	236
9.2.2. Preparació de les mostres .....	236
9.2.3. Anàlisi de les mostres .....	236
9.2.4. Origen de les mostres de pinsos i continguts intestinals .....	237
9.2.5. Càlculs .....	237
9.3. Resultats i discussió .....	238
9.4. Referències bibliogràfiques .....	255
<b>10. DISCUSSIÓ GENERAL .....</b>	<b>257</b>
<b>11. CONCLUSIONS .....</b>	<b>281</b>
<b>12. ANNEXES .....</b>	<b>287</b>
12.1 Determinació de fòsfor total .....	289
12.1.1. Introducció .....	289
12.1.2. Reactius i solucions .....	289
12.1.3. Procediment analític .....	289
12.1.4. Càlculs .....	290
12.1.5. Exactitud i precisió .....	290
12.1.6. Aspectes de seguretat i higiene .....	290
12.2 Determinació de l'activitat fitasa .....	291
12.2.1. Introducció .....	291
12.2.2. Reactius i solucions .....	291
12.2.3. Procediment analític .....	292
12.2.4. Càlculs .....	293
12.2.5. Exactitud i precisió .....	294
12.2.6. Aspectes de seguretat i higiene .....	294
12.2.7. Bibliografia .....	294



**LLISTA DE FIGURES****2. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA.**

<b>Figura 2.1.</b> Diagrama esquemàtic del metabolisme del fòsfor .....	<b>5</b>
<b>Figura 2.2.</b> Naturalesa del fòsfor contingut en les matèries primeres .....	<b>6</b>
<b>Figura 2.3.</b> Representació esquemàtica de l'àcid fític (A) i d'una sal amb diferents metalls quelats (B) .....	<b>10</b>
<b>Figura 2.4.</b> Representació de la hidròlisi de l'àcid fític per una 3-fitasa (fitasa microbiana) .....	<b>17</b>
<b>Figura 2.5.</b> Classificació de les fosfatases, presentant els dos grans grups de fitases: les histidina fitases i les fitases metalodependents .....	<b>22</b>
<b>Figura 2.6.</b> Representació esquemàtica de l'estructura amb els dos dominis de la fitasa <i>Aspergillus niger</i> .....	<b>23</b>
<b>Figura 2.7.</b> Esquema de la ruta de hidròlisi de fitasa .....	<b>26</b>
<b>Figura 2.8.</b> Ruta de degradació del fitat per fitasa de llegums .....	<b>27</b>
<b>Figura 2.9.</b> Ruta de desfosforilació de l'hexafosfat d'inositol per acció de la fitasa del segó de blat de <i>Triticum aestivum</i> L. cv Nourin #61 .....	<b>27</b>
<b>Figura 2.10.</b> Representació esquemàtica dels grans dels cereals emprats en la prova: 10.1) morenc (a, tall longitudinal; b, tall transversal), 10.2 blat (a, tall longitudinal; b, tall transversal) i 10.3 ordí .....	<b>48</b>
<b>Figura 2.11.</b> Classificació dels carbohidrats .....	<b>51</b>

**9. DETERMINACIÓ DELS FOSFATS D'INOSITOL MITJANÇANT ESPECTROSCÒPIA DE RESONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR DE P<sup>31</sup>. RETENCIÓ DE FITAT EN EL TRACTE GASTROINTESTINAL DE BROILERS.**

<b>Figura 9.1.</b> Espectres obtinguts en l'anàlisi per RMN de P <sup>31</sup> desacoblat de H <sup>1</sup> . a) pinso, b) contingut del tub digestiu .....	<b>239</b>
<b>Figura 9.2.</b> Representació de la concentració dels compostos fosfats en cada tram del tracte gastrointestinal avaluat dels animals emprats en l'assaig 2. a) P no fític, b) IP <sub>6</sub> , c) IP <sub>5</sub> , d) IP <sub>n</sub> (n<5), e) P total .....	<b>248</b>

**10. DISCUSSIÓ GENERAL.**

<b>Figura 10.1.</b> Gràfiques comparatives del pes mig final, energia metabolitzable aparent, percentatge de cendres dels dits i retenció aparent de fòsfor total entre els resultats obtinguts en l'assaig 2 i l'assaig 4 .....	<b>266</b>
--	------------

**LLISTA DE TAULES****2. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA.**

<b>Taula 2.1.</b> Percentatge de fòsfor total i de fòsfor fític, relació entre el fòsfor fític i el fòsfor total present, i activitat fitàsica en diferents matèries primeres vegetals .....	<b>7</b>
<b>Taula 2.2.</b> Concentració de fòsfor en diferents fosfats inorgànics d'origen mineral .....	<b>8</b>
<b>Taula 2.3.</b> Activitat fitàsica d'ingredients de la dieta .....	<b>20</b>
<b>Taula 2.4.</b> Llista de microorganismes productors de fitasa .....	<b>21</b>
<b>Taula 2.5a.</b> Efectes de l'addició de fitasa en dietes de porcs sobre els paràmetres productius .....	<b>32</b>
<b>Taula 2.5b.</b> Efectes de l'addició de fitases en dietes de porcs sobre la digestibilitat de nutrients ..	<b>35</b>
<b>Taula 2.5c.</b> Efectes de l'addició de fitasa en dietes de porcs sobre els paràmetres productius i els de digestibilitat de nutrients .....	<b>39</b>
<b>Taula 2.6.</b> Requeriments en la dieta de fòsfor no fític i relació Ca:P per varies classes de porcs ..	<b>44</b>
<b>Taula 2.7.</b> Nomenclatura i acció dels enzims degradadors de $\beta$ -glucans .....	<b>52</b>
<b>Taula 2.8a.</b> Efectes de l'addició de fitasa en dietes de pollastres .....	<b>60</b>
<b>Taula 2.8b.</b> Efectes de l'addició de fitasa en dietes de gallines .....	<b>66</b>
<b>Taula 2.8c.</b> Efectes de l'addició de fitasa en dietes de gall dindi i d'altres animals .....	<b>69</b>

**4. EFECTES DE L'ADDICIÓ DE FITASA MICROBIANA EN EL CREIXEMENT DE BROILERS I BIODISPONIBILITAT I EXCRECIÓ MINERAL SEGONS EL TIPUS DE DIETA.**

<b>Taula 4.1.</b> Tractaments experimentals avaluats .....	<b>111</b>
<b>Taula 4.2.</b> Composició de les dietes base experimentals .....	<b>112</b>
<b>Taula 4.3.</b> Activitat fitàsica trobada en les dietes experimentals .....	<b>112</b>
<b>Taula 4.4.</b> Paràmetres productius de broilers que menjaren les dietes experimentals .....	<b>113</b>
<b>Taula 4.5.</b> Energia metabolitzable aparent de les dietes experimentals .....	<b>114</b>
<b>Taula 4.6.</b> Concentracions de cendres dels dits i de minerals en l'excreta; retenció aparent de fòsfor total i calci de les dietes .....	<b>114</b>
<b>Taula 4.7.</b> Ingesta i excreció diària de minerals dels animals que menjaren les dietes experimentals .....	<b>115</b>
<b>Taula 4.8.</b> Equacions de resposta per pes final i cendres de dits de broilers que menjaren dietes de blat amb nivells creixents de fòsfor no fític i de fitasa afegida .....	<b>116</b>
<b>Taula 4.9.</b> Valors calculats d'equivalència de fòsfor per a dietes de blat .....	<b>116</b>

**5. EFECTE DE LA FITASA MICROBIANA EN BROILERS QUE MENJAREN DIETES D'ORDI EN PRESENCIA O NO DE FITASA ENDÒGENA.**

<b>Taula 5.1.</b> Tractaments experimentals .....	<b>132</b>
<b>Taula 5.2.</b> Composició de les dietes base .....	<b>133</b>
<b>Taula 5.3.</b> Efecte del procés d'autoclau (105°C) en les característiques de l'ordi .....	<b>134</b>
<b>Taula 5.4.</b> Activitat fitàsica determinada per anàlisi en les dietes experimentals.....	<b>134</b>
<b>Taula 5.5.</b> Paràmetres productius (7-21 dies) .....	<b>135</b>
<b>Taula 5.6.</b> Consum de pinso i agua (14-17 dies), viscositat intestinal estudiada al final del període i percentatge de culs bruts (11 dies) .....	<b>136</b>
<b>Taula 5.7.</b> Energia metabolitzable aparent de les dietes experimentals .....	<b>137</b>
<b>Taula 5.8.</b> Composició mineral del plasma de broiler, concnetració de matèria seca i de cendres dels dits, i pes de pàncreas expressat com a % de pes corporal .....	<b>138</b>
<b>Taula 5.9.</b> Retenció aparent i excreció de fòsfor total i de calci de les dietes experimentals .....	<b>139</b>

## **6. EFECTE DE L'ADDICIÓ DE FITASA MICROBIANA A DIETES BASADES EN SUBPRODUCTES EN PRESENCIA O NO DE FITASA ENDÒGENA.**

<b>Taula 6.1.</b> Tractaments experimental emprats .....	<b>162</b>
<b>Taula 6.2.</b> Activitat fitàsica trobada en les dietes experimentals .....	<b>162</b>
<b>Taula 6.3.</b> Composició de les dietes experimentals .....	<b>163</b>
<b>Taula 6.4.</b> Paràmetres productius 1-21 dies .....	<b>164</b>
<b>Taula 6.5.</b> Consum d'aigua i pinso entre els dies 15 i 19, i viscositat intestinal al final de la prova .....	<b>164</b>
<b>Taula 6.6.</b> Energia metabolitzable aparent de les dietes experimentals .....	<b>165</b>
<b>Taula 6.7.</b> Composició mineral del plasma, i composició dels dits dels animals .....	<b>166</b>
<b>Taula 6.8.</b> Retenció aparent, ingesta i excreció de fòsfor total de les dietes experimentals .....	<b>167</b>

## **7. EFECTE DE L'ADDICIÓ DE DIFERENTS NIVELLS DE FITASA MICROBIANA EN DIETES DE BLAT EN PRESENCIA O NO DE FITASA ENDÒGENA.**

<b>Taula 7.1.</b> Tractaments experimental emprats .....	<b>191</b>
<b>Taula 7.2.</b> Composició de les dietes experimentals .....	<b>192</b>
<b>Taula 7.3.</b> Activitat fitàsica trobada en les dietes experimentals .....	<b>193</b>
<b>Taula 7.4.</b> Paràmetres productius al final de la prova .....	<b>193</b>
<b>Taula 7.5.</b> Consum d'aigua i pinso entre els dies 15 i 19, i viscositat intestinal al final de la prova .....	<b>194</b>
<b>Taula 7.6.</b> Valors energètics de les dietes experimentals, i digestibilitat ileal de proteïnes .....	<b>194</b>
<b>Taula 7.7.</b> Composició mineral del plasma i composició dels dits dels animals .....	<b>195</b>
<b>Taula 7.8.</b> Excreció mineral i retenció aparent de fòsfor total i calci de les dietes experimentals .....	<b>196</b>
<b>Taula 7.9.</b> Ingesta mineral diària .....	<b>197</b>

## **8. AVALUACIÓ DE LES POSSIBLES INTERACCIONS ENTRE L'ADDICIÓ DE FITASA I ENZIMS CARBOHIDRASA SOBRE LA DIGESTIBILITAT DE NUTRIENTS EN BROILERS.**

<b>Taula 8.1.</b> Tractaments experimentals .....	<b>216</b>
<b>Taula 8.2.</b> Composició de les dietes base .....	<b>217</b>
<b>Taula 8.3.</b> Paràmetres productius dels broilers que menjaren dietes de moresc .....	<b>218</b>
<b>Taula 8.4.</b> Paràmetres productius dels broilers que menjaren dietes de blat .....	<b>219</b>
<b>Taula 8.5.</b> Paràmetres productius dels broilers que menjaren dietes d'ordi .....	<b>220</b>
<b>Taula 8.6.</b> EMA, EMAn, coeficients de digestibilitat de matèria seca, lípids i midó en broilers que menjaren dietes de moresc .....	<b>221</b>
<b>Taula 8.7.</b> EMA, EMAn, coeficients de digestibilitat de matèria seca, lípids i midó en broilers que menjaren dietes de blat .....	<b>222</b>
<b>Taula 8.8.</b> EMA, EMAn, coeficients de digestibilitat de matèria seca, lípids i midó en broilers que menjaren dietes d'ordi .....	<b>223</b>
<b>Taula 8.9.</b> Coeficients de retenció i excrecions de fòsfor total i calci en broilers que menjaren dietes de moresc .....	<b>224</b>
<b>Taula 8.10.</b> Coeficients de retenció i excrecions de fòsfor total i calci en broilers que menjaren dietes de blat .....	<b>225</b>
<b>Taula 8.11.</b> Coeficients de retenció i excrecions de fòsfor total i calci en broilers que menjaren dietes d'ordi .....	<b>226</b>

## **9. DETERMINACIÓ DELS FOSFATS D'INOSITOL MITJANÇANT ESPECTROSCÒPIA DE RESONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR DE P<sup>31</sup>. RETENCIÓ DE FITAT EN EL TRACTE GASTROINTESTINAL DE BROILERS.**

<b>Taula 9.1.</b> Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de P <sup>31</sup> en pinsos i continguts intestinals de l'Assaig 1 i recuperació de fòsfor total en els pinsos .....	<b>249</b>
---	------------

<b>Taula 9.2a.</b> Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de $P^{31}$ i recuperació de fòsfor total en els pinsos de l'Assaig 2 .....	<b>250</b>
<b>Taula 9.2b.</b> Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de $P^{31}$ en continguts de pap i pedrer de l'Assaig 2 .....	<b>250</b>
<b>Taula 9.2c.</b> Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de $P^{31}$ en continguts ileal i cloaca de l'Assaig 2 .....	<b>250</b>
<b>Taula 9.3.</b> Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de $P^{31}$ en pinsos i continguts intestinals de l'Assaig 3 i recuperació de fòsfor total en els pinsos .....	<b>251</b>
<b>Taula 9.4.</b> Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de $P^{31}$ en pinsos i continguts intestinals de l'Assaig 4 i recuperació de fòsfor total en els pinsos .....	<b>252</b>
<b>Taula 9.5.</b> Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de $P^{31}$ en pinsos i continguts intestinals de l'Assaig 5 i recuperació de fòsfor total en els pinsos .....	<b>253</b>
<b>Taula 9.6.</b> Retenció aparent ileal de fòsfor total, fòsfor no fític i $IP_6$ dels animals emprats en l'assaig 2 .....	<b>254</b>
<b>Taula 9.7.</b> Retenció aparent ileal de fòsfor total, fòsfor no fític i $IP_6$ dels animals emprats en l'assaig 3 .....	<b>254</b>
<b>Taula 9.8.</b> Retenció aparent ileal de fòsfor total, fòsfor no fític i $IP_6$ dels animals emprats en l'assaig 4 .....	<b>254</b>

**CLAU D'ABREVIATURES**

**AME:** apparent metabolizable energy

**AMEn:** nitrogen-corrected apparent metabolizable energy

**d:** dies

**EMA:** energia metabolitzable aparent

**EMAn:** energia metabolitzable aparent corregida per una retenció de nitrogen zero

**FNF:** fòsfor no fític

**IPn:** fosfats d'inositol ( $n \leq 6$ )

**mPa.s:** miliPascal per segon

**NMR:** nuclear magnetic resonance

**NPP:** non-phytate phosphorus

**NS:** no significatiu estadísticament

**NSP:** non-starch polysaccharides

**PNA:** polisacàrids no amilacis

**RMN:** ressonància magnètica nuclear

**SE:** suplementació enzimàtica

**U:** unitats

**vs:** versus