

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

J. JUANPERE¹, A. M. PÉREZ-VENDRELL¹, E. ANGULO² i J. BRUFAU¹

¹Departament de Nutrició Animal, IRTA, Centre Mas Bové, Apartat 415, 43280 Reus, Espanya.

²Departament de Producció Animal, UDL, Alcalde Rovira Roure, 177, 25198, Lleida, Espanya.

Animal Feed Science and Technology (enviat)

4.1. Introducció

El fòsfor és un mineral essencial pel creixement animal. Però el fòsfor present en les llavors és en forma de fòsfor fític que no és disponible, degut a la manca o a la limitació de la fitasa endògena en l'aviram. El fòsfor fític es troba unit a alguns cations, com Ca, Mg i K, a proteïnes i a lípids, produint sals insolubles. La baixa utilització del fòsfor fític causa l'addició en excés de fòsfor no fític en el pinso, provocant alguns problemes, com un increment en l'excreció de fòsfor, i consegüentment indueix a problemes mediambientals.

El moresc i el blat són els dos principals cereals emprats en el pinso per a aviram. Els beneficis de la fitasa en dietes de moresc estan ben documentats per a la nutrició de broilers i gallines (Simons i col., 1990; Broz i col., 1994; Mitchell i Edwards, 1996; Van der Klis i col., 1997; Um i Paik, 1999). L'addició de fitasa també té efectes positius en la biodisponibilitat de minerals en broilers (Broz i col., 1994; Sebastian i col., 1996a; Yi i col., 1996; Camden i col., 2001). Encara que el percentatge de fòsfor fític en ambdós cereals és similar (70-80% del fòsfor total pel moresc i 60-80% pel blat, Reddy i col., 1989), la quantitat de fitasa endògena és la principal diferència entre els cereals. Mentre que l'activitat fitàsica endògena del moresc és molt baixa (15 U/kg), l'activitat fitàsica endògena del blat es troba entre 1000 i 1400 U/kg (Eeckhout i De Paepe, 1994), que podria tenir un efecte en la disponibilitat del fòsfor fític. Tanmateix, s'han realitzat pocs estudis al voltant de la inclusió de fitasa en dietes de blat per a pollastres d'engreix (Ravindran i col., 1999; Zyla i col., 1999; Rutherford i col., 2002).

El principal objectiu d'aquest assaig va ser avaluar les millores degudes a l'addició de fitasa microbiana en dietes de blat (amb una elevada activitat fitàsica endògena), i comparar-los amb els resultats obtinguts per les dietes de moresc, sense activitat fitàsica endògena. També es va intentar determinar el nivell òptim de l'enzim fitasa pel cas de les dietes de blat.

4.2. Materials i mètodes

4.2.1. Maneig dels animals

Es van utilitzar dos vuitanta-vuit pollastres broiler de l'estirp Ross 308 d'1 dia de vida. Només es van fer servir els animals lliures de qualsevol senyal clínic (això és, sense problemes de potes o altres membres, ulls oberts i comportament actiu). Els pollastres es posaren en 48 gàbies situades en dues bateries Petersime¹ provē des de calefacció elèctrica i ventilació forçada, en una habitació sense finestres. Els animals van tenir 23 hores de llum i 1 hora de foscor des del dia 1 fins al 4, 20 h de llum des del dia 4 al 10, i 18 h de llum des del dia 10 fins al final de la prova. Durant la primera setmana, la temperatura de la sala era de 30 – 35°C, entre 29 i 32°C durant la segona setmana, i la darrera setmana entre 27 i 30°C. El pinso en farina i l'aigua es van subministrar *ad libitum* durant tot l'assaig. La prova va acabar als 24 dies.

4.2.2. Tractaments i disseny experimental

Es van usar quatre tipus de dietes que diferien en el cereal emprat (morenc o blat) i en dos nivells de fòsfor no fític (FNF): 4.5 g/kg (P-normal) i 2.7 g/kg (P-deficient). A les dietes de morenc es va afegir una sola dosi de l'enzim fitasa (600 FTU/kg), mentre que per les dietes de blat es va fer un estudi dosi-resposta amb diferents nivells de l'enzim (0, 200, 400, 600 FTU/kg), com es pot observar en la Taula 4.1. Cada tractament experimental es va replicar sis vegades i cada rèplica contenia vuit broilers mascles.

4.2.3 Fabricació del pinso i composició de les dietes

Tots els ingredients (excepte el llard, la sal, el fosfat bicàlcic, el carbonat càlcic, el corrector vitamínic i mineral i els productes provats) es van moldre a en un molí de 30 CV, a una mida de sedàs de 3 mm. Es va utilitzar una sola dieta per a tot l'assaig. La composició de les dietes base es mostra en la Taula 4.2. El blat va ser de la varietat Cartaya de la collita de 1998. La fitasa microbiana (EC 3.1.3.8) emprada en aquest estudi va ser Natuphos 5000G de BASF. A partir del

¹ Petersime Incubator Company, Gettysburg, Ohio, USA.

dia 18, es va incloure en les dietes 5 g de òxid de titani (IV) per quilo de pinso com a marcador de digestibilitat.

4.2.4. Anàlisis químiques

Totes les mostres de dietes experimentals i matèries primeres es van moldre a 0.5 mm abans d'analitzar. Les mostres s'analitzaren segons els mètodes oficials acceptats per l'AOAC (1990) per a matèria seca (codi 934.01), proteïna bruta (976.05), extracte eteri (920.39), cendres (942.05) i fibra bruta (978.10). La concentració de fòsfor total es va analitzar espectrofotomètricament pel mètode de molibdo-vanadat (965.17; AOAC, 1990). Les concentracions de calci i zinc es van analitzar per espectrofotometria d'absorció atòmica per flama. L'activitat fitàsica present en les matèries primeres i dels pinsos finals es van analitzar segons Engelen i col. (1994). En les matèries primeres, es va determinar el contingut de fòsfor fític seguint el mètode descrit per Haug i Lantzschi (1983). La concentració de diòxid de titani present en pinsos i excretes es va analitzar segons Short i col. (1996).

4.2.5. Paràmetres productius

Els pollastres es van pesar conjuntament a l'arribada a la granja, i per lot als 21 dies. El consum de pinso, guany mig diari i l'índex de transformació es van calcular en el període comprès entre els 0 i 21 dies. La mortalitat es registrà cada dia, incloent la causa de la mort. El dotzè dia es va avaluar el percentatge d'animals amb els culs bruts. El consum d'aigua i de pinso i la relació aigua/pinso es va registrar des del dia 15 fins al 17. Al final de l'assaig, es van emprar tots els animals per obtenir la concentració de cendres en dits, com a indicador de la deposició de fòsfor (qualitat de l'os), segons el mètode descrit per Potter i col. (1995).

4.2.6. Assaig de balanç

Es va utilitzar el mètode de marcador, amb òxid de titani (IV) per determinar l'energia metabolitzable aparent (EMA) i les retencions aparents de fòsfor total, calci i zinc de les dietes experimentals. En el dia 21 es van recollir les excretes, durant un període curt de temps, es van guardar a -20°C, i finalment es van liofilitzar. Posteriorment, les mostres d'excreta es van moldre i

guardar per a analitzar. Va determinar-se l'energia bruta de les mostres de pinsos i excreta mitjançant un calorímetre adiabàtic IKA C-400 (DIN 51900, 1977) per obtenir l'EMA.

4.2.7. Estudis sobre la retenció de minerals

En el vint-i-dosè dia es van sacrificar totes els animals per injecció intravenosa de pentobarbital sòdic per tal de recollir mostres. Es van tallar els dits del mig de tots els animals (entre el segon i en tercer tars), en van guardar i pesar, i calcinar per tal d'obtenir els valors de cendres dels dits (Cabahug i col., 1999). Tots els procediments van ser aprovats per la Comissió Ètica d'Experimentació Animal de l'IRTA.

4.2.8. Càlculs

Els valors d'EMA de les dietes es van calcular mitjançant la fórmula següent, fent-se les correccions apropiades per les diferències en el contingut d'humitat.

$$EMA = EB_{al} - [(TiO_{2,al} / TiO_{2,exc}) \times EB_{exc}]$$

on EB_{al} és l'energia bruta del pinso, EB_{exc} és l'energia bruta de l'excreta, $TiO_{2,al}$ és la concentració de diòxid de titani en el pinso i $TiO_{2,exc}$ el contingut de diòxid de titani en l'excreta.

Els valors d'energia metabolitzable corregida per una retenció de nitrogen zero ($EMAn$) de les dietes es van calcular segons la fórmula següent:

$$EMAn_{,al} = EMA - [(Guany Mig Diari \times 200 \times 8.22) / (Consum Mig Diari \times 6.25)]$$

Les correccions es van fer assumint que el guany de pes està format per 200 g de proteïna per quilo guanyat (Blum i col., 1977), que la proteïna equival a 6.25 vegades el nitrogen Kjeldahl i que l'equivalent d'energia és 8.22 kcal/g N guanyat.

Els coeficients de digestibilitat ileal aparent de nutrients es van calcular de la següent manera, emprant el procediment de marcador inert:

$$Dig X = \{ 1 - [(TiO_{2,al} \times X_{exc}) / (TiO_{2,exc} \times X_{al})] \}$$

On X_{al} és la concentració en la dieta i X_{exc} és la concentració en l'excreta.

4.2.9. Anàlisi estadística

Les dades es varen analitzar amb una anàlisi de variança amb disseny de blocs a l'atzar, emprant els procediments del General Linear Model (GLM) del Statistical Analysis System Institute Inc. (1985). Els efectes estadístics es van analitzar per cada tipus de dieta (morenc o blat). Les diferències significatives registrades entre les mitjanes dels tractaments per a cada paràmetre es van comparar pel test de Duncan de rangs múltiples amb un 5% de nivell de probabilitat.

Els efectes principals del nivell de FNF i de l'addició de fitasa microbiana van ser analitzats pels següents grups de contrastos lineals:

- a) Nivell de FNF: T-1 i T-4 enfront de T-2 i T-5.
- b) Addició de fitasa microbiana: T-2 i T-5 enfront de T-3 i T-8.

En les dietes de blat, es van examinar les equacions lineals i no lineals dels paràmetres avaluats per a fòsfor no fític (sense fitasa afegida) i per a fitasa afegida en les dietes amb 2.7 g FNF/kg per a trobar l' R^2 més elevat. El guany de pes i la concentració de cendres dels dits van ser les variables utilitzades per a calcular les equacions de l'equivalència de P, segons el mètode descrit per Denbow i col. (1995).

4.3. Resultats

4.3.1. Matèries primeres i pinsos

Abans de començar l'assaig de creixement, es va realitzar un test per determinar l'activitat fitàsica de les dietes, especialment en les dietes de blat, per confirmar l'increment gradual de les dosis. Els resultats es mostren en la Taula 4.3. Els valors analitzats de les dietes van ser superiors als calculats, per exemple 577 enfront de 428 FTU/kg pel T-5, però en les dietes de morenc els valors analitzats i calculats van ser molt similars (5 enfront de 10 FTU/kg per T-1).

4.3.2. Paràmetres productius

Els pollastres broiler que menjaren dietes de morenc P-deficients consumiren significativament ($P < 0.01$) menys que els que menjaren les dietes P-deficients més fitasa o les dietes P-normal (Taula 4.4). Resultats similars es van obtenir entre els tractaments per l'índex de transformació. El consum d'aigua i pinso va ser avaluat entre els 15 i 17 dies, no observant-se diferències en el consum d'aigua, encara que en el consum de pinso i la relació aigua/pinso van ser diferents estadísticament ($P < 0.05$). El consum de pinso dels animals que menjaren dietes P-deficient va ser més baix que la dels que menjaren dietes P-normal i l'addició de fitasa millorà numèricament aquest paràmetre. En les dietes de blat no s'observaren respostes en cap dels paràmetres productius després d'afegir fitasa (Taula 4.4).

4.3.3. Valors energètics i retenció mineral

L'energia metabolitzable aparent (EMA) i l'energia metabolitzable aparent corregida per nitrogen (EMAN) de les dietes no canviaren significativament ni en les dietes de morenc ni en les de blat (Taula 4.5) ni per efecte del nivell de fòsfor ni pel nivell de fitasa en cap de les dietes. Les concentracions de humitat i cendres dels dits van incrementar-se significativament ($P < 0.0001$) degut a l'addició de fitasa a les dietes de blat. Les concentracions de cendres dels dits dels animals que menjaren dietes de morenc P-deficients més fitasa afegida van ser significativament més grans que les dels animals que menjaren dietes de morenc P-deficients (Taula 4.6), però en cap cas els resultats no van igualar els obtinguts pels animals que consumiren dietes P-normal. En animals que menjaren dietes de blat, els valors de cendres dels dits incrementaren amb els valors superiors de fitasa afegida (118.8 i 117.3 g/kg per 400 i 600 FTU/kg, respectivament, enfront de 109.3 i 110.7 per 0 i 200 FTU/kg, respectivament), però totes elles eren estadísticament menors que els resultats de les dietes P-normal (132.6 g/kg).

Els coeficients de retenció aparent de fòsfor total i calci es mostren en la Taula 4.6, mentre que la ingesta i excreció diària d'aquests minerals així com la de zinc es mostren en la Taula 4.7. Les dietes control de morenc (4.5 FNF/kg) mostraren els valors de retenció més baixos per fòsfor total i calci. Disminuint el nivell de fòsfor de la dieta, els coeficients de retenció milloraren

significativament per fòsfor total (de 0.63 a 0.78) i per calci (de 0.29 a 0.40). La inclusió de fitasa a les dietes P-deficient produïren els valors més grans de retenció en tots els casos, assolint-se valors de 0.84 i 0.47 per fòsfor total i calci, respectivament. En general, l'excreció mineral segueix patrons contraris a la retenció: l'excreció de minerals dels animals que menjaren dietes amb fitasa va ser significativament menor que les dietes P-normal: 40 enfront de 107 mg/animal/d, respectivament, pel fòsfor total i 178 enfront de 331 mg/animal/d, respectivament, pel calci. L'excreció de zinc va ser 2.5 enfront de 3.2 mg/animal/d per les dietes P-deficient i P-normal, respectivament.

En les dietes de blat, tots els nivells de inclusió de fitasa milloraren la retenció aparent de fòsfor total (al voltant del 30% respecte la dieta P-normal). No s'observaren diferències significatives entre els tractaments en la retenció de calci. Les dietes P-deficients presentaren excrecions de fòsfor total i calci menors, i no es trobaren increments degut a l'addició de fitasa (Taula 4.7). No es trobaren diferències significatives en l'excreció de zinc.

Es van estudiar les equacions lineals i no lineals de diferents paràmetres respecte el nivell de fitasa i la concentració de FNF en les dietes de blat, essent el pes final i la concentració de cendres dels dits les que s'ajustaven millor, els resultats dels quals estan en la Taula 4.8. Els valors equivalents de fòsfor no fític per la fitasa derivats de les equacions prèvies van ser similars, generalment, per al pes final i les concentracions de cendres de dits, que van ser usats per la seva importància metabòlica i econòmica (Taula 4.9). Els valors de les mitjanes de FNF equivalent va ser utilitzat per calcular alguns paràmetres com el P alliberat, el percentatge de P fític alliberat i el P alliberat per 100 U de fitasa. La quantitat total de P alliberat augmentà, però l'eficàcia de 100 unitats d'activitat fitàsica canviaren segons els nivells de fitasa emprats. L'equivalència de P calculada per a 250, 500, 750 i 1000 U de fitasa va ser 0.50, 0.85, 1.20 i 1.55 g, respectivament, que implica que l'alliberació de fòsfor fític es trobaria entre el 22 i el 68%, i una equivalència de 605 U de fitasa per a 1 g de P de fosfat bicàlcic per quilo de pinso.

4.4. Discussió

En la Taula 4.3 poden observar-se els valors d'activitat fitàsica en dietes de morenc i de blat. Els valors analitzats segueixen les mateixes pautes que les formulades. Encara que les activitats fitàsiques trobades en les dietes de blat van ser més altes que les esperades, es va obtenir un increment uniforme dels nivells de fitasa en els tractaments. Això podria ser explicat si s'assumeix que el blat té una activitat fitàsica endògena menor que la que realment té, però, a més, cal considerar la variabilitat en el mètode analític usat, que podria produir alguna sobreestimació dels resultats.

L'addició de fitasa a dietes de morenc-soja P-deficient millorà els paràmetres productius de broilers als 21 dies arribant fins a valors similars als obtinguts amb els que menjaren dietes P-normal. Com que l'índex de transformació no va canviar, l'increment de pes corporal està relacionat a un major consum de pinso, comparable a la dieta control positiu de morenc. S'han descrit resultats molt semblants en la literatura (Sebastian i col., 1996a; Sebastian i col., 1996b; Kornegay i col., 1996; Namkung i Leeson, 1999; Lan i col., 2002), utilitzant en tots casos nivells similars de fòsfor no fític (entre 2.0 i 3.3 g FNF/kg de dieta). Llavors, en aquests casos, la inclusió de fitasa permet que els animals consumien i creixien com els animals que menjaren el control positiu amb un nivell més gran de fòsfor no fític, tal com recomana el NRC (1994). Tanmateix, en dietes de blat, l'addició gradual de fitasa no varià cap dels paràmetres productius (Taula 4.4), encara que amb els nivells de fitasa superiors (400 – 600 U/kg) s'obtingueren resultats millors de creixement i consum. Considerant que la fitasa microbiana afegida va ser la mateixa en les dietes de morenc i de blat, i consegüentment amb la mateixa activitat, la manca de diferències estadístiques en dietes de blat podria ser atribuïda a una major activitat fitàsica endògena del blat, tal com descriuen Eeckhout i De Paepe (1994), estant corroborat per l'anàlisi dels pinsos (Taula 4.3). Les millores en el guany de pes i l'índex de transformació per l'addició de fitasa han estat descrites en dietes de blat amb diferent continguts d'àcid fític (Cabahug i col., 1999), especialment a nivells baixos, mostrant una interacció significativa fitasa × fòsfor no fític; observant petites diferències en els paràmetres

productius amb nivells afegits de fitasa entre 400 i 800 U/kg. En aquest assaig, els paràmetres productius assoliren un plateau a nivells de fitasa exògena superiors a 400 U/kg, trobant-se llavors només petites variacions en les respostes.

Tal com es pot veure en la Taula 4.5, no es trobaren diferències significatives entre els tractaments en els valors energètics de les dietes. L'energia metabolitzable aparent de les dietes de moresc van estar molt propers als formulats teòricament: 12.90 MJ/kg (valor teòric) enfront de 12.74 i 12.96 MJ/kg (valors experimentals). En les dietes de blat, la disminució del fòsfor no fític i l'addició gradual de l'enzim fitasa incrementà els valors energètics de les dietes per sobre del 4%, però no estadísticament significatiu. Ravindran i col. (1999) van descriure resultats similars, no trobant canvis significatius en l'EMA quan la fitasa va ser afegida a dietes amb blat amb valors baixos d'EMA, mentre que utilitzant blat amb valors normals d'EMA, l'enzim fitasa millorà els valors energètics. Aquests autors també van descriure millores de l'energia degudes a l'addició de la fitasa properes al 4-5%, i Ravindran i col. (2000) també van trobar valors similars en dietes de blat-sorgo. Ravindran i col. (1999) postularen que la fitasa podria actuar com una xilanasa exògena trencant les parets cel·lulars i millorant l'acció entre els enzims digestius i els continguts cel·lulars. És de notar que el valor de l'EMA utilitzat per Ravindran i els valors utilitzats en aquest estudi són molts similars (12.40 MJ/kg i 12.48 MJ/kg, respectivament).

La mineralització dels ossos es va estimar avaluant els valors de concentració de cendres dels dits (Taula 4.6). En les dietes de moresc, l'addició de fitasa a dietes P-deficient incrementà la concentració de cendres de dits però no s'arribà als valors de les dietes P-normal; les millores podrien ser degudes a l'alliberament de minerals (P, Ca, Zn, Cu) del complex fitat per la fitasa que permetria als animals distribuir-los i utilitzar-los per a constituir els ossos (Ravindran i col., 1995). Resultats similars es van observar en les dietes de blat; els animals que menjaren dietes de blat amb fitasa afegida en les dosis més grans (400 – 600 U/kg) mostraren valors de cendres dels dits més grans o iguals que no pas els animals que menjaren dietes de moresc.

El nivell de fòsfor no fític tingué més efectes en la retenció aparent de fòsfor total que el nivell de fitasa (Taula 4.7). La presència d'enzim incrementà numèricament la retenció aparent de fòsfor total en ambdós tipus de dietes, mentre que s'observaren diferències estadísticament significatives quan es disminuï el nivell de fòsfor no fític. Això podria indicar que havent més fòsfor no fític en la dieta, hi hauria una menor eficiència en la utilització del fòsfor; però els animals podrien utilitzar quantitats semblants de fòsfor, i que el mineral no utilitzat és excretat, observant-se resultats comparables en un altre dels nostres assaigs (Juanpere i col., 2004). Tal com mostra la Taula 4.7, els pollastres consumiren diàriament menys fòsfor en dietes P-deficients, excretant menys fòsfor, mantenint constant la quantitat de fòsfor utilitzat. Kornegay i col. (1996) trobaren resultats similars als presentats en aquest assaig després de l'addició de fitasa també en dietes de morenc-soja. En aquell estudi, els autors van trobar augments en la retenció aparent i la quantitat de fòsfor i calci retingut i una reducció de l'excreció de P, quan es provaren dietes P-deficients i la inclusió de fòsfor no fític disminuï el coeficient de retenció aparent de fòsfor. En les dietes de blat, els coeficients de retenció de fòsfor total van ser millors després de l'addició de fitasa, produint-se els resultats més grans amb els nivells propers a 200 o 400 U de fitasa/kg, encara que només numèricament, per la qual cosa es pot assumir que la presència de l'enzim microbià millorà la retenció aparent de fòsfor total, i que la millora no segueix un patró dosi-resposta. Kornegay (1999) va revisar algunes proves amb broilers on la inclusió de fitasa a dietes de blat P-deficient incrementà la retenció de fòsfor fític i total.

L'excreció de fòsfor dels animals que menjaren dietes de blat no va ser afectada per la inclusió de l'enzim fitasa. El fòsfor total de la dieta va ser el principal factor que afectà l'excreció de fòsfor. Els pollastres que menjaren les dietes P-deficient mostraren un menor consum de pinso que els animals que menjaren les dietes P-normal, que implicaria un menor consum de fòsfor total que produeix també una menor excreció d'aquest mineral. Zyla i col. (2001) també va obtenir una disminució en l'excreció de P (en un 45%) quan es disminuï ren les concentracions de fòsfor no fític i total en dietes de blat.

Els valors més grans de la retenció de Ca es varen trobar en dietes de morenc P-deficient més fitasa, mentre que en les dietes de blat, els millors coeficients de la retenció de calci es van obtenir després de l'addició de fitasa encara que no estadísticament significatives. Les millores en la retenció de calci degut a la fitasa en dietes de morenc està ben descrita en la bibliografia. Zanini i Sazzad (1999) trobaren que l'addició de 500 U de fitasa/kg a dietes de morenc que contenen 4 g de FNF/kg augmentaren la concentració i utilització de Ca en 100 mg/animal/d, mentre que Sebastian i col. (1996b) observaren que la fitasa microbiana (600 U/kg) afegida a dietes P-deficients (3 g FNF/kg) milloraven tant la retenció de P i Ca i la utilització d'aquests minerals en pollastres broilers que menjaren dietes de morenc-soja.

En la Taula 4.6, es mostra que no es troba diferències estadísticament significatives entre els tractaments en la retenció de calci, i que ni la disminució en el fòsfor total de la dieta ni l'addició de fitasa van afectar aquests resultats, que podria estar influenciat pels grans valors de la fitasa endògena en dietes de blat.

En les dietes de blat formulades per contenir diferents nivells de fitasa, es va estudiar la regressió lineal i no lineal de diferents paràmetres, com el pes final, la concentració de cendres dels dits, la retenció de fòsfor i calci i l'excreció de fòsfor i calci. Els resultats que millor s'ajustaven foren els de pes final i la concentració de cendres dels dits, i són els que es van utilitzar per calcular l'equivalència de P, segons el procediment descrit en la literatura per varis autors (Denbow i col., 1995, Kornegay i col., 1996 i Yi i col., 1996 en broilers i Qian i col., 1996 en galls dindi). Alguns d'aquests autors van utilitzar altres paràmetres com el consum de pinso (Denbow i col., 1995) o retenció de fòsfor (Qian i col., 1996). Els resultats d'aquest assaig indiquen que van ser necessàries 605 U de fitasa/kg per substituir 1 g de P en forma de fosfat bicàlcic. Aquest valor es va obtenir de l'expressió $Y \text{ (g P)} = 2.855 + 1.398 * 10^{-3} X \text{ (unitats de fitasa)}$, obtingut de la mitjana d'ambdós paràmetres (pes final i concentració de cendres dels dits). La majoria dels estudis citats prèviament presentaren que les equacions no lineals s'ajustaven millor que les lineals. En aquest treball, l'interval d'activitat fitàsica en pinsos va estar entre 0 i 600 U/kg, mentre que altres autors usen

valors el doble de gran (Denbow i col., 1995). L'interval 0-600 U/kg correspondria a la primera part de la corba, on el creixement és major, i es poden assimilar amb una recta (en el nostre cas, $R^2 = 0.55$ pel pes final i 0.77 per les cendres dels dits). Els resultats de la regressió no lineal ajustada per a la concentració de cendres dels dits presentava uns valors més alts de R^2 i una major probabilitat ($P < 0.001$) (dades no mostrades), però també uns errors estàndards massa grans, donant una pitjor resolució dels paràmetres avaluats.

El valor calculat de l'equivalència de fòsfor de 605 U de fitasa/kg en dietes que contenen 2.7 g de FNF per quilo de dieta és menor que els trobats en altres estudis. Denbow i col. (1995) van trobar un valor mitjà entre 2.0 i 2.7 g de P per quilo en dietes de morenc igual a 821 U de fitasa/kg (utilitzant els paràmetres guany de pes i concentració de cendres dels dits), i, quan les dietes contenen 2.7 g P/kg, el valor obtingut era 1128 U/Kg, el doble del trobat en aquest estudi, explicació que podria venir donada per la fitasa endògena. És de suposar que en utilitzar blat en les dietes, i tenir una major activitat endògena, no necessitarà l'addició d'una quantitat elevada de fitasa microbiana exògena. Yi i col. (1996) van trobar que 1g de P era equivalent a 785 U fitasa/kg en forma de fosfat defluorinat, quan els pollastres menjaren dietes de morenc-soja formulada a 2.7 de fòsfor no fític per quilo de pinso. En galls dindi que també menjaren dietes de morenc i contenen 2.7 g FNF/kg, Qian i col. (1996) van trobar que 1 de P era equivalent a 652 U de fitasa/kg. D'acord amb tots aquests resultats obtinguts, el valor trobat per l'equivalència de fòsfor amb les unitats fitasa sembla variar amb el nivell de FNF de la dieta i amb la font de FNF. Els fosfats minerals tenen diferents biodisponibilitats, així que, generalment, la biodisponibilitat del fosfat bicàlcic acostuma a ser major que la del fosfat monocàlcic quan aquest darrer es emprat com a estàndard, i aquesta biodisponibilitat varia en gran manera amb els estàndards de referència i les condicions experimentals utilitzats (Soares, 1995).

El fòsfor alliberat per cada 100 U de fitasa va ser 0.20 i 0.15 g/kg pels valors de 250 i 1000 U/kg, respectivament, observant-se que la quantitat disminueix a mida que la fitasa augmenta, tal com Kornegay i col. (1996) també observaren. Per tal de millorar la precisió d'aquests resultats, seria

necessari establir més nivells de fòsfor no fític. No obstant, els resultats trobats van ser prou semblants als d'altres autors considerant que en el present treball els pollastres van consumir dietes de blat, i que en la majoria de les dietes descrites en la literatura per estudiar l'equivalència de P s'usa el moresc com a cereal.

Els resultats d'aquest estudi demostren que l'addició de fitasa a dietes de moresc-soja deficientes de fòsfor permet mantenir la mateixa productivitat que les dietes formulades seguint els requeriments del NRC, amb nivells semblants de retenció mineral i disminuint l'excreció de minerals. L'addició gradual de fitasa a dietes de blat-soja deficientes de fòsfor no va modificar la productivitat dels animals, encara que a nivells alts de fitasa (400 i 600 U/kg) milloraren la retenció de fòsfor.

Basant-se en les dades de pes final i concentració de cendres dels dits, els resultats d'utilitzar la regressió lineal mostren que 1 g de P de fosfat bicàlcic podria ser equivalent a 605 U de fitasa/kg de dieta de blat.

Taula 4.1. Tractaments experimentals avaluats.

Tractaments	Cereal	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa ¹ (FTU/kg)
T-1	Moresc	4.5	-
T-2	Moresc	2.7	-
T-3	Moresc	2.7	600
T-4	Blat	4.5	-
T-5	Blat	2.7	-
T-6	Blat	2.7	200
T-7	Blat	2.7	400
T-8	Blat	2.7	600

¹ Enzim usat: Natuphos 5000G (activitat fitàsica: 5831 U/g), (aportat per BASF)

Taula 4.2. Composició de les dietes base experimentals.

Ingredient (g/kg)	Dietes de moresc		Dietes de blat	
	P-Normal	P-deficient	P-Normal	P-deficient
Moresc	542.8	565.5	-	-
Blat	-	-	619.8	645.9
Farina de soja 480 g CP/kg	370.2	366.8	293.7	286.4
Llard	43.1	35.4	41.2	34.0
DL-Metionina	2.5	2.5	2.6	2.6
L-Lisina HCl	-	0.1	1.9	2.0
L-Treonina	-	-	0.2	0.2
Carbonat càlcic	15.5	14.2	16.0	14.6
Fosfat bicàlcic	17.1	6.8	16.2	5.9
Sal	4.7	4.7	4.4	4.4
Clorur de colina	0.1	0.1	-	-
Minerals i vitamines	4.0	4.0	4.0	4.0
Contingut estimat de nutrients (g/kg):				
Energia metabolitzable (MJ/kg)	12.90	12.90	12.48	12.48
Protèina bruta	219.7	220.0	220.0	220.0
Lisina	12.0	12.0	12.0	12.0
Met + Cys	9.2	9.2	9.2	9.2
Calci	11.0	8.1	11.0	8.1
Fòsfor Total	6.4	4.6	6.8	5.0
Fòsfor no fític	4.5	2.7	4.5	2.7
Fòsfor fític	1.9	1.9	2.3	2.3
Fitasa endògena (U/kg)	6	6	410	428

¹ Un quilo de pinso conté: Vitamina A, 12000 IU; Vitamina D₃, 2400 IU; Vitamina E, 30 mg; Vitamina K₃, 3 mg; Vitamina B₁, 2.2 mg; Vitamina B₂, 8.0 mg; Vitamina B₆, 5.0 mg; Vitamina B₁₂, 11.0 g; Àcid fòlic, 1.5 mg; Biotina, 150 g; Pantotenat càlcic, 25 mg; Àcid Nicotínic, 65 mg; Etoxiquina, 150 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; Zn, 40 mg; Mn, 60 mg; Se, 0.15 mg; I, 0.33 mg.

Taula 4.3. Activitat fitàsica trobada en les dietes experimentals.

Tractaments	Cereal	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	Enzim fitasa analitzat (FTU/g)
T-1	Moresc	4.5	-	10
T-2	Moresc	2.7	-	36
T-3	Moresc	2.7	600	674
T-4	Blat	4.5	-	476
T-5	Blat	2.7	-	577
T-6	Blat	2.7	200	938
T-7	Blat	2.7	400	1215
T-8	Blat	2.7	600	1461

Taula 4.4. Paràmetres productius de broilers que menjaren les dietes experimentals.

Cereal	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/kg)	Pes final (g)	GMD (g/d)	CMD (g/d)	IT (g/g)	Consum d'aigua (g)	Consum de pinso (g)	Relació aigua/pinso (g/g)	Culs bruts
morenc	4.5	-	641 ^a	28 ^a	42 ^a	1.48	117	50 ^a	2.4 ^b	0.35
morenc	2.7	-	562 ^b	25 ^b	37 ^b	1.52	100	39 ^b	2.6 ^a	0.39
morenc	2.7	500	621 ^a	27 ^a	41 ^a	1.51	114	45 ^{ab}	2.5 ^{ab}	0.39
		Error estàndard	14.2	0.7	0.8	0.015	6.2	2.5	0.07	0.111
		Pr > F	**	**	**	NS	NS	*	*	NS
Blat	4.5	-	592	26	41	1.59	112	49	2.3	0.35
Blat	2.7	-	533	23	38	1.63	80	36	1.8	0.39
Blat	2.7	200	563	25	40	1.60	99	44	2.2	0.39
Blat	2.7	400	574	25	39	1.57	108	44	2.5	0.47
Blat	2.7	600	563	25	41	1.66	110	48	2.3	0.31
		Error estàndard	13.5	0.6	1.0	0.023	8.1	3.63	0.20	0.086
		Pr > F	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Contrasts (Pr > T)										
Dietes P-deficient vs. P-normal			***	***	***	NS	**	**	NS	NS
No enzim vs. fitasa			*	*	**	NS	*	*	NS	NS

NS: no estadísticament significatiu; * (P < 0.05); ** (P < 0.01); *** (P < 0.001).

^{a, b} Mitjanes en una columna sense lletra comuna difereixen significativament (P < 0.05).

Taula 4.5. Energia metabolitzable aparent de les dietes experimentals.

Cereal	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	EMA (MJ/kg MS)	EMAn (MJ/kg MS)
Moresc	4.5	-	13.0	12.3
Moresc	2.7	-	12.8	12.2
Moresc	2.7	600	12.7	12.1
		Error estàndard	0.14	0.15
		Pr > F	NS	NS
Blat	4.5	-	12.0	11.4
Blat	2.7	-	12.1	11.5
Blat	2.7	200	12.1	11.5
Blat	2.7	400	12.5	11.9
Blat	2.7	600	12.0	11.5
		Error estàndard	0.13	0.13
		Pr > F	NS	NS
Contrasts (Pr > T)				
Dieta P-normal vs. Dieta P-deficient			NS	NS
No enzim vs. Fitasas			NS	NS

NS: no estadísticament significatiu.

Taula 4.6. Concentracions de cendres dels dits i de minerals en l'excreta; retenció aparent de fòsfor total i calci de les dietes.

Cereal	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	Cendres dits (g/kg)	Fòsfor total en excreta (%/MS)	Coefficient retenció fòsfor total	Calci en excreta (%/MS)	Coefficient retenció calci
Moresc	4.5	-	132 ^a	0.92 ^a	0.63 ^b	2.83 ^a	0.29 ^b
Moresc	2.7	-	109 ^c	0.37 ^b	0.78 ^a	1.74 ^b	0.40 ^a
Moresc	2.7	600	117 ^b	0.36 ^b	0.80 ^a	1.48 ^b	0.47 ^a
		Error estàndard	15.3	0.029	0.032	0.113	0.017
		Pr > F	**	***	**	***	***
Blat	4.5	-	133 ^a	0.95 ^a	0.53 ^b	2.75 ^a	0.18
Blat	2.7	-	109 ^c	0.47 ^b	0.69 ^a	2.01 ^b	0.17
Blat	2.7	200	111 ^c	0.40 ^c	0.73 ^a	1.75 ^b	0.16
Blat	2.7	400	119 ^b	0.43 ^{bc}	0.72 ^a	1.77 ^b	0.21
Blat	2.7	600	117 ^b	0.44 ^{bc}	0.71 ^a	1.86 ^b	0.25
		Error estàndard	11.6	0.023	0.050	0.122	0.020
		Pr > F	***	***	NS	***	***
Contrasts (Pr > T)							
Dieta P-normal vs. Dieta P-deficient			***	***	NS	***	***
No enzim vs. Fitasas			***	NS	NS	NS	NS

NS: no estadísticament significatiu; ** (P < 0.01); *** (P < 0.001).

^{a, b} Mitjanjes en una columna sense lletra comuna difereixen significativament (P < 0.05).

Taula 4.7. Ingesta i excreció diària de minerals dels animals que menjaren les dietes experimentals.

Cereal	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/kg)	Ingesta (mg/animal/d)		Excreció (mg/animal/d)		
			Fòsfor total	Calci	Fòsfor total	Calci	Zinc
Morenc	4.5	-	285 ^a	432 ^a	107 ^a	331 ^a	3.2 ^a
Morenc	2.7	-	183 ^b	317 ^b	40 ^b	190 ^b	2.6 ^b
Morenc	2.7	500	203 ^b	335 ^b	40 ^b	178 ^b	2.5 ^b
	Error estàndard		4.7	7.5	4.7	17.9	0.14
	Pr > F		***	***	***	***	**
Blat	4.5	-	272 ^a	425 ^a	127 ^a	367 ^a	2.7
Blat	2.7	-	184 ^c	279 ^c	58 ^b	251 ^b	2.7
Blat	2.7	200	201 ^b	285 ^c	55 ^b	239 ^b	2.8
Blat	2.7	400	185 ^c	279 ^c	53 ^b	218 ^b	2.7
Blat	2.7	600	200 ^{bc}	331 ^b	58 ^b	249 ^b	2.7
	Error estàndard		5.2	8.6	4.6	21.2	0.18
	Pr > F		***	***	***	***	NS
Contrasts (Pr > T)							
Dietes P-deficient vs. P-normal			***	***	***	***	NS
No enzim vs. Fitasa			***	***	NS	NS	NS

NS: no estadísticament significatiu; ** (P < 0.01); *** (P < 0.001).

^{a, b} Mitjanes en una columna sense lletres comunes diferencien significativament (P < 0.05).

Taula 4.8. 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.

Ítem	Fòsfor no fític	R ²	Fitasa afegida	R ²
Dietes de blat				
Pes final (g)	Y = 442.09 + 33.27X	0.99	Y = 542.49 + 0.052X	0.55
Cendres dits (g/kg)	Y = 74.379 + 12.949X	0.86	Y = 109.23 + 0.016X	0.77

Taula 4.9. Valors calculats d'equivalència de fòsfor per a dietes de blat.

Fitasa, U / kg dieta	250	500	750	1000
	FNF equivalent, g/kg			
Pes final ¹	3.41	3.80	4.19	4.58
Cendres dits ²	3.00	3.31	3.61	3.92
Mitjana de FNF equivalent, g/kg ³	3.20	3.55	3.90	4.25
P alliberat, g/kg	0.50	0.85	1.20	1.55
% de P fític ⁴	22	37	52	68
P alliberat (g/kg) / 100 U de fitasa	0.202	0.171	0.160	0.155

¹ Y = 3.018 + 1.566 * 10⁻³ X, r² = 0.99; on Y = FNF (g/kg) i X = activitat fitasa (Unitats per quilogram)

² Y = 2.691 + 1.230 * 10⁻³ X, r² = 0.99; on Y = FNF (g/kg) i X = activitat fitasa (Unitats per quilogram)

³ Valors de pes final i cendres dits amb un pes estadístic igual.

⁴ Fòsfor fític en aquesta dieta era de 2.3 g/kg.

4.5. Referències bibliogràfiques

Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official methods of analysis. 15th ed., Assoc. Anal. Chem., Washington D. C.

Blum, J. C., M. Plouzeau i P. Stevans. 1977. Influence des conditions d'élevage et de préparation sur la qualité des viandes de volaille et sur les oeufs. *Revue Française de Diététique* 82: 7-32.

Broz, J., P. Oldale, A. H. Perrin-Voltz, G. Rychen, J. Schulze i C. Simoes Nunes. 1994. Effects of supplemental phytase on performance and phosphorus utilisation in broiler chickens fed a low phosphorus diet without addition of inorganic phosphates. *Brit. Poultry Sci.* 35, 273–280.

- Cabahug, S., V. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 1999. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus contents. I. Effects on bird performance and toe ash. *Brit. Poultry Sci.* 40, 660–666.
- Camden, B. J., P. C. H. Morel, D. V. Thomas, V. Ravindran i M. R. Bedford.** 2001. Effectiveness of exogenous microbial phytase in improving the bioavailabilities of phosphorus and other nutrients in maize-soya-bean meal diets for broilers. *Anim. Sci.* 73, 289-297.
- Denbow, D. M., V. Ravindran, E. T. Kornegay, Z. Yi i R. M. Hulet.** 1995. Improving phosphorus availability in soybean meal for broilers by supplemental phytase. *Poult. Sci.* 74, 1831–1842.
- DIN 51900.** 1977. Determination of the gross calorific value by the bomb calorimeter and calculation of the net calorific value. Deutsches Institut für Normung e. V., Berlin, Germany..
- Eeckhout, W. i M. De Paepe.** 1994. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 47, 19–29.
- Engelen, A. J., F. C. van der Heeft, P. H. G. Randsdorp i E. L. C. Smit.** 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.* 77(3), 760–764.
- Haug, W. i H. J. Lantzsch.** 1983. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *J. Sci. Food Agric.* 34, 1423–1426.
- Juanpere, J., A. M. Pérez-Vendrell i J. Brufau.** 2004. Effect of microbial phytase on broilers fed barley based diets in the presence or not of endogenous phytase. *Anim. Feed Sci. Tech.* 115 (3-4), 265-279.
- Kornegay, E. T.** 1999. A review of phosphorus digestion and excretion as influenced by microbial phytase in poultry. BASF Technical Symposium, January 16, Atlanta, BASF Corp., Mount Olive.
- Kornegay, E. T., D. M. Denbow, Z. Yi i V. Ravindran.** 1996. Response of broilers to graded levels of microbial phytase added to maize-soyabean-meal-based diets containing three levels of non-phytate phosphorus. *Br. J. Nutr.* 75, 839–852.

- Lan, G. Q., N. Abdullah, S. Jalaludin i Y. W. Ho.** 2002. Efficacy of supplementation of a phytase-producing bacteria culture on the performance and nutrient use of broiler chickens fed corn-soybean meal diets. *Poult. Sci.* 81, 1522-1532
- Mitchell, R. D. I H. M. Edwards.** 1996. Effects of phytase and 1,25-dihydroxycholecalciferol on phytate utilization and the quantitative requirement of calcium and phosphorus in young broiler chickens. *Poult. Sci.* 75, 95–110.
- Namkung, H. I S. Leeson.** 1999. Effect of phytase enzyme on dietary nitrogen-corrected apparent metabolizable energy and the ileal digestibility of nitrogen and amino acids in broiler chicks. *Poult. Sci.* 78, 1317-1319.
- NRC** (1994).
- Potter, L. M., M. Potchanakorn, V. Ravindran i E. T. Kornegay.** 1995. Bioavailability of phosphorus in various phosphate sources using body weight and toe ash as response criteria. *Poult. Sci.* 74, 813–820.
- Qian, H., E. T. Kornegay i D. M. Denbow.** 1996. Phosphorus equivalence of microbial phytase in turkey diets as influenced by calcium to phosphorus ratios and phosphorus level. *Poult. Sci.* 75, 69–81.
- Ravindran, V., W. L. Bryden i E. T. Kornegay.** 1995. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Biol. Rev.* 6, 125–143.
- Ravindran, V., S. Cabahug, G. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 2000. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus levels. II. Effects on apparent metabolizable energy, nutrient digestibility and nutrient retention. *Brit. Poultry Sci.* 41, 193–200.
- Ravindran, V., P. H. Selle i W. L. Bryden.** 1999. Effects of phytase supplementation, individually and in combination, with glycanase, on the nutritive value of wheat and barley. *Poult. Sci.* 78, 1588–1595.

- Reddy, N. R., M. D. Pierson, S. K. Sathe i D. K. Salunkhe.** 1989. Phytates in cereals and legumes. CRC Press, Boca Raton.
- Rutherford, S. M., T. K. Chung i P. J. Moughan.** 2002. The effect of microbial phytase on ileal phosphorus and amino acid digestibility in the broiler chicken. *Brit. Poultry Sci.* 44, 598-606.
- Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague.** 1996a. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and utilization of dietary calcium, phosphorus, copper, and zinc in broiler chickens fed corn-soybean diets. *Poult. Sci.* 75, 729–736.
- Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague.** 1996b. Efficacy of supplemental microbial phytase at different dietary calcium levels on growth performance and mineral utilization of broiler chickens. *Poult. Sci.* 75, 1516–1523.
- Short, F. J., P. Gorton, J. Wiseman i K. N. Boorman.** 1996. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Anim. Feed Sci. Tech.* 59, 215-221.
- Simons, P. C. M., H. A. J. Versteegh, A. W. Jongbloed, P. A. Kemme, P. Slump, K. D. Bos, M. G. E. Wolters, R. F. Beudeker i G. J. Verschoor.** 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *Br. J. Nutr.* 64, 525–540.
- Soares, Jr., J. H.** 1995. Phosphorus availability. In: Ammerman, C. B., Baker, D. H., Lewis, A. J. (Eds), *Bioavailability of nutrients for animals*, Academic Press, San Diego, pp. 257-285.
- Statistical Analysis System Institute Inc.** 1985. *SAS User's Guide: Statistics, Ver. 5.* SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Um, J. S i I. K. Paik.** 1999. Effects of microbial phytase supplementation on egg production, eggshell quality, and mineral retention of laying hens fed different levels of phosphorus. *Poult. Sci.* 78, 75–79.
- Van der Klis, J. D., H. A. J. Versteegh, P. C. M. Simons i A. K. Kies.** 1997. The efficacy of phytase in corn-soybean meal-based diets for laying hens. *Poult. Sci.* 76, 1535–1542.

Yi, Z., E. T. Kornegay, V. Ravindran i D. M. Denbow. 1996. Improving phytate phosphorus availability in corn and soybean meal for broilers using microbial phytase and calculation for phosphorus equivalency values for phytase. *Poult. Sci.* 75, 240–249.

Zanini, S. F. i M. H. Sazzad. 1999. Effects of microbial phytase on growth and mineral utilisation in broilers fed on maize soyabean-based diets. *Brit. Poultry Sci.* 40, 348–352.

Zyla, K., D. Gogol, J. Koreleski, S. Swiatkiewicz i D. R. Ledoux. 1999. Simultaneous application of phytase and xylanase to broiler feeds based on wheat: feeding experiment with growing broilers. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1841–1848.

Zyla, K., J. Koreleski, S. Swiatkiewicz, D. R. Ledoux i J. Piironen. 2001. Influence of supplemental enzymes on the performance and phosphorus excretion of broilers fed wheat-based diets to 6 weeks of age. *Anim. Feed Sci. Technol.* 89: 113-118.

**EFFECTE DE LA FITASA MICROBIANA EN BROILERS ALIMENTATS
AMB DIETES D'ORDI EN PRESENCIA O NO DE FITASA ENDÒGENA**

J. JUANPERE, A. M. PÉREZ-VENDRELL i J. BRUFAU

Departament de Nutrició Animal, IRTA, Centre Mas Bové, Apartat 415, 43280 Reus, Espanya

Animal Feed Science and Technology, vol. 115 (3-4) pp. 265-279

5.1. Introducció

La fitasa és un enzim àmpliament estudiat en els darrers anys, pel gran interès en diversos aspectes: nutritiu, ja que l'addició de fitasa incrementa la utilització per part dels animals del fòsfor de les plantes, principalment en forma de fitat; i ambiental, ja que l'addició de fitasa disminueix l'excreció de fòsfor, reduint l'eutroficació.

Fitasa és un enzim fosfatasa àcida amb activitat estereasa, que és capaç d'hidrolitzar l'hexafosfat de mio-inositol a grups ortofosfats inorgànics i alliberar mio-inositol lliure d'alguns èsters fosfònics més baixos (Reddy i col., 1989).

Pot trobar-se fitasa endògena intestinal, però aquesta té una activitat molt baixa. La majoria de les fitases provenen d'ingredients de la dieta o és d'origen microbià (Ravindran i col., 1995), Així, la 6-fitasa (EC 3.1.3.26) en pinsos prové bàsicament de cereals i llegums, mentre que els microorganismes presents en el tracte intestinal produeixen la 3-fitasa (EC 3.1.3.8). La temperatura òptima per a l'activitat fitàsica es troba entre 45 i 60° C, disminuint ràpidament a temperatures més elevades (Wodzinski i Ullah, 1996).

Els efectes positius associats a l'addició de fitasa a dietes d'aviram inclouen millores en el creixement (Perney i col., 1993; Ravindran i col., 2001) i la digestibilitat, especialment de proteïnes (Broz i col., 1994; Kornegay i Qian, 1996; Sebastian i col., 1996). S'han fet pocs estudis per estudiar la influència del tractament per calor sobre l'activitat enzimàtica, o la inactivació de l'enzim en pinsos en forma de granulat (Edwards i col., 1999; Jongbloed i Kemme, 1990; Viveros i col., 1994; Viveros i col., 2002). La velocitat de destrucció del fitat pel procés d'autoclau sembla ser més baixa quan el fitat està associat a proteïnes i/o cations en productes naturals com cereals o olis de llavors. En algunes matèries primeres, com l'arròs o el blat, el fitat és molt estable a l'escalfament, però en altres productes naturals, per exemple alguns llegums, el fitat es degrada ràpidament en un temps petit (Reddy i col., 1989).

El principal objectiu d'aquesta prova fou avaluar els efectes d'una fitasa microbiana afegida al pinso en el creixement del pollastre broiler, i sobre l'energia de la dieta i la retenció de minerals en dietes que contenien fitasa endògena o no, segons la presència de cereal (ordi) autoclavat o no tractat.

5.2. Material i mètodes

5.2.1. Maneig dels animals.

S'utilitzaren tres-cents vuitanta-quatre pollastres d'engreix mascles d'un dia d'edat de la raça Ross 308. La prova acabà als 24 dies. Només s'incloueren en l'experiment els animals lliures de qualsevol senyal clínic (això és, sense problemes de potes o altres membres, ulls oberts i comportament actiu). Els pollastres es van posar en 48 gàbies en dues bateries Petersime² prové des amb calefacció elèctrica, en una sala sense finestres i amb ventilació forçada. Els programes de llum i temperatura varen ser els estàndards emprats en la granja. L'aigua i el pinso en forma de farina van ser subministrats *ad libitum* durant tot l'experiment.

5.2.2. Tractaments i disseny experimental

S'utilitzaren sis tractaments, variant en la presència o absència de fitasa microbiana, el cereal emprat (ordi no tractat o autoclavat) i en la concentració de fòsfor no fític (FNF) (4.5 g/kg i 2.7 g/kg) (Taula 5.1). L'ordi es va tractar per vapor calent (autoclavat a 105°C durant 15 min, amb 10 mm de doblada). Després del procés es va confirmar la destrucció de fitasa endògena. Es van utilitzar vuit rèpliques de cada tractament experimental, contenint cada rèplica vuit pollastres broiler mascles.

5.2.3. Producció del pinso i composició nutritiva de les dietes

Abans de fer la barreja, tots els ingredients del pinso, excepte el greix, la sal, el fosfat bicàlcic, el carbonat càlcic, les vitamines i el corrector mineral, es van moldre mitjançant un molí de martell de 30 CV fins que les partícules passaren pel tamís de 3 mm. Durant tot l'experiment es va oferir una

² Petersime Incubator Company, Gettysburg, Ohio, USA.

sola dieta en forma de farina. Les dietes bassals es formularen per ser isonitrogenades i isocalòriques (Taula 5.2).

L'energia metabolitzable (EM) es va estimar a partir dels valors d'EM dels ingredients de les taules de composició dels aliments de l'INRA (Sauvant i col., 2002). L'ordi era de la varietat Baraka de la collita del 2000. La fitasa microbiana (EC 3.1.3.8) emprada en l'estudi era una preparació experimental (SP-1002 en pols amb una activitat fitàsica de 3295 U/kg, de Hoffman-La Roche). Les dietes inclouen, des del primer dia, 5 g de diòxid de titani (TiO₂) per quilo de pinso com a marcador de digestibilitat.

5.2.4. Anàlisis químiques

Abans d'analitzar, totes les mostres de les dietes experimentals i de les matèries primeres es van moldre en tamís de 0.5 mm. Les mostres foren analitzades utilitzant mètodes estàndards (AOAC, 1990) per matèria seca (codi 934.01), proteïna bruta (codi 976.05), extracte eteri (codi 920.39), cendres (codi 942.05) i fibra bruta (codi 978.10). La concentració de fòsfor total es va analitzar colorimètricament pel mètode del molibdo-vanadat (codi 965.17). La concentració de calci es va analitzar per espectroscòpia d'absorció atòmica de flama. L'activitat fitàsica present en les matèries primeres i en els pinsos finals es va analitzar pel mètode descrit per Engelen i col. (1994). L'activitat β -glucanàsica es va determinar amb un mètode basat en la utilització de substrat acolorit, que en aquest cas fou Azo-glucà d'ordi (McCleary i col., 1997). Es va construir una corba estàndard a partir de les dades obtingudes després d'incloure l'enzim en diferents concentracions en els pinsos controls (sense enzim incorporat en la fabricació). El contingut de β -glucans es determinà segons McCleary i Glennie-Holmes (1985). El contingut de fòsfor fític es determinà en les matèries primeres i el pinso mitjançant el mètode descrit per Haug i Lantzsch (1983). La concentració de diòxid de titani present en pinsos i excretes s'analitzà segons Short i col. (1996).

5.2.5. Paràmetres productius.

Els pollastres es pesaren conjuntament quan arribaren a la granja. Entre els dies 7 i 21 es calcularen el consum de pinso, guany mig diari i índex de conversió del pinso. La mortalitat s'enregistrà

diàriament, incloent la causa de la mort. En el dia 11, s'avaluà el percentatge d'animals amb culs bruts. Des del dia 14 fins al 17 s'enregistrà el consum d'aigua, consum de pinso i la relació aigua/pinso. La qualitat de l'os i la deposició del fòsfor s'avaluaren amb la mesura de la concentració de cendres dels dits en el final de l'experiment, utilitzant dos ocells per gàbia (16 pollastres per tractament de la dieta), segons el mètode descrit per Potter i col. (1995).

5.2.6. Prova de balanç

Es va emprar el diòxid de titani com a marcador en la metodologia per determinar l'energia metabolitzable aparent (EMA) i la retenció aparent de fòsfor total i calci de les dietes experimentals. Les excretes es recolliren el dia 21 durant un període curt de temps, es guardaren a -20°C, i finalment es liofilitzaren. Posteriorment, les mostres d'excreta es molgueren i es guardaren per a analitzar. L'energia bruta de les mostres de les dietes i les excretes s'analitzaren amb un calorímetre amb bomba adiabàtica IKA, C-400 (DIN 51900, 1977) per obtenir l'energia metabolitzable aparent (EMA).

5.2.7. Estudis de retenció mineral.

Tots els animals se sacrificaren en els dies 22, 23 o 24 per injecció intravenosa de pentobarbital sòdic. Es tragueren i es pesaren els pàncrees. S'agafaren les mostres ileals des del diverticle de Meckel fins a 15 cm abans a la unió ili-cecal, i es guardaren en gel fins a determinar la viscositat intestinal de la digesta fresca. Les mostres d'aquesta digesta se centrifugaren a 12000 rpm durant 5 minuts a 15° C, i després el sobrenadant es recollí i emmagatzemat en gel fins a determinar la viscositat, usant un viscosímetre digital Brookfield, mantingut a 30°C i llegida després d'un període d'estabilització d' 1 min. Després de l'eutanàsia, s'agafaren els dits del mig de dos pollastres per rèplica (entre el segon i el tercer metatars), es guardaren en bosses de plàstic i posteriorment foren pesats i calcinats per obtenir els valors de cendres dels dits (Cabahug i col., 1999). Abans de l'eutanàsia, s'agafaren mostres de sang per punció cardíaca. El plasma se separà per centrifugació de la sang durant 10 min a 2000* g, i es determinaren les concentracions de fòsfor i calci en el plasma (Lima i col, 1997).

5.2.8. Cura dels animals

Tots els procediments experimentals utilitzats estan aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de l'IRTA.

5.2.9. Càlculs

Mitjançant la següent fórmula es calcularen els valors d'EMA de les dietes. Es feren les correccions apropiades per diferències en el contingut de la humitat.

$$\text{EMA} = \text{EB}_{\text{dieta}} - [(\text{TiO}_{2,\text{dieta}} / \text{TiO}_{2,\text{exc}}) \times \text{EB}_{\text{exc}}]$$

on EB_{dieta} és l'energia bruta del pinso i EB_{exc} és l'energia bruta de l'excreta. Els coeficients de digestibilitat aparent ileal es calcularen amb la següent fórmula, utilitzant el procediment del marcador inert.

$$\text{Dig X} = 1 - [(\text{TiO}_{2,\text{diet}} \times \text{X}_{\text{exc}}) / (\text{TiO}_{2,\text{exc}} \times \text{X}_{\text{diet}})]$$

on X_{diet} és la concentració en la dieta i X_{exc} és la concentració en l'excreta.

5.2.10. Anàlisi estadística.

Les dades s'analitzaren com un disseny de blocs a l'atzar via anàlisi de variances, usant els procediments del General Linear Models (GLM) del Statistical Analysis System Institute Inc. (1985). La significància estadística es va establir a $P < 0.05$. Si es trobaren efectes principals significants, les mitjanes es compararen pel test Duncan de rangs múltiples.

Els efectes de l'addició de fitasa microbiana i el tractament de l'ordi s'examinaren en un conjunt de contrastes lineals:

Addició de fitasa microbiana: T-2, T-5 vs. T-3, T-6

Tractament d'ordi: T-2, T-3 vs. T-5, T-6

5.3. Resultats i discussió

5.3.1. Matèries primeres i pinsos

Abans de començar la prova, es va realitzar un estudi per determinar les condicions d'autoclau necessàries per inactivar l'activitat fitàsica endògena present en l'ordi. Els resultats d'aquesta prova es presenten en la Taula 5.3. Per tant, tot l'ordi Baraka es va dividir en dues meitats, i una d'elles es va autoclavar a 105°C durant 15 min (10 mm de profunditat), i es va usar en els tractaments 4, 5 i 6. L'activitat fitàsica del pinso determinada per anàlisi es mostren en la Taula 5.4. El procés d'autoclau inactivà la fitasa endògena present en l'ordi (T-4 i T-5 vs. T-1 i T-2), i les activitats fitàsiques mesurades en els tractaments T-3 i T-6 confirmen l'addició de 500 U/kg de la fitasa microbiana exògena. Aquests resultats estan en acord amb els trobats per Jongbloed i Kemme (1990) que van descriure la inactivació de la fitasa endògena a temperatures superiors a 60°C. Després del procés d'autoclau, es va observar una reducció del fòsfor fític en totes les dietes, estant al voltant del 8% pel fòsfor fític de l'ordi (dades no mostrades). Altres característiques de l'ordi (com els continguts de β -glucans i de pentosans) no es veieren afectades pel tractament de calor.

5.3.2. Paràmetres productius

En la Taula 5.5 es mostren les dades corresponents al creixement animal avaluat durant el període entre els dies 7 i 21. Es van trobar diferències estadísticament significants entre els tractaments en tots els paràmetres. Els animals que consumiren les dietes T-2 i T-5 (deficients en FNF) menjaren significativament menys pinso, creixeren a una velocitat significativament més lenta, i aconseguint-se un pes final més baix que pels que menjaren les dietes control T-1 i T-4, respectivament. L'addició de fitasa exògena a les dietes deficients de P millorà el creixement animal a nivells comparables als animals que menjaren dietes amb control positiu. No s'observaren efectes per la presència de fitasa endògena en les dietes T-1 a T-3 en relació a les dietes T-4 a T-6, respectivament. Potkansky (2000) descrigué que la fitasa del cereal mostra només el 40-79% de l'eficàcia de la fitasa microbiana degut al pH baix present en el tracte intestinal del broiler.

El procés d'autoclau incrementà la viscositat de l'ordi, resultant en una major quantitat de culs bruts als 11 dies en pollastres que consumiren les dietes amb ordi autoclavat (per exemple, 41% per a T-1 i 85% per a T-4, Taula 5.6). Els animals que consumiren ordi autoclavat presentaren unes viscositats significativament més altes que els broilers que consumiren ordi no tractat ($P < 0.001$). El percentatge de culs bruts estava ben correlacionat amb la viscositat intestinal (Taula 5.6). El procés d'autoclau afecta alguns paràmetres nutritius, per exemple, el midó. Segons Reddy i col. (1989), el tractament de calor pot causar gelatinització de les molècules de midó, així que és d'esperar un increment en la viscositat intestinal en els animals que menjaren dietes amb cereal autoclavat. Gracia i col (2003) també van descriure les modificacions de paràmetres com les estructures de proteïna i de fibra degut al procés tèrmic. En ordi no germinat, l'activitat β -glucanàsica és molt baixa o no n'hi ha (Fincher, 1992). Knuckles i Chiu (1999) afirmaren que el procés d'autoclau disminueix l'activitat β -glucanasa entre un 50 i un 75%, mentre que Izydorczyk i col. (2000) afirmen que, en absència de β -glucanasa el pes molecular dels β -glucans solubles és més gran, com a resultat de l'augment de la viscositat intestinal. No obstant, les baixes activitats β -glucanasa trobades en l'ordi cru no explica totalment l'increment de la viscositat mesurada després del procés d'autoclau.

El consum d'aigua dels animals que menjaren dietes deficientes de P (T-2 i T-5) va ser significativament més baix que la d'aquells que menjaren les dietes control (T-1 i T-4), d'igual manera que el consum de pinso (Taula 5.6). L'addició de la fitasa microbiana a les dietes deficientes de P millorà el consum d'aigua i pinso fins a nivells similars als de les dietes control positiu (T-3 vs. T-1, i T-6 vs. T-4, respectivament). Els broilers que menjaren ordi autoclavat també mostraren un consum d'aigua superior al dels animals que menjaren les dietes amb l'ordi sense tractar (143.7 g/d versus 133.3 g/d).

En la Taula 5.7 es presenten els valors energètics de les dietes experimentals. La inclusió de cereal autoclavat en les dietes no modificà els valors energètics. En les dietes que contenien ordi sense tractar, no s'observaren efectes en els valors d'EMA degut a la fitasa exògena, mentre que l'addició

de fitasa a les dietes deficients de P millorà els valors de l'energia en les dietes amb ordi autoclavat (T-6 vs. T-5, Taula 5.7).

5.3.3. Estudis de retenció mineral

Els resultats de la determinació de la matèria seca i de les cendres dels dits es mostren en la Taula 5.8. Es van trobar diferències estadísticament significatives entre els tractaments en la concentració de les cendres dels dits. Els animals que menjaren els tractaments T-2 i T-5 (deficients de P) mostraren valors més baixos que la resta d'animals. Els pollastres dels tractaments T-3 i T-6 presentaren majors percentatges de cendres en dits que aquells que menjaren les dietes T-2 i T-5, observant-se que la fitasa microbiana corregeix parcialment la deficiència de fòsfor en la dieta. Aquests resultats podrien ser usats com a indicadors de la biodisponibilitat de fòsfor, i per corroborar una deposició més gran de P quan s'afegeix l'enzim fitasa als pinsos.

En la Taula 5.8 es poden observar les dades corresponents a la concentració plasmàtica de calci i fòsfor dels broilers. Els animals que menjaren dietes deficients de P van tenir concentracions de fòsfor en plasma significativament menors ($P < 0.001$), comparat als broilers que menjaren les dietes control, i també concentracions majors de calci ($P < 0.001$). Aquest efecte va ser més pronunciat quan els broilers van menjar ordi tractat, on s'inactivà la fitasa endògena. La inclusió de fitasa microbiana augmentà els nivells de fòsfor en plasma i reduí la concentració de calci, però els valors obtinguts no van igualar els dels animals que menjaren les dietes control positiu, seguint un patró similar al percentatge de cendres en dits. En el nostre estudi, la fitasa endògena de l'ordi no influí en les concentracions minerals del plasma, doncs no es trobaren diferències significatives degut al tractament de l'ordi. La fitasa és un enzim depenent de pH, tal com és ben conegut. La majoria de fitases microbianes presenten dos intervals de pH òptim, 2.5 - 3.0 i 5.5 - 6.0, mentre que el pH òptim de la fitasa endògena del cereal és 5.5 - 6.0. Ravindran i col. (1995) van descriure que les fitases microbianes són més efectives i consistents que les fitases de les plantes, ja que el proventricle és el lloc d'acció de l'enzim, i que el proventricle té un pH de 4.8 (Denbow, 2000). Al pH del proventricle, la fitasa microbiana provada mostrà una activitat màxima del voltant del 86%

(Simon i Igbasan, 2002). Les fitases dels cereals són menys estables en pH àcid del tracte digestiu i poden ser inactivades. Llavors, la fitasa microbiana és l'enzim que actua en la retenció mineral. Aquestes observacions estan d'acord amb Simons i col. (1990), qui trobaren que la fitasa de les plantes són menys efectives que les microbianes en la utilització del fòsfor. Això és degut al petit interval de pH en què es desenvolupa l'acció enzimàtica.

Tal com era d'esperar, la concentració de calci en plasma va ser més baixa després de l'addició de fitasa microbiana. Alguns autors (Han i col., 1997; Orban i col., 1999) han descrit que la concentració en plasma de calci disminueix i la concentració de fòsfor augmenta quan s'inclou fitasa en dietes deficientes de P. Quan el nivell de P en les dietes és baix, es produeix un augment en la concentració de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, i creix l'absorció intestinal de fòsfor. Quan els animals mengen dietes amb fitasa microbiana afegida, els grups fosfats del fitat es degraden i pot ser absorbit, i llavors ser usat per al creixement.

En la Taula 5.8 es mostren els pesos dels pàncrees. No s'observaren diferències estadístiques en el pes del pàncrees degut a la presència o no de fitasa endògena o pel nivell FNF de la dieta.

En la Taula 5.9 es mostren les concentracions de fòsfor i calci de l'excreta recollida als 21 dies. Tal com es pot observar, el contingut de P trobat en l'excretes dels animals que menjaren dietes deficientes de P (T-2, T-3, T-5 i T-6) va ser menor que la determinada en les excretes dels animals que menjaren les dietes control (T-1 i T-4) (un 40% menys de fòsfor), encara que es va trobar una interacció positiva entre l'enzim fitasa i el procés d'autoclau. Les concentracions de calci en les excretes dels animals que menjaren les dietes deficientes de P van ser un 30% menors que les trobades en les excretes dels animals que menjaren les dietes control. L'addició de l'enzim fitasa microbiana en els tractaments T-3 i T-6 va millorar significativament la retenció de fòsfor ($P < 0.001$) si es compara a les dietes control T-1 i T-4, respectivament (Taula 5.9). Aquests resultats estan d'acord amb els trobats en un estudi previ de l'IRTA (dades no publicades). La retenció de calci va ser menor en els tractaments T-4 i T-6 que la de les dietes amb ordi sense tractar ($P < 0.001$). L'addició de fitasa microbiana a les dietes amb ordi sense tractar no millorà la retenció de Ca en les

dietes deficientes de P (T-2 vs. T-3), però en les dietes amb ordi autoclavat la inclusió de la fitasa millorà la retenció de Ca fins a nivells similars als de les dietes control (T-5 i T-6 vs. T-4). Amb el tractament per calor, els cations bivalents units als grups fosfats del fitat són alliberats, i llavors minerals com el calci o el zinc esdevenen més disponibles (Reddy i col., 1989).

En aquest experiment, els animals menjaren dietes amb una alta relació Ca:FNF (3:1), similar als usats per Denbow i col. (1995) i Qian i col. (1996). Posteriorment, Dieckmann i col. (2002) van descriure que, en estudis de disponibilitat de fòsfor, la relació Ca:FNF de la dieta no hauria d'estar per sota de 1:1 ni per sobre de 2:1. A relacions superiors, la retenció de calci disminueix dràsticament en, aproximadament, 40% i 20%, respectivament. S'haurien de realitzar més estudis per confirmar aquests resultats de retenció i excreció amb relacions baixes de Ca:P.

En general, no s'observaren efectes importants per la presència o no de fitasa endògena de l'ordi, però la inclusió de fitasa microbiana a dietes d'ordi deficientes de fòsfor augmentà la retenció aparent de fòsfor i reduí la presència d'aquest element en l'excreta de broilers (per sobre del 45%), resultant un factor favorable pel medi ambient. A més, el percentatge de cendres dels dits i la concentració plasmàtica de fòsfor i calci també van ser influïts pels continguts de fòsfor de la dieta i la presència o no de fitasa exògena, seguint una tendència similar als paràmetres productius, i mostrant la seva utilitat com a indicadors del metabolisme del fòsfor en avicultura.

Taula 5.1. Tractaments experimentals.

Tractaments	Dieta	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa * (FTU/kg)
T-1	Ordi sense tractar - soja	4.5	-
T-2	Ordi sense tractar - soja	2.7	-
T-3	Ordi sense tractar - soja	2.7	500
T-4	Ordi autoclavat - soja	4.5	-
T-5	Ordi autoclavat - soja	2.7	-
T-6	Ordi autoclavat - soja	2.7	500

* Enzim usat: Phytase SP 1002 CT batch PPQ 6883 en pols (Activitat fitàsica: 3295 U/g) (aportat per Roche Vitamins Ltd, Basle)

Taula 5.2. Composició de les dietes base.

INGREDIENT (g/kg)	P Normal	P deficient
Ordi	583.03	576.62
Farina de soja 480g CP/kg	187.51	229.12
Llard	60.00	60.00
Farina de soja extrusionada	122.21	101.41
DL-metionina	4.16	2.94
L-lisina HCl	1.54	1.28
L-treonina	0.63	0.18
Carbonat càlcic	5.66	4.25
Fosfat bicàlcic	6.65	6.08
Sal	4.60	4.12
Minerals i vitamines ¹	4.00	4.00
Contingut estimat de nutrients: (g/kg)		
Energia metabolitzable (MJ/kg)	12.48	12.48
Protèina bruta	213.8	223.5
Fibra bruta	42.2	42.5
Extracte eteri	100.0	96.2
Cendres	66.6	55.7
Lisina	11.5	12.0
Met + Cys	10.1	9.2
Calci	11.0	8.1
Fòsfor total	6.7	5.0
Fòsfor no fític	4.5	2.7
Fòsfor fític	2.2	2.3
Fitasa endògena (U/kg)	249	247

¹ Un kg de pinso conté: Vitamina A, 12000 IU; Vitamina D₃, 2400 IU; Vitamina E, 30 mg; Vitamina K₃, 3 mg; Vitamina B₁, 2.2 mg; Vitamina B₂, 8.0 mg; Vitamina B₆, 5.0 mg; Vitamina B₁₂, 11.0 g; Àcid fòlic, 1.5 mg; Biotina, 150 g; Pantotenat càlcic, 25 mg; Àcid nicotínic, 65 mg; Etoxiquina, 150 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; Zn, 40 mg; Mn, 60 mg; Se, 0.15 mg; I, 0.33 mg.

Taula 5.3. Efecte del procés d'autoclau (105°C) en les característiques de l'ordi.

Ordi en farina	Temps d'autoclau (min)			
	0	10	15	20
Fitasa (U/kg)	191	52	2	0
Viscositat (mPa.s)	7.70	4.51	4.50	4.72
Pentosans totals (g/kg DM)	70.2	70.4	73.1	72.2
β -Glucans totals (g/kg DM)	45.2	43.9	44.6	45.2

Ordi sencer	Temps d'autoclau (min)			
	0	10	15	20
Fitasa (U/kg)	221	41	0	0
Viscositat (mPa.s)	7.74	5.76	4.55	4.67
Pentosans totals (g/kg DM)	74.5	71.5	68.0	66.8
β -Glucans totals (g/kg DM)	45.5	44.9	45.0	45.1

Taula 5.4. Activitat fitàsica determinada per anàlisi en les dietes experimentals.

Tractaments	Dieta	Fòsfor fític (g/kg)	no afegit (FTU/g)	fitasa Enzim analitzat (FTU/g)	fitasa
T-1	Ordi no tractat - soja	4.5	-	162	
T-2	Ordi no tractat - soja	2.7	-	196	
T-3	Ordi no tractat - soja	2.7	500	765	
T-4	Ordi autoclavat - soja	4.5	-	0	
T-5	Ordi autoclavat - soja	2.7	-	12	
T-6	Ordi autoclavat - soja	2.7	500	567	

Taula 5.5. Paràmetres productius (7-21 dies).

Tractaments	Ordi	Fòsfor no fíic (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	Pes final (g)	GMD (g/d)	CMD (g/d)	IT (g/g)
T-1	No tractat	4.5	-	623 ^a	34 ^a	50 ^a	1.41 ^{cd}
T-2	No tractat	2.7	-	559 ^b	30 ^b	42 ^b	1.38 ^d
T-3	No tractat	2.7	500	640 ^a	35 ^a	49 ^a	1.38 ^d
T-4	Autoclavat	4.5	-	628 ^a	34 ^a	51 ^a	1.49 ^a
T-5	Autoclavat	2.7	-	547 ^b	29 ^b	43 ^b	1.47 ^{ab}
T-6	Autoclavat	2.7	500	611 ^a	34 ^a	49 ^a	1.45 ^{bc}
				Error estàndard	11.5	0.9	0.012
				Pr > F	***	***	***
Contrasts (Pr > T)							
				Enzim vs. Sense enzim	***	***	NS
				Ordi tractat vs. no tractat	NS	NS	***

NS: No significant ($P \geq 0.05$), *** $P \leq 0.001$.
 Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament ($P < 0.05$).

Taula 5.6. Consum de pinso i aigua (14-17 dies), viscositat intestinal estudiada al final del període i percentatge de culs bruts (11 dies).

Tractaments	Ordi	Fòsfor no fíic (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	Consum d'aigua (g/d)	Consum de pinso (g/d)	Relació aigua / pinso (g/g)	Viscositat intestinal (mPa.s)	Culs bruts (%)
T-1	No tractat	4.5	-	143 ^a	62 ^a	2.4 ^b	23 ^b	41 ^c
T-2	No tractat	2.7	-	117 ^c	49 ^b	2.4 ^b	23 ^b	54 ^{bc}
T-3	No tractat	2.7	500	141 ^a	59 ^a	2.3 ^b	14 ^b	73 ^{ab}
T-4	Autoclavat	4.5	-	150 ^a	61 ^a	2.4 ^b	52 ^a	85 ^a
T-5	Autoclavat	2.7	-	130 ^b	50 ^b	2.6 ^a	45 ^a	78 ^{ab}
T-6	Autoclavat	2.7	500	149 ^a	58 ^a	2.6 ^a	66 ^a	77 ^{ab}
		Error estàndard		3.7	1.5	0.06	7.2	1.0
		Pr > F		***	***	**	***	*
Contrasts (Pr > T)								
		Enzim vs. Sense enzim		***	***	NS	NS	NS
		Ordi tractat vs. no tractat		**	NS	***	***	NS

NS: No significant ($P \geq 0.05$), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P \leq 0.001$.
 Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament ($P < 0.05$).

Taula 5.7. Energia metabolitzable aparent de les dietes experimentals.

Tractaments	Ordi	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	EMA (MJ/kg MS)	EMAn (MJ/kg MS)
T-1	No tractat	4.5	-	12.6 ^{bc}	11.8 ^c
T-2	No tractat	2.7	-	12.4 ^c	11.6 ^c
T-3	No tractat	2.7	500	12.8 ^{bc}	12.0 ^{bc}
T-4	Autoclavat	4.5	-	13.2 ^{ab}	12.5 ^{ab}
T-5	Autoclavat	2.7	-	12.6 ^{bc}	11.8 ^{bc}
T-6	Autoclavat	2.7	500	13.5 ^a	12.7 ^a
<i>Error estàndard.</i>				0.23	0.22
				<i>Pr>F</i>	<i>**</i>
Contrasts (Pr>T)					
Enzim vs. No enzim				**	**
Ordi tractat vs. no tractat				NS	*

NS: No significant ($P \geq 0.05$), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Les mitjanes dins una columna sense lletra comuna difereixen significativament ($P < 0.05$).

Taula 5.8. Composició mineral del plasma de broiler, concentració de matèria seca i de cendres dels dits, i pes de pàncreas expressat com a % de pes corporal.

Tractaments	Ordi	Fòsfor no fíic (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	Calci plasma (mg/dl)	Fòsfor plasma (mg/dl)	Matèria seca dietes (g/kg)	Cendres dits (g/kg)	Pàncreas (%/PV)
T-1	No tractat	4.5	-	12.7 ^c	7.2 ^a	345 ^a	127 ^a	0.39
T-2	No tractat	2.7	-	15.4 ^b	4.4 ^c	320 ^{cd}	104 ^c	0.42
T-3	No tractat	2.7	500	13.5 ^c	5.5 ^b	329 ^{bc}	118 ^b	0.39
T-4	Autoclavat	4.5	-	12.7 ^c	7.3 ^a	336 ^{ab}	128 ^a	0.41
T-5	Autoclavat	2.7	-	16.3 ^a	3.8 ^c	313 ^d	105 ^a	0.42
T-6	Autoclavat	2.7	500	13.2 ^c	6.1 ^b	330 ^b	120 ^b	0.41
		Error estàndard		0.32	0.24	3.4	2.0	0.01
		Pr > F		***	***	***	***	NS
Contrasts (Pr > T)								
		Enzim vs. Sense enzim		***	***	***	***	NS
		Ordi tractat vs. no tractat		NS	NS	NS	NS	NS

NS: No significant ($P \geq 0.05$), *** $P \leq 0.001$.Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament ($P < 0.05$).

Taula 5.9. Retenció aparent i excreció de fòsfor total i de calci de les dietes experimentals.

Tractaments	Ordi	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	Retenció de P total (g/kg MS)	P total en excreta (g/kg MS)	Retenció de calci	Calci en excreta (g/kg MS)
T-1	No tractat	4.5	-	0.58 ^{cd}	7.3 ^a	0.57 ^a	14.9 ^b
T-2	No tractat	2.7	-	0.62 ^{bc}	4.2 ^c	0.45 ^b	10.5 ^d
T-3	No tractat	2.7	500	0.65 ^b	4.1 ^c	0.47 ^b	10.0 ^d
T-4	Autoclavat	4.5	-	0.54 ^d	7.8 ^a	0.30 ^c	16.8 ^a
T-5	Autoclavat	2.7	-	0.58 ^{cd}	4.7 ^b	0.23 ^d	11.9 ^c
T-6	Autoclavat	2.7	500	0.69 ^a	3.8 ^c	0.35 ^c	10.5 ^d
		Error estàndard		0.02	0.2	0.02	0.4
		Pr > F		***	***	***	***
Contrasts (Pr > T)							
		Enzim vs. Sense enzim		***	***	**	**
		Ordi tractat vs. no tractat		NS	NS	***	***

NS: No significant ($P \geq 0.05$), ** $P < 0.01$, *** $P \leq 0.001$.
 Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament ($P < 0.05$).

5.4. Referències bibliogràfiques

- Association of Official Analytical Chemists.** 1990. Official methods of analysis. 15th ed., Assoc. Anal. Chem., Washington D. C.
- Broz, J., P. Oldale, A. H. Perrin-Voltz, G. Rychen, J. Schulze i C. Simoes Nunes.** 1994. Effects of supplemental phytase on performance and phosphorus utilisation in broiler chickens fed a low phosphorus diet without addition of inorganic phosphates. *Brit. Poultry Sci.* 35, 273-280.
- Cabahug, S., V. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 1999. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus contents. I. Effects on bird performance and toe ash. *Brit. Poultry Sci.* 40, 660-666.
- Denbow, D. M.** 2000. En: Whittow, G. C. (Ed), *Sturkie's Avian Physiology*. Academic Press, San Diego, p. 314.
- Denbow, D. M., V. Ravindran, E. T. Kornegay, Z. Yi i R. M. Hulet.** 1995. Improving phosphorus availability in soybean meal for broilers by supplemental phytase. *Poult. Sci.* 74, 1831-1842.
- Dieckmann, A., R. Timmler i M. Rodehutschord.** 2002. Investigation on the optimal Ca:P ratio in studies on P availability in broiler chicken. En: *Proc. 11th European Poultry Conference*. *Arch. Geflügelk.*, 66 (Sonderheft II), p.104.
- DIN 51900.** 1977. Determination of the gross calorific value by the bomb calorimeter and calculation of the net calorific value. Deutsches Institut für Normung e. V., Berlin, Germany.
- Edwards Jr, H. M., A. B. Carlos, A. B. Kasim i R. T. Toledo.** 1999. Effects of steam pelleting and extrusion of feed on phytate phosphorus utilization in broiler chickens. *Poult. Sci.* 78, 96-101.
- Engelen, A. J., F. C. van der Heeft, P. H. G. Randsdorp i E. L. C. Smit.** 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.* 77(3), 760-764.
- Fincher, G. B.** 1992. En: Shewry, P.R. (Ed), *Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*. CAB International, Wallingford, p. 420.

- Gracia, M. I., M. A. Latorre, M. García, R. Lázaro i G. G. Mateos.** 2003. Heat processing of barley and enzyme supplementation of diets for broilers. *Poult. Sci.* 82: 1281-1291.
- Han, Y. M., F. Yang, A. G. Zhou, E. R. Miller, P. K. Ku, M. G. Hogberg i X. G. Lei.** 1997. Supplemental phytases of microbial and cereal sources improve dietary phytate phosphorus utilization by pigs from weanling through finishing. *J. Anim. Sci.* 75, 1017-1025.
- Haug, W. i H. J. Lantzsch.** 1983. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *J. Sci. Food Agr.* 34, 1423-1426.
- Izydorczyk, M.S., J. Storsley, D. Labossiere, A. W. Mac-Gregor i B. G. Rossnagel.** 2000. Variation in total and soluble beta-glucan content in hullless barley: effects of thermal, physical, and enzymic treatments. *J. Agric. Food Chem.* 48 (4): 982-989.
- Jongbloed, A. W. i P. A. Kemme.** 1990. Effect of pelleting mixed feeds on phytase activity and the apparent absorbability of phosphorus and calcium in pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 28, 233-242.
- Knuckles, B. E. i M.-C- M. Chiu.** 1999. beta-Glucanase activity and molecular weight of beta-glucans in barley after various treatments. *Cereal Chem.* 76, 92-95.
- Kornegay, E. T. i H. Qian.** 1996. Replacement of inorganic phosphorus by microbial phytase for young pigs fed on a maize-soyabean-meal diet. *Brit. J. Nutr.* 76, 563-578.
- Lima, F.R., C. X. Mendonça, Jr, J. C. Alvarez, J. M. F. Garzillo, E. Ghion i P. M. Leal.** 1997. Biological Evaluation of commercial dicalcium phosphates as sources of available phosphorus for broiler chicks. *Poult. Sci.* 76, 1707-1713.
- Mc Cleary, B.V. i M. Glennie-Holmes.** 1985. Enzymic quantification of (1-3),(1-4)- β -d-glucan in barley and malt. *J. Inst. Brew.* 91,285-295.
- Mc Cleary, B.V. i T. S. Gibson i D. C. Mugford.** 1997. Measurement of total starch in cereal products by amyloglucosidase- α -amylase method: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 80, 571-579.

- Orban, J. I., O. Adeola i R. Strohline.** 1999. Microbial phytase in finisher diets of white pekin ducks: effect on growth performance, plasma phosphorus concentration, and leg bone characteristics. *Poult. Sci.* 78, 366-377.
- Perney, K. M., A. H. Cantor, M. L. Straw i K. L. Herkelman.** 1993. The effect of dietary phytase on growth performance and phosphorus utilization of broiler chicks. *Poult. Sci.* 72, 2106-2114.
- Potkansky, A.** 2000. The comparison of plant and microbial phytases in the feeding. In: *Proceeding of the International Symposium on Phytase in Animal Nutrition*. Grela, E. R., ed., Lublin, pp. 21-27.
- Potter, L. M., M. Potchanakorn, V. Ravindran i E. T. Kornegay.** 1995. Bioavailability of phosphorus in various phosphate sources using body weight and toe ash as response criteria. *Poult. Sci.* 74, 813-820.
- Qian, H., H. P. Veit, E. T. Kornegay, V. Ravindran i D. M. Denbow.** 1996. Effects of supplemental phytase and phosphorus on histological and other tibial bone characteristics and performances of broilers fed semi-purified diets. *Poult. Sci.* 75, 618-626.
- Ravindran, V., P. H. Selle, G. Ravindran, P. C. H. Morel, A. K. Kies i W. L. 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.
- Ravindran, V., W. L. Bryden i E. T. Kornegay.** 1995. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Biol. Rev* 6(2), 125-143.
- Reddy, N.K., M. D. Pierson, S. K. Sathe i D.K. Salunkhe.** 1989. *Phytates in cereals and legumes*. CRC Press, Boca Raton.
- Sauvant, D., J.-M. Perez i G. Tran.** 2002. *Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage*. INRA, Paris, France.

- Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague.** 1996. Efficacy of supplemental microbial phytase at different dietary calcium levels on growth performance and mineral utilization of broiler chickens. *Poult. Sci.* 75, 1516-1523.
- Short, F. J., P. Gorton, J. Wiseman i K. N. Boorman.** 1996. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Anim. Feed Sci. Tech.* 59, 215-221.
- Simon, O. i F. Igbasan.** 2002. *In vitro* properties of phytases from various microbial origins. *Int. J. Food Sci. Tech.* 37, 813-822
- Simons, P. C. M., H. A. J. Versteegh, A. W. Jongbloed, P. A. Kemme, P. Slump, K. D. Bos, M. G. E. Wolters, R. F. Beudeker i G. J. Verschoor.** 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *Brit. J. Nutr.* 64, 525-540.
- Statistical Analysis System Institute Inc.** 1985. SAS User's Guide: Statistics, Ver. 5. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Viveros, A., A. Brenes, I. Arija i C. Centeno.** 2002. Effects of microbial phytase supplementation on mineral utilization and serum enzyme activities in broilers chicks fed different levels of phosphorus. *Poult. Sci.* 81, 1172-1183.
- Viveros, A., A. Brenes, M. Pizarro i M. Castaño.** 1994. Effect of enzyme supplementation of a diet based on barley, and autoclave treatment, on apparent digestibility, growth performance and gut morphology of broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 237-251.
- Wodzinski, R. J. i A. H. J. Ullah.** 1996. Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 263-302.

**EFFECTE DE L'ADDICIÓ DE FITASA MICROBIANA A DIETES AMB
SUBPRODUCTES EN PRESENÇA O NO DE FITASA ENDÒGENA**

6.1. Introducció

L'addició de enzims microbians a pinsos utilitzats en avicultura ha incrementat en els darrers anys. En alguns casos, s'afegeixen per reforçar l'acció dels enzims endògens, ja sigui dels ingredients de la dieta o del propi animal, que moltes vegades són poc actius en les condicions del tracte gastrointestinal. Un exemple d'aquests enzims és la fitasa.

La fitasa es troba involucrada en el metabolisme del fòsfor, facilitant el trencament de l'enllaç fòsfor-fitat, reduint la capacitat de l'àcid fíctic de quelar minerals, especialment els bivalents, o d'unir-se amb molècules de midó i proteïnes (Ravindran i col., 1995). L'alliberament d'aquestes nutrients permet millores en la productivitat avícola, i una millor utilització del fòsfor present en les llegums i els cereals i subproductes emprats en la fabricació del pinso.

La fitasa microbiana [3-fitasa (EC 3.1.3.8)] més emprada és la que procedeix de llevats o fongs, i en especial la procedent del gènere *Aspergillus*. Les fitases originàries d'aquests microorganismes presenten dos intervals òptims de pH, entre 2.5-3 i 5.5-6 que facilita la seva acció dins el tracte intestinal. Les fitases vegetals [6-fitasa (EC 3.1.3.26)] tenen un interval de pH òptim entre 4.5 i 5.5 (Reddy i col., 1989) per sota del pH intestinal.

El marge de temperatures òptimes de les fitases es troben entre 45 i 60°C (Wodzinski i Ullah, 1996), disminuint ràpidament la seva activitat a temperatures més elevades, no trobant-se activitat a temperatures superiors a 100°C (Juanpere i col., 2004). Les temperatures de fabricació dels pinsos acostumen a ser entre 70 i 90°C, i per tant, es fàcil pensar que l'activitat fitàsica dels ingredients de la dieta pot reduir-se o anul·lar-se per efecte de la temperatura. Comercialment, les fitases microbianes es presenten amb una coberta protectora que comporta no veure's afectades per la temperatura, especialment quan el pinso es prepara en forma de grànul (López-Álvarez, 2002).

En avicultura, la majoria d'estudis que s'han realitzat sobre els efectes de la disminució de la fitasa endògena s'han realitzat en cereals (Jongbloed i Kemme, 1990), no existint massa informació sobre com afecta en subproductes i les seves conseqüències. En canvi, sí que s'han realitzat estudis de la degradació de la fitasa en subproductes (segó de blat) en estudis d'humans. Sandberg i col. (1986,

1987 i 1996) han desenvolupat estudis en els que descriuen mètodes per inactivar la fitasa, avaluar la metodologia emprada, i estudiar els efectes en la dieta dels humans, trobant que l'absorció de ferro amb dietes amb segó de blat cru o segó de blat amb la fitasa inactivada era quasi bé igual, augmentant significativament quan s'afegia fitasa microbiana activa a la dieta (Sandberg i col.,1997).

Dins dels estudis referits a subproductes en pollastres, trobem que Viveros i col. (2002) van passar segó de sègol per autoclau a 120° i 15 min, per a després subministrar-ho en dietes de moresc-soja. Ribeiro i col (2003) van utilitzar dietes de moresc-soja amb segó d'arròs, que és alt en fitat, i van sotmetre la dieta a un procés de granulació (a 85°C). Aquests autors van trobar que la granulació no afectà negativament l'activitat fitàsica de les dietes.

Els principals objectius d'aquest assaig foren l'avaluació dels efectes en la biodisponibilitat de fòsfor i altres minerals per l'addició de fitasa exògena a dietes de moresc-soja amb segó de blat, depenent de la presència o no d'activitat fitàsica endògena del segó de blat.

6.2. Material i mètodes

6.2.1. Maneig dels animals

S'utilitzaren dos-cents vuitanta-vuit pollastres mascles de la raça Ross 308 d'1 dia de vida. La prova va durar 24 dies. Només es van utilitzar els animals sense problemes de potes, amb ulls oberts i un comportament actiu. Els pollastres es posaren en 48 gàbies situades en dos bateries Petersime, en una nau sense finestres i amb calefacció elèctrica i ventilació forçada. Els programes de llum i temperatura emprats foren els habituals en la granja, seguint el següent programa:

1a setmana: 30-35° C	0-4 dies: 23 h de llum
2a setmana: 29-32° C	4-10 dies: 20 h de llum
3a setmana: 27-30° C	10 fins al final: 18 h de llum

L'aigua i el pinso en forma de farina es varen subministrar *ad libitum* durant tot l'experiment.

6.2.2. Tractaments i disseny experimental

Els animals es distribuïren en vuit tractaments, que variaven en el subproducte emprat (tractat o no per l'autoclau), el nivell de subproducte (0, 5 o 10%), i el nivell de fitasa exògena (500 U per kg de pinso), tal com es mostra en la Taula 6.1. El blat es va tractar en autoclau per un procés de vapor calent (a 105° C durant 10 minuts, en safates de 10 mm de profunditat), comprovant-se la total eliminació de l'activitat fitàsica en finalitzar el procés (Taula 6.2). Tots els tractaments experimentals es replicaren sis vegades, i cada rèplica contenia sis animals. Els animals només reberen un pinso durant tot l'assaig.

6.2.3. Fabricació del pinso i composició nutritiva de les dietes

Tots els ingredients inclosos en els pinsos, excepte el greix, la sal, el fosfat bicàlcic, el carbonat càlcic, vitamines i el corrector mineral, i els productes avaluats, varen ser mòlts en un molí de 30 CV, a una mida de tamís de 3mm. Les dietes base es formularen per tal que fossin totes iguals en proteïnes i en energia, tal com es veu en la Taula 6.3. El segó de blat i el moresc van ser de la collita de 2000. La fitasa microbiana (E.C. 3.1.3.8) utilitzada en l'assaig era una preparació experimental (SP-1002 en forma de pols, amb una activitat fitàsica de 3295 U/kg, de l'empresa Roche Vitamins). Des del primer dia de l'assaig, els pinsos contenien diòxid de titani (TiO₂) com a marcador de digestibilitat, en una concentració de 5g per kg de pinso.

6.2.4. Anàlisi química

Totes les mostres de les dietes experimentals i les matèries primeres es passaren pel molí amb un sedàs de 0.5 mm. Les mostres s'analitzaren utilitzant els mètodes estàndards de l'AOAC (1990) per matèria seca (Codi 934.01), extracte eteri (Codi 920.39), cendres (Codi 942.05), proteïna bruta (976.05) i fibra bruta (Codi 978.10). La concentració de fòsfor total s'analitzà colorimètricament pel mètode del molibdo-vanadat (Codi 965.17). La concentració de calci es va analitzar per espectrofotometria d'absorció atòmica de flama. El biòxid de titani en els pinsos, les excretes i els continguts ileals s'analitzaren segons el procediment descrit per Short i col. (1996). L'activitat

fitàsica present en les matèries primeres i els pinsos finals s'analitzaren segons Engelen i col. (1994).

6.2.5. Paràmetres productius i assaig de balanç

Els animals es pesaren conjuntament en arribar a la granja i per gàbia als 21 dies, tanmateix com el pinso. Així es calculà el consum de pinso, el guany de pes mig diari i l'índex de transformació entre 1 i 21 dies. La mortalitat s'enregistrà diàriament, incloent la causa de la mort. En el desè dia, es va avaluar el percentatge d'animals amb culs bruts. Entre els dies 15 i 19 de l'assaig es registraren el consum d'aigua, de pinso, i s'obtingué la relació aigua/pinso. L'energia metabolitzable aparent (EMA) es determinà pel procediment del marcador d'òxid de titani. Les excretes es recolliren en el 21è dia de l'assaig, durant un període curt de temps, per tal que fossin fresques, van ser emmagatzemades a -20° C, i finalment liofilitzades; posteriorment, es molgueren i s'emmagatzemaren pel seu anàlisi. L'energia bruta de les mostres dels pinsos i de les excretes foren analitzades mitjançant un combústió complerta en un calorímetre adiabàtic IKA C-400 (DIN 51900, 1977) per obtenir l'EMA de les dietes.

6.2.6. Estudis sobre la retenció de minerals

Tots els animals es varen sacrificar mitjançant injecció intravenosa de pentobarbital sòdic en els dies 22, 23 i 24 de l'assaig experimental. Es recolliren mostres intestinals des del diverticle de Meckel fins a 15 cm abans a la unió ili-cecal, que foren emmagatzemades en gel, per tal de mesurar la viscositat intestinal de la digesta fresca. Les mostres d'aquests continguts digestius es centrifugaren a 12000 rpm durant 5 min a 15° C, i els sobrenadants recollits es guardaren en gel fins que la viscositat fos determinada mitjançant un viscosímetre digital Brookfield, mantingut a 30° C i llegida després d'1 min. Abans de l'eutanàsia, es recolliren mostres de sang de dos animals per rèplica, per punció cardíaca. El plasma se separà per centrifugació de la sang a $2000 \times g$ durant 10 minuts (Lima i col., 1997), i es determinà la concentració de fòsfor i calci del plasma. Tanmateix, després de l'eutanàsia, es tallaren els dits del mig de dos animals de cada rèplica (entre el segon i el

tercer tars), que foren pesats i calcinats per tal d'obtenir els valors de cendres dels dits (Cabahug i col., 1999).

6.2.7. Cura dels animals

Totes els procediments emprats amb els pollastres han estat aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de l'IRTA

6.2.8. Càlculs

Els valors d'EMA de les dietes es calcularen segons la fórmula següent, tenint en compte que es realitzaren les correccions apropiades per diferències en el contingut d'humitat.

$$EMA = EB_{dieta} - ((TiO_2, dieta / TiO_2, excreta) \times EB_{excreta})$$

on EB_{dieta} i $EB_{excreta}$ són l'energia bruta del pinso i de l'excreta, respectivament.

Els valors d'EMA corregida per una retenció de nitrogen zero (EMAn) es calcularen segons la fórmula següent:

$$EMAn, dieta = EMA - [(GMD \times 0.2 \times 8220) / (CMD \times 6.25)]$$

Els coeficients de digestibilitat dels nutrients es calcularen usant el procediment de marcador per la següent fórmula:

$$Dig X = 1 - ((TiO_2, dieta \times X_{excreta}) / (TiO_2, excreta \times X_{dieta}))$$

on X_{dieta} i $X_{excreta}$ són la concentració del nutrient X en la dieta i en l'excreta, respectivament.

6.2.9. Anàlisi estadística

Les dades es varen analitzar amb una anàlisi de varianza amb disseny de blocs a l'atzar, emprant els procediments General Lineal Models (GLM) del Statistical Analysis System Institute Inc. (1985).

La significància estadística s'acceptà quan $P < 0.05$. Quan es trobaren que els efectes principals eren significatius, les mitjanes individuals foren comparades mitjançant el test de Duncan de interval múltiple. Els efectes principals de l'addició de fitasa microbiana, del tractament amb autoclau i del nivell de inclusió del segó de blat foren analitzats pels següents grups de contrastos:

Addició de fitasa microbiana: T-1, T-5 i T-7 enfront de T-4, T-6 i T-8.

Tractament de segó de blat: T-2 i T-3 enfront de T-5 i T-7.

Nivell inclusió de segó de blat: T-2 i T-5 enfront de T-3 i T-7.

6.3. Resultats

6.3.1. Tractament del segó de blat

Prèviament a la prova experimental en granja, es van realitzar uns estudis per optimitzar les condicions emprades en el procés d'autoclau necessàries per inactivar la fitasa endògena del segó de blat. Els resultats obtinguts en el nostre laboratori (1219 U de fitasa per g pel segó de blat normal, i menys de 5 U/g pel segó de blat a 10, 15, 20 i 30 minuts) ens van demostrar que les condicions eren les adequades. En la Taula 6.2, es presenten els valors de l'activat fitàsica obtinguts en les dietes usades en l'assaig experimental, segons anàlisi realitzat per l'empresa DSM Nutritional Products, en la seva seu de Basilea. L'anàlisi de les dades ens permet comprovar com els tres primers pinsos, que tenen un creixement en la concentració de segó de blat, presenten la mateixa tendència en l'activitat fitàsica, amb el doble de valors de la dieta amb 10% de segó respecte a la dieta amb 5% (153 U/g per la dieta amb 10% i 83 U/g per la dieta amb un 5% de segó), essent aquests valors lleugerament superiors als valors teòrics (Taula 6.3). Observant els valors de fitasa dels T-4, T-6 i T-8 es confirma que la quantitat de fitasa exògena afegida es troba propera a les 500 U de fitasa/kg. També es pot comprovar com les dietes amb el segó passat per l'autoclau i la dieta sense segó tenen activitats fitàsiques molt baixes, tal com correspon, i que estan per sota del límit de detecció de 50 U/Kg.

6.3.2. Paràmetres productius

Tant el pes dels animals en el darrer dia de la prova com el guany de pes mig diari i el consum mig diari de pinso es veieren afectats tant per la presència de fitasa microbiana exògena en les dietes com per la presència de fitasa endògena del segó de blat (Taula 6.4). Es pot dir que l'addició de fitasa exògena va fer augmentar el pes final en uns 30-35 grams respecte als animals que no menjaren fitasa microbiana, essent el guany mig d'uns 2 grams, la mateixa quantitat que va créixer

el consum de pinso. L'índex de transformació (relació entre consum de pinso i guany de pes) va donar una significància de $P = 0.0541$ per a l'addició de fitasa exògena a les dietes, amb valors més interessants per a la producció quan la fitasa és afegida, mentre que quan el segó és passat per l'autoclau no s'obtingueren diferències estadísticament significatives. La inclusió de 10% de segó en les dietes experimentals de moresc-soja va produir animals més grans i amb una eficàcia millor ($P < 0.001$), però tant en les dietes amb un 5% com per un 10% els animals consumiren igual quantitat de pinso.

Si tenim en compte, però, el període de temps dels dies 15 a 19, podem comprovar com el consum de pinso i aigua es veu afectat tant per l'addició de la fitasa exògena, com pel nivell de segó en la dieta ($P < 0.05$) o com per l'eliminació de la fitasa endògena ($P < 0.001$), tal com es pot observar en la Taula 6.5. En tots tres casos, la relació entre l'aigua beguda i el pinso consumit es manté igual, no essent estadísticament diferent.

6.3.3. Viscositat intestinal

En la Taula 6.5 es mostren els valors obtinguts de viscositat intestinal de tots els animals. L'anàlisi jeràrquic de tots els tractaments ens mostra que no hi ha diferències pel que fa a la viscositat, tot i que el valor més baix es troba pels T-1 i T-8 (2.8 mPa.s) i el més alt pel T-6 (4.5 mPa.s), essent més del 60% superior un de l'altre. Aquesta manca de diferència en els resultats també es veu reflectida en efectuar les anàlisis dels diferents contrastos. Es va observar que cap dels tres factors estudiats van fer canviar la viscositat del contingut intestinal.

6.3.4. Valors energètics i digestibilitat de nutrients

En la Taula 6.6 es mostren els valors de l'EMA i l'EMAn. El valor energètic més gran s'obtingué per la dieta amb 10% de segó i fitasa (T-8), mentre que els més baixos fou per les dietes T-1 i T-2, és a dir, la dieta sense segó i la dieta amb un 5% de segó no tractat, respectivament.

No es produïren diferències significatives per l'eliminació de la fitasa endògena del segó de blat en cap dels dos paràmetres. Sí que se n'observaren en ambdós paràmetres quan s'analitzà el factor fitasa i el nivell de segó. Es van obtenir valors energètics més elevats quan, per una part, s'incloué

fitasa en la dieta, i per altra banda, s'inclogué segó en un 10%, ja que per mantenir les nivell energètic de la dieta, també inclogué en la dieta un 6% de llard.

Pel que fa a la digestibilitat ileal de proteïna (Taula 6.6) es mostren només els resultats corresponents a la mitjana dels tractaments, ja que per problemes de quantitat de mostra, es van barrejar les diferents rèpliques per obtenir només una rèplica sola. Per tant, es presenten les dades com a informació de quines són, tot i no tenir opció de realitzar l'estudi estadístic. Veient les dades es pot observar que el valor més alt s'obté per la dieta amb 10% de segó i sense tractar (85.0%), mentre que per les dietes amb 10% de segó i autoclavat presenten els valors més baixos (81.5% per la dieta sense fitasa i 81.4% per la dieta amb fitasa) conjuntament amb la dieta amb un 5% de segó no tractat (81.4%).

La digestibilitat fecal de midó va ser bastant elevada, obtenint-se valors dins d'un petit interval, que va des del 93.1% de T-3 fins al 95.0% del T-2. L'aplicació de fitasa en les dietes va produir diferències entre els tractaments amb una significància de $P = 0.0575$. Tenint en compte aquest grau de significància, els millors resultats s'obtingueren després d'afegir la fitasa microbiana. Les dietes amb 5% de segó donaren millors resultats que les que tenien un 10% en la seva composició ($P < 0.01$), donant un percentatge major en un 1.7% (94.8 enfront de 93.1%). No s'obtingueren millores degut a la presència de la fitasa endògena del segó de blat.

6.3.5. Efectes sobre la disponibilitat de minerals

Les dades de la composició mineral del plasma dels animals emprats en l'assaig es troben en la Taula 6.7. Observant les dades es pot veure que la presència de fitasa microbiana en la dieta produeix un augment en la concentració de fòsfor no fític (en més d'un 25%). La quantitat de fòsfor en el plasma va lligada a la concentració de calci. La presència de fitasa exògena en les dietes fa disminuir la presència de calci en el plasma, cosa que es ratifica en realitzar el contrast corresponent a la presència de fitasa microbiana ($P < 0.0001$), havent-hi un descens des de 14.3 fins a 13.2 mg/dl. L'eliminació de la fitasa endògena del segó de blat no va tenir cap efecte sobre la concentració de

calci, però si en la del fòsfor no fític, provocant una disminució propera al 12% (de 6.3 a 5.6 mg/dl). No s'observà cap efecte per la diferent quantitat de segó de blat present en les dietes.

La concentració de cendres en els dits es un bon indicador de la mineralització per l'aportació de la dieta. Només s'observaren efectes significatius deguts a l'addició de fitasa microbiana en la dieta, amb augments que van des de 11.3 a 12.0%, per les dietes sense fitasa i amb fitasa, respectivament. Per acabar de comprovar aquest fet, es mesurà la quantitat de fòsfor en els dits, obtenint-se que la presència de fitasa exògena provocà un increment estadísticament significatiu des de 14.5 fins a 15.0% ($P < 0.01$).

La ingestió, excreció i retenció aparent de fòsfor total es mostren en la Taula 6.8. Amb els resultats dels contrastos lineals obtinguts només s'observaren efectes en la quantitat ingerida de fòsfor total deguda a l'addició de fitasa exògena i a l'eliminació de l'endògena del segó. Es produeix un augment en la ingestió del fòsfor total propera al 10% (21 grams) quan s'afegeix la fitasa microbiana, i hi ha una disminució del consum (19 grams) en eliminar la fitasa endògena, ambdues variacions en el mateix sentit que la ingesta de pinso. No s'observaren variacions estadístiques en la retenció aparent de fòsfor total en cap dels tres contrastos estudiats. Malgrat no ser significatius, si que es poden observar unes tendències a augmentar la retenció de fòsfor total després de l'addició de fitasa microbiana en les dietes (62.7% sense fitasa i 65.8% amb fitasa, $P = 0.10$) i per l'augment en el nivell de segó (60.9% per les dietes amb 5% de segó i 62.6% per les dietes amb 10% de segó, $P = 0.40$), i a disminuir per l'eliminació de la fitasa endògena mitjançant l'autoclau (62.8% sense fitasa i 60.9% amb fitasa, $P = 0.45$). Pel que fa a l'excreció del fòsfor total, s'observaren tendències a ser menors després d'afegir la fitasa a la dieta, d'augmentar el segó i d'eliminar la fitasa endògena del segó.

6.4. Discussió

Amb l'estudi realitzat s'ha pogut comprovar que temperatures superiors a 100°C permeten inactivar l'enzim fitasa de subproductes de molinera, amb una alta activitat fitàsica endògena. Segons dades d'anàlisi del laboratori IRTA, el segó de blat utilitzat en la composició de les dietes presentava una activitat de 1219 U/g en el seu estat natural. S'ha pogut determinar que l'activitat dels pinsos ja fabricats era nul·la o quasi bé nul·la en els tractaments T-5 a T-8 (Taula 6.2), tenint en compte que l'únic ingredient amb una quantitat important de fitasa endògena era el segó. Sandberg i els seus col·laboradors (1987) ja van descriure que cuinant una dieta de segó per a humans, encara que siguin condicions molt fortes, pot fer perdre l'activitat fitàsica del segó, sense que observessin canvis en el contingut de midó, dels components de la fibra de la dieta o del fitat. En un altre estudi del mateix grup (Sandberg i col., 1996), els autors van aconseguir inactivar la fitasa endògena de mostres de 100 grams de segó després de passar-lo per un autoclau a una temperatura de 120°C durant 6 minuts. Les condicions emprades en aquesta prova van diferir en una menor temperatura (però encara superior a la temperatura de desnaturalització de l'enzim) i més temps (10 minuts), utilitzant-se aquest temps ja que les mostres que es posaven en l'autoclau cada vegada eren superiors a 1 quilo de pes.

La inclusió de la fitasa microbiana en les dietes experimentals de moresc-soja amb segó de blat van produir augments significatius en el creixement dels pollastres i en el consum de pinso (Taula 6.4). Les millores trobades en ambdós paràmetres permeten que l'índex de transformació pugui considerar-se que és diferent degut a la presència de l'enzim exogen a una significància del 5.4%, una mica superior al 5% que tenim establert com a límit acceptat. L'índex va ser millor productivament parlant, és a dir més baix, quan la fitasa fou afegida als pinsos. Aquests resultats estan d'acord amb el que troben altres autors (Broz i col., 1994; Windisch i Kirchgeßner, 1996; Ahmad i col., 1999). Com és ben sabut, les dietes de moresc-soja són les més emprades en els estudis de creixement i de digestibilitat, tant en porcs com en pollastres. Per això, encara que en el nostre estudi el segó de blat s'addiciona de manera gradual, la base de la dieta està composta pel

morenc com a cereal, i per tant com a aportació principal d'energia, i la soja, com a aportació proteica.

L'eliminació de la fitasa endògena del segó de blat, juntament amb la baixa activitat de la dieta base de morenc-soja va produir un menor consum de pinso, i com a resultat, un menor creixement dels animals. Les dues disminucions, que són de l'ordre del 6-7%, no van fer variar l'índex de transformació, mantenint-se la relació en presència o no de fitasa endògena. Es pot pensar, doncs, que la fitasa endògena no fa variar molt les dades productives. Però no és així, ja que l'animal té un pes inferior en uns 25 g respecte a l'animal que consumeix fitasa endògena de la dieta, i, a més, en aquest segon cas, l'índex de transformació també és menor.

Les dades referents al consum d'aigua i pinso, durant la tercera setmana del període experimental (Taula 6.5), semblen confirmar que, la fitasa exògena influeix incrementant aquests paràmetres i que l'eliminació de la fitasa endògena els disminueix. De manera similar, la relació entre l'aigua beguda i el pinso ingerit es va mantenir constant, encara que sembla que la tendència sigui a augmentar (més aigua beguda per cada gram de pinso consumit) quan hi ha fitasa afegida o segó tractat.

Els valors obtinguts de viscositat intestinal no es modificaren per la fitasa, ja sigui l'exògena afegida o l'endògena inactivada. En qualsevol cas, els valors obtinguts són baixos, com és habitual en dietes en què el morenc representa l'ingredient principal (veure dades en l'assaig 5, capítol 8). Amb l'observació de les dades de cada tractament (Taula 6.5), no es pot treure massa idees de com afecta el procés d'autoclau o l'addició de fitasa exògena. Les dietes amb un increment lineal de segó sense tractar presenten un increment similar de viscositat. Per tant, això pot fer pensar que el segó com a matèria primera fa incrementar la viscositat, tot i tenir-ne només 1.59 mPa.s a pH 1.5. En presència de fitasa exògena, la viscositat presenta un comportament irregular, encara que no significatiu: es manté igual sense segó; amb 5% de segó, augmenta des de 3.5 a 4.5 mPa.s; i amb 10% de segó, disminueix des de 3.4 a 2.8 mPa.s.

L'addició de fitasa microbiana en les dietes de moresc, soja i segó de blat va produir augments en els valors energètics de les dietes, cosa que també es donà en contrastar les dietes amb 10% de segó respecte les que en portaven un 5%. L'augment dels valors energètics per la fitasa està ben documentat (Ravindran i col., 1995 i 2001; Ravindran, 1999), podent ser explicat per la hidròlisi de l'àcid fític que fa que les proteïnes i el midó que poden estar units siguin més disponibles. La millora per una major quantitat de segó de blat en la dieta no és massa clara. L'addició de segó de blat fa disminuir la presència de moresc en la dieta, el qual té més del doble d'energia metabolitzable (13.85 MJ/kg) que el segó (6.56 MJ/kg) (Leeson i Summers, 1991), el que semblaria que els valors energètics haguessin de disminuir. Però per evitar aquesta disminució, i en el nostre cas també compensar-la, s'afegeix una major quantitat de llard, amb una energia metabolitzable de 35.96 MJ/kg, que fa augmentar 0.12 MJ/kg l'energia de la dieta amb 10% de segó respecte a les dietes que en tenen un 5%.

La inclusió d'un 10% de segó en les dietes va permetre una millora en les digestibilitats fecals dels nutrients. Tal com s'acaba de dir, en aquesta dieta la quantitat de greixos és més elevada que en les anteriors, per la qual cosa és més fàcil que pugui ser assimilat en el cos i augmentar-ne la retenció. En canvi, l'augment de la quantitat de segó en les dietes va propiciar una disminució en la digestibilitat fecal del midó, segurament deguda a què augmentant el segó també s'augmenta la concentració de PNA, i per tant fent menys disponible el midó. La inclusió de la fitasa microbiana no va variar la digestibilitat de lípids deixant-la igual, però sí que millorà la de midó encara que va ser en una significància de $P = 0.0575$. Com se sap la fitasa permet que el midó enllaçat al grup fosfat de l'àcid fític s'alliberi augmentant la seva utilització, tal com descriuen Ravindran i col. (2000).

La concentració plasmàtica de calci disminuï i la de fòsfor no fític augmentà després de l'addició de fitasa microbiana en les dietes (Taula 6.7). L'eliminació de la fitasa endògena pel procés de temperatura (T-2 i T-3 enfront de T-5 i T-7) va tenir una influència negativa en la concentració de fòsfor no fític, disminuint-la, passant de 6.3 a 5.6 mg/dl ($P < 0.05$), observant-se que amb una $P =$

0.0754 la concentració de calci augmenta des de 13.8 fins a 14.3 mg/dl. Probablement, el procés d'autoclau ha produït modificacions en el fitat, que poden ser de tipus d'estructura, canviant la seva conformació, o també pel trencament d'enllaços, la qual cosa ha permès que augmenti la concentració de calci lliure en el segó, i per tant en resulti més disponible. Com que sembla que hi ha un augment en la concentració de calci, es podria entendre el perquè de la disminució de la concentració del fòsfor no fític. Encara que veient aquesta disminució ens pot portar a pensar que la temperatura modifica l'estructura de l'àcid fític, canviant la conformació i produint uns altres tipus d'enllaços, que no pas el trencament total de l'enllaç fitat-fòsfor, doncs hauria de augmentar la concentració de fòsfor. De produir-se així, s'estaria en desacord amb Mulimani i col. (2003), els quals van observar que l'autoclau produeix reduccions significatives d'àcid fític en lleguminoses, que contenen una concentració molt elevada d'aquest (18 – 26%).

L'addició de l'enzim fitasa microbiana en les dietes de morenc i soja amb segó de blat va augmentar la concentració de cendres dels dits (Taula 6.7) significativament en un 0.7%, aproximadament. L'augment en la quantitat de les cendres indica que més minerals s'han dipositat en els ossos dels animals, gràcies al fet que s'ha augmentat la seva disponibilitat pel trencament del complex fitat-minerals per acció enzimàtica. Deposició que es confirmà amb l'anàlisi de la concentració de fòsfor en les cendres dels dits, amb un augment del 0.5% en valor absolut (de 14.5 a 15.0%). Alguns autors ja han descrit l'augment de la concentració de minerals en ossos, ja sigui en els dits, com en el nostre cas, o en tibia (Zanini i Sazzad, 1999), encara que també hi ha estudis que mostren que l'aplicació de fitasa microbiana en dietes de morenc i soja (sense segó) no produeixen variació en la concentració de fòsfor en tibia en broilers (Broz i col., 1994; Sebastian i col., 1996a, b) i en porcs (Young i col., 1993). Aquests autors descriuen millores amb les cendres i fòsfor, però també en altres minerals com el Ca, Cu o Zn, encara que no en tots els casos els resultats siguin significatius. L'eliminació de la fitasa endògena del segó no va produir variacions en la retenció aparent de fòsfor total (Taula 6.8). La manca de variacions també es va produir en el cas de l'addició de fitasa microbiana. En la bibliografia, generalment, l'addició de fitasa a dietes de morenc-soja representa

un increment en la retenció de fòsfor total (Cabahug i col.,1999; Zanini i Sazzad, 1999; Pérez-Vendrell, 2000b; Rutherford i col., 2004), cosa que no passa en aquest estudi en els tractaments T-1 i T-4, que es corresponen a dietes de morenc-soja sense segó afegit amb i sense fitasa exògena, respectivament. Però, a més, el valor obtingut pel tractament T-1 (66.2%) és bastant elevat si el considerem per a valors normals per a aquest tipus de dietes trobats tant en els nostres assaigs (veure dades de l'assaig 1; Juanpere i col., 2001, 2002) com en treballs d'altres autors (Sebastian i col., 1996a; Lan i col., 2002).

Quan s'augmenta la quantitat de segó inclòs en les dietes, també s'augmenta la concentració de fòsfor total present, ja que el segó té una elevada concentració de minerals en la seva composició (11.6 g de fòsfor total/kg en el segó de blat enfront de 2.8 g/kg de morenc i 6.1 g/kg de soja, segons Eeckhout i De Paepe, 1994). Una de les condicions fixades en el moment de formular és que les dietes han de tenir 2.7 g de fòsfor no fític per quilo de pinso, per tant hi ha d'haver un increment en la concentració de fòsfor fític. En principi, aquest fet no ha de tenir influència en la retenció aparent del fòsfor si ens fixem amb la fitasa microbiana afegida a la dieta, doncs en fer els contrastos de les dietes amb i sense fitasa es contrarestarien els possibles efectes, i per la mateixa raó en l'anàlisi dels efectes de la fitasa endògena. On si que es podrien produir diferències seria en l'estudi del contrast del nivell de segó, ja que, com s'ha dit anteriorment, les dietes amb 10% de segó tenen una major concentració tant de fòsfor total com de fític, però aquestes diferències no s'han trobat.

Un paràmetre important per avaluar els beneficis de la fitasa és el de l'excreció de fòsfor total. Amb l'enzim s'aconsegueix una millor utilització i, per tant, hauria de disminuir la quantitat excretada per l'animal. En aquest experiment, amb dietes baixes amb fòsfor no fític, l'excreció no es veu modificada per la presència de l'enzim exogen, ja que en les dietes amb nivells de fòsfor no fític igual a 0.45%, nivell recomanat pel NRC, el que s'excreta és l'excedent afegit en la dieta. Les dades no són sorprenents doncs ja s'ha observat en altres experiments duts a terme pel nostre grup (Pérez-Vendrell i col., 2000a)

L'augment de la concentració de segó de blat té una especial incidència en els valors energètics de la dieta i en la digestibilitats fecal de midó i lípids (Taula 6.6). En posar un 10% de segó, l'EMA i l'EMAn de la dieta augmentaren ambdós significativament. En afegir el segó, aportació principal de fibra de la dieta, (i per tal d'assajar dietes isoenergètiques) s'ha de fer una modificació de la composició de la dieta, ja que disminueix el valor energètic de la dieta (el segó te menys energia que el morenc) i augmenta la quantitat de greix o llard a afegir. Aquest greix més disponible és el que fa augmentar l'energia metabolitzable de la dieta. L'addició d'una major quantitat de segó de blat va fer disminuir la digestibilitat del midó en quasi bé un 2%, resultat que està en desacord amb el trobat per Jorgensen i col. (1996), on en un estudi amb concentracions més elevades de segó (19 i 38%) no van observar variacions, amb una digestibilitat del 97%, en dietes d'ordi.

La finalitat de l'ús del segó en animals monogàstrics i en humans és diferent. En els animals fa disminuir la viscositat, fent que el contingut que passa per l'intestí sigui més assimilable, mentre que en els humans actua com a arrossegador de substàncies, com per exemple el colesterol. Ambdós efectes, no obstant, són produïts per la gran concentració de PNA que presenta el segó. Tal com s'ha dit, en augmentar el nivell de segó, s'ha de posar més greix, nutrient que esdevé més disponible, per sobre del que pot haver-hi en el morenc o la soja, i conseqüentment, s'incrementa la seva digestibilitat.

L'augment de la concentració de segó, disminució del morenc present, que és de 70 g/kg de la dieta al 5% a la del 10% de segó, i la pujada que tot això implica en el greix a afegir a la dieta (de 39 a 60 g/kg per les dietes del 5% i 10%, respectivament), fan que els animals que menjaren les dietes amb una major presència de segó presentaren un pes final superior als altres, amb un increment del consum de pinso i una disminució de l'índex de transformació (Taula 6.4). Tal com s'ha descrit anteriorment, el factor que té una major acció és la quantitat de greix, que permet una major aportació energètica disponible, i els subseqüents resultats en els paràmetres productius.

En general, la inclusió de fitasa en dietes de morenc-soja deficitàries en fòsfor, en presència de segó de blat, va tenir efectes beneficiosos sobre la producció de pollastres broilers, amb una millor

aportació energètica de la dieta, però sense tenir repercussions pel que fa a l'excreció de fòsfor, que es mantingué igual. Quan en aquestes dietes s'afegeix segó de blat, sembla que afegir un 10% pot ser més beneficiós que l'addició d'un 5%, ja que els resultats productius i de digestibilitat de nutrients són més positius. L'eliminació de la fitasa endògena del segó de blat present en dietes de moresc-soja deficientes de fòsfor no seria recomanable ja que va suposar un menor consum de pinso i creixement dels animals, i una disminució en el fòsfor no fític en plasma. Les digestibilitats de nutrients i retencions minerals no variaren per l'eliminació de la fitasa.

Taula 6.1. Tractaments experimental emprats.

Tractaments	Segó de blat	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa ¹ (U/kg)
T-1	0% No tractat	2.7	-
T-2	5% No tractat	2.7	-
T-3	10% No tractat	2.7	-
T-4	0% No tractat	2.7	500
T-5	5% Autoclavat	2.7	-
T-6	5% Autoclavat	2.7	500
T-7	10% Autoclavat	2.7	-
T-8	10% Autoclavat	2.7	500

¹ Enzim usat: Phytase SP 1002 CT batch PPQ 6883 en forma de pols (Activitat fitàsica: 3169 U/g) (subministrat per Roche Vitamins Ltd, Basilea)

Taula 6.2. Activitat fitàsica trobada en les dietes experimentals.

Tractaments	Segó de blat	Enzim fitasa afegit (U/g)	Enzim fitasa analitzat (U/g) ¹
T-1	0% No tractat	-	< 50
T-2	5% No tractat	-	83
T-3	10% No tractat	-	153
T-4	0% No tractat	500	657
T-5	5% Autoclavat	-	<50
T-6	5% Autoclavat	500	626
T-7	10% Autoclavat	-	< 50
T-8	10% Autoclavat	500	660

¹ anàlisi realitzat per Roche Vitamins Ltd.

Taula 6.3. Composició de les dietes experimentals.

INGREDIENT (g/kg)	Segó de blat		
	0%	5%	10%
Moresc	604.0	536.9	467.2
Segó de blat	-	50.0	100.0
Farina de soja 480 g/kg	343.1	339.5	334.5
Llard	18.1	39.1	60.0
DL-metionina	2.6	2.6	2.7
L-lisina HCl	0.7	0.7	0.7
Carbonat càlcic	12.0	12.0	12.0
Fosfat bicàlcic	10.7	10.5	10.2
Sal	4.7	4.7	4.7
Clorur de colina 50%	0.2	0.2	0.2
Minerals i vitamines ¹	4.0	4.0	4.0
Composició estimada de nutrients (g/kg)			
Energia metabolizable (MJ/kg)	12.5	12.5	12.5
Protèina bruta	205.1	206.5	210.0
Fibra bruta	24.3	26.6	28.8
Extracte eteri	47.0	67.2	87.3
Cendres	55.4	56.2	56.9
Lisina	12.0	12.0	12.0
Met + Cys	9.2	9.2	9.3
Calci	8.1	8.1	8.1
Fòsfor total	6.0	6.3	6.6
Fòsfor no fític	2.7	2.7	2.7
Fòsfor fitat	3.3	3.6	3.9
Fitasa endògena (U/kg)	6	66	127

¹ Un kg de pinso conté: Vitamina A, 12000 IU; Vitamina D₃, 2400 IU; Vitamina E, 30 mg; Vitamina K₃, 3 mg; Vitamina B₁, 2.2 mg; Vitamina B₂, 8.0 mg; Vitamina B₆, 5.0 mg; Vitamina B₁₂, 11.0 g; Àcid fòlic, 1.5 mg; Biotina, 150 g; Pantotenat càlcic, 25 mg; Àcid Nicotínic, 65 mg; Etoxiquina, 150 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; Zn, 40 mg, Mn, 60 mg, Se, 0.15 mg, I, 0.33 mg

Taula 6.4. Paràmetres productius 1-21 dies.

Tractament	Segó de blat	Enzim fitasa afegit (U/g)	Pes final (g)	GMD (g/d)	CMD (g/d)	IT (g/g)
T-1	0% No tractat	-	650 ^{cd}	29 ^{cd}	40 ^b	1.39 ^a
T-2	5% No tractat	-	702 ^{ab}	31 ^{ab}	43 ^a	1.38 ^a
T-3	10% No tractat	-	740 ^a	33 ^a	43 ^a	1.31 ^c
T-4	0% No tractat	500	682 ^{bc}	30 ^{bc}	42 ^{ab}	1.37 ^{ab}
T-5	5% Autoclavat	-	642 ^d	29 ^d	40 ^b	1.38 ^a
T-6	5% Autoclavat	500	689 ^b	31 ^b	41 ^{ab}	1.35 ^b
T-7	10% Autoclavat	-	708 ^{ab}	32 ^{ab}	41 ^{ab}	1.30 ^c
T-8	10% Autoclavat	500	732 ^a	33 ^a	43 ^a	1.30 ^c
<i>Error estàndard</i>			13.2	0.6	0.7	0.010
<i>Pr > F</i>			***	***	**	***
Contrasts (Pr > T)						
No enzim vs Fitasa			**	***	**	0.0541
No tractat vs Autoclau			**	**	**	NS
5% de segó vs 10% de segó			**	***	NS	***

NS: no significatiu, ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P ≤ 0.05).

Taula 6.5. Consum d'aigua i pinso entre els dies 15 i 19, i viscositat intestinal al final de la prova.

Tractaments	Segó de blat	Enzim fitasa afegit (U/g)	Consum de pinso (g)	Consum d'aigua (g)	Relació aigua/pinso (g/g)	Viscositat intestinal (mPa.s)
T-1	0% No tractat	-	67 ^{bc}	154	2.3	2.4
T-2	5% No tractat	-	71 ^b	152	2.2	3.1
T-3	10% No tractat	-	74 ^a	162	2.2	3.6
T-4	0% No tractat	500	70 ^b	152	2.2	2.9
T-5	5% Autoclavat	-	66 ^c	137	2.1	3.5
T-6	5% Autoclavat	500	69 ^{bc}	155	2.2	4.5
T-7	10% Autoclavat	-	69 ^{bc}	148	2.2	3.4
T-8	10% Autoclavat	500	70 ^b	156	2.2	2.8
<i>Error estàndard</i>			1.5	4.9	0.05	0.61
<i>Pr > F</i>			**	NS	NS	NS
Contrasts (Pr > T)						
No enzim vs Fitasa			*	*	NS	NS
No tractat vs Autoclau			**	**	NS	NS
5% de segó vs 10% de segó			*	*	NS	NS

NS: no significatiu, * P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P ≤ 0.05).

Taula 6.6. Energia metabolitzable aparent de les dietes experimentals.

Tractaments	Segó de blat	Enzim fitasa afegit (U/g)	EMA (MJ/kg)	EMAn (MJ/kg)	Digestibilitat		
					Fecal de midó (%)	Fecal de lípids (%)	Ileal de proteïna (%)
T-1	0%	No tractat	14.3 ^d	13.5 ^d	93.4 ^{bc}	78.8 ^d	82.6
T-2	5%	No tractat	14.3 ^d	13.8 ^{bcd}	95.0 ^a	82.3 ^{bc}	81.4
T-3	10%	No tractat	15.2 ^a	14.4 ^a	93.1 ^c	84.5 ^{ab}	85.0
T-4	0%	No tractat	14.6 ^{bcd}	13.8 ^{bcd}	94.6 ^{ab}	79.3 ^d	84.3
T-5	5%	Autoclavat	14.4 ^{cd}	13.6 ^{cd}	94.6 ^{ab}	81.3 ^{cd}	83.5
T-6	5%	Autoclavat	14.9 ^{abc}	14.0 ^{abc}	94.5 ^{abc}	80.6 ^{cd}	84.0
T-7	10%	Autoclavat	15.0 ^{ab}	14.2 ^{ab}	93.2 ^c	85.0 ^{ab}	81.5
T-8	10%	Autoclavat	15.3 ^a	14.4 ^a	94.1 ^{abc}	85.4 ^a	81.4
<i>Error estàndard</i>			0.19	0.19	0.53	1.08	-
<i>Pr > F</i>			***	**	*	***	-
Contrasts (Pr > T)							
No enzim vs Fitasa			*	*	0.0575	NS	-
No tractat vs Autoclau			NS	NS	NS	NS	-
5% de segó vs 10% de segó			***	**	**	**	-

NS: no significatiu, * P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P ≤ 0.05).

Taula 6.7. Composició mineral del plasma, i composició dels dits dels animals.

Tractaments	Segó de blat	Enzim fitasa afegit (U/g)	Calci en plasma (mg/dl)	Fòsfor no fític en plasma (mg/dl)	Màteria seca dits (%)	Cendres dits (%/MS)	Fòsfor en dits (%/cendres)
T-1	0%	No tractat	14.3 ^a	5.1 ^c	32.4 ^{cd}	10.9 ^c	14.3
T-2	5%	No tractat	14.0 ^{ab}	6.2 ^{ab}	32.5 ^{bcd}	11.4 ^{abc}	14.5
T-3	10%	No tractat	13.4 ^{bc}	6.4 ^{ab}	32.2 ^d	11.7 ^{ab}	14.5
T-4	0%	No tractat	13.4 ^{bc}	7.0 ^a	33.6 ^a	12.1 ^a	14.9
T-5	5%	Autoclavat	14.0 ^{ab}	5.2 ^c	31.9 ^d	11.3 ^{bc}	14.6
T-6	5%	Autoclavat	13.1 ^c	6.8 ^{ab}	33.3 ^{ab}	12.0 ^{ab}	14.9
T-7	10%	Autoclavat	14.5 ^a	5.9 ^{bc}	32.2 ^d	11.3 ^{bc}	14.6
T-8	10%	Autoclavat	13.0 ^c	6.9 ^a	33.2 ^{abc}	12.1 ^a	15.1
<i>Error estàndard</i>			0.30	0.35	0.28	0.2	0.2
<i>Pr > F</i>			***	***	***	**	NS
Contrasts (Pr > T)							
No enzim vs Fitasa			***	***	**	***	**
No tractat vs Autoclau			NS	*	NS	NS	NS
5% de segó vs 10% de segó			NS	NS	NS	NS	NS

NS: no significatiu, * P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001.
 Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P ≤ 0.05).

Taula 6.8. Retenció aparent, ingesta i excreció de fòsfor total de les dietes experimentals.

Tractaments	Segó de blat	Enzim fitasa afegit (U/g)	Fòsfor total en excreta (%/MS)	Retenció aparent de fòsfor total (%)	Ingesta de fòsfor total (g)	Excreció de fòsfor total (mg)
T-1	0%	No tractat	-	66.2	193 ^c	65
T-2	5%	No tractat	-	62.8	228 ^a	85
T-3	10%	No tractat	-	62.7	208 ^b	77
T-4	0%	No tractat	500	66.2	206 ^b	70
T-5	5%	Autoclavat	-	59.1	192 ^c	79
T-6	5%	Autoclavat	500	61.2	205 ^b	75
T-7	10%	Autoclavat	-	62.8	207 ^b	77
T-8	10%	Autoclavat	500	67.4	228 ^a	74
			<i>Error estàndard</i>	0.035	2.3	3.7
			<i>Pr > F</i>	NS	NS	***
Contrasts (Pr > T)						
No enzim vs Fitasa			NS	NS	***	NS
No tractat vs Autoclau			NS	NS	***	NS
5% de segó vs 10% de segó			NS	NS	NS	NS

NS: no significatiu, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament ($P \leq 0.05$).

6.5. Referències bibliogràfiques

Ahmad, T., S. Rasool, M. Sarwar, A. Haq i Z. Hasan. 2000. Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chickens. Anim. Feed Sci. Tech. 83, 103-114.

Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official methods of analysis. 15th ed., Assoc. Anal. Chem., Washington D. C.

Broz, J., P. Oldale, A. H. Perrin-Voltz, G. Rychen, J. Schulze i C. Simoes Nunes. 1994. Effects of supplemental phytase on performance and phosphorus utilisation in broiler chickens fed a low phosphorus diet without addition of inorganic phosphates. Brit. Poultry Sci. 35, 273-280.

- Cabahug, S., V. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 1999. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus contents. I. Effects on bird performance and toe ash. *Brit. Poultry Sci.* 40, 660-666.
- DIN 51900.** 1977. Determination of the gross calorific value by the bomb calorimeter and calculation of the net calorific value. Deutsches Institut für Normung e. V., Berlin, Germany.
- Eeckhout, W. i M. De Paepe.** 1994. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 47, 19-29.
- Engelen, A. J., F. C. van der Heeft, P. H. G. Randsdorp i E. L. C. Smit.** 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.* 77(3), 760-764.
- Jongbloed, A. W. i P. A. Kemme.** 1990. Effect of pelleting mixed feeds on phytase activity and the apparent absorbability of phosphorus and calcium in pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 28, 233-242.
- Jorgensen, H., X.-Q. Zhao, K. E. Bach Knudsen i B. O. Eggum.** 1996. The influence of dietary fibre source and level on the development of the gastrointestinal tract, digestibility and energy metabolism in broiler chickens. *British journal of nutrition.* 75, 379-395.
- Juanpere, J., A. M. Pérez-Vendrell i J. Brufau.** 2002. Effect of microbial phytase on mineral bioavailability of broilers fed nsp-rich diets (barley) in the presence or not of endogenous phytase. En: 11th European Poultry Conference, Bremen, Alemanya (Pòster).
- Juanpere, J., A. M. Pérez-Vendrell i J. Brufau.** 2004. Effect of microbial phytase on broilers fed barley based diets in the presence or not of endogenous phytase. *Anim. Feed Sci. Tech.* 115 (3-4), 265-279.
- Juanpere, J., A. M. Pérez-Vendrell, A.M., Ll. Llauradó i J. Brufau.** 2001. Effects of phytase supplementation, individually and in combination with other dietary enzymes on broiler nutrient availability of diets rich in NSP. En: 13th European Symposium of Poultry Nutrition, Blankenberge, Bèlgica (Pòster).

- Lan, G. Q., N. Abdullah, S. Jalaludin i Y. W. Ho.** 2002. Efficacy of supplementation of a phytase-producing bacteria culture on the performance and nutrient use of broiler chickens fed corn-soybean meal diets. *Poult. Sci.* 81, 1522-1532.
- Lesson, S. i J. D. Summers.** 1991. Commercial poultry nutrition. University Books. Guelph, Canadà.
- Lima, F. R., C. X. Mendonça Jr, J. C. Alvarez, J. M. F. Garzillo, E. Ghion i P. M. Leal.** 1997. Biological evaluations of commercial dicalcium phosphates as sources of available phosphorus for broiler chicks. *Poult. Sci.* 76, 1707-1713.
- López-Álvarez, J. A.** 2002. Estabilidad de la fitasa de la *Peniophora Lycii* frente a los tratamientos térmicos de los piensos. *Anaporc.* 218, 80-85.
- Mulimani, V. H., N. S. Kadi i S. Thippeswamy.** 2003. Effect of processing on phytic acid content in different red gram (*Cajanus cajan* L.) varieties. *J. Food Sci. Techn.-Mysore* 40 (4), 371-373.
- Pérez-Vendrell, A.M., J. Juanpere, M. Francesch i J. Brufau.** 2000a. Effects of microbial phytase on broiler performance and mineral excretion according type of diet. En: 3rd European Symposium of Feed Enzymes, Noordwijkerhout, Holanda. (Pòster)
- Pérez-Vendrell, A.M., R. Salvadó, E. Angulo i J. Brufau.** 2000b Efectos de la adición de fitasa microbiana sobre la retención aparente de fósforo, calcio y zinc en pollos broiler en función del tipo de dieta. En: 3a Conferència-Saló de Fabricants de Pinsos del Mediterrani, Reus, Espanya. (Pòster)
- Ravindran, V.** 1999. Protein and Energy effects of microbial phytase in poultry diets. BASF Technical Symposium: Use of Natuphos phytase in layer nutrition and management. Atlanta, USA. 1-21.
- Ravindran, V., P. H. Selle, G. Ravindran, P. C. H. Morel, A. K. Kies i W. L. 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.
- Ravindran, V., S. Cabahug, G. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 2000. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-

phytate phosphorus levels. II. Effects on apparent metabolisable energy, nutrient digestibility and nutrient retention. *Brit. Poultry Sci.* 41, 193-200.

Ravindran, V., W. L. Bryden i E. T. Kornegay. 1995. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Biol. Rev.* 6 (2), 125-143.

Reddy, N.K., M. D. Pierson, S.K. Sathe i D.K. Salunkhe. 1989. Phytates in cereals and legumes. CRC Press, Boca Raton, USA.

Ribeiro, A. M. L., A. J. Mireles i K. C. Klasing. 2003. Interactions between dietary phosphorus level, phytase supplementation and pelleting on performance and bone parameters of broilers fed high levels of rice bran. *Anim. Feed Sci. Tech.* 103, 155-161.

Rutherford, S. M., T. K. Chung, P. C. H. Morel i P. J. Moughan. 2004. Effect of microbial phytase on ileal digestibility of phytate phosphorus, total phosphorus and amino acids in a low-phosphorus diet for broilers. *Poult. Sci.* 83, 61-68.

Sandberg A. S., H. Andersson, B. Kivisto i B. Sandstrom. 1986. Extrusion cooking of a high-fibre cereal product. 1. Effects on digestibility and absorption of protein, fat, starch, dietary fibre and phytate in the small intestine. *Br J Nutr.* 55(2), 245-254.

Sandberg, A. S., H. Andersson, N. G. Carlsson i B. Sandström. 1987. Degradation products of bran phytate formed during digestion in the human small intestine: effect of extrusion cooking on digestibility. *J. Nutr.* 117, 2061-2065.

Sandberg, A.S., L. R. Hulthén i A. M. Türk. 1996. Dietary *Aspergillus niger* phytase increases iron absorption in humans. *J. Nutr.* 126, 476-480.

Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague. 1996a. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and utilization of dietary calcium, phosphorus, copper, and zinc in broiler chickens fed corn-soybean diets. *Poult. Sci.* 75, 729-736.

Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague. 1996b. Efficacy of supplemental microbial phytase at different dietary calcium levels on growth performance and mineral utilization of broiler chickens. *Poult. Sci.* 75, 1516-1523.

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

Statistical Analysis System Institute Inc. 1985. *SAS User's Guide: Statistics, Ver. 5.* SAS Institute Inc., Cary, NC.

Windisch, W. i M. Kirchgeßner. 1996. Effect of microbial phytase supplementation on performance data and metabolism of phosphorus, calcium and nitrogen at different levels of calcium supply in broilers. *Arch. Geflügelkd.* 60, 1, 42-47.

Wodzinsky, R. J. i A. H. J. Ullah. 1996. Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 263-302.

Zanini, S. F. i M. H. Sazzad. 1999. Effects of microbial phytase on growth and mineral utilisation in broilers fed on maize soyabean-based diets. *Brit. Poultry Sci.* 40, 348-352.

Young, L. G., M. Leunissen i J. L. Atkinson. 1993. Addition of microbial phytase to diets of young pigs. *J. Anim. Sci.* 71: 2147-2150.

**EFFECTE DE L'ADDICIÓ DE DIFERENTS NIVELLS DE FITASA
MICROBIANA EN DIETES DE BLAT EN PRESÈNCIA O NO DE FITASA
ENDÒGENA**

7.1. Introducció

L'enzim fitasa hidrolitza l'àcid fític a mio-inositol i a àcid fosfòric. L'ús d'aquest enzim s'ha vist incrementat darrerament en la indústria agroalimentària, pel fet d'augmentar la disponibilitat i la utilització del fòsfor present en les llegums i els cereals emprats en la fabricació del pinso. El fòsfor, en forma de fitat, és poc disponible per les aus, degut, entre altres motius, a la baixa activitat de la fitasa endògena del tracte intestinal. A més, la fitasa endògena present en el pinso, varia molt en funció del tipus d'ingredient usat (Ravindran i col., 1995). Aquesta fitasa [6-fitasa (EC 3.1.3.26)] té un interval òptim de pH al voltant de 4.5-5.5 (Reddy i col., 1989) cosa que fa que l'enzim no sigui molt actiu al pH gastrointestinal. A més, el seu rang de temperatura òptima es troba entre 45 i 60° C, disminuint ràpidament la seva activitat a temperatures més elevades (Wodzinski i Ullah, 1996), temperatures que estan per sota de les utilitzades en la fabricació de pinso i, per tant, molt probablement serà destruïda per la temperatura. És per això que en el pinso s'afegeix fitasa d'origen microbià [3-fitasa (EC 3.1.3.8)], ja sigui d'origen bacterià, de fongs o de llevats, essent una de les més emprades la provinent de l'*Aspergillus niger*. La fitasa d'aquest origen presenta dos punts de pH òptims a 2.5 i 5.5, i una temperatura òptima de 55-60° C, tot i que comercialment es presenta amb una coberta que la protegeix de temperatures més elevades.

L'addició de la fitasa microbiana en els pinsos produeix una millora dels paràmetres productius (Ravindran i col., 2001; Wu i col., 2003) i de la digestibilitat de nutrients (Kornegay, 1999; Ravindran i col., 2000; Juanpere, 2002; Baidoo i col., 2003; Wu i col., 2003) tant en porcs com aviram. A més, a llarg termini, hi ha una millora mediambiental, amb la reducció de l'excreció de fòsfor i de la contaminació del sòl.

S'han realitzat alguns estudis sobre l'activitat fitàsica endògena dels cereals. Barrier-Guillot i col. (1996) en un estudi sobre 56 mostres de blat, trobaren que l'activitat variava des de 206 a 775 U/kg, amb una mitjana de 508 U/kg. Però no s'han fet molts estudis referent al tractament per la temperatura sobre l'activitat enzimàtica, o per la inactivació en els pinsos granulats (Edwards i col., 1999; Carlson i Poulsen, 2003). En algunes matèries primeres, com l'arròs o el blat, el fitat és molt

estable a l'escalfament, però en altres productes com algunes llegums, el fitat es degrada ràpidament en un període curt de temps (Reddy i col., 1989). La velocitat de destrucció del fitat per l'autoclau sembla ser més petita quan el fitat està associada amb proteïnes i/o cations en productes naturals com cereals. Carlson i Poulsen (2003) trobaren que el fitat total es podia arribar a degradar entre el 17 i 79%, deixant les mostres de cereal en remull a temperatures de fins a 40°C durant més de 8 hores.

Els principals objectius d'aquest assaig foren l'avaluació de la biodisponibilitat de fòsfor i altres minerals, i del creixement dels animals, depenent de la presència o no d'activitat fitàsica endògena en el blat; i, l'estudi dels efectes de diferents nivells de fitasa exògena, alguns més alts dels habituals.

7.2. Material i mètodes

7.2.1. Maneig dels animals

S'utilitzaren dos-cents vuitanta-vuit pollastres mascles de la raça Ross 308 d'1 dia de vida. La prova va acabar als 24 dies. Només es van utilitzar els animals sense problemes de potes, amb ulls oberts i un comportament actiu. Els pollastres es posaren en 48 gàbies situades en dos bateries Petersime, en una nau sense finestres i amb calefacció elèctrica i ventilació forçada. Els programes de llum i temperatura emprats foren els habituals en la granja.

1a setmana: 30-35° C

2a setmana: 29-32° C

3a setmana: 27-30° C

0-4 dies: 23 h de llum

4-10 dies: 20 h de llum

10 fins al final: 18 h de llum

L'aigua i el pinso en forma de farina es varen subministrar *ad-libitum* durant tot l'experiment.

7.2.2. Tractaments i disseny experimental

Els animals es distribuïren en vuit tractaments, que variaven en el cereal emprat (tractat o no per l'autoclau), el nivell de fòsfor no fíctic (4.5 i 2.7 g FNF per kg de pinso), i el nivell de fitasa exògena (0, 500 i 5000 U per kg de pinso), tal com es mostra en la Taula 7.1. El blat es va tractar en autoclau per un procés de vapor calent (a 120° C durant 10 minuts, en safates de 10 mm de profunditat),

comprovant-se la total eliminació de l'activitat fitàsica en finalitzar el procés. Tots els tractaments experimentals es replicaren vuit vegades, i cada rèplica contenia sis animals. Els animals només reberen un pinso durant tot l'assaig.

7.2.3. Fabricació del pinso i composició nutritiva de les dietes

Tots els ingredients inclosos en els pinsos, excepte el greix, la sal, el fosfat bicàlcic, el carbonat càlcic, vitamines i el corrector mineral, i els productes avaluats, varen ser mòlts en un molí de 30 CV, a una mida de tamís de 3mm. Les dietes base es formularen per tal que fossin totes iguals en proteïnes i en energia, tal com es veu en la Taula 7.2. El blat era de la variant Soissons de la collita de 2002. La fitasa microbiana (E.C. 3.1.3.8) utilitzada en l'assaig era una preparació experimental (SP-1002 en forma de pols, amb una activitat fitàsica de 3295 U/kg, de l'empresa Hoffman-La Roche). En tots els tractaments s'inclogué, des del primer dia, la mateixa dosi de xilanasa (40 ppm), per evitar els efectes antinutritius dels pentosans del blat. La xilanasa emprada fou Safizym XP-20 LOT N° 3361, de l'empresa Lesaffre Development. Des del primer dia de l'assaig, els pinsos contenien diòxid de titani (TiO₂) com a marcador de digestibilitat, en una concentració de 5g per kg de pinso.

7.2.4. Anàlisi química

Totes les mostres de les dietes experimentals i les matèries primeres es passaren pel molí amb un sedàs de 0.5 mm. Les mostres s'analitzaren utilitzant els mètodes estàndards de l'AOAC (1990) per matèria seca (Codi 934.01), extracte eteri (Codi 920.39), cendres (Codi 942.05) i fibra bruta (Codi 978.10). La concentració de proteïna bruta dels pinsos es determinà pel mètode de Dumas (AOAC, Codi 990.03). La concentració de fòsfor total s'analitzà colorimètricament pel mètode del molibdo-vanadat (Codi 965.17). Les concentracions de calci, ferro i zinc s'analitzaren per espectrofotometria d'absorció atòmica de flama. El diòxid de titani en els pinsos, les excretes i els continguts ileals s'analitzaren segons el procediment descrit per Short i col. (1996). L'activitat fitàsica present en les matèries primeres i els pinsos finals s'analitzaren segons Engelen i col. (1994).

7.2.5. Paràmetres productius i assaig de balanç

Els animals es pesaren conjuntament en arribar a la granja i per gàbia als 21 dies, igual que el pinso. Així es calculà el consum de pinso, el guany de pes mig diari i l'índex de transformació entre 1 i 21 dies. La mortalitat s'enregistrà diàriament, incloent la causa de la mort. Entre els dies 15 i 19 de l'assaig es registraren el consum d'aigua, de pinso, i s'obtingué la relació aigua/pinso. L'energia metabolitzable aparent (EMA) es determinà pel procediment del marcador d'òxid de titani. Les excretes es recolliren en el 21è dia de l'assaig, durant un període curt de temps, foren emmagatzemades a -20° C, i finalment liofilitzades; posteriorment, es molgueren i s'emmagatzemaren per la seva anàlisi. L'energia bruta de les mostres dels pinsos i de les excretes foren analitzades mitjançant un calorímetre de bomba adiabàtica IKA C-400 (DIN 51900) per obtenir-ne l'EMA de les dietes.

7.2.6. Estudis sobre la retenció de minerals

Tots els animals es varen sacrificar mitjançant injecció intravenosa de pentobarbital sòdic en els dies 22, 23 i 24 de l'assaig experimental. Es recolliren mostres intestinals des del diverticle de Meckel fins a 15 cm abans a la unió ili-cecal, i emmagatzemades en gel, per tal de mesurar la viscositat intestinal de la digesta fresca. Les mostres d'aquests continguts digestius es centrifugaren a 12000 rpm durant 5 min a 15° C, i els sobrenadants recollits es guardaren en gel fins que la viscositat fos determinada mitjançant un viscosímetre digital Brookfield, mantingut a 30° C i llegit després d'1 min. Abans de l'eutanàsia, es recolliren mostres de sang per punció cardíaca. El plasma se separà per centrifugació de la sang a $2000 \times g$ durant 10 minuts (Lima i col., 1997), i llavors es determinà la concentració de fòsfor i calci del plasma. Després de l'eutanàsia, es tallaren els dits del mig de dos animals de cada rèplica (entre el segon i el tercer tars), que foren pesats i calcinats per tal d'obtenir els valors de cendres dels dits (Cabahug i col., 1999).

7.2.7. Cura dels animals

Totes els procediments emprats han estat aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de l'IRTA

7.2.8. Càlculs

Els valors d'EMA de les dietes es calcularen segons la fórmula següent, tenint en compte que es realitzaren les correccions apropiades per diferències en el contingut d'humitat.

$$EMA = EB_{dieta} - ((TiO_{2,dieta} / TiO_{2,excreta}) \times EB_{excreta})$$

on EB_{dieta} i $EB_{excreta}$ són l'energia bruta del pinso i de l'excreta, respectivament.

Els valors d'EMA corregida per una retenció de nitrogen zero (EMAn) es calcularen segons la fórmula següent:

$$EMAn_{dieta} = EMA - [(GMD \times 0.2 \times 8220) / (CMD \times 6.25)]$$

Els coeficients de digestibilitat dels nutrients es calcularen usant el procediment de marcador per la següent fórmula:

$$Dig X = 1 - ((TiO_{2,dieta} \times X_{excreta}) / (TiO_{2,excreta} \times X_{dieta}))$$

on X_{dieta} i $X_{excreta}$ són la concentració del nutrient X en la dieta i en l'excreta, respectivament.

7.2.9. Anàlisi estadística

Les dades es varen analitzar com una anàlisi de variança amb disseny de blocs a l'atzar, emprant els procediments General Lineal Models (GLM) del Statistical Analysis System Institute Inc. (1985). La significància estadística s'acceptà quan $P < 0.05$. Quan es trobaren que els efectes principals eren significants, les mitjanes individuals foren comparades mitjançant el test de Duncan de rangs múltiples. Els efectes principals de l'addició de fitasa microbiana i del tractament del blat foren analitzats pels següents grups de contrastos:

Addició de fitasa microbiana: T-2 i T-6 enfront de T-3, T-4, T-7 i T-8.

Tractament del blat: T-2, T-3 i T-4 enfront de T-6, T-7 i T-8.

Nivell enzim fitasa microbiana afegit (500 vs 5000 U/kg): T-3 i T-7 enfront de T-4 i T-8.

Nivell de fòsfor no fític (4.5 g/kg vs 2.7 g/kg): T-1 i T-5 enfront de T-2 i T-6.

7.3. Resultats

7.3.1. Paràmetres productius

Els estudis previs van demostrar que les condicions emprades en l'autoclau per inactivar l'enzim fitasa endògena del blat foren efectives. En aquests estudis només es va mirar l'activitat fitàsica, és a dir, la resta de paràmetres que es poden veure afectats pel procés tèrmic de l'autoclau no es van avaluar. En la Taula 7.3, es poden observar els valors obtinguts de l'activat fitàsica en les dietes usades en l'assaig experimental. Es pot veure que en les dietes control positiu (4.5 g/kg) i control negatiu (2.7 g/kg i 0 U) amb blat no tractat, presenten valors quasi idèntics, i que la petita diferència es correspon al valor teòric obtingut en la formulació. En utilitzar el blat passat per l'autoclau, l'activitat fitàsica del control negatiu desapareix, mentre que en el control positiu queda un valor residual (103 U/kg). Els valors de les dietes amb fitasa microbiana exògena, demostren que hi ha un augment gradual tal com es pretenia. Així com que els valors de l'activitat de les dietes amb blat tractat en autoclau són menors que els de les dietes amb blat no tractat (418 i 4636 enfront de 814 i 4836, respectivament).

Els pollastres que menjaren les dietes control positiu són els que tingueren un pes més elevat, amb un major guany mig diari, respecte als altres animals (Taula 7.4). Tots els animals que van menjar dietes deficientes de fòsfor van tenir un creixement menor que els anteriors, encara que similars entre ells, excepte en el cas dels animals que menjaren dietes control negatiu i sense fitasa, que encara tingueren un pes més baix. Aquests animals (tractament T-6) tingueren un pes final inferior en 120-125 grams, respecte als pollastres del T-5. En els contrastos lineals, es van trobar diferències significatives pel que fa a la presència d'enzim fitasa microbià exogen, amb pesos superiors en presència de l'enzim, així com també se'n trobaren per l'efecte de l'autoclau, on en general la diferència de pes és d'uns 35 grams. Proporcionalment, es van trobar els mateixos resultats quant al guany mig diari, tenint en compte que aquest valor és el quocient del pes final pels dies de durada de l'assaig. No es trobaren diferències entre el consum mig diari dels tractaments, malgrat que la presència d'enzim sembla que faci augmentar el consum, segons es desprèn de l'estudi del contrast

lineal de les dietes amb presència de fitasa microbiana (T-3, T-4, T-7 i T-8) respecte les que no en tenen (T-2 i T-6) ($P = 0.05$). Amb tots aquests resultats, s'obté els valors de l'índex de transformació. El valor més baix, és a dir, el millor productivament parlant, es correspon a la dieta control positiu amb blat no tractat (1.353 g/g), mentre que els pitjors valors són per les dietes deficient de fòsfor amb el blat passat per l'autoclau, ja sigui amb o sense enzim exogen. Els contrastos ens confirmem aquests resultats, en què, per una banda, l'addició de fitasa microbiana produeix millores significatives en tots els paràmetres ($P = 0.05$), originats amb independència del nivell de fitasa incorporat a la dieta, doncs no s'observen diferències entre la presència de 500 o 5000 U de fitasa per quilo. Per altra banda, els millors resultats s'obtenen amb el blat sense tractar ($P = 0.001$).

No s'obtingueren resultats significatius quant a consum en el control d'aigua i pinso realitzat des del dia 15 fins al 19 de l'experiment, així com en la relació entre aquests dos paràmetre (Taula 7.5). Encara que en el cas del consum d'aigua i de la relació els valors corresponents al T-1 donin més alts (163.8 enfront a 124.8-136.6, i 2.25 enfront a 1.77-1.98, respectivament) degut a la gran variació de les dades obtingudes fan que aquestes no siguin significatives.

No es produïren diferències significatives en els valors de viscositat dels continguts intestinals dels animals, degut a la presència de l'enzim xilanasa en tots els tractaments en la mateixa dosi (40 ppm), amb valors que varien des de 2.60 mPa.s per la dieta deficient de fòsfor i blat autoclavat amb una dosi de 5000 U de fitasa/kg, fins a 3.42 mPa.s per la dieta amb un nivell normal de fòsfor i blat passat per l'autoclau (Taula 7.5). Una mesura relacionada amb la viscositat intestinal és el nombre d'animals que presenten femtes adherides a la cloaca. En aquest assaig no es realitzà aquesta mesura, ja que en el desè dia de la prova els animals mostraren la cloaca neta.. Cal tenir en compte que en tots els pinsos s'incorporà xilanasa per evitar els possibles problemes derivats de la presència de polisacàrids no amilacis. Avaluant l'efecte del procés d'autoclau del blat sobre la viscositat intestinal, es veu que surt significativa ($P < 0.05$), presentant una viscositat més elevada els tractaments amb blat autoclavat.

7.3.2. Valors energètics

En la Taula 7.6 es mostren els valors de l'EMA. Els majors valors són el corresponents a les dietes amb 5000 U de fitasa per quilo de pinso, en ambdós casos, és a dir, amb blat sense tractar i el passat per l'autoclau (3672 i 3664 kcal/kg, respectivament), mentre que els valors més baixos es corresponen a les dietes amb nivell deficient de fòsfor i blat sense tractar, sense i amb 500 U de fitasa per quilo de pinso (3579 i 3571 kcal/kg, respectivament). Una situació similar es troba per la EMAn, coincidint que el valor més alt s'obtenen pels T-4 i T-8 (3484 i 3491 kcal/kg, respectivament) i el més baix pel T-3 (3388 kcal/kg). En l'avaluació dels contrastos, es van obtenir resultats significatius els estudis referents al tractament de blat sobre l'EMAn (amb valors energètics més elevats quan el blat es va passar per l'autoclau) i la inclusió de 500 o 5000 U de fitasa per quilo en ambdós paràmetres (amb valors més elevats amb 5000 U de fitasa per quilo). La dieta amb nivells deficients de fòsfor, amb blat sense tractar i 5000 U de fitasa per quilo de pinso és la que va produir la millor digestibilitat ileal de proteïna (84.6%). No s'obtingueren diferències significatives pel que fa als contrastos en dos dels casos estudiats, és a dir, ni pel tractament del blat ni per l'addició de fitasa microbiana, mentre que la inclusió de 5000 U/kg de fitasa produeix un augment en la digestibilitat ileal de proteïnes respecte a la inclusió de 500 unitats.

7.3.3. Efectes sobre la retenció de minerals

Les dades de la composició mineral del plasma dels animals emprats en l'assaig es troben en la Taula 7.7. En el cas de la mesura de la concentració de fòsfor no fític, s'observa que els animals que menjaren les dietes control negatiu en tenen una menor concentració en sang que els animals que menjaren les dietes control negatiu més 5000 U de fitasa per quilo de pinso (6.6 i 6.4 mg/dl per T-2 i T-5 enfront de 8.2 i 7.9 mg/dl per T-4 i T-8, respectivament). L'addició de fitasa microbiana va incrementar-ne significativament la concentració ($P < 0.01$), mentre que no es va trobar cap efecte en el cas del tractament del blat. La disminució del nivell de fòsfor total de la dieta va produir una disminució de la concentració de calci en el plasma dels animals que menjaren dietes amb blat passat per l'autoclau, efecte que no es va veure contrarestat per l'addició de la fitasa exògena; en

canvi, quan es mira les dades corresponents a les dietes amb blat sense tractar, s'observa que la concentració obtinguda varia molt lleugerament, però només numèricament i no significativa. Referent als contrastos estudiats només es produïren diferències significatives pel FNF degut a la presència d'enzim exogen i al nivell de l'enzim (augmentant-ne la concentració amb l'addició d'enzim) i pel zinc en plasma segons si el nivell d'enzim era 500 o 5000 U/kg de fitasa (168 i 142 ìg/dl, respectivament). Degut a la gran variabilitat de les mesures, no es trobaren diferències estadístiques en les concentracions de ferro i zinc en plasma.

El valor més alt del percentatge de cendres als dits dels pollastres es va obtenir pels animals que menjaren la dieta control positiu amb blat sense tractar (12.7%), mentre que pels que menjaren la dieta control negatiu amb blat passat per l'autoclau el percentatge és el més baix (10.7%). La resta de tractaments donaren valors que no difereixen entre sí. L'efecte tractament del blat no va donar diferències significatives, però sí que se'n van obtenir en avaluar l'addició de fitasa microbiana ($P < 0.01$), on les majors concentracions s'obtenen després d'afegir 5000 U de fitasa per quilo de pinso.

La quantitat de minerals en l'excreta i les retencions aparents de fòsfor total i calci es mostren en la Taula 7.8. El percentatge de fòsfor total en l'excreta mostra clarament un cert paral·lisme amb la reducció de fòsfor total produïda en la formulació dels pinsos. La quantitat és més alta en les dues dietes de control positiu (0.99% per T-1 i 0.95% per T-5), i en la resta de les sis dietes la quantitat es manté entre 0.4 i 0.5%, però ni per l'addició de fitasa microbiana ni pel tractament del blat es trobaren diferències significatives, ja que en el càlcul no és té en compte cap d'aquestes dues dietes. Així doncs, no es trobaren diferències pel que fa a l'excreció de fòsfor. Diferències que sí s'observaren en la retenció aparent de fòsfor total. En les dietes amb blat sense tractar, l'addició de les 5000 U de fitasa microbiana per quilo de pinso, va millorar-ne significativament el resultat tant respecte al control positiu com al control negatiu, no existint diferències entre els resultats depenent de la dosi afegida. Per altra banda, en les dietes amb blat passat per autoclau, la reducció de FNF de la dieta beneficia la retenció del fòsfor total, augmentant-la al voltant del 10%, quantitat que només es millorà numèricament en afegir la fitasa microbiana. Globalment, però, no es produïren millores

estadístiques degut a la presència o no de l'enzim microbià, pel tractament del blat o pels dos nivells més alts d'enzim afegit.

El nivell de calci en l'excreta està relacionat directament amb la quantitat d'inclusió en el pinso, tal com passava en el cas del fòsfor total. Les excretes corresponents als animals que menjaren els controls positiu amb blat sense tractar (2.24% Ca) i amb blat passat per autoclau (2.14% Ca) es va trobar que eren els que tenien més calci, mentre que les excretes corresponents als animals que menjaren les altres dietes es va trobar que presentaven valors més baixos, aproximadament del 50%. En l'estudi dels contrastos, ni l'addició de fitasa microbiana ni el tractament del blat ni el nivell de fitasa van donar resultats estadísticament significatius. Però, pel que fa a la retenció aparent del calci els resultats van ser just al contrari de la concentració del mineral en l'excreta, ja que les retencions de les dietes amb control positiu (32.7% pel T-1 i 41.4% pel T-5) donen valors més baixos que les retencions de les altres dietes, on s'observa que el valor més alt de tots s'obté per la dieta control negatiu i amb blat sense tractar (56.8%). Per tant, i veient aquests resultats, s'ha vist que l'addició de fitasa microbiana exògena produeix resultats significatius, amb una disminució de la retenció, sent el valor més alt quan no hi ha l'enzim endogen; per altra banda, també s'obtingueren resultats estadísticament significatius amb una major retenció quan s'utilitza dietes amb blat sense tractar que no pas quan el blat és passat per l'autoclau (53.6% en presència de fitasa endògena i 50.4% sense fitasa endògena).

En aquest estudi també s'avaluà la concentració de zinc i ferro en l'excreta. Les concentracions d'ambdós minerals en les excretes dels diferents tractaments no registraren diferències, no veient-se efectes ni per afegir la fitasa ni pel tractament del blat, degut a la alta variabilitat de les dades obtingudes. La reducció de la quantitat de FNF de la dieta mostra una certa tendència a disminuir la quantitat de ferro en l'excreta, amb els valors més baixos per les concentracions corresponents a les dietes control negatiu amb fitasa exògena i amb blat sense tractar (648 i 659 ppm per a T-3 i T-4, respectivament). Es pot veure en l'estudi dels contrastos lineals que no s'obtingueren resultats significativament diferents en afegir fitasa microbiana, però sí que s'obtingueren en analitzar el

tractament per temperatura del blat, amb valors més alts pel cas del blat autoclavat (718 ppm) que pel blat sense tractar (668 ppm).

La reducció de la concentració de FNF de la dieta, i també de la concentració de fòsfor total i del consum, es veu reflectida en les dades de ingestió de fòsfor total (Taula 7.9). Els pollastres que van ingerir menys fòsfor fou els que van menjar els pinsos que tenia un nivell de FNF de 2.7 g/kg sense cap enzim afegit, tant pel cas que el blat es passà per l'autoclau com si no es passà, tot i que aquest darrer cas és el que en tingué una menor quantitat. L'addició de l'enzim exogen produí una major ingesta de fòsfor, malgrat que no s'observaren diferències entre els que menjaren 500 o 5000 U/kg de fitasa microbiana. Tanmateix, els animals que menjaren pinso amb blat tractat menjaren més fòsfor total que els altres. Pel que fa a la ingestió de la resta de minerals estudiats, és a dir, calci, zinc i ferro (Taula 7.9) l'addició de fitasa microbiana produí diferències significatives pel calci i pel ferro, amb una reducció de la ingesta de calci en augmentar la quantitat de fitasa afegida i una disminució pel cas del ferro en afegir 500 U/kg, augmentant de nou en augmentar la dosi de fitasa a 5000U/kg. Referent al tractament de blat, es veieren afectades les ingestions de calci i de zinc. En ambdós casos, els animals en menjaren més quan el blat del pinso es passà per l'autoclau.

7.4. Discussió

Un dels primers objectius del present treball va ser confirmar que les condicions utilitzades per tractar el blat (120°C durant 15 minuts) eren adequades per inactivar l'activitat fitasa endògena present en el cereal. Ja ho vàrem poder comprovar en altres estudis realitzats pel nostre grup amb cereals amb baixa activitat fitàsica, com el moresc, o en subproductes del blat amb una activitat més elevada, com el segó de blat, tal com es troba reflectit en els assaigs 2 i 3 d'aquesta memòria. Feta l'anàlisi corresponent, comprovarem que el blat tractat presenta una activitat fitàsica nul·la (dades no mostrades), i que, per tant, en fabricar el pinso, l'activitat present haurà disminuït. També ens va permetre comprovar que les condicions emprades (més extremes que en els casos anteriors quant a

temperatura) eren correctes i útils per a següents assaigs. Les altes temperatures produeixen una pèrdua de l'estructura de l'enzim, per tant una desnaturalització com a proteïna que és. Aquest canvi de configuració de l'enzim pot veure's amplificat per la humitat en el procés d'escalfament (Ward, 2002). A mida que augmenta la humitat del sistema, la temperatura a la qual l'enzim es desnaturalitza disminueix, i per tant pot ser inactivat amb més facilitat.

L'addició de l'enzim fitasa en les dietes de blat amb baix nivell de fòsfor no fític produí canvis en els paràmetres productius dels pollastres. Malgrat que en cap cas s'assoliren els valors obtinguts en la dieta control positiu, l'addició de fitasa microbiana provocà variacions en els resultats de tal manera que en presència de l'enzim els valors són més elevats que no pas quan no hi és (control negatiu). Amb la incorporació de 5000 U de fitasa per quilo es van obtenir pollastres una mica més grossos, però no diferents dels que menjaren dietes amb 500 U/kg (ús habitual avui en dia en la fabricació de pinso). Els millors valors de l'índex de transformació en les dietes baixes de fòsfor també s'obtingueren en aquelles que s'afegí fitasa. És ben conegut, i està ben documentat en la bibliografia que l'addició de fitasa microbiana en dietes deficientes de fòsfor produeix millores en els paràmetres productius (guany de pes i índex de transformació) ja sigui en dietes de blat o en altres tipus de dietes (Boling i col., 2000; Keshavarz, 2003; Ribeiro i col., 2003).

La viscositat intestinal de les dietes no es veié afectada per l'addició de fitasa microbiana. La baixa influència de la fitasa en la viscositat intestinal ja està especificada en l'assaig 5 descrit en aquesta memòria. La viscositat dona valors baixos ja que totes les dietes inclogueren des de bon començament xilanasa i amb el mateix nivell d'inclusió, realitzant-se d'aquesta manera ja que, en assaigs anteriors, es va observar que la xilanasa reduï a la viscositat millorant els paràmetres productius i que, en general, no es van obtenir interaccions negatives entre xilanasa i fitasa, tal com està descrit en l'assaig 5 d'aquesta memòria. Pel fet de posar en totes les dietes la mateixa concentració de xilanasa (40 ppm) ens vàrem assegurar que les possibles interaccions d'ambdós enzims es trobarien en tots les dietes.

En aquest assaig, la inclusió de la fitasa microbiana exògena als pinsos no produí variacions en els valors energètics de les dietes (Taula 7.6), només observant una diferència significativa en contrastar la dosi de 500 enfront la de 5000 U/kg. Amb la dosi superior de fitasa exògena, s'obtenen els valors més elevats, propiciat per una major contribució proteica, tal com pot concloure d'observar els valors de la digestibilitat ileal de proteïna. Podria dir-se que la fitasa ha fet la seva funció correctament, facilitant que hagi més proteïnes disponibles, i que aquestes siguin més utilitzades. Però, els resultats no concorden massa amb els de creixement, ja que els pollastres van ser igual de grossos menjant les dosis de 500 i 5000 U/kg. Aquesta manca de correlació entre els resultats energètics i els productius també es produeix en la resta de contrastos lineal estudiats, en què ni l'eliminació de la fitasa endògena o la disminució de la concentració de fòsfor no fític produeixen canvis estadístics en l'energia de les dietes, però sí que repercuteixen disminuint el creixement dels animals. En altres assaigs d'aquesta memòria, s'ha descrit que una de les causes de l'augment energètic estaria relacionat amb el contingut de greix de les dietes; en aquest estudi, se subministrà la mateixa quantitat de llard en tots els tractaments i els valors esperats en els pinsos haurien de ser semblants.

La inclusió de fitasa exògena en les dietes no produí una gran variació de la concentració de minerals en sang. L'únic paràmetre modificat fou la concentració de FNF, que assolí els valors més alts en presència de 5000 U/kg de fitasa, essent diferents dels del control negatiu. A més, en avaluar la inclusió de 500 i 5000 U/kg, obtinguérem una concentració major per 5000 U/kg. Aquest increment era d'esperar, per l'acció de la fitasa (Sebastian i col., 1996; Viveros i col., 2002), tal com ja s'havia vist en l'assaig 2. En canvi, la concentració de calci en sang, normalment lligat a la concentració de FNF, no va variar de la mateixa manera. És més, en afegir fitasa, la seva concentració no es veu modificada sent exactament igual sigui quina sigui la quantitat afegida de fitasa. Si, a més, realitzant el càlcul de la relació Ca:FNF plasmàtic es veu que, augmentant la dosi de fitasa, la relació va disminuint, ja que sense enzim era bastant elevada (1.79:1) per assolir el valor més baix amb 5000 U de fitasa per quilo (1.37:1), i que és inferior al valor de la dieta control

positiu (1.46:1). Aquestes dades ens permetria pensar que quan disminuïm la concentració de fòsfor en la dieta es produeix un desequilibri en la relació d'aquests minerals en el plasma, que es compensa parcialment amb les 500 U/kg de fitasa, i totalment en afegir les 5000 U/kg. Shirley i Edwards (2003) van avaluar la relació entre les retencions de calci i fòsfor en dietes de moresc-soja i addició exponencial de fitasa fins a 12000 U/kg. Els valors obtinguts van des de 1.72:1 per la dieta base fins a 1.28:1 per l'addició de la dosi superior de fitasa, valors semblants als nostres. Aquests autors associen els valors del creixement amb les concentracions plasmàtiques dels minerals, i descriuen que les concentracions fisiològiques de Ca dins el pollastre poden ser més fermament regulades que les de P.

Referent als altres dos minerals en sang estudiats, l'addició de l'enzim fitasa, en les condicions emprades en el nostre experiment, no comportaren diferències significatives en les concentracions plasmàtiques, possiblement degut a la gran variació dels resultats obtinguts. Els nivells obtinguts no són diferents dels nivells habituals en pollastres per al ferro (Morris, 1987) i pel zinc (Richards i Augustine, 1988; Mohanna i Nys, 1999) per la qual cosa podem pensar que la fitasa no va tenir influència sobre aquests minerals, ja que amb la quantitat que conté el corrector mineral afegit a la dieta fa que l'animal tingui una concentració en excés d'aquests dos minerals.

En aquest assaig experimental, l'addició de fitasa microbiana no produí millores significatives en la retenció aparent de fòsfor, però sí en la de calci (Taula 7.8) i en el percentatge de cendres del dit (Taula 7.7). Tal com és observat sovint en la bibliografia (Ravindran i col, 2000; Wu i col, 2003) la disminució la concentració de fòsfor en la dieta implica un augment en la retenció aparent de fòsfor total. En el nostre estudi, sembla no existir una relació directa entre l'augment de la retenció de fòsfor i la inclusió de fitasa microbiana; aparentment, té més pes la disminució del fòsfor de la dieta. Per altra banda, en aquest treball, en presència de fitasa hi ha una disminució en la retenció de calci; així les retencions per les dietes control negatiu són més elevades. Aquestes dades estan en desacord en allò trobat fins al moment, ja sigui en altres treballs del nostre grup (assaigs 1 i 5), com en altres estudis que es poden trobar en la bibliografia, tant en dietes de blat o de moresc (Sebastian

i col., 1996; Ahmad i col., 2000). Una causa que pot justificar aquesta diversitat de resultat comparat amb assaigs anteriors podria ser la menor relació Ca:FNF d'aquest assaig. En aquest assaig es va establir una relació 2:1, a partir d'estudis realitzats per altres investigadors (Dieckmann i col., 2002), els quals diuen que els millors resultats tant en paràmetres productius com en retenció s'obtenen en quan la relació es troba entre 1:1 i 2:1, produint-se grans variacions negatives en augmentar-la. En la resta d'assaigs es va treballar en relacions de 3:1, que era un valor més proper a la relació més habitual en estudis realitzats fins el moment (Cabahug i col., 1999; Ravindran i col., 2000). Malgrat això, amb els valors experimentals obtinguts no serà fàcil discernir quina quantitat de fòsfor no fític s'allibera per la fitasa microbiana, i com afectarà numèricament en la relació entre els dos minerals. Pot trobar-se una valoració quantitativa del fòsfor no fític lliure després de l'efecte de la fitasa en l'apartat d'aquesta memòria referent a la determinació per RMN.

L'augment del percentatge de cendres en dits amb la inclusió de fitasa ve donat per una millor mineralització, i conseqüentment, unes millores significatives de la disponibilitat de minerals per l'animal i íntimament relacionat al guany del pes dels animals (Ahmad i col, 2000). Aquests autors observaren que el pes final i el percentatge de cendres en els dits els pollastres que menjaren dietes amb nivells recomanats de fòsfor va ser comparable al dels pollastres que menjaren dietes que contenien un 20% menys de FNF però amb fitasa afegida, i, per tant, que la inclusió de fitasa incrementa la utilització de FNF en dietes baixes de fòsfor.

L'addició de fitasa microbiana produí variacions en la ingestió dels minerals en funció de la quantitat afegida (Taula 7.9). Així en presència de fitasa el consum de fòsfor total és un 10% més elevat, segurament degut a l'activitat que està realitzant l'enzim del pinso, abans d'arribar a l'intestí de l'animal. Per la resta de minerals no se segueix un patró similar, havent-hi una disminució de calci com major sigui la dosi de l'enzim (arribant a ser d'un 12%), un manteniment de la concentració del zinc, i pel ferro primer una disminució en afegir 500 U de fitasa per quilo per després tornar a augmentar amb les 5000 U/kg de fitasa a nivells comparables al control negatiu. La disminució trobada degut a la dosi baixa de fitasa fou del 15%.

El tractament de calor realitzat en el blat afectà el pes final de l'animal i l'índex de transformació (Taula 7.4). En ambdós casos la variació fou d'aproximadament del 5%, disminuint el pes final i augmentant-ne l'índex. El procés d'autoclau dut a terme influeix sobre la fitasa endògena, tal com s'ha descrit anteriorment, però, segurament, que també deu influenciar sobre altres propietats del blat, com les concentracions de metalls, relacionada també, en part, per la disminució de la quantitat de fitasa. Aquestes altres propietats que poden veure's modificades podrien ser la fracció soluble dels pentosans o els xilans del blat, que podria comprovar-se si existissin diferències en la viscositat intestinal. Observant els valors de la viscositat intestinal que es presenten en la Taula 7.5, es pot veure com el tractament del blat influeix negativament, augmentant-la un 13%, cosa que ja s'havia vist anteriorment en la bibliografia (Stewart i col., 1998; Juanpere i col., 2004)

La concentració de minerals en sang i les cendres dels dits no es veieren modificades pel tractament de temperatura donat al blat. Aquesta manca de canvis en les cendres dels dits ens podria fer pensar que existeix una no modificació de les retencions aparents dels dos minerals estudiats; però no és així, observant-se canvis en les retencions de calci degut al procés tèrmic. La retenció de calci disminuï amb el tractament del blat en valors corresponents en mitjana del 6%. Jongbloed i Kemme (1990) ja observaren, en un treball amb porcs, una disminució de la digestibilitat de Ca, tot i que també n'observaren pel P, amb pinsos granulats a 80°C. Aquests autors postulen que la disminució en la retenció de Ca tindrà repercussions en l'aportació de Ca a l'animal. Es coneix que l'àcid fític té una gran afinitat pels cations bi- i trivalents. Com que la fitasa es destrueix amb l'autoclau, l'àcid fític serà menys hidrolitzat, per la qual cosa el Ca té més possibilitats d'unir-se a l'àcid fític.

Relacionat amb la retenció, hi ha la ingesta dels diferents minerals. El tractament del blat no produeix uns efectes iguals pels minerals estudiats. Els animals que menjaren les dietes amb blat autoclavat consumiren més fòsfor total i zinc que els que menjaren dietes amb blat sense tractar, però també consumiren menys calci, mentre que tots consumiren nivells similars de ferro. La ingesta de minerals està directament lligat amb el consum del pinso. Segons les dades presentades en la Taula 7.4, totes els animals van menjar la quantitat diària de pinso igual, per tant, seria

d'esperar que tots ells mengessin la mateixa quantitat de minerals, ja que les dietes deficientes de fòsfor tenen la mateixa concentració de minerals. Si els resultats de la ingesta mineral van donar diferents pot ser degut, amb molta probabilitat, a la precisió de les anàlisis realitzades, i, consegüentment, aquestes dades estiguin sotmeses a l'error metodològic.

Segons les dades obtingudes en aquest assaig experimental es pot concloure que l'addició de fitasa exògena en dietes deficitàries en fòsfor i amb 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 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'EMA de la dieta ni en la retenció aparent 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. Amb les dades que s'extreuen de l'estudi es pot concloure, que la dosi de fitasa exògena emprada habitualment en pinsos de broilers podria ser augmentada sense provocar perjudicis a l'animal, malgrat que calen més estudis per confirmar aquestes dades.

Taula 7.1. Tractaments experimental emprats.

Tractaments	Blat	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa ¹ (FTU/kg)
T-1	No tractat	4.5	-
T-2	No tractat	2.7	-
T-3	No tractat	2.7	500
T-4	No tractat	2.7	5000
T-5	Autoclavat	4.5	-
T-6	Autoclavat	2.7	-
T-7	Autoclavat	2.7	500
T-8	Autoclavat	2.7	5000

¹ Enzim usat: Phytase SP 1002 CT batch PPQ 6883 en forma de pols (Activitat fitàsica: 3295 U/g) (subministrat per Roche Vitamins Ltd, Basilea)

Taula 7.2. Composició de les dietes experimentals.

INGREDIENT (g/kg)	P Normal	P Baix
Blat	606.1	636.1
Farina de soja 48%	273.3	297.2
Soja Full fat	41.4	0.9
Llard	40.0	40.0
DL-metionina	2.4	2.4
L-lisina HCl	1.3	1.4
Carbonat càlcic	10.2	7.1
Fosfat bicàlcic	17.0	6.5
Sal	4.3	4.4
Minerals i vitamines ¹	4.0	4.0
Composició estimada de nutrients (g/kg)		
Energia metabolizable (MJ/kg)	12.48	12.48
Protèina bruta	215.0	215.0
Fibra bruta	28.0	28.1
Extracte eteri	64.2	57.7
Cendres	57.9	44.2
Lisina	12.0	12.0
Met + Cys	9.2	9.2
Calci	9.0	5.4
Fòsfor total	6.8	5.0
Fòsfor no fític	4.5	2.7
Fòsfor fitat	2.2	2.3
Fitasa endògena (U/kg)	353	371

¹ Un kg de pinso conté: Vitamina A, 12000 IU; Vitamina D₃, 2400 IU; Vitamina E, 30 mg; Vitamina K₃, 3 mg; Vitamina B₁, 2.2 mg; Vitamina B₂, 8.0 mg; Vitamina B₆, 5.0 mg; Vitamina B₁₂, 11.0 g; Àcid fòlic, 1.5 mg; Biotina, 150 g; Pantotenat càlcic, 25 mg; Àcid Nicotínic, 65 mg; Etoxiquina, 150 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; Zn, 40 mg, Mn, 60 mg, Se, 0.15 mg, I, 0.33 mg.

Taula 7.3. Activitat fitàsica trobada en les dietes experimentals.

Tractaments	Blat	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (U/g)	Enzim fitasa analitzat (U/g)
T-1	No tractat	4.5	-	345
T-2	No tractat	2.7	-	357
T-3	No tractat	2.7	500	814
T-4	No tractat	2.7	5000	4836
T-5	Autoclavat	4.5	-	103
T-6	Autoclavat	2.7	-	-
T-7	Autoclavat	2.7	500	418
T-8	Autoclavat	2.7	5000	4636

Taula 7.4. Paràmetres productius al final de la prova.

Blat	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (U/g)	Pes final (g)	GMD (g/d)	CMD (g/d)	IT (g/g)
No tractat	4.5	-	791 ^a	36 ^a	49	1.35 ^e
No tractat	2.7	-	717 ^b	32 ^b	47	1.46 ^c
No tractat	2.7	500	743 ^b	33 ^b	48	1.43 ^c
No tractat	2.7	5000	750 ^b	34 ^b	48	1.44 ^c
Autoclavat	4.5	-	794 ^a	36 ^a	50	1.39 ^d
Autoclavat	2.7	-	668 ^c	30 ^c	46	1.54 ^a
Autoclavat	2.7	500	709 ^b	32 ^b	49	1.53 ^{ab}
Autoclavat	2.7	5000	729 ^b	33 ^b	49	1.50 ^b
<i>Error estàndard</i>			17.0	0.7	1.0	0.012
<i>Pr > F</i>			***	***	NS	***
Contrasts (Pr>T)						
No enzim / Enzim			**	**	*	*
No tractat / Autoclavat			*	**	NS	***
500 U/kg / 5000 U/kg			NS	NS	NS	NS
4.5 g FNF/kg / 2.7 g FNF/kg			***	***	*	***

NS: no significatiu, * P 0.05, ** P 0.01, *** P 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 7.5. Consum d'aigua i pinso entre els dies 15 i 19, i viscositat intestinal al final de la prova.

Blat	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	Consum aigua (g)	Consum pinso (g)	Relació aigua/ pinso (g/g)	Viscositat Intestinal (mPa.s)
No tractat	4.5	-	164	73	2.3	3.4
No tractat	2.7	-	130	70	1.9	2.6
No tractat	2.7	500	126	69	1.8	2.7
No tractat	2.7	5000	134	71	1.9	2.7
Autoclavat	4.5	-	137	72	1.9	3.4
Autoclavat	2.7	-	127	66	2.0	3.3
Autoclavat	2.7	500	126	71	1.8	3.2
Autoclavat	2.7	5000	125	70	1.8	2.6
<i>Error estàndard.</i>			9.7	2.3	0.14	0.28
<i>Pr > F</i>			NS	NS	NS	NS
Contrasts (Pr>T)						
Fitasa microbiana / Sense fitasa microbiana			NS	NS	NS	NS
No tractat / Autoclavat			NS	NS	NS	*
500 U/kg / 5000 U/kg			NS	NS	NS	NS
4.5 g FNF/kg / 2.7 g FNF/kg			*	*	NS	NS

NS: no significatiu, * P 0.05.

Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 7.6. Valors energètics de les dietes experimentals, i digestibilitat ileal de protèines.

Blat	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	EMA (kcal/kg)	EMAn (kcal/kg)	Digestibilitat ileal de Protèina (%)
No tractat	4.5	-	15.1 ^{ab}	14.3 ^{abc}	82.5 ^b
No tractat	2.7	-	14.9 ^b	14.2 ^{bc}	82.0 ^b
No tractat	2.7	500	14.9 ^b	14.1 ^c	82.0 ^b
No tractat	2.7	5000	15.3 ^a	14.5 ^a	84.6 ^a
Autoclavat	4.5	-	15.1 ^{ab}	14.3 ^{abc}	83.0 ^{ab}
Autoclavat	2.7	-	15.1 ^{ab}	14.4 ^{abc}	82.7 ^b
Autoclavat	2.7	500	15.1 ^{ab}	14.4 ^{ab}	82.6 ^b
Autoclavat	2.7	5000	15.3 ^a	14.5 ^a	83.7 ^{ab}
<i>Error estàndard</i>			0.10	0.10	0.61
<i>Pr > F</i>			*	*	*
Contrasts (Pr>T)					
Fitasa microbiana / Sense fitasa microbiana			NS	NS	NS
No tractat / Autoclavat			NS	*	NS
500 U/kg / 5000 U/kg			**	*	**
4.5 g FNF/kg / 2.7 g FNF/kg			NS	NS	NS

NS: no significatiu, * P 0.05, ** P 0.01.

Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 7.7. Composició mineral del plasma i composició dels dits dels animals.

Blat	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (U/kg)	Calci en plasma (mg/dl)	Fòsfor no fític en plasma (mg/dl)	Relació Ca:FNF	Ferro en plasma (µg/dl)	Zinc en plasma (µg/dl)	Matèria seca dits (%)	Cendres dits (%)
No tractat	4.5	-	11.3 ^{ab}	7.8 ^{ab}	1.46 ^{bc}	116	162	33.8	12.7 ^a
No tractat	2.7	-	11.3 ^{ab}	6.6 ^c	1.75 ^a	118	159	33.0	11.3 ^{bc}
No tractat	2.7	500	10.9 ^b	7.4 ^{abc}	1.49 ^{bc}	104	166	33.7	11.9 ^{ab}
No tractat	2.7	5000	11.0 ^b	8.2 ^a	1.35 ^c	128	144	34.4	11.9 ^{ab}
Autoclavat	4.5	-	11.7 ^a	7.3 ^{abc}	1.62 ^{ab}	116	163	34.3	12.1 ^{ab}
Autoclavat	2.7	-	10.9 ^b	6.4 ^c	1.83 ^a	114	156	33.3	10.7 ^c
Autoclavat	2.7	500	11.1 ^b	6.9 ^{bc}	1.62 ^{ab}	110	169	33.8	11.4 ^{bc}
Autoclavat	2.7	5000	11.0 ^b	7.9 ^{ab}	1.40 ^{bc}	113	13	33.3	11.7 ^b
<i>Error estàndard</i>									
<i>Pr > F</i>									
Contrasts (Pr > T)									
Fitasa microbiana / Sense fitasa microbiana			NS	**	***	NS	NS	NS	**
No tractat / Autoclavat			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
500 U/kg / 5000 U/kg			NS	***	*	NS	*	NS	NS
4.5 g FNF/kg / 2.7 g FNF/kg			*	**	**	NS	NS	*	***

NS: no significatiu, * P 0.05, ** P 0.01, ***P 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 7.8. Excreció mineral i retenció aparent de fòsfor total i calci de les dietes experimentals.

Blat	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (U/kg)	Fòsfor total en excreta (%/MS)	Retenció aparent fòsfor total (%)	Calci en excreta (%/MS)	Retenció calci (%)	Zinc en excreta (ppm)	Ferro en excreta (ppm)
No tractat	4.5	-	0.99 ^a	55.2 ^c	2.24 ^a	32.7 ^d	245	748 ^a
No tractat	2.7	-	0.48 ^b	66.2 ^b	1.02 ^c	56.8 ^a	218	697 ^{abc}
No tractat	2.7	500	0.46 ^b	71.0 ^{ab}	1.02 ^c	51.6 ^b	227	648 ^c
No tractat	2.7	5000	0.41 ^b	75.5 ^a	1.01 ^c	52.5 ^{ab}	232	659 ^c
Autoclavat	4.5	-	0.95 ^a	60.1 ^c	2.14 ^b	41.4 ^c	219	739 ^{ab}
Autoclavat	2.7	-	0.49 ^b	70.2 ^{ab}	1.05 ^c	52.8 ^{ab}	234	677 ^{bc}
Autoclavat	2.7	500	0.49 ^b	70.6 ^{ab}	1.03 ^c	49.1 ^b	223	740 ^{ab}
Autoclavat	2.7	5000	0.48 ^b	71.3 ^{ab}	0.97 ^c	49.2 ^b	233	731 ^{ab}
<i>Error estàndard</i>								
			0.03	1.84	0.04	1.76	7.6	24.8
			***	***	***	***	NS	**
Contrasts (Pr > T)								
Fitasa microbiana / Sense fitasa microbiana			NS	NS	NS	**	NS	NS
No tractat / Autoclavat			NS	NS	NS	**	NS	*
500 U/kg / 5000 U/kg			NS	NS	NS	NS	NS	NS
4.5 g FNF/kg / 2.7 g FNF/kg			***	***	***	***	NS	NS

NS: no significatiu, * P 0.05, ** P 0.01, ***P 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 7.9. Ingesta mineral diària.

Blat	Fòsfor no fític (g/kg)	Enzim fitasa afegit (FTU/g)	Fòsfor Total (mg/anim/d)	Calci (mg/anim/d)	Zinc (mg/anim/d)	Ferro (mg/anim/d)
No tractat	4.5	-	300 ^b	441 ^b	3.01 ^b	8.48 ^{bc}
No tractat	2.7	-	183 ^f	305 ^c	2.77 ^c	9.15 ^a
No tractat	2.7	500	210 ^{cde}	276 ^d	2.82 ^c	7.36 ^d
No tractat	2.7	5000	205 ^{de}	259 ^{de}	2.59 ^d	8.82 ^{ab}
Autoclavat	4.5	-	320 ^a	485 ^a	3.66 ^a	8.38 ^{bc}
Autoclavat	2.7	-	202 ^e	269 ^d	2.95 ^{bc}	8.64 ^b
Autoclavat	2.7	500	220 ^c	267 ^d	2.79 ^c	8.07 ^c
Autoclavat	2.7	5000	218 ^{cd}	249 ^e	3.04 ^b	8.55 ^{bc}
<i>Error estàndard</i>			4.8	6.1	0.06	0.18
<i>Pr > F</i>			***	***	***	***
Contrasts (Pr>T)						
Fitasa microbiana / Sense fitasa microbiana			***	***	NS	**
No tractat / Autoclavat			**	**	**	NS
500 U/kg / 5000 U/kg			NS	*	NS	***
4.5 g FNF/kg / 2.7 g FNF/kg			***	***	**	**

NS: no significatiu, * P 0.05, ** P 0.01, *** P 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna sense lletra comuna difereixen significativament (P 0.05).

7.5. Referències bibliogràfiques

Ahmad, T., S. Rasool, M. Sarwar, A. Haq i Z. Hasan. 2000. Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chickens. Anim. Feed Sci. Tech. 83, 103-114.

Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official methods of analysis. 15th ed., Assoc. Anal. Chem., Washington D. C.

Baidoo, K. K., Q. M. Yang i R. D. Walker. 2003. Effects of phytase on apparent digestibility of organic phosphorus and nutrient in maize-soya bean meal based diets for sows. Anim. Feed Sci. Tech. 104, 133-141.

- Barrier-Guillot, B., P. Casado, P. Maupetit, C. Jondreville, F. Gatel i M. Larbier.** 1996. Wheat phosphorus availability: 2-in vivo study in broilers and pigs; relationship with endogenous phytase activity and phytic phosphorus content in wheat. *J. Sci. Food Agric.* 70, 69-74.
- Boling, S. D., M. W. Douglas, R. B. Shirley, C. M. Parsons i K. W. Koelkebeck.** 2000. The effects of various dietary levels of phytase and available phosphorus on performance of laying hens. *Poult. Sci.* 79, 535-538.
- Cabahug, S., V. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 1999. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus contents. I. Effects on bird performance and toe ash. *Brit. Poultry Sci.* 40, 660-666.
- Carlson, C. W. i H. D. Poulsen.** 2003. Phytate degradation in soaked and fermented liquid feed-effect of diet, time of soaking, heat treatment, phytase activity, pH and temperature. *Anim. Feed Sci. Tech.* 103, 141-154.
- Dieckmann, A., R. Timmler i M. Rodehutsord.** 2002. Investigation on the optimal Ca:P ration in studies on P availability in broiler chicken. 11th European Poultry Conference. 1-4.
- DIN 51900.** 1977. Determination of the gross calorific value by the bomb calorimeter and calculation of the net calorific value. Deutsches Institut für Normung e. V., Berlin, Germany.
- Edwards Jr, H. M., A. B. Carlos, A. B. Kasim i R. T. Toledo.** 1999. Effects of steam pelleting and extrusion of feed on phytate phosphorus utilization in broiler chickens. *Poult. Sci.* 78, 96-101.
- Engelen, A. J., F. C. van der Heeft, P. H. G. Randsdorp i E. L. C. Smit.** 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.* 77(3), 760-764.
- Jongbloed, A. W. i P. A. Kemme.** 1990. Effect of pelleting mixed feeds on phytase activity and the apparent absorbability of phosphorus and calcium in pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 28, 233-242.
- Juanpere, J., A. M. Pérez-Vendrell i J. Brufau.** 2002. Effect of microbial phytase on mineral bioavailability of broilers fed nsp-rich diets (barley) in the presence or not of endogenous phytase. En: 11th European Poultry Conference, Bremen, Alemanya (Pòster).

- Juanpere, J., A. M. Pérez-Vendrell i J. Brufau.** 2004. Effect of microbial phytase on broilers fed barley based diets in the presence or not of endogenous phytase. *Anim. Feed Sci. Tech.* 115 (3-4), 265-279.
- Keshavarz, K.** 2003. The effect of different levels of non phytate phosphorus with and without phytase on the performance of four strains of laying hens. *Poult. Sci.* 82, 71-91.
- Kornegay, E. T.** 1999. A review of phosphorus digestion and excretion as influenced by microbial phytase in poultry. En: BASF Technical Symposium. Use of Natuphos phytase in broiler nutrition and waste management, 69-81.
- Lima, F. R., C. X. Mendonça Jr, J. C. Alvarez, J. M. F. Garzillo, E. Ghion i P. M. Leal.** 1997. Biological evaluations of commercial dicalcium phosphates as sources of available phosphorus for broiler chicks. *Poult. Sci.* 76, 1707-1713.
- Mohanna, C. i Y. Nys.** 1999. Changes in zinc and manganese availability in broiler chicks induced by vegetal and microbial phytases. *Anim. Feed Sci. Tech.* 77, 241-253.
- Morris, E. R.** 1987. Iron. En: Trace elements in human and animal nutrition. Ed: W. Mertz Vol I, pp 79-142. Academic Press INC, San Diego, USA.
- Ravindran, V., W. L. Bryden i E. T. Kornegay.** 1995. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Biol. Rev.* 6 (2), 125-143.
- Ravindran, V., S. Cabahug, G. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 2000. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus levels. II. Effects on apparent metabolisable energy, nutrient digestibility and nutrient retention. *Brit. Poultry Sci.* 41, 193-200.
- Ravindran, V., P. H. Selle, G. Ravindran, P. C. H. Morel, A. K. Kies i W. L. 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.
- Reddy, N.K., M. D. Pierson, S. K. Sathe i D.K. Salunkhe.** 1989. Phytates in cereals and legumes. CRC Press, Boca Raton, USA.

- Ribeiro, A. M. L., A. J. Mireles i K. C. Klasing.** 2003. Interactions between dietary phosphorus level, phytase supplementation and pelleting on performance and bone parameters of broilers fed high levels of rice bran. *Anim. Feed Sci. Tech.* 103, 155-161.
- Richards, M. P. i P. C. Augustine.** 1988. Serum and liver zinc, copper, and iron in chicks infected with *Eimeria acervulina* or *Eimeria tenella*. *Biol Trace Elem Res.* 17, 207 - 219.
- Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague.** 1996. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and utilization of dietary calcium, phosphorus, copper, and zinc in broiler chickens fed corn-soybean diets. *Poult. Sci.* 75, 729-736.
- Shirley, R. B. i H. M. Edwards Jr.** 2003. Graded levels of phytase past industry standards improves broiler performance. *Poult. Sci.* 82, 671-680.
- Short, F. J., P. Gorton, J. Wiseman i K. N. Boorman.** 1996. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Anim. Feed Sci. Tech.* 59, 215-221.
- Statistical Analysis System Institute Inc.** 1985. *SAS User's Guide: Statistics, Ver. 5.* SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Stewart, R. A., A. McAllister i K. J. McCracken.** 1998. Effects of wheat source, heat treatment and enzyme inclusion on diet metabolisability and broiler performance. *Br Poult Sci.* 39 (Suppl), S42-3.
- Viveros, A., A. Brenes, I. Arija i C. Centeno.** 2002. Effects of microbial phytase supplementation on mineral utilization and serum enzyme activities in broilers chicks fed different levels of phosphorus. *Poult. Sci.* 81, 1172-1183.
- Ward, N. E.** 2002. Phytase stability may be improved by new technology. *Feedstuffs.* March, 4, 11-12.
- Wodzinsky, R. J. i A. H. J. Ullah.** 1996. Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 263-302.
- Wu, Y. B., V. Ravindran i W. H. Hendriks.** 2003. Effects of microbial phytase, produced by solid-state fermentation, on the performance and nutrient utilisation of broilers fed maize- and wheat-based diets. *Brit. Poultry Sci.* 44 (5), 710-718.

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

J. JUANPERE¹, A. M. PÉREZ-VENDRELL¹, E. ANGULO² i J. BRUFAU¹

¹Departament de Nutrició Animal, IRTA, Centre Mas Bové, Apartat 415, 43280 Reus, Espanya.

²Departament de Producció Animal, UDL, Alcalde Rovira Roure, 177, 25198, Lleida, Espanya.

Poultry Science (enviat)

8.1. Introducció

Degut a la baixa disponibilitat del fòsfor en els ingredients vegetals dels pinsos, s'afegeix fòsfor no fític a les dietes, normalment en excés, per tal de satisfer els requeriments dels animals. Aquest excés s'excreta parcialment a l'ambient, així com encareix els pinsos. Alguns estudis descriuen l'addició de fitasa (3-fitasa, EC 3.1.3.8) a dietes de monogàstrics per tal de contrarestar la presència d'àcid fític i augmentar la biodisponibilitat de fòsfor (Hatten i col., 2001). Les millores en la disponibilitat de fòsfor per la 3-fitasa van ser inicialment descrites per Simons i col. (1990), mentre que varis autors descrigueren millores en la disponibilitat d'altres minerals com calci, zinc, coure i ferro (Schöner i col., 1991; Broz i col., 1994; Roberson i Edwards, 1994; Yi i col., 1996; Sebastian i col., 1996a, b). Tanmateix, s'han descrit algunes interaccions relacionades amb la concentració de calci i de la vitamina D3 i amb la font de fibra per Edwards (1993), Lei i col. (1994), Ravindran i col. (1995) i Qian i col. (1996, 1997). La majoria d'aquests estudis es van dur a terme en dietes de morenc-soja (Yi i col., 1996). Per tant, no es coneix molt dels efectes de la 3-fitasa en disponibilitat mineral, energia i digestibilitat de nutrients quan s'usen dietes amb altres cereals, com el blat i l'ordi. Aquestes dietes estan caracteritzades pel seu important contingut en PNA i una elevada fitasa endògena (Eeckhout i De Paepe, 1994). Avui en dia són molt emprats en dietes d'animals monogàstrics els enzims carbohidrasa específics per a dietes amb una elevada concentració de PNA. Els enzims carbohidrasa ajuden al trencament de les parets cel·lulars dels grans del cereal en l'intestí, per després alliberar tant els carbohidrats de la paret cel·lular com els nutrients que estan atrapats dins les cèl·lules per tal de facilitar la digestió pels enzims endògens de l'animal. Es necessita un trencament total, no només pels enzims capaços d'atacar els components insolubles de les parets cel·lulars, però també per a un segon grup de carbohidrases capaces de reduir els oligosacàrids solubles en aigua a components monomèrics (Chesson, 1993; Sørensen i Nielsen, 1998). Llavors els enzims carbohidrasa milloren el creixement i disminueixen la viscositat intestinal (Brufau i col., 1991; Almirall i Esteve-García, 1995; Steinfeldt i col., 1998b; Zanella i col., 1999; Dänicke i col.,

2000), així com millorar el valor energètic de les dietes i la biodisponibilitat de nutrients (Salobir, 1998; Steinfeldt i col., 1998a; Choct i col., 1999).

L'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar els efectes de suplementar 3-fitasa i enzims carbohidrasa específics en la dieta i les interaccions entre aquests enzims en els valors energètics i la digestibilitat de nutrients en dietes riques en PNA.

8.2. Materials i mètodes

8.2.1. Maneig dels animals

Es van utilitzar cent noranta-dos pollastres broilers d'un dia d'edat de la raça Ross 308. Els pollastres van créixer durant els deu primers dies (període pre-experimental) en gàbies al terra i menjaren una dieta de morenc i soja amb 4.5 g de fòsfor no fític (FNF) per quilo de pinso. En el desè dia, els pollastres es van traslladar a una sala de bateries equipada amb 96 gàbies de metall amb un menjador, un abeurador i una safata de plàstic per a la recollida d'excretes. Les gàbies estaven situades en una sala sense finestres amb calefacció elèctrica i ventilació forçada. Els pollastres es pesaren individualment i es distribuïren en vuit blocs homogenis pel pes viu. Es distribuïren els dotze tractaments de la dieta a l'atzar (vuit rèpliques de dos pollastres per tractament). Durant tot l'experiment l'aigua i el pinso en forma de farina se subministraren *ad libitum*.

8.2.2. Tractaments i disseny experimental

L'estudi es va concebre en un arranjament factorial de tractaments 2x2 per avaluar els efectes de dues concentracions de fitasa i dues dels enzims carbohidrasa quan s'incloueren en tres dietes diferents, de morenc, blat o ordi, respectivament (Taula 8.1). Es va utilitzar una única dosi de cada enzim depenent de l'activitat prèviament analitzada en els productes i les recomanacions dels fabricants.

8.2.3. Fabricació del pinso i composició nutritiva de les dietes

es va oferir una única dieta durant tot l'experiment. Les dietes base estaven formulades per tal de ser isonutritives, cada una contenint 2.7 g de FNF/kg a la mateixa concentració de proteïna i energia (Taula 8.2). El blat i l'ordi eren de les varietats Cartaya i Baraka, respectivament, de la collita de 1999. Els enzims en pols van ser mesclats amb una petita quantitat del cereal i afegits a la resta de la dieta durant la mescla final, estant descrits en la Taula 8.1.

8.2.4. Anàlisis químiques

Abans de les anàlisis, totes les mostres de matèries primeres i de les dietes experimentals es van moldre amb un sedàs de 0.5 mm. Les mostres es van analitzar, seguint mètodes estàndards (AOAC, 1990), per matèria seca (codi 934.01), proteïna bruta (976.05), extracte eteri (920.39), cendres (942.05) i fibra bruta (978.10). La concentració de fòsfor total es va analitzar colorimètricament pel mètode del molibdo-vanadat (965.17). La concentració de calci s'analitzà per espectrofotometria d'absorció atòmica de flama. L'activitat fitàsica present en les matèries primeres i en els pinsos finals s'analitzà segons Engelen i col. (1994). L'activitat xilanàsica en les dietes de blat i l'activitat β -glucanàsica en les dietes d'ordi es van avaluar amb un mètode colorimètric, emprant Azo-xilà o Azo-glucà com a substrats, respectivament (Cosson i col., 1999). Les corbes estàndard es construïren incloent l'enzim a diferents concentracions en pinsos control (sense enzim afegit); el contingut de β -glucans s'analitzà segons McCleary i Glennie-Holmes (1985). El fòsfor fític de les matèries primeres es determinà segons el mètode descrit per Haug i Lantzsch (1983).

8.2.5. Assaig de balanç

El balanç es va dur a terme pel procediment de recollida total i d'alimentació *ad libitum* (mètode de referència europeu amb alguna modificació, Bourdillon i col., 1990) per tal de determinar l'energia metabolitzable aparent (EMA) de les dietes. L'assaig de balanç començà el setzè dia després d'un període d'adaptació de 6 dies (10-16d). En el vint-i-unè dia, després de divuit hores de dejú, els pollastres menjaren les dietes experimentals durant quatre dies, i seguidament divuit hores més de dejú. Les excretes es recolliren diàriament una vegada, emmagatzemades a -20°C i finalment liofilitzades. Més tard, les mostres de l'excreta es molgueren i guardades per a l'anàlisi. S'analitzà

l'energia bruta de les mostres de pinsos i excretes amb una bomba adiabàtica IKA, C-4000 (DIN 51900, 1977), proteïna (976.05; AOAC, 1990), lípids (extracció amb èter de petroli després d'un tractament amb HCl) i midó (McCleary i col., 1997). També s'analitzà el contingut de β -glucans en les excretes dels animals que consumiren dietes d'ordi. Els valors de l'EMA de la dieta es calcularen per diferència entre l'energia ingerida i l'excretada. Els pollastres es pesaren al començament i al final del període de balanç, i l'EMAn es va avaluar assumint que el pes està compost de 200 g de proteïna per quilo guanyat, que la proteïna és igual a 6.25 vegades el nitrogen Kjeldahl i que l'energia és equivalent a 8.22 kcal/kg de nitrogen retingut (Blum i col., 1977).

La mortalitat es va registrar diàriament, incloent la causa probable de la mort. Al final del període, se sacrificaren tots els pollastres per injecció intravenosa de pentobarbital sòdic, segons el procediment N° 689 aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de l'IRTA. Es prengueren mostres del tub digestiu des del diverticle de Meckel fins a 15 cm abans de la unió ili-cecal i es guardaren en gel per mesurar la viscositat de la digesta fresca. Les mostres se centrifugaren a 12000 rpm durant 5 minuts a 15°C; s'agafà el sobrenadant i es guardà en gel. La viscositat va ser determinada en un viscosímetre digital Brookfield mantingut a 30°C i llegit després d'un minut.

8.2.6. Càlculs

Els valors d'EMA de les dietes es calcularen mitjançant la fórmula següent. Es feren les correccions adequades per les diferències en el contingut d'humitat.

$$EMA_{dieta} = [(Pinso consumit \times EB_{dieta}) - (Quantitat excreta \times EB_{exc})] / Pinso consumit$$

On EB_{dieta} és l'energia bruta de l'aliment i EB_{exc} l'energia bruta de l'excreta.

Els valors de l'energia metabolitzable aparent corregida a valor zero de nitrogen (EMAn) de les dietes es van calcular segons la següent fórmula:

$$EMAn_{dieta} = EMA - [(Guany de pes \times 200 \times 8.22) / (Pinso consumit \times 6.25)]$$

Els coeficients de digestibilitat aparent fecal de nutrients es van calcular usant el mètode de recollida total i amb la fórmula següent:

$$dig X = [(Pinso consumit \times X_{dieta}) - (Quantitat excreta \times X_{exc})] / (Pinso consumit \times X_{dieta})$$

on X_{dieta} és el percentatge del nutrient en la dieta i X_{exc} és el percentatge del nutrient en l'excreta.

8.2.7. Anàlisi estadística

Les dades s'analitzaren amb una anàlisi de varianza ANOVA com dissenys de bloc a l'atzar, emprant els procediments del General Linear Models (GLM) del SAS (1985). L'anàlisi ANOVA es va fer seguint el model: $X_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ij}$ on μ = mitjana total, α_i = efecte del primer factor, β_j = efecte del segon factor, $(\alpha\beta)_{ij}$ = interacció entre factors, e_{ij} = contribució de l'error amb mitjana 0 i varianza σ^2 , $i=1\dots a$, $j=1\dots b$. Les mitjanes dels tractaments es van comparar pel test Duncan de rangs múltiples. La significància estadística es va considerar a $P < 0.05$.

Quan es van trobar interaccions entre enzims, es va calcular la importància biològica dels coeficients, segons Little (1981), i expressat com el percentatge de la suma de quadrats del factor interacció respecte la suma total de quadrats de l'error del model.

8.3. Resultats

8.3.1. Paràmetres productius

Els paràmetres productius dels broilers (guany de pes corporal, consum de pinso i índex de transformació) va ser mesurat entre el 16è i el 21è dia de vida de l'animal. Les dades d'aquests paràmetres es presenten en les Taules 3, 4 i 5 per les dietes de morenc, blat i ordi, respectivament. En tots els casos, no s'observaren diferències significativament estadístiques degut a l'addició enzimàtica en qualsevol dels paràmetres, encara que la majoria d'ells es veieren millorats lleugerament per la presència d'enzims. No s'esperaven diferències significants entre tractaments degut al curt període de temps utilitzat. Només es va observar una interacció significativa ($P < 0.01$) en els pollastres que menjaren dietes de morenc. Els que menjaren fitasa i α -galactosidasa tingueren un menor índex de transformació que els que menjaren dieta amb fitasa sola. Els millors índexs de transformació s'obtingueren amb la inclusió de fitasa en dietes de morenc i blat, i amb la inclusió de β -glucanasa en dietes d'ordi. Els valors de la relació pinso consumit/excreta

augmentaren significativament per l'addició de xilanasa i β -glucanasa en dietes de blat i ordi, respectivament; igualment, suplementar les dietes de moresc amb fitasa va augmentar també aquest paràmetre encara que no significativament. No es van trobar diferències significatives entre tractaments en la concentració de matèria seca de l'excreta, excepte quan s'afegí fitasa a dietes de blat ($P < 0.05$).

8.3.2. Viscositat intestinal

Tal com era d'esperar, la viscositat intestinal va disminuir significativament per l'addició de tots els enzims carbohidrasa provats ($P < 0.05$, Taules 3, 4 i 5). La reducció va ser del 17% en dietes de moresc ($P < 0.05$), 56% en dietes de blat ($P < 0.001$) i 69% per les dietes d'ordi ($P < 0.001$). S'observà un augment en la viscositat intestinal en afegir fitasa a les dietes de moresc ($P < 0.01$). No es detectaren efectes similars en els altres dos tipus de dietes. No s'obtingueren interaccions significatives entre els enzims.

8.3.3. Valors energètics

Els valors energètics obtinguts per a les dietes de moresc, blat i ordi es presenten en les Taules 6, 7 i 8, respectivament. L'addició de fitasa millorà significativament l'EMA de les dietes de moresc en un 2% aproximadament ($P < 0.05$) però no es trobaren efectes en les dietes de blat i ordi.

Tots els enzims carbohidrasa usats van incrementar l'energia metabolitzable de les dietes experimentals, però només es trobaren increments estadísticament significatius quan la β -glucanasa va ser inclosa en dietes d'ordi, augmentant els valors d'EMA i EMAn en 70 i 57 kcal/kg, respectivament. No s'obtingueren interaccions significatives entre la fitasa i els enzims carbohidrasa en cap de les dietes.

8.3.4. Digestibilitat de nutrients

Els valors de les digestibilitats de matèria seca, lípids i midó de les dietes experimentals estan ressenyats en les Taules 6, 7 i 8. Els efectes de la fitasa van ser només significatius en el cas de la digestibilitat de matèria seca de dietes de moresc ($P < 0.05$) i digestibilitat de midó de dietes d'ordi ($P < 0.05$). Els enzims carbohidrasa provats sempre van millorar les digestibilitats de nutrients,

encara que en diferents maneres. Malgrat que les millores en les digestibilitats de nutrients degudes a l'addició de α -galactosidasa en les dietes de moresc no van ser estadísticament significatives, l'addició de xilanasa a dietes de blat millorà la digestibilitat de matèria seca ($P < 0.05$) i midó ($P < 0.001$). En el cas de les dietes d'ordi, la inclusió de β -glucanasa millorà significativament ($P < 0.05$) tots els coeficients de digestibilitats estudiats: matèria seca (de 0.65 a 0.67), lípid (de 0.76 a 0.81), midó (0.97 a 0.98) i també els β -glucans totals (de 0.45 a 0.57).

8.3.5. Retenció de minerals

Els resultats de les retencions aparents de fòsfor total i de calci es presenten en la Taula 8.9 (dietes de moresc), Taula 8.10 (dietes de blat) i Taula 8.11 (dietes d'ordi). L'addició de fitasa incrementà significativament la retenció aparent de fòsfor total en totes les dietes, i els enzims carbohidrasa no afectaren aquest paràmetre. L'addició de fitasa va produir increments en els coeficients de retenció de fòsfor del 26% en les dietes de moresc, 6% en les dietes de blat i 10% en les dietes d'ordi, reflectit en una reducció de l'excreció de P total en 40 mg/d per animal en dietes de moresc, 19 mg/d per animal en dietes d'ordi ($P < 0.01$) i 11 mg/d per animal en dietes de blat ($P < 0.05$). Es va observar una interacció significativa entre la fitasa i els enzims carbohidrasa en la retenció de P total de dietes de blat i ordi. Els enzims carbohidrasa no afectaren significativament la retenció aparent i l'excreció de fòsfor, excepte en el cas de les dietes de moresc, on l'excreció de P va augmentar amb la inclusió de β -glucanasa (14 mg P/d per animal).

En el present estudi, l'addició de fitasa millorà la retenció de calci en totes les dietes, encara que aquest efecte només va ser significatiu en les dietes de moresc ($P < 0.01$). L'addició de carbohidrases a les dietes presentà efectes diferents: l'addició de α -galactosidasa no afectà la retenció de calci en les dietes de moresc, i en dietes de blat, la inclusió de xilanasa disminuï la retenció en un 8%, mentre que suplementar β -glucanasa a dietes d'ordi millorà la retenció de calci en un 17%; a més, es va observar una interacció positiva entre la fitasa i la β -glucanasa ($P < 0.01$). No va haver diferències estadísticament significatives en l'excreció de calci quan la fitasa va ser afegida a dietes de blat i ordi, però en dietes de moresc l'excreció de Ca disminuï significativament

($p < 0.01$) en un 24% aproximadament, equivalent a 80 mg/d per animal. L'addició de β -glucanasa a dietes d'ordi disminuï significativament l'excreció de calci en 21mg/d per animal. La xilanasa i l' α -galactosidasa afegides a dietes de blat i moresc, respectivament, no afectaren significativament la concentració de calci excretat.

8.3.6. Avaluació de les interaccions entre enzims

Es van detectar poques interaccions entre els enzims provats. En el cas de les dietes de moresc hi va haver una interacció significativa negativa entre la fitasa i l' α -galactosidasa ($P < 0.01$) en l'índex de transformació, però en el cas del coeficient de digestibilitat de lípids hi va haver una interacció positiva entre aquests enzims ($P < 0.05$). La importància biològica d'aquestes interaccions va ser avaluada segons Little (1981). Les interaccions en l'índex de transformació i la digestibilitat de lípids varen ser importants, ja que la suma de quadrats de les interaccions representaren el 67 i el 43% del model total, respectivament.

En el cas de les dietes de blat, s'observà una interacció positiva entre la fitasa i la xilanasa en la retenció aparent de P total amb una relació de importància biològica (Little, 1981) del 68%. Finalment, en les dietes d'ordi, es trobaren interaccions significatives entre la fitasa i la β -glucanasa en les retencions aparents de fòsfor total i calci i en l'excreció de calci, essent els seus valors de importància biològica iguals a 39, 54 i 60%, respectivament.

8.4. Discussió

En aquest experiment, la inclusió de fitasa microbiana a dietes riques en PNA millorà el creixement lleugerament però no significativament. Això era esperat, donar el curt període temps avaluat i perquè aquesta prova no va ser dissenyada per a aquest propòsit. Tanmateix, es van observar algunes tendències cap a la millora del creixement en els tres tipus de dietes emprades, amb les millores més grans en creixement i índex de transformació observat per als pollastres que menjaren les dietes d'ordi.

En la literatura s'han descrit millores significatives en els paràmetres productius degut a l'addició de fitasa a dietes de moresc, blat o ordi, això si en proves de 21 o més dies de duració. Broz i col. (1994) estudiaren l'addició de fitasa en dietes deficientes de P de moresc i descriueren increments significatius en el creixement de l'animal i el consum de pinso, encara que les millores en l'índex de transformació no foren significatives. Huyghebaert (1996), estudiant l'eficàcia de la fitasa microbiana en el creixement i mineralització d'ossos de broilers que consumiren dietes amb concentracions variables de Ca i P, trobà millores en el creixement animal, consum de pinso i índex de transformació quan la fitasa era inclosa en la dieta, però que els resultats eren dependents de la relació Ca:P. Cabahug i col. (1999), emprant dietes amb fitasa i xilanasa, mantingueren que el factor principal que influeix el creixement animal és la concentració de FNF, que és més important que altres factors, com la viscositat intestinal.

La viscositat intestinal podria ser útil per a la predicció de la digestibilitat de nutrients, a partir que la viscositat modula la velocitat de trànsit de la digesta pel intestí, la secreció de enzims digestius endògens i la microflora bacteriana, ja sigui de manera quantitativa o qualitativa. Està ben documentat que viscositats intestinals baixes produeixen un millor accés als nutrients de l'aliment tant pels enzims endògens com per la microflora intestinal, facilitant la digestió de nutrients (Almirall i col., 1995). L'addició de fitasa en el nostre estudi no millorà la viscositat intestinal en cap de les dietes provades, i s'arribà a registrar una pujada significativa en les dietes de moresc. Tampoc no es trobaren millores en els coeficients de digestibilitat de matèria seca, lípids i midó degut a la fitasa (Taules 8.6, 8.7 i 8.8).

La inclusió de fitasa produí algunes millores en l'energia de dietes baixes en FNF. El mecanisme pel qual la fitasa millora la utilització de l'energia no està massa clar. Pot estar relacionat amb una millor utilització de la proteïna i aminoàcids, però podria ser degut a l'eliminació dels efectes adversos en la digestió del midó (Ravindran, 1999). La fitasa exògena produí un important increment en el valor energètic només en la dieta de moresc, on l'activitat fitàsica endògena és molt baixa (Taula 8.2). Els valors d'energia més alts es trobaren en les dietes d'ordi, resultats que són

coherents amb els paràmetres productius observats, i estan possiblement relacionats amb una major concentració de greix afegit en la dieta per tal de mantenir els pinsos isoenergètics. És possible que la contribució proteica a l'energia sigui millorada per la fitasa, ja que l'enzim pot alliberar proteïnes que estan fortament unides al fitat. Alguns autors han descrit millores degut a l'addició de fitasa en valors d'energia encara que no significatius en dietes de blat (Ravindran i col., 1999). Aquests autors, utilitzant concentracions de fòsfor no fític recomanades pel NRC (1994), obtingueren millores en l'energia properes al 5% en dietes amb blat normal o amb una EMA baixa. Malgrat això, els mateixos autors (Ravindran i col., 2000), utilitzant dietes de blat amb nivells adequats o baixos de P no fític (2.3 g/kg) i diferents concentracions d'àcid fític, van trobar que, en el cas de l'EMA, les millores degudes a la fitasa afegida van ser més grans en dietes amb FNF adequat que en les dietes deficientes de P, però en ambdós casos les diferències van ser significatives.

Suplementar les dietes experimentals amb fitasa va permetre millorar la retenció aparent de fòsfor total, així com reduir l'excreció de fòsfor total, encara que en el cas dels broilers que menjaren dietes de blat, la reducció de l'excreció de fòsfor total no va ser estadísticament significativa. Les millores en la retenció de fòsfor per l'addició de fitasa eren d'esperar, i estan descrites en la literatura (Broz i col., 1994; Sebastian i col., 1996 a, b; Ibrahim i col., 1999; Ravindran i col., 2000). Les dietes experimentals deficientes de P presentaven un alt coeficient de retenció, i amb l'addició de la fitasa, s'enregistraren encara més pujades en aquest paràmetre (0.68-0.70), també per a les dietes de blat que ja presenten un coeficient molt gran en dietes sense suplementar (0.66). Com que millorà la retenció de fòsfor total, també es produí una reducció en la seva excreció. Encara que tots aquests resultats estan relacionats amb el fòsfor total, poden ser atribuïts al fòsfor fític, ja que el FNF produït per l'acció de la fitasa pot ser destinat a diverses rutes metabòliques de l'animal. Tots aquests resultats indiquen que la fitasa actua específicament en el trencament de les unions fòsfor-fitat, produint grups PO_4^{3-} , que són molt disponibles per l'animal, i finalment mio-inositol quan s'han trencat tots els sis enllaços. Les dietes de morenc tenen una activitat fitàsica endògena molt més baixa en comparació amb les de blat i ordi, i per això s'enregistren unes diferències tan grans

entre les dietes amb i sense fitasa exògena tant en la retenció aparent i l'excreció de fòsfor total. El petit increment en el coeficient de retenció aparent de fòsfor total pels animals que menjaren dietes de blat podria ser atribuït a l'elevada activitat endògena avaluada (459 U/kg, Taula 8.2). La magnitud de la resposta a la fitasa de la retenció aparent de fòsfor total en les dietes d'ordi va ser intermedi entre els trobats per les dietes de morenc i blat, de manera similar al seu nivell de fitasa endògena (275 U/kg).

Era d'esperar unes millores en la retenció aparent i l'excreció de calci en les dietes experimentals per l'addició de fitasa (Huyghebaert, 1996; Zanini i Sazzad, 1999; Ahmad i col., 2000). En les dietes de blat i ordi (amb una considerable activitat fitàsica endògena) les millores observades en la retenció de calci degudes a la fitasa exògena foren menors que les trobades en les dietes de morenc. Les millores són produïdes perquè, al pH en què la fitasa trenca la molècula de fitat a P i mio-inositol, el calci que es troba quelat i unit al fitat és alliberat en forma iònica, la qual pot ser millor assimilada per l'animal. És per això que la fitasa pot millorar la retenció de fòsfor i calci. Les concentracions de P i Ca en les dietes experimentals usades estaven per sota dels requeriments de l'animal, llavors s'estimula la retenció de Ca i P fins a uns nivells superiors per l'acció de la fitasa. En aquesta situació, els animals poden retenir i usar major proporció de la concentració dels minerals provenint de la dieta, reduint la seva excreció al medi ambient (Zanini i Sazzad, 1999; Ahmad i col., 2000).

En el present experiment, l'addició d'enzims carbohidrasa a les dietes experimentals produí algunes millores significants en els paràmetres productius. Les millores en el creixement de broilers degudes a enzims β -glucanasa en dietes d'ordi està ben documentat (Viveros i col., 1994; Azain i col., 2002). Viveros i col. (1994) van descriure que la β -glucanasa en pinsos millorava el creixement d'animals de 28 dies de vida. El creixement, el consum de pinso i l'índex de transformació milloraven en 27%, 3.7% i 18%, respectivament.

Tot i el curt període experimental descrit en aquest treball, les reduccions més grans en viscositat intestinal s'obtingueren amb els enzims carbohidrasa provats. El valor de viscositat intestinal més

gran el trobem en els animals que menjaren dietes d'ordi sense enzims (14.5 mPa.s), mentre que amb la inclusió de β -glucanasa, amb el trencament dels β -glucans, el valor va disminuir fins a 4.5 mPa.s, una reducció propera al 70%, que malgrat tot no és tan baixa com la viscositat obtinguda en les dietes de moresc o blat, amb α -galactosidasa o xilanasa afegida, respectivament. Salobir (1998) i Steinfeldt (1998b) van trobar reduccions estadísticament significatives en viscositat ileal degut a la xilanasa en broilers que menjaren dietes de blat amb la concentració recomanada de P. Zyla i col. (1999) avaluaren els efectes de l'aplicació simultània de fitasa i xilanasa a dietes de blat, i trobaren que la viscositat intestinal era aproximadament un 40% menor quan s'inclou a la xilanasa. En dietes amb només fitasa afegida però a una concentració elevada (1000 U/kg) van obtenir un marcat increment en la viscositat intestinal, que estan en concordància amb els trobats en aquest experiment.

La inclusió de l' α -galactosidasa i la xilanasa en dietes de moresc i blat, respectivament, produí petites però no estadísticament significatives millores en l'EMA i l'EMAn, mentre que l'addició de β -glucanasa en dietes d'ordi produïren millores significatives en l'EMA i l'EMAn. L'addició dels enzims carbohidrasa a les dietes riques en PNA van produir increments en la digestibilitat de nutrients de manera conseqüent, de tal manera que cada enzim actuà sobre un PNA específic i característic per a cada dieta (α -galactosidasa/ α -galactòsids, xilanasa/xilans i β -glucanasa/ β -glucans). Aquests resultats estan ben descrits pels diferents autors en relació a les dietes de blat o ordi (Viveros i col., 1994; Almirall i col., 1995; Steinfeldt i col., 1998a; Francesch i col., 1999). En aquest experiment, les millores en les dietes de moresc degut a la inclusió d' α -galactosidasa no van ser significants, l'addició de xilanasa a dietes de blat produïren millores no significants en el coeficient de digestibilitat de lípids però la inclusió de β -glucanasa en dietes d'ordi augmentà els coeficients de digestibilitat de matèria seca, lípids, midó i β -glucans ($P < 0.05$).

L'avaluació de les interaccions observades entre la fitasa i els enzims carbohidrasa mostraren uns efectes positius en la disponibilitat mineral, en la digestió i en la retenció. Es van observar interaccions positives en la retenció aparent de fòsfor total en els pollastres que menjaren dietes de

blat i ordi i en la retenció i excreció de calci en pollastres que menjaren dietes d'ordi. Sembla que la inclusió d'ambdós enzims simultàniament millora la resposta, donant millors resultats que els obtinguts quan els enzims estan afegits sols (Taules 10 i 11). Aquests resultats foren confirmats amb el càlcul de la importància biològica de la interacció. En el cas del coeficient de digestibilitat de lípids en pollastres que menjaren dietes de moresc, la significància de la interacció no és clara. Encara que la interacció estadística fos significativa, els coeficients obtinguts quan els enzims eren provats individualment van ser millors que la dieta control sense enzims, però van ser molt similars quan s'afegiren els dos enzims alhora (Taula 8.6). La interacció entre la fitasa i l' α -galactosidasa va ser negativa per l'estudi de l'índex de transformació. En aquest cas, la inclusió dels dos enzims conjuntament produïren pitjors resultats que la inclusió de cada enzim per separat, resultant en un índex de transformació similar al de la dieta sense enzims (Taula 8.3). Aquesta interacció negativa, amb un coeficient de importància biològica del 67%, podria estar relacionada amb el fet que l'índex de transformació és la relació entre altres dos paràmetres (guany de pes i consum de pinso). Aquests dos paràmetres mostraren resultats numèricament millors però en proporció diferents quan els enzims van ser usats en combinació que no pas quan es van usar per separat. Els pollastres que menjaren dietes de moresc amb els dos enzims afegits menjaren i cresqueren més que els que menjaren els pinsos amb un sol enzim afegit, però la resposta en consum i creixement va ser d'una magnitud diferent, i això va fer que l'índex de transformació fos desigual. Els efectes per l'ús d'una fitasa i un enzim carbohidrasa en combinació podrien descriure's com que un enzim permet augmentar l'activitat de l'altra. Així hi ha una reducció en les propietats antinutritives del fitat i dels polisacàrids no amilacis (Ravindran i col., 1999).

Els presents resultats confirmen que la fitasa i els enzims carbohidrasa actuen independentment i que poden ser combinats en dietes riques en PNA sense interaccions negatives remarcables. L'addició de fitasa millorà la retenció de fòsfor i calci sense afectar el creixement en el curt període de temps avaluat, mentre que els enzims glucosidasa reduïren la viscositat intestinal i milloraren les digestibilitats de nutrients.

Taula 8.1. Tractaments experimentals.

Tractament	Dieta	Enzim fitasa afegida ¹ (U/kg)	Activitat total fitasa analitzada ²	Enzims glicosidasa ³
T-1	Moresc	-	31	-
T-2	Moresc	500	571	-
T-3	Moresc	-	25	á-Galactosidasa ⁴ : 18
T-4	Moresc	500	689	á-Galactosidasa: 18
T-5	Blat	-	281	-
T-6	Blat	500	1089	-
T-7	Blat	-	416	Xilanasa ⁵ : 3540 (3600)
T-8	blat	500	1113	Xilanasa: 3540 (4250)
T-9	Ordi	-	235	-
T-10	Ordi	500	863	-
T-11	Ordi	-	205	â-Glucanasa ⁶ : 3150 (3210)
T-12	Ordi	500	700	â-Glucanasa: 3150 (3230)

¹ Fitasa microbiana (E.C. 3.1.3.8) (Natuphos®, BASF Española, 6,900 U phytase/g). Una unitat de fitasa es defineix com la quantitat d'enzim que allibera 1 ìmol de fòsfor no fític/min provenint de fitat sòdic 5 mM a pH 5.5 i 37°C.

² L'activitat fitàsica total analitzada és la suma de la fitasa endògena i de l'afegida.

³ Valors de l'activitat: Estimats (Analitzats).

⁴ á-Galactosidasa (EC 3.2.1.22) (á-Galactosidase I, Industrial Técnica Pecuaria, S.A., 35 unitats á-galactosidase/g). Una unitat á-galactosidasa es defineix com la quantitat d'enzim que hidrolitza 1 ìmol de p-nitrofenil-á-galactòsid a p-nitrofenil i D-galactosa a pH 6.5 i 25°C.

⁵ Xilanasa (EC 3.2.1.8) (Safizym XP-20®, Lesaffre Developpement, 59,000 U xylanase/g). Una unitat de xilanasa es defineix com la quantitat d'enzim que allibera 1 ìmol de sucre reductor provenint de xilà de civada en 1 min a pH 4.5 i 30°C.

⁶ â-Glucanasa (EC 3.2.1.6) (Roxazyme® G2, Hoffman La Roche, 21,000 U â-glucanase /g). Una unitat â-glucanasa es defineix com la quantitat d'enzim que allibera 1 ìmol de sucres reductors expressat en forma de glucosa provenint del â-glucà de l'ordi en 1 min a pH 4.5 i 30°C.

Taula 8.2. Composició de les dietes base.

Ingredient (g/kg)	Dieta Pre-experimental	Dieta moresc-soja	Dieta blat-soja	Dieta ordi-soja
	P-Normal		P-deficient	
Moresc	573.3	634.9	-	-
Blat	-	-	695.4	
ordi	-	-	-	644.7
Farina de soja 48%	342.1	295.4	213.3	228.5
Llard	39.0	4.1	24.0	60.0
Farina de peix LT999	-	37.0	37.0	37.7
DL-metionina	2.8	2.2	2.2	2.8
L-lisina HCl	0.9	-	1.9	1.4
L-treonina	-	-	0.2	0.3
Carbonat càlcic	15.6	14.2	13.2	15.2
Fosfat bicàlcic	17.4	4.1	5.6	1.8
Sal	4.7	4.1	3.3	4.4
Clorur de colina 50%	0.2	0.1	-	-
Minerals i vitamines ¹	4.0	4.0	4.0	4.0
Contingut estimat de nutrients (g/kg)				
Energia metabolitzable (MJ/kg)	12.9	12.5	12.5	12.5
Protèina bruta	210.0	216.1	220.0	223.5
Lisina	12.0	12.0	12.0	12.0
Met + Cys	9.2	9.2	9.2	9.2
Ca	11.0	8.1	8.1	8.1
Fòsfor total	6.4	4.4	5.0	4.4
Fòsfor No fític	4.5	2.7	2.7	2.7
Fòsfor fític	2.8	1.7	2.3	1.7
Fitasa endògena (U/kg)	6	6	459	276

¹ Aportació per quilo de pinso: Vitamina A, 12,000 IU; Vitamina D₃, 2,400 IU; Vitamina E, 30 mg; Vitamina K₃, 3 mg; Vitamina B₁, 2.2 mg, Vitamina B₂, 8.0 mg; Vitamina B₆, 5.0 mg; Vitamina B₁₂, 11.0 ìg; Àcid fòlic, 1.5 mg; Biotina, 150 ìg; Pantotenat càlcic, 25 mg; Àcid Nicotínic, 65 mg; Etoxiquina, 150 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; Zn, 40 mg; Mn, 60 mg; Se, 0.15 mg; I, 0.33 mg.

Taula 8.3. Paràmetres productius dels broilers que menjaren dietes de moresc.

Fòsfor no fític	Enzim fitasa afegit (U/kg)	α -Galactosidasa (mg/kg)	Guany de pes (g)	Consum de pinso (g)	Índex de transformació (g/g)	Relació pinso excreta consumit: excreta (g/g)	Matèria seca excreta (g/kg)	Viscositat intestinal (mPa.s)
0.27%	-	-	306	539	1.77	3.19	266	1.9
0.27%	500	-	324	537	1.66	3.44	282	2.6
0.27%	-	500	314	561	1.73	3.44	261	1.8
0.27%	500	500	324	568	1.76	3.37	276	1.9
Fitasa (U/kg)								
		0	310	550	1.75	3.31	263	1.8 ^b
		500	324	555	1.72	3.41	279	2.3 ^a
		<i>Error estàndard</i>	7.8	12.9	0.015	0.058	8.6	0.10
		<i>Pr > F</i>	NS	NS	NS	NS	NS	**
α -Galactosidasa (mg/kg)								
		0	314	538	1.72	3.31	274	2.2 ^a
		500	319	565	1.74	3.40	269	1.9 ^b
		<i>Error estàndard</i>	7.8	12.9	0.015	0.058	8.6	0.10
		<i>Pr > F</i>	NS	NS	NS	NS	NS	*
Interacció fitasa * α -Galactosidasa								
			NS	NS	**	NS	NS	NS

NS: no significatiu, * P 0.05, ** P 0.01.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 8.4. Paràmetres productius dels broilers que menjaren dietes de blat.

Fòsfor no fític	Enzim fitasa afegit (U/kg)	Xilanasa (mg/kg)	Guany de pes (g)	Consum de pinso (g)	Índex de transformació (g/g)	Relació pinso excreta (g/g)	Matèria seca excreta (g/kg)	Viscositat intestinal (mPa.s)
0.27%	-	-	306	579	1.78	3.47	274	5.1
0.27%	500	-	344	594	1.69	3.42	245	4.6
0.27%	-	60	326	573	1.76	3.68	287	1.9
0.27%	500	60	345	586	1.71	3.71	265	2.4
Fitasa (U/kg)		0	316	576	1.77	3.57	281 ^a	3.5
		500	344	590	1.70	3.56	255 ^b	3.5
		<i>Error estàndard</i>	11.0	8.9	0.030	0.079	7.45	0.48
		<i>Pr > F</i>	NS	NS	NS	NS	*	NS
Xilanasa (mg/kg)		0	325	587	1.74	3.45 ^b	259	4.9 ^a
		60	335	579	1.74	3.69 ^a	276	2.1 ^b
		<i>Error estàndard</i>	11.0	8.9	0.030	0.079	7.45	0.48
		<i>Pr > F</i>	NS	NS	NS	*	NS	***
Interacció fitasa * Xilanasa			NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS: no significatiu, * P 0.05, *** P 0.001.
 Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 8.5. Paràmetres productius dels broilers que menjaren dietes d'ordi.

Fòsfor no fític	Enzim fitasa afegit (U/kg)	β -Glucanasa (mg/kg)	Guany de pes (g)	Consum de pinso (g)	Índex de transformació (g/g)	Relació pinso excreta consumit: excreta (g/g)	Màteria seca excreta (g/kg)	Viscositat intestinal (mPa.s)
0.27%	-	-	327	588	1.71	2.97	306	13.7
0.27%	500	-	350	607	1.65	2.82	291	15.2
0.27%	-	150	345	583	1.67	3.10	307	4.1
0.27%	500	150	362	622	1.68	3.11	302	4.8
Fitasa (U/kg)								
		0	3336	585	1.69	3.04	306	8.9
		500	356	615	1.67	2.96	296	10.0
		<i>Error estàndard</i>	8.6	15.1	0.021	0.061	7.05	1.63
		<i>Pr > F</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS
β -Glucanasa (mg/kg)								
		0	338	597	1.67	2.90 ^b	299	14.5 ^a
		150	353	601	1.68	3.11 ^a	305	4.5 ^b
		<i>Error estàndard</i>	8.6	8.9	0.021	0.061	7.05	1.63
		<i>Pr > F</i>	NS	NS	NS	*	NS	***
Interacció fitasa * β -glucanasa								
			NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS: no significatiu, * P 0.05, *** P 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 8.6. EMA, EMAn, coeficients de digestibilitat de matèria seca, lípids i midó en broilers que menjaren dietes de morenc.

Fòsfor no fític	Enzim fitasa afegit (U/kg)	α -Galactosidasa (mg/kg)	EMA (MJ/kg)	EMAn (MJ/kg)	Digestibilitat matèria seca	Digestibilitat lípid	Digestibilitat midó
0.27%	-	-	12.4	11.7	0.68	0.67	0.95
0.27%	500	-	12.7	11.9	0.69	0.72	0.97
0.27%	-	500	12.5	12.1	0.69	0.72	0.96
0.27%	500	500	12.7	12.0	0.70	0.71	0.97
Fitasa (U/kg)							
		0	12.4 ^b	11.8	0.68 ^b	0.70	0.96
		500	12.7 ^a	12.0	0.70 ^a	0.72	0.97
		<i>Error estàndard</i>	0.07	0.08	0.004	0.001	0.004
		<i>Pr > F</i>	*	NS	*	NS	NS
α -Galactosidasa (mg/kg)							
		0	12.5	11.8	0.68	0.70	0.96
		500	12.6	12.0	0.70	0.72	0.97
		<i>Error estàndard</i>	0.07	0.08	0.004	0.001	0.004
		<i>Pr > F</i>	NS	NS	NS	NS	NS
Interacció fitasa * α -Galactosidasa							
			NS	NS	NS	*	NS

NS: no significatiu, * P 0.05.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 8.7. EMA, EMAn, coeficients de digestibilitat de matèria seca, lípids i midó en broilers que menjaren dietes de blat.

Fòsfor no fític	Enzim fitasa afegit (U/kg)	Xilanasa (mg/kg)	EMA (MJ/kg)	EMAn (MJ/kg)	Digestibilitat matèria seca	Digestibilitat lípid	Digestibilitat midó
0.27%	-	-	12.8	12.2	0.70	0.75	0.95
0.27%	500	-	12.9	12.3	0.70	0.78	0.96
0.27%	-	60	13.2	12.6	0.73	0.78	0.98
0.27%	500	60	12.9	12.2	0.71	0.79	0.98
Fitasa (U/kg)		0	13.0	12.4	0.72	0.76	0.96
		500	12.9	12.2	0.71	0.79	0.97
	<i>Error estàndard</i>		0.11	0.11	0.005	0.017	0.003
		<i>Pr > F</i>	NS	NS	NS	NS	NS
Xilanasa (mg/kg)		0	12.9	12.2	0.70 ^b	0.76	0.95 ^b
		500	13.0	12.4	0.72a	0.79	0.98 ^a
	<i>Error estàndard</i>		0.11	0.11	0.006	0.015	0.003
		<i>Pr > F</i>	NS	NS	*	NS	***
Interacció fitasa * Xilanasa			NS	NS	NS	NS	NS

NS: no significatiu, * P 0.05, *** P 0.001

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 8.8. EMA, EMAn, coeficients de digestibilitat de matèria seca, lípids i midó en broilers que menjaren dietes d'ordi.

Fòsfor no fític	Enzim fitasa afegit (U/kg)	β -Glucanasa (mg/kg)	EMA (MJ/kg)	EMAn (MJ/kg)	Digestibilitat matèria seca	Digestibilitat lípid	Digestibilitat midó	Digestibilitat β -glucans
0.27%	-	-	12.8	12.2	0.65	0.77	0.972	0.48
0.27%	500	-	12.8	12.1	0.65	0.76	0.970	0.42
0.27%	-	150	13.1	12.5	0.67	0.83	0.989	0.58
0.27%	500	150	13.0	12.3	0.67	0.79	0.980	0.56
Fitasa (U/kg)	0	0	13.0	12.3	0.67	0.80	0.980 ^a	0.53
	500	500	12.9	12.3	0.66	0.78	0.975 ^b	0.50
	<i>Error estàndard</i>		8.6	0.07	0.021	0.016	0.0016	0.013
	<i>Pr > F</i>		NS	NS	NS	NS	*	NS
β -Glucanasa (mg/kg)	0	0	12.8 ^b	12.2 ^b	0.65 ^b	0.76 ^b	0.971 ^b	0.45 ^b
	150	150	13.0 ^a	12.4 ^a	0.67 ^a	0.81 ^a	0.984 ^a	0.57 ^a
	<i>Error estàndard</i>		0.07	0.07	0.003	0.016	0.0016	0.013
	<i>Pr > F</i>		**	**	***	*	***	***
Interacció fitasa * β -glucanasa			NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS: no significatiu, * P 0.05, ** P 0.01, *** P 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 8.9. Coeficients de retenció i excrecions de fòsfor total i calci en broilers que menjaren dietes de morenc.

Fòsfor no fític	Enzim fitasa afegit (U/kg)	α -Galactosidasa (mg/kg)	Retenció aparent fòsfor total	Retenció calci	Excreció fòsfor total (mg/d/anim)	Excreció calci (mg/d/anim)
0.27%	-	-	0.55	0.47	115	327
0.27%	500	-	0.68	0.64	77	240
0.27%	-	500	0.54	0.50	130	252
0.27%	500	500	0.68	0.63	86	255
Fitasa (U/kg)						
		0	0.54 ^b	0.48 ^b	121 ^a	326 ^a
		500	0.68 ^a	0.63 ^a	81 ^b	246 ^b
		<i>Error estàndard</i>	0.014	0.013	4.0	11.3
		<i>Pr > F</i>	***	**	**	**
α -Galactosidasa (mg/kg)						
		0	0.61	0.55	94 ^b	279
		500	0.61	0.56	108 ^a	298
		<i>Error estàndard</i>	0.014	0.013	3.8	11.3
		<i>Pr > F</i>	NS	NS	**	NS
Interacció fitasa * α -Galactosidasa						
			NS	NS	NS	*

NS: no significatiu, * P 0.05, ** P 0.01, *** P 0.001.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 8.10. Coeficients de retenció i excrecions de fòsfor total i calci en broilers que menjaren dietes de blat.

Fòsfor no fític	Enzim fitasa afegit (U/kg)	Xilanasa (mg/kg)	Retenció aparent fòsfor total	Retenció calci	Excreció fòsfor total (mg/d/anim)	Excreció calci (mg/d/anim)
0.27%	-	-	0.69	0.62	100	259
0.27%	500	-	0.67	0.61	111	257
0.27%	-	60	0.62	0.55	121	267
0.27%	500	60	0.74	0.59	91	248
Fitasa (U/kg)		0	0.66 ^b	0.58	107	262
		500	0.70 ^a	0.60	96	250
		<i>Error estàndard</i>	0.016	0.012	7.7	10.7
		<i>Pr > F</i>	*	NS	NS	NS
Xilanasa (mg/kg)		0	0.68	0.62 ^a	103	258
		60	0.68	0.57 ^b	99	253
		<i>Error estàndard</i>	0.016	0.012	7.5	10.7
		<i>Pr > F</i>	NS	*	NS	NS
Interacció fitasa * Xilanasa			**	NS	NS	NS

NS: no significatiu, * P 0.05, ** P 0.01.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P 0.05).

Taula 8.11. Coeficients de retenció i excrecions de fòsfor total i calci en broilers que menjaren dietes d'ordi.

Fòsfor no fític	Enzim fitasa afegit (U/kg)	β -Glucanasa (mg/kg)	Retenció aparent fòsfor total	Retenció calci	Excreció fòsfor total (mg/d/anim)	Excreció calci (mg/d/anim)
0.27%	-	-	0.61	0.45	115	303
0.27%	500	-	0.62	0.38	110	316
0.27%	-	150	0.59	0.44	124	314
0.27%	500	150	0.70	0.52	90	263
Fitasa (U/kg)						
		0	0.60 ^b	0.44	120 ^a	308
		500	0.66 ^a	0.45	101 ^b	291
		<i>Error estàndard</i>	0.016	0.016	4.4	6.4
		<i>Pr > F</i>	*	NS	**	NS
β -Glucanasa (mg/kg)						
		0	0.61	0.41 ^a	113	309 ^a
		500	0.65	0.48 ^b	108	288 ^b
		<i>Error estàndard</i>	0.016	0.016	4.4	8.2
		<i>Pr > F</i>	NS	**	NS	*
Interacció fitasa * β -Glucanasa			*	**	NS	**

NS: no significatiu, * P 0.05, ** P 0.01.

Les mitjanes dins d'una columna amb lletra no comuna difereixen significativament (P 0.05).

8.5. Referències bibliogràfiques

Ahmad, T., S. Rasool, M. Sarwar, A. Haq i Z. Hasan. 2000. Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 83, 103-114.

Almirall, M. i E. Esteve-García. 1995. In vitro stability of a α -glucanase preparation from *Trichoderma longibrachiatum* and its effect in a barley based diet fed to broiler chicks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 54, 149-158.

Almirall, M., M. Francesch, A. M. Pérez-Vendrell, J. Brufau i E. Esteve-Garcia. 1995. The differences in intestinal viscosity produced by barley and α -glucanase alter digesta enzyme activities and ileal nutrient digestibilities more in broiler chicks than in cocks. *J. Nutr.* 125, 947-955.

Association of Official Analytical Chemists. 1990. "Official methods of analysis". 15th ed., Assoc. Anal. Chem., Washington, D.C.

Azain, M. J., X. L. Li, A. K. Shah i T. E. Davies. 2002. Separation of the effects of xylanase and α -glucanase addition on performance of broilers chicks fed barley based diets. *Poult. Sci.* 81(Suppl. 1), 121.

Blum, J. C., M. Plouzeau i P. Stevans. 1977. Influence des conditions d'élevage et de préparation sur la qualité des viandes de volaille et sur les oeufs. *Rev. Fr. Diét.* 82, 7-32.

Bourdillon, A., B. Carré, L. Conan, M. Francesch, M. Fuentes, G. Huyghebaert, W. M. M. A. Janssen, B. Leclercq, M. Lessire, J. McNab, M. Rigoni, M. i J. Wiseman. 1990. European reference method of in vivo determination of metabolizable energy in poultry: reproductibility, effect of age, comparison with predicted values. *Brit. Poultry Sci.* 31, 567-576.

Broz, J., P. Oldale, A. H. Perrin-Voltz, G. Rychen, J. Schulze i C. Simoes-Nunes. 1994. Effects of supplemental phytase on performance and phosphorus utilisation in broiler chickens fed a low phosphorus diet without of inorganic phosphates. *Brit. Poultry Sci.* 35, 273-280.

- Brufau, J., C. Nogareda, A. M. Pérez-Vendrell, M. Francesch i E. Esteve-Garcia.** 1991. Effect of *Trichoderma viride* enzymes in pelleted broiler diets based on barley. *Anim. Feed Sci. Technol.* 34, 193-202.
- Cabahug, S., V. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 1999. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate contents. I. Effects on bird performance and toe ash. *Brit. Poultry Sci.* 40, 660-666.
- Chesson, A.** 1993. Feed enzymes. *Anim. Feed Sci. Tech.* 45, 65-79.
- Choct, M., R. J. Hughes i M. R. Bedford.** 1999. Effects of a xylanase on individual bird variation, starch digestion throughout the intestine, and ileal and caecal volatile fatty acid production in chickens fed wheat. *Brit. Poultry Sci.* 40, 419-422.
- Cosson, T., A. M. Pérez-Vendrell, B. González-Teresa, D. Reñé, P. Taillade i J. Brufau.** 1999. Enzymatic assays for xylanase and α -glucanase feed enzymes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 77, 345-353.
- Dänicke, S., H. Jeroch, W. Böttcher i O. Simon.** 2000. Interactions between dietary fat type and enzyme supplementation in broiler diets with high pentosan contents: effects on procaecal and total tract digestibility of fatty acids, metabolizability of gross energy, digesta viscosity and weights of small intestine. *Anim. Feed Sci. Technol.* 84, 279-294.
- DIN 51900.** 1977. Determination of the gross calorific value by the bomb calorimeter and calculation of the net calorific value. Deutsches Institut für Normung e. V., Berlin, Germany.
- Edwards Jr, H. M.** 1993. Dietary 1,25-dihydroxycholecalciferol supplementation increases natural phytate phosphorus utilization in chickens. *J Nutr.* 123, 567-577.
- Eeckhout, W. i M. De Paepe.** 1994. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 47, 19-29.
- Engelen, A. J., F. C. Van der Heeft, P. H. G. Randsdorp i E. L. C. Smit.** 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC* 77, 760-764.

- Francesch, M., S. Pérez-Moya, I. Badiola i J. Brufau.** 1999. Effects of cereal and feed enzyme on water consumption, dietary metabolizable energy and nutrient digestibility in broiler chickens. Page 258 in Proceedings of the 12th European Conference on Poultry Nutrition. WPSA, Veldhoven, The Netherlands.
- Hatten, III, L.F., D. R. Ingram i S. T. Pittman, 2001.** Effect of phytase on production parameters and nutrient availability in broilers and laying hens: a review. *J. Appl. Poult. Res.* 10, 274-278.
- Haug, W. i H. J. Lantzsch.** 1983. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *J. Sci. Food Agr.* 34, 1423-1426.
- Huyghebaert, G.** 1996. Effects of dietary calcium, phosphorus, Ca/P ratio and phytase on zootechnical performances and mineralisation in broiler chicks. *Arch. Geflugelkd.* 61(2), 53-61.
- Ibrahim, S., J. P. Jacob i Blair.** 1999. Phytase supplementation to reduce phosphorus excretion of broilers. *J. Appl. Poult. Res.* 8, 414-425.
- Lei, X. G., P. K. Ku, E. R. Miller, M. T. Yokoyama i D. E. Ullrey.** 1994. Calcium level affects the efficacy of supplemental microbial phytase in corn-soybean meal diets of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 72, 139-143.
- Little, T. M.** 1981. Interpretation and presentation of results. *Hortscience*, 16(5), 637-640.
- McCleary, B.V. i H. Glennie-Holmes.** 1985. Enzymic quantification of (1-3), (1-4)- α -D-glucan in barley and malt. *J. Inst. Brew.* 91, 285-295.
- McCleary, B.V., T. S. Gibson i D. C. Mugford.** 1997. Measurement of total starch in cereal products by amyloglucosidase- α -amylase method: Collaborative study. *J. AOAC* 80, 571-579.
- NRC.** 1994. Nutrients requirements of domestic animals. Nutrient requirements of poultry (9th rev. ed.). National Research Council, National Academy Press, Washington, DC.
- Qian, H., E. T. Kornegay i D. M. Denbow.** 1996. Phosphorus equivalence of microbial phytase in turkey diets as influenced by calcium to phosphorus ratios and phosphorus levels. *Poult. Sci* 75, 69-81.

- Qian, H, E. T. Kornegay i D. M. Denbow.** 1997. Utilization of phytate phosphorus and calcium as influenced by microbial phytase, cholecalciferol, and the calcium:total phosphorus ratio in broiler diets. *Poult. Sci.* 76, 37-46.
- Ravindran, V.** 1999. Protein and energy effects of microbial phytase in poultry diets. Pages 1-21 in *Proceedings of BASF Technical Symposium, Atlanta, GE.*
- Ravindran, V., W. L. Bryden i E. T. Kornegay.** 1995. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Biol. Rev.* 6(2), 125-143.
- Ravindran, V., P.H. Selle i W.L. Bryden.** 1999. Effects of phytase supplementation, individually ad in combination, with glycanase, on the nutritive value of wheat and barley. *Poult. Sci.* 78, 1588-1595.
- Ravindran, V., S. Cabahug, G. Ravindran, P. H. Selle i W. L. Bryden.** 2000. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate levels. II. Effects on apparent metabolism energy, nutrient digestibility and nutrient retention. *Brit. Poultry Sci.* 41, 193-200.
- Roberson, K. D. i H. M. Edwards Jr.** 1994. Effects of 1,25-dihydroxicholecalciferol and phytase on zinc utilization in broiler diets. *Poult. Sci* 73, 1312-1326.
- Salobir, J.** 1998. Effect of xylanase alone and in combination with α -glucanase on energy utilisation, nutrient utilisation and intestinal viscosity of broilers fed diets based on two wheat samples. *Arch. Geflugelkd.* 5, 209-213.
- Schöner, F. J., P. P. Hoppe i G. Swarchz.** 1991. Comparative effects of microbial phytase and inorganic phosphorus as performance and retentions of phosphorus, calcium and crude ash in broilers. *J. Anim. Physiol. An. N.* 66,248.
- Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague.** 1996a. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and utilization of dietary calcium, phosphorus, copper, and zinc in broiler chicken fed corn-soybean diets. *Poult. Sci* 75, 729-736.

- Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez i P. C. Lague.** 1996b. Efficacy of supplemental phytase at different calcium levels on growth performance and mineral utilization of broiler chicks. *Poult. Sci.* 75, 1516-1523.
- Simons, P. C. H., H. A. J. Versteegh, A. W. Jongbloed, P. A. Kemme, P. Slump, K. A. Bos, M. G. E. Wolters, R. F. Beudeker i G. J. Verschoor.** 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broiler and pigs. *Brit. J. Nutr.* 64, 525-540.
- Steenfeldt, S., M. Hammershøj, A. Müllertz i J. Fris Jensen.** 1998a. Enzyme supplementation of wheat-based diets for broilers. 2. Effect on apparent metabolisable energy content and nutrient digestibility. *Anim. Feed Sci. Technol.* 75, 45-64.
- Steenfeldt, S., A. Mullertz i J. Fris Jensen.** 1998b. Enzyme supplementation of wheat-based diets for broilers. 1. Effects on growth performance and intestinal viscosity. *Anim. Feed Sci. Technol.* 75, 27-43.
- Viveros, A., A. Brenes, M. Pizarro i M. Castaño.** 1994. Effect of enzyme supplementation of a diet based on barley, and autoclave treatment, on apparent digestibility, growth performance and gut morphology of broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 237-251.
- Yi, Z., E. T. Kornegay i D. M. Denbow.** 1996. Supplemental microbial phytase improves zinc utilization in broilers. *Poult. Sci.* 75, 540-546.
- Zanella, I., N. K. Sakomura, F. G. Silversides, A. Figueiredo i M. Pack.** 1999. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. *Poult. Sci.* 78, 561-568.
- Zanini, S. F. i M. H. Sazzad.** 1999. Effects of microbial phytase on growth and mineral utilisation in broilers fed on maize soyabean-based diets. *Brit. Poultry Sci.* 40, 348-352.
- Zyla, K., D. Gogol, J. Koreleski, S. Swiatkiewicz i D. R. Ledoux.** 1999. Simultaneous application of phytase and xylanase to broilers feeds based on wheat: feeding experiment with growing broilers. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1841-1848.

**DETERMINACIÓ DELS FOSFATS D'INOSITOL MITJANÇANT
ESPECTROSCÒPIA DE RESONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR DE P³¹.
RETENCIÓ DE FITAT EN EL TRACTE GASTROINTESTINAL DE
BROILERS**

9.1. Introducció

El fitat (1,2,3,4,5,6-hexakisfosfat de mio-inositol) és l'anàleg superior d'una àmplia sèrie de fosfats d'inositol que es troben en la natura (Oberleas, 1971), especialment en llavors de plantes i en algunes arrels i tubercles. Degut a la seva forta càrrega quelant, el fitat actua com a transportador o lloc d'emmagatzematge per a minerals traça i fosfats durant el creixement de la planta (Reddy i col., 1989). El fosfat esdevé disponible durant la germinació per la hidròlisi catalitzada per l'enzim fitasa que també es troba present en la llavor. Alguns processos com la cocció, la fermentació i la germinació poden facilitar la hidròlisi del fitat (O'Neill i col., 1980).

Common (1940) va descriure un mètode per a l'anàlisi del fòsfor fític, essent un dels més utilitzats en els setanta i vuitanta. Aquest mètode comprèn una extracció àcida seguida d'una precipitació àcida per un complex de ferro a pH baix. Un dels desavantatges dels mètodes amb precipitació de ferro és que no només el fític precipita, ja que també poden precipitar altres compostos que continguin fòsfor (Sandberg i Ahderinne, 1986). de Boland i col. (1975) van trobar que els fosfats d'inositol, des del di- fins a l'hexa-, formen complexos insolubles de ferro. No obstant, els mono-, di- i trifosfats eren solubles de manera bastant apreciable i no precipitaven quantitativament.

Per això, alguns autors han utilitzat altres tècniques per a la determinació de fitat, com per exemple els de cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) (Graf i Dintzis, 1982, Sandberg i Ahderinne, 1986; Lehrfeld, 1989). La cromatografia pot presentar problemes en la identificació dels fosfats d'inositol i el fòsfor no fític en el mateix cromatograma.

Una tècnica que està sent utilitzada en els darrers anys és la ressonància magnètica nuclear de l'isòtop P^{31} (RMN P^{31}) (O'Neill i col., 1980; Ersöz i col., 1990). Aquesta tècnica té com a principal avantatge que no necessita estàndards molt cars (Kempe i col., 1999) i que permet estudiar el fòsfor orgànic, podent-se fer anàlisis quantitatives i comparatives de diverses formes de fòsfor (Cade-Menun i col., 2002).

L'objectiu d'aquest estudi va ser confirmar la determinació de fosfats d'inositol segons antecedents trobats en la bibliografia, per després aplicar-la en les mostres de pinsos i continguts obtingudes

dels assaigs efectuats, ja que un dels objectius principals del segon assaig fou analitzar l'evolució dels fosfats d'inositol en quatre trams diferents del tub digestiu.

9.2. Material i mètodes

9.2.1 Materials

L'àcid 2-aminoetilfosfònic es va obtenir de Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). L'aigua deuterada es va obtenir del Servei de Recursos Científics de la Universitat Rovira i Virgili (Tarragona). L'aigua ultrapura es va preparar utilitzant un sistema d'osmosi inversa MilliQ, obtenint aigua amb resistència específica de 9 M Ω cm o superior i una conductivitat específica de 91 μ S o inferior. Es van emprar dues classes de fitases, Natuphos i SP1002, les quals estan descrites en els assaigs anteriors.

9.2.2 Preparació de les mostres

Les mostres es van preparar segons el mètode descrit per Kemme i col. (1999), exceptuant algunes petites modificacions. 3.0 g de mostres de pinsos i continguts intestinals liofilitzats i mòlts es van extreure en 15.0 ml d'HCl 0.75M durant 2h a temperatura ambient, sota agitació. Els extractes es van centrifugar i es van agafar 3.0 ml del sobrenadant per escalfar-los durant 15 minuts a 100°C, sota agitació. Després de deixar refredar, les solucions se centrifugaren. Posteriorment, es van afegir 4.0 ml d'àcid etilendiaminatetraacètic (EDTA, 30 mg/ml) a 2.0 ml del sobrenadant. El pH de la solució es va ajustar a 6.0, utilitzant NaOH 2 M, i llavors es liofilitzà. Les mostres liofilitzades es van dissoldre en 5.0 ml d'aigua bidestil lada, es filtraren (0.45 μ m) i el pH s'ajustà a 12.6 utilitzant la mateixa solució de NaOH. Finalment, les mostres es van tornar a liofilitzar.

9.2.3 Anàlisi de les mostres

Els espectres de RMN de P³¹ desacoblat de H¹ es van enregistrar a 121.47 MHz K en un aparell Varian Gemini 2000 300MHz utilitzant tubs de 10 mm per a totes les mostres. Les condicions de l'espectròmetre van ser: 8 segons de temps de relaxació; 19 microsegons de pols de 90° pel P³¹; 32

“scans” (repeticions de la inducció per cada experiment). Les dades del RMN es van processar mitjançant multiplicació exponencial (2 Hz d'amplada de línia). Els desplaçaments químics per l'espectre de P^{31} es van mesurar en parts per milió (ppm) en un camp descendent, usant H_3PO_4 com a referència externa. L'àcid 2-aminoetilfosfònic (15 mg/ml) es va emprar com a referència interna per la quantificació dels senyals de P^{31} .

El contingut de fòsfor total dels pinsos també es determinà colorimètricament pel mètode de molibdo-vanadat (codi 965.17 AOAC, 1990). Les concentracions dels diferents fosfats d'inositol no van ser analitzats per altres mètodes.

9.2.4 Origen de les mostres de pinsos i continguts intestinals

Els pinsos i els continguts del tub digestiu emprats en aquestes proves són els que s'han utilitzat en els assaigs descrits en aquesta memòria, indicats segons l'ordre establert. Només es va utilitzar una rèplica de cada mostra, degut a la poca quantitat de mostra que es tenia, ajuntant-se els continguts de tots els animal en una sola rèplica.

9.2.5 Càlculs

Els resultats obtinguts en els assaigs dels fosfats d'inositol determinats per RMN de P^{31} , estan expressats com a percentatge de fòsfor i calculats segons les respectives relacions molars, de la següent manera:

$$\% X = \frac{\text{\AA}rea \text{ pic } X \times \text{Pes patró (mg)} \times 100}{\text{\AA}rea \text{ pic patró} \times \text{Pes mostra (g)} \times 1000}$$

En el cas dels pinsos, la suma dels concentracions de fòsfor, procedent dels fosfats d'inositol i el fòsfor no fític, es va relacionar amb el contingut de fòsfor total mesurat colorimètricament. Aquesta relació es considera una estimació de la recuperació de P total. No es determinà la recuperació de l'hexafosfat d'inositol ja que el mètode colorimètric emprat en l'anàlisi (Haug i Lantzschi, 1983) presentà dificultats en la determinació d'algunes mostres.

$$\% \text{ Recuperació} = \frac{(\text{compostos amb f \AA sfor}) \times 100}{[\text{F\AA sfor total}]_{\text{colorim\AA tric}}}$$

9.3. Resultats i Discussió

La identificació dels diferents pics observats en els espectres es va fer per comparació a la informació obtinguda de Kemme i col. (1999). El pic corresponent al patró apareix a un desplaçament químic de quasi 17 ppm. Fixant aquest pic ja quedaran fixats els següents. La determinació de RMN de P^{31} presenta un avantatge respecte a la de H^1 . En aquesta última, cada protó té un pic característic i influenciat pel seu entorn. Així, la forma del pic serà diferent en cas d'haver-hi un o varis protons equivalents propers, formant doblets, triplets, o més pics. En el cas del P^{31} , cada pic representa una classe de fòsfor, malgrat que un tipus de fòsfor pugui presentar més d'un pic.

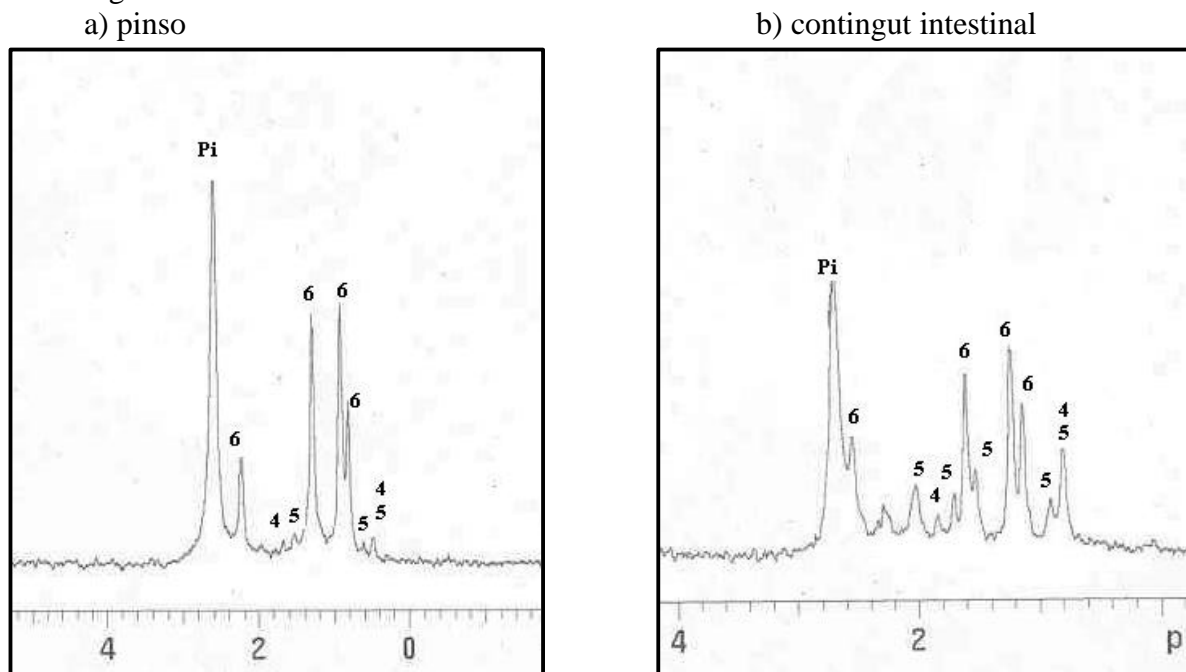
El fòsfor no fític va donar el pic amb el desplaçament més gran, amb un valor d'aproximadament 6.0 ppm. L'IP₆ presenta quatre pics característics i d'una àrea important a 5.7, 4.5, 4.0 i 3.7 ppm de desplaçaments químics. L'IP₅ mostra una major quantitat de pics, però d'àrea molt inferiors, a 5.0, 4.6, 4.4, 3.5 i 3.3 ppm. Aquest últim pic se solapa amb un corresponent a l'IP₄, que també presenta un pic a 4.7. En la determinació realitzada en pinsos es veieren clarament els pics corresponents al fosfat no fític, i als dos fosfats d'inositol més grans, mentre que la resta es poden intuir, però sense diferenciar-se molt de la línia base. En els espectres corresponents als continguts s'obtingueren pics corresponents al tetrafosfat d'inositol i en menor quantitat algun pic que podria ser del trifosfat, tot i que només va ser en alguna mostra. Aquesta trobada d'una quantitat limitada de fosfats d'inositol més baixos està d'acord amb les dades trobades per Sandberg i Ahderinne (1986) i Skoglund i col (1997) en estudis en humans i Schlemmer i col. (1997) i Skoglund i col. (1997b) en estudis amb porcs i broilers. Kemme i col. (1999) tampoc van observar presència de IP₃, IP₂ i IP₁ en continguts digestius ileals de porcs. La no presència d'aquests fosfats d'inositol més baixos podria ser deguda a una manca d'aquests compostos en la digesta. Una altra explicació proposada pels autors es la que la fitasa d'*Aspergillus niger* (emprada també en el nostre cas) no seria capaç de trencar l'IP₁ mentre no hagués una acumulació d'aquesta espècie. Una conclusió a la que es pot arribar és que la no formació dels fosfats d'inositol més baixos (mono-, di- i tri-) és perquè es necessita un temps major

per a arribar-se a ells mitjançant la hidròlisi dels fosfats més grans, i el temps de residència del contingut en el tracte gastrointestinal dels pollastres no és suficient.

Les anàlisis es van realitzar a pH 12.6, ja que els fosfats d'inositol són estables a aquestes condicions. Amb altres condicions de pH, poden presentar-se problemes de desplaçament per ressonàncies. L'EDTA, en incloure's abans del primer ajustament de pH, no té cap efecte sobre l'equilibri àcid-base, actuant com a agent quelant dels cations, competint amb el fitat, permetent uns senyals amb una millor resolució en el RMN (O'Neill, 1980).

En la Figura 9.1 a) es pot observar un espectre corresponent a una mostra de pinso. Pels pinsos la quantitat de mostra pesada i posada en cada tub era entre 0.10 i 0.12 g, ja que es va veure que era l'òptima per obtenir bons espectres, i es va posar uns 0.10 ml de solució de patró intern de tal manera que al final hi hagués entre 0.75 i 0.80 mg de P, excepte en el quart assaig, en què el pes de fòsfor va ser propera als 0.4 mg, ja que la solució de patró era el doble de concentrada.

Figura 9.1. Espectres obtinguts en l'anàlisi per RMN de P^{31} desacoblat de H^1 . a) pinso; b) contingut del tub digestiu.



En la Figura 9.1 b) es pot observar un espectre de continguts del tub digestiu d'una mostra. Pels continguts la quantitat de mostra pesada era inferior a la dels pinsos, pesant-se entre 0.6 i 0.9,

segons els assaigs, i la quantitat de mostra disponible. La diferència principal respecte als pinsos es troba en la quantitat posada de patró, ja que el pes final obtingut es trobava entre els 0.36 i 0.39 mg de P, excepte en el quart assaig en què els valors es trobaven entre 0.4 i 0.5 mg de P. La principal raó de la diferència de pes del fòsfor del patró va ser deguda a l'ús de diferents concentracions de la solució de patró. Es va fer així per facilitar l'espectre, ja que d'aquesta manera el pic corresponent al patró i als pics de les mostres analitzades sortien en proporcions adequades per poder calcular les concentracions dels diferents fosfats.

Des de la Taula 9.1 fins a la Taula 9.5 es presenten els resultats de les concentracions dels compostos fosfats d'inositol dels pinsos i dels continguts intestinals corresponent a cada assaig, amb la correspondència del nombre de taula amb l'assaig. La Taula 9.2 s'ha dividit en 3 parts, podent-se trobar en la Taula 9.2a els valors corresponents als pinsos, en la Taula 9.2b els valors dels continguts del pap i del pedrer, i en la Taula 9.2c els valors dels continguts ileals i de la cloaca. Els valors de les Taules 2b i 2c són els que s'han utilitzat per avaluar l'evolució del fitat en el tracte gastrointestinal dels pollastres.

Referent als resultats, primer de tot s'ha de comentar que les diferències entre tractaments no s'han pogut analitzar estadísticament, degut a que només es tenia una rèplica per a cada mostra. Per tant, els resultats que es presenten s'han de considerar com a tendències, però a més s'ha de tenir en compte que aquesta tècnica té com a principal inconvenient una relativa baixa sensibilitat (Kempe i col., 1999), el que fa que potser si s'haguessin pogut fer més rèpliques, s'haurien pogut observar comportaments diferenciats en els diferents assaigs.

Pinsos. Observant els valors de recuperació de P total obtinguts en els diferents assaigs, es pot comprovar com en l'assaig 1 estan per sobre de 100% però no massa superiors, i en l'assaig 2 estan la majoria per sota, arribant-se fins al cas del T-2 amb una recuperació del 51%. En la resta d'assaigs, els valors es troben bastant per damunt de 100%, ja que si es calcula la mitjana per a cada assaig, aquestes donen 112, 136 i 123 pels assaigs 3, 4 i 5, respectivament. Destacar que en el quart assaig s'obtingué un 218% de recuperació pel T-2.

Malgrat això, s'ha observat que la concentració de fòsfor no fític en tots els pinsos analitzats manté una correlació amb els valors teòrics. És a dir, en aquells assaigs en què la dieta control positiu té un 0.45% de fòsfor no fític i les altres dietes tenen 0.27% FNF, els resultats extrets de RMN també les mantenen, encara que numèricament hagin diferències. Per exemple, en les dietes de moresc de l'assaig 1 el valor teòric per a T-1 és 0.45% i l'experimental és 0.37%, mentre que per a T-2 i T-3 els analitzats són 0.20 i 0.21%, respectivament, quan el valor teòric fou 0.27%.

La determinació dels fosfats d'inositol ha demostrat que la majoria de fòsfor fític present en el pinso es troba en forma de IP₆, havent-se trobat una quantitat molt baixa de IP₅, igual o inferior al 0.05% en bona part de les mostres, excepte en les corresponents al quart assaig en què els valors es troben entre 0.08 i 0.10%. En tot cas, no es detectà presència de fosfats més baixos en les mostres de pinso analitzades. En tots les anàlisis realitzades, es veu que la quantitat de IP₆ es manté constant en totes les mostres, mentre que el que és més variable és el fòsfor no fític, depenent de la concentració afegit.

Les variacions en les recuperacions de fòsfor total, amb valors superiors al 100%, poden ser explicats en l'error del mètode, o en la desviació possible de resultats. Kemme i col. (1999) comenten que l'error fet en l'estimació seria del 5% en els compostos més concentrats (IP₆ i fòsfor no fític) i del 10% (generalment pel IP₅ i IP₄).

Continguts intestinals (assaigs 1, 3, 4 i 5). En les dietes de moresc de l'assaig 1 es pot comprovar perfectament com ha actuat l'enzim fitasa (Taula 9.1). Així en afegir l'enzim en la dieta deficient de fòsfor es produeix una reducció en la quantitat de fòsfor total, degut principalment per la reducció en la quantitat de IP₆ (0.46% en T-2 i 0.20% en T-3). En aquest mateix assaig, les dietes de blat presenten un comportament diferent. La reducció de fòsfor total ja es produeix en reduir el fòsfor no fític de la dieta, tot i així la quantitat de fòsfor total dels continguts dels animals alimentats amb fitasa exògena es manté dins d'uns mateixos valors 0.45-0.50%, observant-se lleugers increments en les concentracions tant de IP₅ com dels fosfats amb menor nombre de fòsfor. Tal com ja s'ha vist anteriorment en el capítol dedicat a l'assaig 1, podem parlar d'una influència important de la fitasa

endògena del blat, superior a la del morenc. Finalment, es pot dir que no hi ha efecte de la dosi sobre el fòsfor total present en els diferents tractaments de blat. Les dietes amb 200, 400 i 600 U de fitasa/kg tingueren concentracions molt similars, que ens permeten pensar que no hi hauria millores significatives.

Els continguts intestinals dels animals emprats en l'assaig 3 (Taula 9.3) presentaren concentracions elevades de IP₆, tenint una mínima quantitat de fòsfor no fític, amb valors des de 0.02 a 0.13%. Hem de considerar diferent el T-6, doncs encara que tingui fitasa exògena en la dieta, els valors tan inferiors obtinguts dels diferents compostos fosfats han de ser deguts a problemes en la preparació de la mostra. Sembla observar-se una tendència a funcionar millor la fitasa en les dietes amb un 10% de segó, ja que tenen els valors més baixos de fòsfor total, directament relacionat amb una menor concentració de fòsfor no fític, encara que haurien de ser tots iguals d'acord amb els valors dels pinsos, ja que les concentracions dels fosfats d'inositol es mantenen iguals. Observant amb deteniment les concentracions de IP₆, es pot veure com la fitasa exògena a la dieta ha actuat disminuint-lo, amb quantitats menors per les dietes amb fitasa (T-4, T-6 i T-8) respecte les dietes sense fitasa (T-1, T-5 i T-7, respectivament). Excepte en els casos de les dietes sense segó, aquesta disminució de l'hexafosfat d'inositol repercuteix en una disminució en la concentració de fòsfor total.

Amb la primera observació a les dades de les anàlisis dels continguts intestinals de l'assaig 4 (Taula 9.4), es pot destacar la bona actuació de la dosi més gran de fitasa exògena (5000 U de fitasa per quilo de pinso) tant si el blat estava passat per autoclau com no. La reducció es basa en uns valors molt baixos de IP₆ (0.12 i 0.10% per T-4 i T-8, respectivament). Gràcies aquests resultats, es pot pensar que en les dietes de blat es pot augmentar més la dosi per tal de disminuir la presència de fòsfor en el contingut i en les excretes. En les dietes amb blat no tractat, pot veure's la disminució en la concentració de P total a mida que reduïm el nivell de fòsfor no fític de la dieta primer, i per l'addició de fitasa microbiana després.

En les dietes amb blat autoclavat, tot i trobar una tendència similar es pot dir que les dietes deficient de fòsfor sense i amb 500 U de fitasa/kg tenen la mateixa quantitat de fòsfor total. En tot cas, es pot contemplar que en totes les dietes deficientes de fòsfor la concentració de IP₆ és menor que les dietes amb una concentració recomanada de fòsfor, i sembla intuir-se una pujada en la concentracions dels fosfats més baixos.

Les concentracions obtingudes en els continguts ileals en l'assaig 5 (Taula 9.5) estan força relacionades amb el cereal inclòs en la formulació de les dietes, sent molt variables depenent si es tracta del morenc, el blat o l'ordi. Pot ser que pel fet que els valors de fòsfor no fític utilitzats en la formulació dels pinsos estigui extret de taules, i no per anàlisi de les mostres. Recordar que el fòsfor no fític varia entre els diferents cereals, però que també pot variar segons la varietat del cereal o l'any de collita (Ravindran, i col., 1995). En el cas de les dietes de morenc es trobà menys fòsfor total en les dietes que tenien fitasa microbiana exògena, essent la dieta amb els dos enzims alhora la de menor concentració. La disminució en el fòsfor total es deu a la reducció en la concentració de l'IP₆, ja que en els quatre casos les concentracions de la resta de fosfats és manté constant. En aquests resultats sembla confirmar-se la interacció positiva que s'havia trobat en la retenció de fòsfor total, i que es descriu en el capítol corresponent.

En tot l'assaig 5, les dades de productivitat i de retenció de minerals de les dietes de blat diferiren de les obtingudes en la resta de les dietes. També es pot notar aquesta tendència en els resultats aquí mostrats. La presència dels dos enzims afegits a la dieta fa que la concentració de fòsfor total sigui molt alta (1.0%), igual que la de la dieta que només té xilanasa, mentre que la dieta amb fitasa exògena té el valor més baix (0.81%). Es corrobora que sembla haver una interacció negativa, com la que es pot trobar en la retenció total de fòsfor total analitzada en el capítol anterior. L'aplicació de l'enzim fitasa sol produeix una reducció interessant en la quantitat de IP₆, passant de 0.57 a 0.39%.

Els valors de P total dels continguts d'animals alimentats amb dietes d'ordi foren molt propers. Les dietes d'ordi sense cap enzim presentaren la menor quantitat de fòsfor total de totes les quatre

dietes. La dieta amb només fitasa té menys IP_6 , però el fòsfor no fític és una mica superior. La dieta amb β -glucanasa és la que té més IP_6 i IP_5 i una quantitat important de fosfats més baixos. La dieta amb els dos enzims va tenir una major presència de fosfats més baixos i una presència quasi nul la de fòsfor no fític. En tot cas, i provocat per la manca de rèpliques i si assumim l'error del mètode, especialment en el moment de la quantificació, amb tota seguretat es pot considerar que la única dieta diferent a les altres és la dieta amb la β -glucanasa. És de remarcar que la dieta amb els dos enzims aplicats alhora és la que presenta una menor concentració de fòsfor no fític i una major dels inositols més baixos, que ens pot fer pensar en una interacció positiva de la fitasa i la β -glucanasa, reforçant l'acció enzimàtica de la fitasa sobre el fòsfor.

Evolució del fitat en els continguts de les diferents seccions del tracte gastrointestinal (Assaig 2).

En la Figura 9.2 hi ha representat la progressió de la concentració dels diferents compostos fosfats (eix Y) per les seccions del tracte gastrointestinal (eix X), representant cada línia un tractament diferent. Les seccions del tracte (pap, pedrer, intestí prim i cloaca) van ser escollides perquè són les més representatives i en les que l'enzim fitasa pot tenir més influència, i basant-se en l'estudi de Sooncharernying i Edwards (1993), que van realitzar l'estudi de la retenció del fitat (IP_6), essent determinat per HPLC.

En el nostre estudi, s'observà una disminució del fòsfor no fític entre el pap i el pedrer, excepte en el cas del T-1 que donà un valor de 0.01% de P no fític en el pap i 0.11% en el pedrer. La composició del contingut en el pap i la del pinso no hauria de ser molt diferent, doncs els pollastres amb el bec només agafen el menjar, i que era en forma de farina. L'observació dels valors de les concentracions en el pinso i en el pap (Taules 2a i 2b, respectivament) ens pot permetre observar que no és així, havent-hi variacions importants en les concentracions, com per exemple pel T-4 amb 0.76% de P no fític en el pap i només 0.33% en el pinso. En el pas del pedrer a l'intestí prim es pot notar com quan les concentracions eren més elevades en el pedrer disminuïen en el l'intestí, i a l'inrevés. Tanmateix, la concentracions de fòsfor no fític en l'intestí és igual en tots els tractaments. En el darrer tram, els valors de les dietes amb nivells recomanats de fòsfor (T-1 i T-4) són les que

presenten major quantitat de fòsfor no fític. Aquest augment, que és generalitzat per tot els tractaments, pot deure's a la digestió del fitat per les fitases endògenes del pollastre en la darrera part de l'intestí. En produir-se al final de l'intestí, aquest fòsfor no fític no podria ser aprofitat i seria excretat per l'animal.

La concentració de IP₆ en tots els tractaments roman gairebé constant en el tram entre el pap i el pedrer, encara que la corresponent a T-2 augmenta des de 0.04 a 0.16%. Es produeix un augment en la concentració en avançar en el tracte, a partir del pedrer, amb increments en la majoria dels casos, assolint el valor màxim en la cloaca, excepte pel T-5 en què el valor màxim s'esdevé en l'intestí. En la cloaca, els valors més grans de IP₆ s'obtingueren en el cas de les dues dietes amb nivells recomanats de 0.45% de FNF, i el valor més baix pel cas de la dieta deficient de fòsfor amb ordi passat per l'autoclau i amb 500 U de fitasa microbiana/kg. Una possible explicació de la més baixa concentració de IP₆ en el pap i el pedrer que en les altres seccions la donen Sooncharernying i Edwards (1993), en un estudi amb pollastres que menjaren dietes de moresc i soja. Aquests autors indiquen que la soja (que té un elevat nivell de IP₆) seria expulsada constantment i regular del pap i el pedrer, mentre que el moresc (baix nivell de IP₆) encara hi romandria més temps. En el nostre estudi pot passar una cosa similar, ja que l'ordi encara que tingui una activitat fitàsica major, té menys fòsfor fític que el moresc (0.17% l'ordi i 0.19% el moresc, Eeckhout i De Paepe, 1994), però aquesta afirmació cal estudiar-la mes concretament en posteriors assaigs.

La tendència general en la concentració de IP₅ és la de disminuir en passar del pap al pedrer, per després augmentar a l'intestí, i finalment mantenir-se amb una concentració quasi bé igual a la cloaca. Donat que en la cloaca els valors es mouen dins un marge d'entre 0.04 i 0.08%, es pot dir que no hi haurien diferències entre els diferents tractaments. L'interval de les concentracions no és molt gran per la qual cosa, qualsevol petita errada en la quantificació o en la preparació de la mostra podria fer canviar bastant tant en sentit negatiu com en positiu els valors. A simple vista, un exemple podria ser el valor de T-6. Mirant bé les dades de la Taula 9.2, es pot observar com la concentració de IP₆ i dels fosfats més baixos en el pedrer és més baixa que les altres. Cal tenir

present que el T-6 és una dieta deficient i amb presència de fitasa microbiana, i per tant, es pot creure que la fitasa ha actuat com era d'esperar. En aquest cas, seria una mica més lògic pensar que aquest valor seria producte d'alguna imprecisió en l'anàlisi.

Les dades referents a la concentració de fosfats menors que el pentafofat són molt dispars, no observant-se cap comportament generalitzat. Un motiu pot ser que en l'espectre aquests pics no presentaven una molt bona resolució, i per tant, no era fàcil realitzar-ne la quantificació. Per això és comprensible observar comportaments com el del T-4 que és molt alt en el pap, sofreix una gran reducció en el pedrer i finalment ser molt gran en la cloaca. Vist que en els pinsos la quantitat d'aquest tipus de fosfats era nul la, seria d'esperar que a mesura que la bola digestiva passa pel tracte la concentració anés augmentant, ja sigui per l'acció de la fitasa microbiana o per l'endògena de la dieta o de l'animal. En la majoria dels tractaments, la concentració es redueix del pap al pedrer, torna a augmentar una mica del pedrer a l'intestí, havent la més gran variació en el pas de l'intestí a la cloaca.

Finalment, la concentració de fòsfor total reflecteix una mica tot el descrit anteriorment, assumint que es tracta del sumatori de la concentració de tots els compostos fosfats. Així, la tendència general és reduir-se entre el pap i el pedrer (amb dos casos particulars: T-4, que passa de 1.18% a 0.22%, i T-1, que augmenta des de 0.24 fins a 0.31%). Del pedrer a l'intestí la tendència és d'augmentar o mantenir-se igual, per posteriorment augmentar una mica més en la cloaca. Els valors obtinguts en la cloaca, no haurien de ser molts diferents dels obtinguts en l'excreta. En aquest estudi no s'ha realitzat aquesta determinació, que podria quedar per a estudis posteriors. Dels resultats obtinguts en la cloaca, es pot derivar que la concentració menor correspon a les dietes deficient de fòsfor amb o sense enzim incorporat a la dieta, mentre que les dues dietes amb nivell recomanat de fòsfor no fític presenten major quantitat de fòsfor total, tal com passa en el cas de les excretes, i es pot observar en les dades mostrades en els capítols corresponent a cada assaig.

Tal com descriuen Sooncharernying i Edwards (1993), el mètode de l'ús de marcador, en el seu cas l'òxid cròmic, no és massa de confiança per avaluar la retenció de l'IP₆, segurament per la

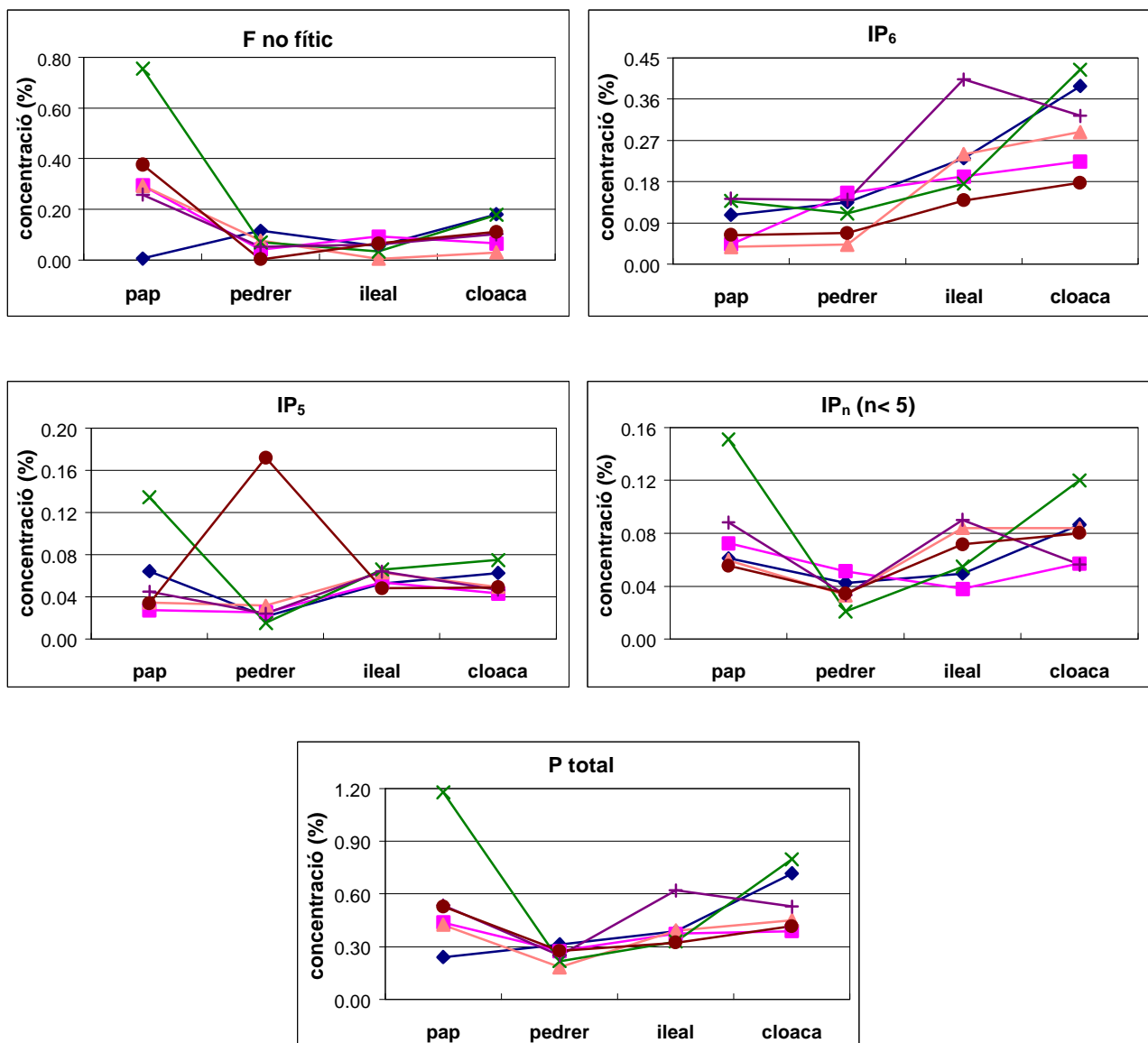
diferència de velocitat de trànsit, tot i que si que podria ser-ho per estudis de digestibilitat d'altres nutrients. Caldria comprovar si amb les dades obtingues en la determinació per RMN dels fosfats d'inositol poden aconseguir-se resultats fiables de retenció aparent. En els assaigs realitzats en aquesta memòria, les dietes contenien diòxid de titani com a marcador, que té una velocitat de trànsit diferent a l'òxid cròmic. S'ha realitzat el càlcul de les retencions aparents de fòsfor total, fòsfor no fític i de l'hexafosfat d'inositol en els assaigs 2, 3 i 4, resultats que es mostren en les Taules 9.6, 9.7 i 9.8, respectivament. Els resultats obtinguts són aproximacions dels que poden realment ser, ja que, tal com es descriu anteriorment, no es van poder analitzar estadísticament les diferències entre tractaments perquè no hi ha rèpliques, essent cada tractament un pool de tots els lots, i perquè els valors de diòxid de titani dels continguts ileals utilitzats en cada cas és la mitjana dels valors analitzats del diòxid de cada lot. Es pot veure com la fitasa microbiana afegida millora els valors de les retencions de fòsfor total, gràcies, en bona part, a l'increment en la retenció de IP₆, ja que els resultats són anàlegs. En l'assaig 2 (Taula 9.6), pot veure's com la fitasa microbiana augmenta la retenció de fòsfor total i de IP₆ tant en les dietes d'ordi no tractat o passat per l'autoclau, igual que en l'assaig 4, en què, en dietes de blat sense tractar, l'addició de 5000 U de fitasa/kg s'obté el millor valor de la retenció de fòsfor total i de IP₆, mentre que en les dietes de blat passat per l'autoclau no es veieren modificades. En l'assaig 3, i desglossant els resultats segons el nivell de inclusió de segó en la dieta de morenc-soja, la presència de fitasa microbiana millorà les retencions de fòsfor total i IP₆, essent els increments superiors en el cas de l'IP₆; per la retenció de fòsfor total, els augments més grans s'obtingueren pels nivells de 5 i 10%.

Segons els resultats que es desprenen d'aquest treball, i que són similars a altres trobats en la bibliografia (Kempe i col., 1999), pot dir-se que la ressonància magnètica nuclear de P³¹ és una bona tècnica per quantificar els fosfats d'inositol, tenint present que en la mateixa mesura també es pot determinar el fòsfor no fític concurrent en la mostra. Totes les mesures es realitzen amb una bona precisió, i la resolució en l'espectre vindrà determinat en gran part per la preparació de la mostra més que no pas per problemes metodològics amb l'espectròmetre.

La tècnica ha permès observar la hidròlisi progressiva en el tracte de l'IP₆ a fosfats d'inositol més baixos (malgrat no s'hagin trobat fosfats d'inositol inferiors a IP₄). S'han observat els efectes de la fitasa exògena, en el pedrer i en la cloaca, per contra no s'han vist efectes del tractament amb autoclau.

Figura 9.2. 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) IP₆; c) IP₅; d) IP_n (n<5); e) P total

T-1: ◆ T-2: ■ T-3: ▲ T-4: ✕ T-5: + T-6: ●



Taula 9.1. Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de P³¹ en pinsos i continguts intestinals de l'Assaig 1 i recuperació de fòsfor total en els pinsos.

TRT	cereal	% FNF	Fitasa afegida (U/kg)	PINSO					CONTINGUTS INTESTINALS					
				FNF (%)	IP ₆ (%)	IP ₅ (%)	P _{total} (%)	RMN colorimètric [*]	Recuperació P _{total} (%)	FNF (%)	IP ₆ (%)	IP ₅ (%)	IP _n (n<5) (%)	P _{total} (%)
T-1	morenc	0.45	-	0.37	0.26	0.03	0.66	0.68	96	0.02	0.49	0.09	0.08	0.68
T-2	morenc	0.27	-	0.20	0.28	0.03	0.51	0.49	104	0.07	0.46	0.10	0.09	0.72
T-3	morenc	0.27	500	0.21	0.29	0.02	0.52	0.49	107	0	0.20	0.06	0.08	0.34
T-4	blat	0.45	-	0.41	0.30	0.05	0.76	0.66	115	0.18	0.31	0.09	0.12	0.70
T-5	blat	0.27	-	0.14	0.24	0.05	0.43	0.49	88	0.01	0.30	0.06	0.05	0.41
T-6	blat	0.27	200	0.18	0.22	0.05	0.45	0.51	88	0	0.27	0.09	0.10	0.46
T-7	blat	0.27	400	0.19	0.30	0.04	0.52	0.47	111	0.01	0.28	0.10	0.13	0.51
T-8	blat	0.27	600	0.20	0.31	0.03	0.54	0.49	110	0.01	0.31	0.07	0.07	0.46

* Determinació realitzada colorimètricament pel mètode de molibdo-vanadat (codi 965.17 AOAC, 1990).

Taula 9.2a. Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de P³¹ i recuperació de fòsfor total en els pinsos de l'Assaig 2.

Trt	Ordi	% FNF	Fitasa afegida (U/kg)	FNF (%)	IP ₆ (%)	IP ₅ (%)	PINSO		Recuperació P total (%)
							RMN	P _{total} (%) colorimètric*	
T-1	No tractat	0.45	-	0.39	0.25	0	0.63	0.73	86
T-2	No tractat	0.27	-	0.10	0.13	0.02	0.25	0.49	51
T-3	No tractat	0.27	500	0.13	0.18	0.01	0.32	0.49	64
T-4	Autoclau	0.45	-	0.33	0.20	0.06	0.59	0.66	89
T-5	Autoclau	0.27	-	0.19	0.29	0.03	0.51	0.49	104
T-6	Autoclau	0.27	500	0.16	0.27	0	0.43	0.49	88

* Determinació realitzada colorimètricament pel mètode de molibdo-vanadat (codi 965.17 AOAC, 1990).

Taula 9.2b. Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de P³¹ en continguts de pap i pedrer de l'Assaig 2.

Trt	PAP					PEDRER				
	FNF (%)	IP ₆ (%)	IP ₅ (%)	IP _n (n<5) (%)	P _{total} (%)	FNF (%)	IP ₆ (%)	IP ₅ (%)	IP _n (n<5) (%)	P _{total} (%)
T-1	0.01	0.11	0.06	0.06	0.24	0.11	0.14	0.02	0.04	0.31
T-2	0.30	0.04	0.03	0.07	0.44	0.04	0.16	0.03	0.05	0.27
T-3	0.29	0.04	0.03	0.06	0.43	0.08	0.04	0.03	0.03	0.18
T-4	0.76	0.14	0.13	0.15	1.18	0.07	0.11	0.01	0.02	0.22
T-5	0.26	0.14	0.04	0.09	0.53	0.05	0.14	0.02	0.03	0.25
T-6	0.38	0.06	0.03	0.06	0.53	0	0.07	0.17	0.03	0.28

Taula 9.2c. Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de P³¹ en continguts ileal i cloaca de l'Assaig 2.

Trt	ILEAL					CLOACA				
	FNF (%)	IP ₆ (%)	IP ₅ (%)	IP _n (n<5) (%)	P _{total} (%)	FNF (%)	IP ₆ (%)	IP ₅ (%)	IP _n (n<5) (%)	P _{total} (%)
T-1	0.05	0.23	0.05	0.05	0.39	0.18	0.39	0.06	0.09	0.72
T-2	0.09	0.19	0.05	0.04	0.37	0.06	0.22	0.04	0.06	0.39
T-3	0	0.24	0.06	0.08	0.39	0.03	0.29	0.05	0.08	0.45
T-4	0.03	0.18	0.07	0.05	0.33	0.18	0.42	0.07	0.12	0.80
T-5	0.06	0.40	0.06	0.09	0.62	0.10	0.32	0.05	0.06	0.53
T-6	0.06	0.14	0.05	0.07	0.32	0.11	0.18	0.05	0.08	0.42

Taula 9.3. Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de P³¹ en pinsos i continguts intestinals de l'Assaig 3 i recuperació de fòsfor total en els pinsos.

TRT	segó	% FNF	Fitasa afegida (U/kg)	PINSO					CONTINGUTS INTESTINALS					
				FNF (%)	IP ₆ (%)	IP ₅ (%)	P total (%) RMN	P total (%) colorimètric*	Recuperació Pt (%)	FNF (%)	IP ₆ (%)	IP ₅ (%)	IP _n (n<5) (%)	P total (%)
T-1	0%	0.27	-	0.23	0.25	0.05	0.53	0.48	110	0.02	0.52	0.09	0.09	0.71
T-2	5% NT	0.27	-	0.26	0.31	0.05	0.62	0.53	115	0.10	0.47	0.10	0.08	0.76
T-3	10% NT	0.27	-	0.25	0.27	0.07	0.59	0.48	122	0.09	0.41	0.12	0.08	0.70
T-4	0%	0.27	500	0.19	0.32	0.04	0.56	0.49	113	0.13	0.42	0.14	0.08	0.77
T-5	5% AU	0.27	-	0.22	0.29	0.04	0.59	0.48	116	0.07	0.44	0.11	0.11	0.73
T-6	5% AU	0.27	500	0.25	0.28	0.06	0.59	0.50	119	0.03	0.14	0.04	0.04	0.24
T-7	10% AU	0.27	-	0.18	0.26	0.04	0.49	0.50	96	0.07	0.45	0.09	0.08	0.69
T-8	10% AU	0.27	500	0.21	0.28	0.07	0.56	0.53	105	0.08	0.32	0.09	0.08	0.57

NT: no tractat; AU: autoclau

* Determinació realitzada colorimètricament pel mètode de molibdo-vanadat (codi 965.17 AOAC, 1990).

Taula 9.4. Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de P³¹ en pinsos i continguts intestinals de l' Assaig 4 i recuperació de fòsfor total en els pinsos.

TRT	blat	% FNF	Fitasa afegida (U/kg)	PINSO					CONTINGUTS INTESTINALS					
				FNF (%)	IP ₆ (%)	IP ₅ (%)	P total (%) RMN	Recuperació Pt (%) colorimètric*	FNF (%)	IP ₆ (%)	IP ₅ (%)	IP _n (n<5) (%)	P total (%)	
T-1	no tractat	0.45	-	0.42	0.50	0.10	1.08	0.62	171	0.15	0.41	0.05	0.02	0.63
T-2	no tractat	0.27	-	0.24	0.51	0.10	0.86	0.39	218	0.06	0.41	0.07	0.02	0.55
T-3	no tractat	0.27	500	0.16	0.33	0.07	0.57	0.44	127	0.06	0.29	0.05	0.01	0.41
T-4	no tractat	0.27	5000	0.16	0.30	0.08	0.56	0.44	126	0.07	0.12	0.06	0.03	0.28
T-5	autoclau	0.45	-	0.38	0.41	0.09	0.89	0.65	136	0.16	0.42	0.05	0.01	0.64
T-6	autoclau	0.27	-	0.15	0.26	0.07	0.49	0.44	110	0.02	0.33	0.03	0.02	0.40
T-7	autoclau	0.27	500	0.14	0.32	0.08	0.54	0.45	117	0.06	0.33	0.07	0.02	0.47
T-8	autoclau	0.27	5000	0.13	0.19	0.04	0.38	0.44	84	0.08	0.10	0.06	0.02	0.27

* Determinació realitzada colorimètricament pel mètode de molibdovanadat (codi 965.17 AOAC, 1990).

Taula 9.5. Composició de fosfats d'inositol i del fosfat no fític trobat amb RMN de P³¹ en pinsos i continguts intestinals de l'Assaig 5 i recuperació de fòsfor total en els pinsos.

TRT ¹	Fitasa cereal (U/kg)	Enzim carbohidrasa (ppm)	PINSO					CONTINGUTS INTESTINALS					
			FNF (%)	IP ₆ (%)	IP ₅ (%)	P total (%) RMN	Recuperació Pt (%)	FNF (%)	IP ₆ (%)	IP ₅ (%)	IP _n (n<5) (%)	P total (%)	
T-1	morenc	-	0.22	0.28	0.06	0.55	0.38	146	0.07	0.68	0.09	0.09	0.92
T-2	morenc	500	0.17	0.22	0.02	0.40	0.38	106	0.12	0.51	0.08	0.09	0.82
T-3	morenc	-	0.21	0.28	0.05	0.54	0.39	137	0.20	0.59	0.09	0.10	0.97
T-4	morenc	500	0.22	0.28	0.06	0.56	0.41	135	0.09	0.43	0.09	0.13	0.74
T-5	blat	-	0.24	0.27	0.04	0.55	0.47	117	0.13	0.57	0.10	0.10	0.90
T-6	blat	500	0.27	0.31	0.04	0.62	0.45	139	0.16	0.39	0.10	0.16	0.81
T-7	blat	-	0.24	0.27	0.04	0.55	0.41	134	0.10	0.71	0.08	0.10	0.99
T-8	blat	500	0.23	0.23	0.06	0.51	0.45	114	0.15	0.61	0.11	0.13	1.00
T-9	ordi	-	0.18	0.22	0.07	0.47	0.43	110	0.07	0.39	0.05	0.07	0.57
T-10	ordi	500	0.14	0.22	0.07	0.43	0.43	99	0.09	0.36	0.07	0.07	0.59
T-11	ordi	-	0.17	0.28	0.05	0.49	0.42	118	0.07	0.45	0.11	0.09	0.73
T-12	ordi	500	0.17	0.27	0.05	0.48	0.42	115	0.01	0.38	0.10	0.13	0.63

¹Tots els tractaments tenen 0.27% de FNF

* Determinació realitzada colorimètricament pel mètode de molibdo-vanadat (codi 965.17 AOAC, 1990).

Taula 9.6. Retenció aparent ileal de fòsfor total, fòsfor no fític i IP₆ dels animals emprats en l'assaig 2.

Trt	Ordi	Retenció aparent				
		% FNF	Fitasa afegida (U/kg)	P _{total} (%)	FNF (%)	IP ₆ (%)
T-1	No tractat	0.45	-	73	94	59
T-2	No tractat	0.27	-	39	62	42
T-3	No tractat	0.27	500	54	99	48
T-4	Autoclau	0.45	-	78	96	66
T-5	Autoclau	0.27	-	51	87	43
T-6	Autoclau	0.27	500	70	84	80

Taula 9.7. Retenció aparent ileal de fòsfor total, fòsfor no fític i IP₆ dels animals emprats en l'assaig 3.

Trt	Segó*	Retenció aparent				
		% FNF	Fitasa afegida (U/kg)	P _{total} (%)	FNF (%)	IP ₆ (%)
T-1	0%	0.27	-	57	98	31
T-2	5% NT	0.27	-	60	87	49
T-3	10% NT	0.27	-	69	90	58
T-4	0%	0.27	500	60	80	61
T-5	5% AU	0.27	-	62	90	55
T-6	5% AU	0.27	500	88	96	85
T-7	10% AU	0.27	-	53	87	40
T-8	10% AU	0.27	500	66	86	61

* NT: No tractat; AU: autoclau

Taula 9.8. Retenció aparent ileal de fòsfor total, fòsfor no fític i IP₆ dels animals emprats en l'assaig 4.

Trt	Blat	Retenció aparent				
		% FNF	Fitasa afegida (U/kg)	P _{total} (%)	FNF (%)	IP ₆ (%)
T-1	No tractat	0.45	-	82	90	75
T-2	No tractat	0.27	-	80	92	75
T-3	No tractat	0.27	500	78	89	74
T-4	No tractat	0.27	5000	86	87	89
T-5	Autoclau	0.45	-	80	88	71
T-6	Autoclau	0.27	-	78	97	66
T-7	Autoclau	0.27	500	76	89	72
T-8	Autoclau	0.27	5000	78	81	84

9.4. Referències bibliogràfiques

- Association of Official Analytical Chemists.** 1990. Official methods of analysis. 15th ed., Assoc. Anal. Chem., Washington D. C.
- de Boland, A. R., G. B. Garner i B. L. O'Dell.** 1975. Identification and properties of "phytate" in cereal grains and oilseed products. *J. Agric. Food Chem.* 23, 1186-1189.
- Cade-Menun, B. J., C. W. Liu, R. Nunlist i J. G. McColl.** 2002. Soil and litter phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy: extractants, metals, and phosphorus relaxation times. *J. Environ. Qual.* 31, 457-465.
- Common, R. H.** 1940. The phytic acid content of some poultry feeding stuffs. *The analyst.* 65, 767, 79-83.
- Eeckhout, W. i M. De Paepe.** 1994. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 47, 19-29.
- Ersöz, A., H. Akgün i N. K. Aras.** 1990. Determination of phytate in turkish diet by phosphorus-31 fourier transform nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 38, 733-735.
- Graf, E. i F. R. Dintzis.** 1982. High-performance liquid chromatographic method for the determination of phytate. *Anal. Biochem.* 199, 413-417.
- Kemme, P. A., A. Lommen, L. H. De Jonge, J. D. Van der Klis, A. W. Jongbloed, Z. Mroz i A. C. Beynen.** 1999. Quantification of inositol phosphates using ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy in animal nutrition. *J. Agric. Food Chem.* 47, 5116-5121.
- Lehrfeld, J.** 1989. High-performance liquid chromatography analysis of phytic acid on a pH-stable, macroporous polymer column. *Cereal Chem.* 66, 510.
- Oberleas, D.** 1971. The determination of phytate and inositol phosphates. *Methods Biochem. Anal.* 20, 87-101.
- O'Neill, I. K., M. Sargent i M. L. Trimble.** 1980. Determination of phytate in foods by phosphorus-31 Fourier transform nuclear magnetic resonance spectrometry. *Anal. Chem.* 52, 1288-1291.

- Reddy, N.K., M. D. Pierson, S.K. Sathe i D.K. Salunkhe.** 1989. Phytates in cereals and legumes. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Sandberg, A. S. i R. Ahderinne.** 1986. HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates in foods and intestinal contents. *J. Food Sci.* 51 (3), 547-550.
- Schlemmer, U, Kl. D. Jany, E. Schulz, C. Wecke i G. Rechkemmer.** 1997. Degradation of phytic acid during gastrointestinal passage in pigs and broilers. En: *Book of Abstracts of Bioavailability'97*. Wageningen, Holanda. pp.123.
- Skoglund, E., N. G. Carlsson i A. S. Sandberg.** 1997a. Determination of isomers of inositol mono- to hexaphosphates in selected foods and intestinal contents using high-performance ion chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 45, 431-436.
- Skoglund, E., T. Larsen i A. S. Sandberg.** 1997b. Comparison between steeping and pelleting a mixed diet at different calcium levels on phytate degradation in pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 77, 471-477.
- Soonchanrernying, S. i H. M. Edwards jr.** 1993. Phytate content of excreta and phytate retention in the gastrointestinal tract of young chickens. *Poult. Sci.* 72, 1906-1916.
- Ravindran, V., W. L. Bryden i E. T. Kornegay.** 1995. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Biol. Rev.* 6 (2), 125-143.