

DISCUSSIÓ GENERAL

Tal com s'ha descrit en el principi d'aquesta memòria, s'han realitzat cinc assaigs per tal d'establir l'acció de l'enzim fitasa sobre la molècula d'àcid fític en pollastres d'engreix o broilers. Els assaigs realitzats s'han efectuat amb diferents cereals, però intentant mantenir el màxim possible les mateixes condicions, per poder comparar els resultats obtinguts de manera global. Seguint els resultats obtinguts en el primer assaig, es va modificar la quantitat d'ús habitual de l'enzim fitasa microbiana afegit a les dietes, que fins al moment era de 600 U per quilo de pinso, per passar a utilitzar-ne 500 U/kg, ja que semblava ser la quantitat idònia a subministrar sense haver una disminució del creixement animal, tal com es descriu en l'apartat 4.4 de l'assaig 1. Habitualment, s'utilitzaven 600 unitats de fitasa per quilo de pinso ja que era tal com estava definit per a dietes de morenc i soja (recomanada per fabricant). En el primer estudi es va realitzar l'avaluació amb dietes de blat ja que calia estudiar la dosi més apropiada en aquest tipus de dietes.

També es va realitzar un assaig metodològic, la determinació dels fosfats d'inositol per RMN, per comprovar els resultats obtinguts en els diferents experiments, i fer un anàlisi de la degradació del fosfat d'inositol en el tracte digestiu.

La inclusió de fitasa a les dietes de broilers deficients de fòsfor no fític va produir millores en el creixement animal, aconseguint-se animals amb un pes superior i un consum no massa més elevat, per la qual cosa, i en general en tots els cereals emprats, no hi hagué canvis importants en l'índex de transformació. En la Figura 10.1, es mostra una gràfica on es pot apreciar la diferència de pes final entre els animals utilitzats en l'assaig 2 i l'assaig 4. Les diferències en tot moment es troben per sobre dels 100 grams, essent majors per les dietes de blat. Encara que això ens pogués indicar que aquestes dietes podrien donar millors resultats que les d'ordi, molt segurament la diferència vindrà donada per la genètica dels pollastres emprats. L'assaig 2 es va dur a terme a principis de l'any 2001, mentre que l'assaig 4 es realitzà a començaments de 2003. Tot i utilitzar en ambdós casos pollastres d'engreix Ross 308, les millores en la genètica de l'animal realitzats en l'interval de

temps comprès entre les dues proves, ha fet que els animals siguin millors, i puguin aprofitar d'una manera més òptima el pinso que se'ls dona.

El cinquè experiment efectuat ens permet comparar el creixement animal en els diferents cereals emprats en tot aquest estudi, malgrat que aquest experiment estava dissenyat per l'estudi de les interaccions entre els enzims sobre l'energia de les dietes. Les dades obtingudes fan pensar que les dietes amb ordi eren les millors, ja que permetien obtenir animals amb paràmetres productius superiors.

A part del tipus de dieta, hi ha un altre factor que influeix en aquest experiment. Per tal de que els tres tipus de dietes fossin iguals en termes energètics, les dietes de blat i ordi tenien major quantitat de greix afegit, especialment en el cas de la dieta d'ordi, que en el cas del morenc era quasi despreciable. Tal com s'ha anat dient en la memòria, aquest greix és més disponible, cosa que facilita el creixement animal.

Si es comparen la resta dels quatre assaigs, que són més semblants i estan dissenyats similarment, es pot dir que les millores més grans en el pes es van produir pels animals que menjaren dietes de morenc (assaig 1, assaig 3) i ordi (assaig 2). Les proves fetes amb les dietes que contenien blat no donaren resultats significatius (assaig 1) o ho feren de tal manera que no s'assoliren els resultats dels controls positius (assaig 4), cosa que sí passà amb els altres casos.

En la bibliografia, s'han descrit millores en el creixement gràcies a l'addició de fitasa a dietes deficientes de fòsfor, independentment del cereal utilitzat, tant en porcs (Peter i col., 2001; Shelton i col., 2003; Torrallardona i col., 2003) com en pollastres (Gheisari i col., 2003; Shirley i Edwards, 2003; Onyango i col., 2004; Wu i col., 2004). Alguns autors, com Sebastian i col. (1996), han tractat d'explicar les millores observades en pollastres que menjaren fitasa. Aquests autors creuen que poden haver algunes explicacions a aquest fet: 1) l'alliberament de minerals del complex fitat-mineral i 2) la utilització de l'inositol pels animals, tal com suggereixen Simons i col (1990) o 3) un increment en la digestibilitat de midó, tal com comenten Knuckles i Betschart (1987) o 4) un augment en la disponibilitat de les proteïnes (Cowieson i col., 2003).

Un paràmetre relacionat amb el creixement és el corresponent a l'energia. L'EMA va augmentar per efecte de la fitasa en bona part de les proves realitzades, amb independència del cereal emprat, ja sigui ordi (assaig 2, però no en el 5) i morenc (assaig 3 i 5, però no en l'1). L'únic cereal en què la fitasa no produí valors d'energia més elevats va ser el blat, doncs no es produïren en cap dels tres experiments en què va ser emprat. La major activitat fitàsica endògena del blat, que és la més gran dels tres cereals emprats, podria ser una explicació d'aquest fet. Com s'ha anat dient en els diferents assaigs, la fitasa permet una millor utilització no només de minerals, si no d'altres nutrients com la proteïna o el midó, nutrients amb una contribució energètica important. Un nutrient important implicat en l'energia de les dietes és el greix. En el nostre estudi, per mantenir les dietes isoenergètiques, va afegir-s'hi més o menys greix en la formulació del pinso. En haver més greix, podria ser utilitzat per la seva digestibilitat, i consegüentment pot ser usat per l'energia, però una part, que estaria en excés, podria constituir complexos insolubles ja que els àcids grassos poden intervenir en la formació de complexos amb el fitat i el calci. (Ravindran i col., 2000).

Al moment de comparar entre les diferents proves, s'ha de tenir en compte que no totes estan formulades per a tenir la mateixa energia, ja que les dietes de morenc de l'assaig 1 estan formulades a 12.9 MJ/kg i la resta a 12.5 MJ/kg. Es pot observar en la Figura 10.1 la gràfica corresponent a l'EMA, on les dietes de blat emprades en la prova 4 van donar valors més alts que les dietes d'ordi de la prova 2, i que en ser tan elevades no presenten diferències per l'addició de la fitasa.

Els mecanismes pels quals s'aconsegueixen millores en l'energia no estan clars, ja que no depenen només dels guanys que puguin observar-se en les digestibilitats de proteïna i aminoàcids (Ravindran, 1999), si no que també hi ha té gran influència el fòsfor disponible, en ser un mineral molt lligat a que hi hagi un major o menor consum de pinso.

Per tal d'estudiar la millor mineralització dels ossos dels pollastres d'engreix degut a l'addició de la fitasa microbiana en dietes deficientes de fòsfor es va mesurar el percentatge de cendres en els dits. Altres autors (Adrizal i Sell, 1996; Applegate i col., 2003; Gheisari, 2003; Payne i Southern, 2003;

Onyango i col., 2004) usen la mesura de les cendres de la tibia, però en els nostres treballs hem pogut comprovar que la utilització dels dits com a mesura de la biodisponibilitat de fòsfor és una bona eina, que corroborarien els resultats trobats en la bibliografia (Cabahug i col., 1999; Rama Rao i Ramasubba Reddy, 2003; Wu i col., 2003; Zyla i col., 2003). Ja Fritz i Roberts (1968) comenten que la mesura de la calcificació en pollastres es pot fer tant per les cendres dels dits com per les de la tibia, i que l'avantatge que presenta el càlcul amb els dits és que és molt més ràpid i fàcil de fer.

En la gràfica comparativa dels resultats de cendres dels dits dels animals utilitzats en l'assaig 2 i 4 (Figura 10.1), pot veure's com l'addició de la fitasa microbiana augmenta la concentració, malgrat que en cap dels dos casos s'arriba als valors que es tenien pels animals que menjaren dietes que complien els requeriments de fòsfor. L'addició d'una dosi molt elevada (5000 U/kg) en l'assaig 4 va fer que la concentració augmentés d'una manera poc important. En els assaigs 1 i 3, en què també s'estudià aquest paràmetre, es van obtenir resultats en el mateix sentit. Aquest augment de la concentració de cendres gràcies a la fitasa microbiana afegida ens indicarà que els animals presentaran una millor mineralització, com a conseqüència d'una millor retenció i utilització dels minerals. Així la fitasa afegida pot evitar problemes de malformació o deformació, com la discondroplasia tibial (Yalçin i col., 2000), que es produeixen pel fet de disminuir el nivell de fòsfor disponible. Aquests problemes es veuen especialment en aus que mengen dietes deficientes de fòsfor i de més dies de vida, tot i que als 21 dies d'edat (temps de finalització de totes les nostres proves) ja comencen a aparèixer.

La concentració de fòsfor no fític en el plasma dels animals estudiats en els experiments 2, 3 i 4 va augmentar després de l'addició de fitasa microbiana a les dietes. Com a contrapartida, la concentració de calci va disminuir, encara que en l'experiment 4 el resultat no va ser significatiu. La disminució de la concentració plasmàtica de calci en augmentar la de fòsfor no fític de la sang està ben demostrada (Orban i col., 1999; Landsman i col., 2001) i està àmpliament relacionada amb el metabolisme dels dos minerals i la seva relació amb la concentració de vitamina D3, el seu vitàmer 1,25-dihidroxicolecalciferol i l'hormona paratiroidea (Bondi, 1988). Nivells baixos de fòsfor en la

dieta augmenta la circulació de 1,25-dihidroxicolecalciferol i, si també hi ha nivells baixos de calci en la dieta, fan augmentar la utilització del fòsfor fític (Orban i col., 1999). Sebastian i col. (1996) també relacionen l'increment de calci en plasma quan disminueix el fòsfor de la dieta a un augment en la concentració de Ca ionitzat en el plasma, que redueix l'alliberament de l'hormona paratiròida; llavors, disminueix la inhibició de l'hormona sobre la reabsorció de fosfat i permet l'excreció urinària del Ca addicional absorbit de l'intestí durant el consum de dietes deficientes de fòsfor (Taylor i Dacke, 1984). A banda d'això, l'augment s'esdevé també per la major quantitat de fòsfor no fític que circula en el metabolisme després de l'acció de la fitasa, tal com ja s'ha descrit anteriorment en aquesta memòria.

En l'assaig 4, també es va avaluar la concentració plasmàtica de ferro i zinc, no obtenint-se diferències en cap dels tractaments avaluats, la qual cosa estaria d'acord amb altres autors (Roberson i Edwards, 1994; Sebastian i col., 1996). Roberson i Edwards suggereixen que un nivell adequat de Zn en les dietes seria responsable del fet de no observar-se efectes significatius en el Zn del plasma.

La retenció aparent de fòsfor total ha estat millorada en tots els casos estudiats. Un dels objectius d'aquest treball consistia en confirmar els efectes de l'enzim sobre aquest paràmetre, que ja se sabia que eren beneficiosos, augmentant la retenció i disminuint l'excreció del fòsfor (Jongbloed i col., 1990; Ravindran i col., 1995; Kornegay, 1999; Ravindran i col., 2001; Applegate i Angel, 2003). Els nostres resultats confirmarien els obtinguts fins al moment per altres autors, inclús poden ajudar a comprendre'ls, ja que en utilitzar diferents cereals permet veure com varien depenent de l'utilitzat en cada moment. En l'assaig 5, on s'utilitzaren cereals amb diferent quantitat de fitasa endògena, pot observar-se com l'enzim afegit permet millorar molt la retenció de fòsfor total en dietes amb *moresc*, que té una activitat fitàsica quasi nul·la, mentre que l'increment en els altres casos és lleugerament inferior, doncs per si sols ja presenten una bona retenció. Aquests resultats queden corroborats en els assaigs 2 i 4, on amb l'ús de fitasa microbiana en dietes d'ordi i blat es mostren

petits increments en la retenció, malgrat que el canvi més important es troba degut a la reducció de la concentració de fòsfor no fític de la dieta. En disminuir el fòsfor no fític present en la dieta, s'augmenta la retenció, resultats que s'obtenen encara que no s'afegeixi fitasa exògena. Aquesta és una qüestió descrita per molts autors (Cabahug i col., 1999; Punna i Roland, 1999; Wu i col., 2003; Rutherford i col., 2004), no tenint una explicació molt clara. Teòricament, en haver menys fòsfor no fític en la dieta, la quantitat que s'utilitza és major, i, la quantitat que s'excreta menor. Però, el que pot passar és que s'utilitza una quantitat similar en tots els casos, quantitat que en valor relatiu serà major quan hi ha menys fòsfor no fític en la dieta. En la part dedicada a la determinació dels fosfats d'inositol per RMN, en les taules 9.6, 9.7 i 9.8, es calculen les retencions ileals de fòsfor no fític dels assaigs 2, 3 i 4, respectivament. En les taules esmentades pot veure's com, en la major part dels casos estudiats, la retenció del fòsfor no fític és molt similar, i quan el valor és més baix es deu segurament a errors de la metodologia i a la manca de rèpliques. Com ja s'ha dit abans en l'apartat 9.3, la retenció de fòsfor total està més íntimament lligada amb la retenció del fòsfor fític que no pas amb la del fòsfor no fític, ja que les variacions observades en el fòsfor fític es veuen reflectides en el fòsfor total.

La disminució de fòsfor no fític de la dieta queda més remarcada pel que fa a la ingesta i l'excreció de fòsfor. En global, hem pogut observar com no hi ha grans diferències per l'addició de fitasa microbiana en la ingesta, només observant-se alguna excepció en el tercer assaig. Aquest assaig que consistia en dietes de morenc i soja amb addició de segó de blat tractat o no amb l'autoclau i amb tots els pinsos contenint la mateixa concentració de fòsfor no fític, ja mostra variacions en el consum de pinso. Per tant, és de suposar que les variacions trobades seran degudes a la major quantitat de pinso ingerida que no al fet de tenir més o menys fòsfor. Com era d'esperar els tractaments dels assaigs amb menor quantitat de fòsfor no fític, i per extensió de fòsfor total, presenten una menor excreció d'aquest mineral. La fitasa microbiana que s'ha afegit a la dieta no ha influït o ho ha fet poc en aquest paràmetre.

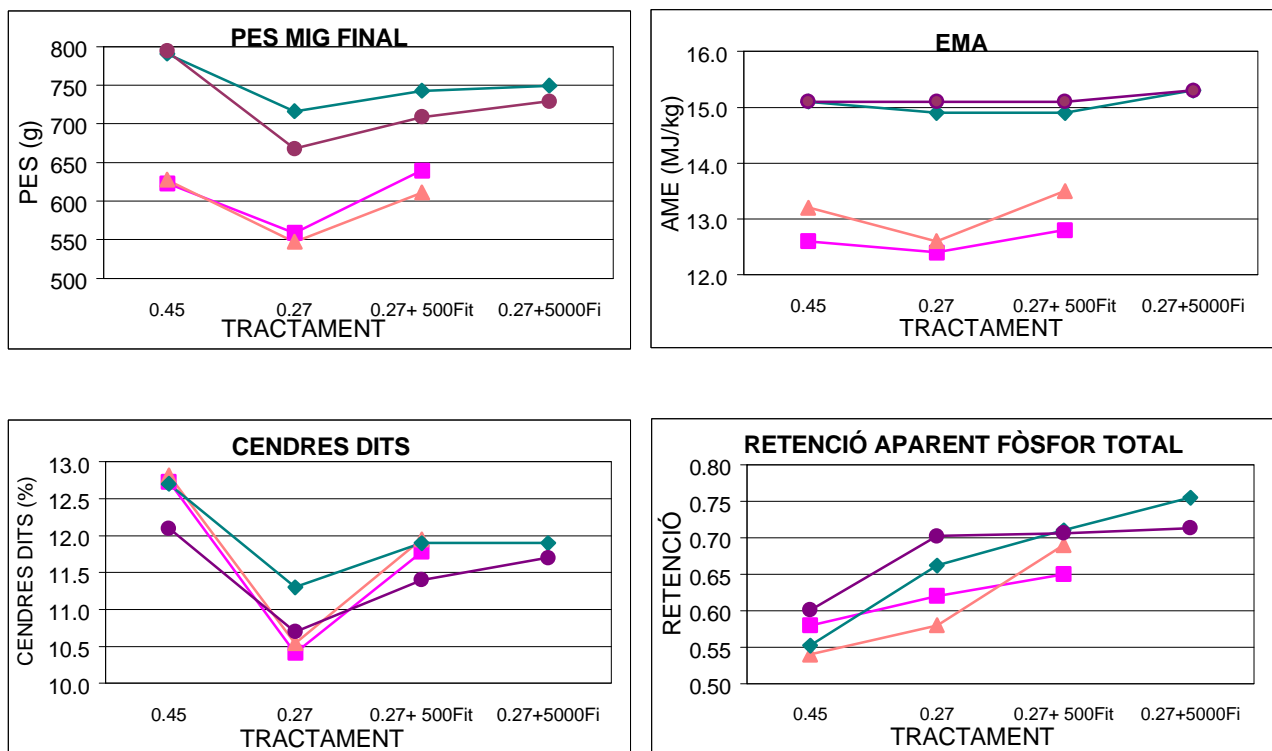
Pel que fa a la resta de minerals, l'acció de la fitasa dona resultats divergents. Pel calci, l'addició de l'enzim permet que hi hagi una major retenció sense que s'hagi observat grans variacions en les ingestes. L'excreció d'aquest mineral ha donat resultats molt diferents, ja que en algun assaig disminuïa (assaig 2 i dietes de moresc de l'assaig 5) i en d'altres no variava. Aquesta variabilitat de resultats està directament lligada a la relació entre el calci i el fòsfor. Alguns autors descriuen aquesta relació respecte al fòsfor total (Qian i col., 1997) mentre que altres ho fan respecte a l'no fític (Huyghebaert, 1996a, b; Rama Rao i col., 2003). Sigui quin sigui, el tipus de fòsfor emprat sembla ser que la relació Ca:P més adequada es troba entre 1:1 i 2:1 (Dieckmann i col., 2002), observant-se resultats contraris al que serien d'esperar quan s'usa valors inferiors o superiors a aquesta relació. La relació Ca:P a part de tenir influència en la mineralització també en tindrà en el creixement. En el nostre estudi hem utilitzat diferents relacions Ca:P no fític, 2:1 (assaig 4) i 3:1 en la resta d'assaigs en les dietes deficientes, i de 2.4:1 en les dietes amb un nivell recomanat de fòsfor no fític. El fet que l'assaig 4 tingués una relació menor comparada a la resta, podria haver contribuït als resultats millors en termes de creixement i energia, tal com es pot veure en la Figura 10.1, a banda de l'explicació ja donada de la millora genètica dels animals.

Una explicació de la no diferència en la retenció de calci, observada en alguns dels assaigs efectuats, podria ser que el major contingut de calci respecte al fòsfor en les dietes baixes en fòsfor causaria un augment en el pH intestinal i reduiria la fracció soluble dels minerals (Shafey, 1993) o que està relacionat amb una mobilització de l'os per mantenir el P del sèrum i excretar l'excés de Ca, Mg i Zn (Viveros i col., 2002).

S'estan realitzant estudis amb mètodes alternatius per a millorar la utilització de P i altres minerals. Un d'aquests mètodes és l'aplicació conjunta de fitasa i d'àcids orgànics, en alguns treballs que s'estan realitzant en el nostre grup o en treballs publicats per altres autors (Porres i col., 2001; Valencia i Chavez, 2002; Brenes i col., 2003; Omogbenigun i col., 2003). Amb l'acció combinada de la fitasa i els àcids orgànics (cítric, acètic) hi ha una disminució del pH gàstric i una estimulació de l'activitat pepsina i proteases pancreàtiques (Valencia i Chavez, 2002). Jongbloed i col. (2000)

van descriure en porcs un efecte sinèrgic dels àcids orgànics i la fitasa microbiana per a cendres i la digestibilitat aparent de P i Mg. Brenes i col. (2003) van observar que l'addició de fitasa i àcid cítric en pollastres millorava la utilització mineral, encara que la presència sola d'àcid cítric reduïa el creixement. Aquests estudis han de servir per aprofundir més en el coneixement de la utilització de minerals, entre ells el fòsfor, per a poder acabar d'establir el mecanisme d'acció de la fitasa i poder concretar encara més el lloc d'acció de l'enzim, i així intentar optimitzar els resultats productius.

Figura 10.1. Gràfiques comparatives del pes mig final, energia metabolitzable aparent, percentatge de cendres dels dits i retenció aparent de fòsfor total entre els resultats obtinguts en l'assaig 2 (ordi sense tractar —■—; ordi autoclau —▲—) i l'assaig 4 (blat sense tractar —◆—; blat autoclau —●—).



Amb l'addició de fitasa microbiana s'han produït resultats disperss i sorprenents per la retenció d'altres minerals estudiats. En alguns treballs (Sebastian i col., 1996; Mohanna i Nys, 1999) s'han descrit valors negatius de la retenció de minerals com el zinc. En els nostres assaigs 1 i 4, es va realitzar paral lelament a aquest treball, una avaluació de la retenció d'aquest mineral. Els resultats que s'obtingueren estan d'acord amb el que deien els de la bibliografia, amb valors negatius de la

retenció, valors que milloraven, sense deixar de ser negatius en algun cas, després de l'addició de la fitasa microbiana. Des d'un punt de vista de l'animal, no és fàcil d'entendre aquests resultats. Una retenció negativa significa que l'animal excreta més mineral que no pas ingereix, el qual ja acostuma a estar en excés, degut a què s'afegeix amb el corrector mineral que es posa al pinso. És de pensar que hi han pèrdues endògenes del mineral, pèrdues que no són el suficientment importants per produir malalties greus per l'animal degut a la seva deficiència. En aquests tipus de proves, hem utilitzat el TiO_2 com a marcador de digestibilitats. Podria passar que el marcador i el mineral estudiat (el zinc) tinguin una diferent velocitat de trànsit intestinal, i que, en el moment de recollir l'excreta, el zinc no hagi acabat de passar pel tub digestiu.

Un altre aspecte important de l'estudi desenvolupat ha estat l'avaluació dels efectes de la fitasa endògena de les matèries primeres emprades en la formulació dels pinsos. Aquesta valoració s'ha fet mitjançant l'eliminació de la fitasa endògena per tractament tèrmic en cereals com ordi i blat, i amb un subproducte de farinera del blat com és el segó de blat, amb una elevada activitat fitàsica. En els tres casos en què s'ha efectuat aquest tractament per autoclau, primerament es va fer un estudi de les condicions i de l'efectivitat del processament. Cal dir que encara que les condicions emprades en cada cas fossin diferents, aquestes no depenien del tipus de matèria primera, ja que sempre es van fer servir temperatures superiors als valors establerts com a òptims de l'enzim fitasa (60-90°) (Reddy i col., 1989; Jongbloed i Kemme, 1990; Viveros i col., 2000), i superiors a 100°C, si no que depenien de l'aparell utilitzat. Els temps utilitzats sempre van ser propers als 10-15 minuts, per assegurar-se l'eliminació total de l'enzim.

El procés tèrmic d'eliminació de la fitasa endògena va tenir efectes nuls o negatius sobre el creixement dels animals. Els animals de l'assaig 2, que menjaren dietes d'ordi, no van veure modificat el seu pes ni el consum, i, a més, van presentar un índex de transformació significativament més elevat. Els animals que menjaren les dietes de moresc, soja i segó de blat (assaig 3) i de blat (assaig 4) amb el cereal passat per autoclau van tenir creixements inferiors respecte als animals que menjaren pinso amb cereal sense tractar. En la Figura 10.1 es pot veure

clarament la diferència de pesos entre els animals que menjaren blat no tractat i blat tractat, pel cas de l'assaig 4, i que arribà a ser fins de 50 grams per les dietes amb 0.27% de FNF i sense fitasa exògena afegida.

Les viscositats intestinals dels animals d'aquests assaigs van presentar uns resultats completament inversos als del creixement. Els valors dels experiments 3 i 4 no variaren i els de l'experiment 2 van augmentar de manera molt dràstica. Cal dir que en l'experiment 4 era d'esperar que no variessin, doncs es va posar xilanasa en la dieta i aquest enzim contraresta els efectes negatius de la presència de PNA en el blat, sense que hi hagi interaccions amb la fitasa (assaig 5).

Es pot dir que la resta de paràmetres analitzats i estudiats (energia, mineralització i retenció) no van canviar per l'eliminació de la fitasa endògena de les diferents matèries primeres. L'únic paràmetre que sí que va canviar, i ho féu amb una lleugera reducció, va ser la concentració de fòsfor no fític en el plasma dels animals de la prova 3. Amb l'eliminació de la fitasa endògena del segó de blat, les dietes que eren deficientes de fòsfor van quedar amb una activitat fitàsica quasi bé nul·la, per la qual cosa no és possible d'aprofitar millor el fòsfor, però també tal com s'ha dit en el capítol 6 (assaig 3) el tractament tèrmic del segó de blat ha fet que l'estructura del fitat es veïés modificada sense arribar-se a trencar, i dificultant l'absorció del fòsfor en la sang.

Hem pogut veure, gràcies a l'estudi realitzat per RMN dels continguts de diferents seccions del tub digestiu dels animals de l'assaig 2, com l'acció de la fitasa es realitza en el tracte alimentari de l'animal. Aquests resultats estan d'acord amb els que van obtenir Nelson i col. (1971), qui per confirmar-ho diuen que la fitasa no actua en l'aliment abans de ser ingerit, independentment de l'activitat fitàsica que presentin les matèries primeres usades. L'activitat fitàsica pot variar segons les condicions d'emmagatzematge de la matèria primera (Eeckhout i De Paepe, 1994; Centeno i col., 2001). Les condicions de temperatura i de humitat a què estan conservades les matèries primeres són factors que poden influir. A més, és ben conegut que la concentració de fòsfor de les matèries primeres es diferent en funció si són cereals, subproductes o llegums (Kirby i Nelson, 1988; Viveros i col., 2000). La diferent localització del fitat i de la fitasa dins del gra també en pot

ser una causa. El fitat és sintetitzat i dipositat durant el desenvolupament de la llavor en regions dites globòides (o també partícules de l'aleurona), mentre que la fitasa es troba localitzada en varis llocs dins del gra dependent de quin es tracti. Així, en el blat no germinat la fitasa es troba associada en un 34% en l'endosperma i un 40% en el teixit de l'aleurona; mentre que en l'ordi es troben en fines estructures al voltant de la capa de l'aleurona (Reddy i col., 1989).

D'aquí es pot extreure que l'eliminació de la fitasa endògena no ha repercutit en el creixement dels animals o en la digestibilitat i retenció de nutrients pels pollastres d'engreix que menjaren dietes deficientes de fòsfor. El procés es va dur a terme per comparar-lo amb els varis processos que impliquen una temperatura elevada i que pot sofrir un pinso en la seva fabricació, com per exemple la granulació. Sembla ser que és indiferent la quantitat de fitasa endògena de la matèria primera, ja que sembla tenir poca activitat dins l'animal. Cal recordar que la fitasa dels vegetals és la 6-fitasa, per la qual cosa sembla que es pot dir que aquesta forma de l'enzim és poc activa dins el tub digestiu de l'animal, essent més activa per tal de millorar tots els paràmetres estudiats la forma 3-fitasa, procedent dels microorganismes i que és la que afegim en la dieta. A més, la fitasa comercial presenta una protecció especial que li permet aguantar les altes temperatures de la granulació i els medis àcids de la primera part del sistema digestiu (López Álvarez, 2002).

Zimmermann i col. (2002) en un estudi amb porcs alimentats amb dietes deficientes de fòsfor de blat i de sègol en les qual tenien fitasa endògena inactivada i/o s'afegia fitasa microbiana, van comprovar com l'eficàcia de la fitasa del cereal era del 40% vers la fitasa microbiana provada i que, per tant, que es necessitaria 2.5 U de fitasa cereal de blat o sègol per reemplaçar 1 U de fitasa microbiana.

La determinació dels fosfats d'inositol per RMN pot aportar una molt bona ajuda quant a l'anàlisi d'aquests compostos, podent realitzar-se en qualsevol mostra, ja siguin pinsos, continguts del tub digestiu o excretes. Una de les principals causes que podrien fer d'aquesta una tècnica molt útil seria la de poder determinar el fòsfor no fític al mateix temps que el fòsfor en forma de fitat. A més,

els patrons, tant intern com extern, són productes fàcilment assequibles, per la qual cosa tampoc encareix o dificulta la utilització de RMN. La tècnica de RMN de P^{31} és més selectiva que el mètode HPLC emprat per a la determinació dels fosfats d'inositol, ja que aquesta utilitza un detector d'índex de refracció, que es un dels mes universals.

Un desavantatge d'aquesta tècnica és que no és fàcil de tenir un aparell de RMN per a realitzar la mesura, tant pel seu cost econòmic, com per l'espai que ocupa i les condicions d'al·liment que requereix. A un laboratori pot no compensar-li fer una gran despesa com aquesta per la realització de poca quantitat de mesures. Un altre inconvenient per la utilització d'aquesta metodologia pel que fa a avaluar les retencions dels fosfats o l'excreció és la quantitat de mostra que es requereix. Segons el mètode descrit per Kemme i col. (1999) s'extreuen 3 grams de mostra en HCl. Però, per exemple en el nostre cas per obtenir 3 grams de continguts intestinals hem hagut d'ajuntar les mostres de tots els lots, perdent la possibilitat de fer rèpliques i, d'aquesta manera, reproduir els resultats o poder analitzar-los estadísticament.

Deixant de banda aquestes qüestions, s'ha pogut comprovar que la tècnica de RMN de P^{31} és una bona eina, permetent-nos, en alguns casos, donar informació complementària respecte a l'aportada per les dades obtingudes directament per la digestibilitat. Abans, però, és també important realitzar una bona extracció, separació i eliminació de metalls quelats, ja que ions com el Fe i el Mn, ions paramagnètics, poden incrementar l'ample de línia i escurçar el temps de relaxació degut al fort camp magnètic dels seus electrons desaparellats (Cade-Menun i col., 2002), amb una saturació de pics, solapant-se i no fent-los visibles.

En el cinquè assaig, es va avaluar les possibles interaccions entre la fitasa i enzims que s'afegeixen de manera habitual en les dietes per tal de contrarestar alguns factors antinutritius. En el nostre cas, es va estudiar les relacions entre la fitasa i els enzims carbohidrasa degradadors dels polisacàrids no amilacis. Aquests tipus de polisacàrids poden augmentar la viscositat de la bola alimentària, fent reduir el contacte entre el menjar i els enzims digestius i alenteix la presa en l'intestí dels sucres,

aminoàcids i lípids que provenen de la digestibilitat dels nutrients majors (Chesson, 2001). També sembla que incrementar la viscositat de la digesta provoca una proliferació bacteriana (Pérez-Moya i col., 2000) que va en detriment tant de l'eficiència digestiva com de la salut de l'animal (Choct i col., 1996). Ambdós tipus d'enzims, malgrat ser específics (pel fòsfor la fitasa, pels PNA les carbohidrases), produeixen millores en la digestibilitat de nutrients, i per això, se'n va avaluar els efectes de l'aplicació conjunta.

En general, no s'ha vist que aquest enzims tinguin interaccions negatives. Les interaccions trobades són de caràcter positiu, i es donen especialment en la retenció i excreció de minerals. Com ja s'ha dit en els apartats 8.3 i 8.4, l'únic paràmetre productiu afectat per una interacció negativa és l'índex de transformació pels animals que menjaren dietes de moresc. Molt probablement, la significància en la interacció és com a conseqüència que aquest paràmetre és la relació entre el consum de pinso i el pes de l'animal, i, per tant, pot estar relacionat amb l'acumulació dels errors dels paràmetres relacionats. Els resultats obtinguts per les dietes de blat, en què no s'observen millores substancials per l'addició de la fitasa i la xilanasa, no estarien totalment d'acord amb els obtinguts per Wu i col. (2004). Aquests autors afegint els dos enzims en dietes amb nivells adequats de fòsfor, no van trobar millores respecte a l'addició individual de cada enzim, encara que els resultats fossin millors que el control sense enzim. Els nostres resultats serien més similars als de Ravindran i col. (1999) i Zyla i col. (1999), que amb la combinació de fitasa i xilanasa no van obtenir efectes beneficiosos en el creixement del broiler. Wu i col (2004) addueixen que el fet que ells obtinguin resultats diferents sigui degut al procés d'obtenció de la fitasa, obtinguda per fermentació en estat sòlid, i que implica que tenen un contingut relativament alt de xilanasa i β -glucanasa.

Bona part de les interaccions entre els enzims es van trobar en avaluar la relació entre la fitasa i la β -glucanasa en les dietes d'ordi, produint-se en la retenció de fòsfor total i calci i en l'excreció de calci. Seguint el càlcul realitzat per Little (1981), es va obtenir la importància biològica de la interacció, que ens permet tenir una idea de la magnitud que pot tenir la presència dels dos enzims conjuntament per sobre de cada enzim per individual. Els valors obtinguts, entre el 39 i el 60%, són

molt elevats, fent-nos pensar que la interacció és molt forta. L'addició dels dos enzims conjuntament va fer augmentar la retenció dels dos minerals i disminuir l'excreció, tal com es pot veure en la Taula 8.11, en canvi, l'aplicació individual de cada enzim va tenir efectes ben diferents. No és prou clara la forma actuació conjunta dels dos enzims, ni com pot afectar la presència d'un respecte a l'altre, però sembla clar que la presència d'ambdós enzims influeix positivament en la productivitat i la digestibilitat en broilers que menjaren dietes deficientes de fòsfor.

La inclusió de 500 U de fitasa per quilo de pinso de dietes deficitàries de fòsfor aportarà avantatges respecte la utilització energètica i mineral sense repercussió en el creixement de l'animal respecte a les dietes control. S'ha vist que incloure una dosi més alta (5000 U/kg) pot permetre una optimització en els resultats referents a la retenció de minerals i a una major energia, tal com descriu Rosen (2003), qui diu que l'eficiència d'un enzim s'ha de fer amb estudis amb increments logarítmics de la dosi aplicada. En estudis posteriors, s'hauria d'acabar de concretar quina és la millor dosi de fitasa a afegir en les dietes deficientes de fòsfor, per tal de obtenir resultats òptims a nivell de recerca, amb independència dels aspectes econòmics (com el cost de la inclusió de l'enzim en la dieta); i també buscar els valors d'equivalència entre la fitasa i el fòsfor no fític per diferents matèries primeres, en funció de l'activitat fitàsica endògena que presenten. Seria recomanable seguir estudiant els efectes de la fitasa endògena de les matèries primeres, especialment en aquelles que presenten una major activitat, buscant l'eficàcia d'aquest enzim respecte la microbiana.

Referències bibliogràfiques.

- Adrizal, P. E. P. i J. L. Sell.** 1996. Utilization of defatted rice bran by broiler chickens. *Poult. Sci.* 75, 1012-1016.
- Applegate, T. J. i R. Angel.** 2003. Issues related to phytase and soluble phosphorus. *Poultry Digest Online.* 3, (10) 1-11.
- Applegate, T. J., R. Angel i H. L. Classen.** 2003. Effect of dietary calcium, 25-hydroxycholecalciferol, or bird strain on small intestinal phytase activity in broiler chickens. *Poult. Sci.* 82, 1140-1148.
- Bondi, A. A.** 1988. *Nutrición Animal.* Ed. Acribia, S.A. Saragossa, Espanya.
- Brenes, A., A. Viveros, I. Arija, C. Centeno, M. Pizarro i C. Bravo.** 2003. The effect of citric acid and microbial phytase on mineral utilization in broiler chicks. *Anim. Feed Sci. Tech.* 110, 201-219.
- 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.
- 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.
- Centeno, C., A. Viveros, A. Brenes, R. Canales, A. Lozano i C. De la Cuadra.** 2001. Effect of several germination conditions on total P, phytate P, phytase, and acid phosphatase activities and inositol phosphate ester in rye and barley. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3208-3215.
- Chesson, A.** 2001. Non-starch polysaccharide degrading enzymes in poultry diets: influence of ingredients on the selection of activities. *World's Poultry Science Journal.* 57, 251-263.
- Choct, M., R. J. Hughes, J. Wang, M. R. Bedford, A. J. Morgan i G. Annison.** 1996. Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. *Brit. Poultry Sci.* 37, 609-321.

- Cowieson, A. J., T. Acamovic i M. R. Bedford.** 2003. Phytic acid and the implications for protein utilisation by poultry. *Brit. Poultry Sci.* 44, (Suppl. 1) S36-S37.
- 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.
- Eeckhout, W. i M. De Paepe.** 1994. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 47, 19-29.
- Fritz, J. C. i T. Roberts.** 1968. Use of toe ash as a measure of calcification in the chick. *J. AOAC Int.* 51, (3) 591-594.
- Gheisari, A., R. Bahadorani i J. Pourreza.** 2003. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and phytate phosphorus availability of corn-wheat-soybean meal diet in broiler chicks. 14th European Symposium of Poultry Nutrition. 42-44.
- Huyghebaert, G.** 1996a. Effects of dietary calcium, phosphorus, Ca/P-ratio and phytase on zootechnical performances and mineralisation in broiler chicks. *Arch. Geflügelkd.* 61, (2) 53-61.
- Huyghebaert, G.** 1996b. The response of broiler chicks to phase feeding for P, Ca and phytase. *Arch. Geflügelkd.* 60, (3) 132-141.
- 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.
- Jongbloed, A. W., P. A. Kemme i Z. Mroz.** 1990. The effect of *Aspergillus niger* phytase in diets for pigs on concentration and apparent digestibility of dry matter, total phosphorus and inositol phosphates in different sections of the alimentary tract. Rapport IVVO n° 221.
- Jongbloed, A. W., Z. Mroz, R. van der weij-Jongbloed i P. A. Kemme.** 2000. The effects of microbial phytase, organic acids and their interaction in diets for growing pigs. *Livestock Prod. Sci.* 67, 113-122.
- 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.

- Kirby, L. K. i T. S. Nelson.** 1988. Total and phytate phosphorus content of some feed ingredients derived from grains. *Nutrition Reports International*. 37 (2), 277-280.
- Knuckles, B. E. i A. A. Betschart.** 1987. Effect of phytate and other myo-inositol phosphate esters on alpha-amylase digestion of starch. *J. Food Sci.* 52, 719-721.
- Kornegay, E. T.** 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.
- Landsman, A., D. Lichstein, M. Bacaner i A. Ilani.** 2001. Dietary phosphate-dependent growth is not mediated by changes in plasma phosphate concentration. *Br. J. Nutr.* 86, 217-223.
- Little, T. M.** 1981. Interpretation and presentation of results. *Hortscience*, 16(5):637-640.
- 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.
- 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.
- Omogbenigun, F. O., C. M. Nyachoti i B. A. Slominski.** 2003. The effect of supplementing microbial phytase and organic acids to a corn-soybean based diet fed to early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 81, 1806-1813.
- Onyango, E. M., M. R. Bedford i O. Adeola.** 2004. The yeast production system in which *Escherichia coli* phytase is expressed may affect growth performance, bone ash, and nutrient use in broiler chicks. *Poult. Sci.* 83, 421-427.
- 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.
- Payne, R. L. i L. L. Southern.** 2003. A comparison of two sources of phytase on growth performance and bone ash in commercial broilers. 14th European Symposium of Poultry Nutrition. 25-26.

- Pérez-Moya, S., M. Francesch, I. Badiola i J. Brufau.** 2000. Influence of enzyme, antibiotic growth promoter and type of cereal on intestinal microflora of broilers. En: XXI World's Poultry Congress, Montreal, Canada (Pòster).
- Peter, C. M., T. M. Parr, E. N. Parr, D. M. Webel i D. H. Baker.** 2001. The effects of phytase on growth performance, carcass characteristics, and bone mineralization of late-finishing pigs fed maize-soyabean meal diets containing no supplemental phosphorus, zinc, copper and manganese. *Anim. Feed Sci. Tech.* 94, 199-205.
- Porres, J. M., P. Etcheverry, D. D. Miller i X. G. Lei.** 2001. Phytase and citric acid supplementation in whole-wheat bread improves phytate-phosphorus release and iron dialyzability. *J. Food Sci.* 66 (4), 614-619.
- Punna, S. i D. A. Roland, Sr.** 1999. Influence of supplemental microbial phytase on first cycle hens fed phosphorus-deficient diets from day one of age. *Poult. Sci.* 78, 1407-1411.
- Rama Rao, S. V. i V. Ramasubba Reddy.** 2003. Relative bio-availability and utilisation of phosphatic fertilisers as sources of phosphorus in broilers and layers. *Brit. Poultry Sci.* 44, 96-103.
- Rama Rao, S. V., A. K. Panda, M. V. L. N. Raju, G. Shyam Sunder i N. K. Praharaj.** 2003. Requirement of calcium for commercial broilers and white leghorn layers at low dietary phosphorus levels. *Anim. Feed Sci. Tech.* 106, 199-208.
- 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, 1-21.
- 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.
- 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.R., M. D. Pierson, S. K. Sathe i D. K. Salunkhe.** 1989. Phytates in cereals and legumes. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Roberson, K. D. i H. M. Edwards, Jr.** 1994. Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and phytase on zinc utilization in broiler chicks. *Poult. Sci.* 73, 1312-1326.
- Rosen, G. D. 2003. Effects of genetic, management and dietary factors on the efficacy of exogenous microbial phytase in broiler nutrition. *Brit. Poultry Sci.* 44, (Suppl. 1) S25-S26.
- 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.
- 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.
- Shafey, T. M.** 1993. Calcium tolerance of growing chickens: effect of ratio of dietary calcium to available phosphorus. *World's Poult. Sci. J.* 49, 5-18.
- Shelton, J. L., L. L. Southern, T. D. Bidner, M. A. Persica, J. Braun, B. Cousins i W. F. McKnight.** 2003. Effect of microbial phytase on energy availability, and lipid and protein deposition in growing swine. *J. Anim. Sci.* 81, 2053-2062.
- Shirley, R. B. i H. M. Edwards, Jr.** 2003. Graded levels of phytase past industry standards improves broiler performance. *Poult. Sci.* 82, 671-680.

- 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.
- Taylor, T. G. i C. G. Dacke.** 1984. Calcium metabolism and its regulation. En: *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. Editor: B. M. Freeman. Academic Press, Londres, Regne Unit. pp. 126-170.
- Torrallardona, D., D. Solà-Oriol, J. Broz i J. Brufau.** 2003. Effects of dicalcium phosphate level and of phytase on performance and P excretion in growing pigs. En: *9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*. Banff, Canadà. Vol.2, 323-325.
- Valencia, Z. i E. R. Chavez.** 2002. Phytase and acetic acid supplementation in the diet of early weaned piglets: effect on performance and apparent nutrient digestibility. *Nutr. Res.* 22, 623-632.
- 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., C. Centeno, A. Brenes, R. Canales i A. Lozano.** 2000. Phytase and acid phosphatase activities in plant feedstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4009-4013.
- 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.
- Wu, Y. B., V. Ravindran, D. G. Thomas, M. J. Birtles i W. H. Hendriks.** 2004. Influence of phytase and xylanase, individually or in combination, on performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology in broilers fed wheat-based diets containing adequate level of phosphorus. *Brit. Poultry Sci.* 45, (1) 76-84.
- Yalçın, S., X. Zhang, L. M. Christa, G. R. McDaniel i D. L. Kuhlert.** 2000. Effects of divergent selection for incidence of tibial dyschondroplasia (TD) on purebred and crossbred performance. 1. TD incidence and calcium and phosphorus plasma concentrations. *Brit. Poultry Sci.* 41, 562-565.

- Zimmerman, B., H. J. Lantzsch, R. Mosenthin, F. J. Schöner, H. K. Biesalski i W. Drochner.** 2002. Comparative evaluation of the efficacy of cereal and microbial phytases in growing pigs fed diets with marginal phosphorus supply. *J. Sci. Food Agric.* 82, 1298-1304.
- 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, M. Mika, B. Stodolak, S. Swiatkiewicz i A. Wikiera.** 2003. Complete dephosphorylation and total conversion of phytates in maize-soybean feeds fed to broilers. 14th European Symposium of Poultry Nutrition. 16-17.

CONCLUSIONS

1. No s'han observat efectes en els paràmetres estudiats degut a la dosi de fitasa exògena afegida en intervals petits a dietes deficientes de fòsfor i elevada activitat fitàsica endògena. Per tant, es pot reduir la dosi habitual de 600 U/kg a 500 U/kg sense haver repercutit en la productivitat del pollastre.

2. La disminució de la concentració de fòsfor de la dieta ha provocat un menor consum de pinso, que implica un menor creixement. S'obtenen les mateixes productivitats alimentant els pollastres amb dietes amb nivell adequat de fòsfor o amb dietes deficitàries en fòsfor suplementades amb 500 U/kg de fitasa microbiana.

3. S'han obtinguts majors retencions de fòsfor en dietes deficitàries de fòsfor respecte a les dietes amb nivells recomanats, disminuint-ne l'excreció. L'addició de 500 U/kg de fitasa microbiana a dietes de broilers deficientes de fòsfor va permetre augmentar la retenció de minerals.

4. La magnitud dels efectes de l'addició de la fitasa exògena és funció de la fitasa endògena dels ingredients de les dietes. L'increment en la retenció de fòsfor és superior en les dietes de baixa activitat fitàsica endògena, com el morenc, i inferior en les dietes de blat, d'alta activitat fitasa endògena.

5. S'ha vist que el pes final del pollastre, la concentració de les cendres dels dits i la concentració de fòsfor inorgànic en el plasma són bons indicadors de la disponibilitat de fòsfor. Basant-se en els dos primers paràmetres, s'ha obtingut que 605 U/kg de fitasa microbiana poden reemplaçar 1 g de P per quilo en dietes de blat i soja deficientes de fòsfor.

6. La utilització d'una dosi elevada (5000 U/kg) de fitasa microbiana ha produït millors resultats d'energia i digestibilitat de nutrients que les dietes amb 500 U/kg de fitasa microbiana, no mostrant cap efecte advers de tolerància a aquest enzim.

7. L'activitat fitasa endògena de les matèries primeres pot eliminar-se totalment per tractament tèrmic per autoclau, amb temperatures superiors a 100° C i en un període de temps comprès entre 10 i 15 minuts.

8. L'eliminació de la fitasa endògena de matèries primeres produeix una disminució en el creixement dels animals que menjaren dietes deficientes de fòsfor, influint especialment en l'índex de transformació i la viscositat intestinal. Els valors energètics de les dietes no s'han modificat.

9. L'eliminació de la fitasa endògena de les matèries primeres no va tenir influència en la retenció de fòsfor total ni en la seva excreció. La retenció de calci es veié afectada per l'eliminació de la fitasa endògena, disminuint els seus valors; l'excreció de calci de les dietes amb ingredients tractats augmentà només en alguns dels casos estudiats.

10. La inclusió d'enzims carbohidrasa en dietes de broilers riques en PNA no va variar la retenció de fòsfor total, augmentant l'excreció d'aquest mineral per les dietes de morenc suplementades amb α -galactosidasa.

La presència de xilanasa en dietes de blat i de β -glucanasa en dietes d'ordi van fer augmentar la retenció de calci, malgrat que només en les dietes d'ordi hi hagués una reducció en l'excreció.

11. No s'han observat interaccions negatives remarcables entre la fitasa i els enzims carbohidrasa en les dietes riques en PNA i deficient de fòsfor, per la qual cosa aquest tipus d'enzims poden ser combinats en les dietes, doncs sembla que actuen independentment sobre els seus respectius substrats.

12. La tècnica de RMN de P^{31} pot ser una bona eina per a determinar els fosfats d'inositol, podent-se identificar alhora el fòsfor no fític, tant en mostres de pinsos com de continguts del tub digestiu o excretes.

13. La tècnica de RMN ha permès comprovar la hidròlisi en el tracte digestiu de l'àcid fític fins a fosfats amb un nombre igual o menor que 5. Es pot dir que els llocs d'acció de la fitasa són el pedrer i la cloaca, ja que és on s'han observat els efectes més grans.

No s'han observat diferències en la hidròlisi de l'àcid per l'eliminació de l'activitat fitàsica dels ingredients de les dietes.

ANNEXES

12.1. DETERMINACIÓ DE FÒSFOR TOTAL (MÈTODE ESPECTROFOTOMÈTRIC)

12.1.1. Introducció.

Determinació del fòsfor de la mostra mineralitzada mitjançant colorimetria a 430 nm del complex format amb el reactiu nitromolibdic-vanadat.

12.1.2. Reactius i solucions.

Reactiu: HCl 37.5%; HNO₃ al 60% i al 10%; amoníac concentrat (NH₄OH); molibdat amònic 4-hidrat [(NH₄)₆Mo₇O₂·4H₂O]; metavanadat amònic (NH₄VO₃); fosfat monopotàssic (KH₂PO₄).

Solucions: - Dissolució de molibdat amònic: Dissoldre 100 g de (NH₄)₆Mo₇O₂·4H₂O en H₂O calenta. Afegir 10 ml d'amoníac i, un cop fred, passar-ho a un aforat de 1000 ml i enrassar.

- Dissolució de metavanadat amònic: Dissoldre 2,35 g de (NH₄)₆VO₃ en un vas de 600 ml d'H₂O destil·lada calenta. Afegir lentament i agitant 20 ml d'una dissolució que conté 7 ml d'àcid nítric 60% i 13 ml d'aigua. Un cop fred, aforar-ho a 1000 ml amb aigua.

- Dissolució de nitro-molibdo-vanadat: En un aforat de 1000 ml afegir 200 ml de la solució de metavanadat amònic, 200 ml de la solució de molibdat amònic i 134 ml de nítric concentrat. Enrassar amb aigua.

- Dissolució patró de fòsfor de 1000 ppm: Dissoldre 4,394 g de KH₂PO₄, prèviament dessecat en estufa a 100° C fins a pes constant, en aigua i aforar-ho a 1000 ml.

12.1.3. Procediment analític.

Preparació de la mostra: Pesar entre 2 i 4 g de mostra molguda a 0,5 Ø en gresols de porcellana, calcinar la mostra a la placa calefactora. Després, posar el gresol a la mufla a 550°C fins obtenir cendres blanques o grises (3-4 hores). Passar les cendres a un erlenmeier de 150 ml, netejant el gresol amb 10 ml d'H₂O. Afegir 20 ml de HCl 37% i evaporar-ho totalment a la placa calefactora (procurant que no esquitxi). Refredar i dissoldre el residu amb HNO₃ 10% (10 ml). Fer bullir durant 5 minuts (sense que arribi a secar-se totalment) i filtrar sobre un matrau aforat de 500 ml netejant el vas amb H₂O i enrassar.

A 10 ml de la solució mostra s'afegeix el reactiu de color (10 ml de solució de nitro-molibdo-vanadat), agitar, deixar en repòs durant 10 minuts i llegir a 430 nm front a aire (després s'hauran de restar els blancs). El blanc mostra es prepara afegint 10 ml del reactiu de color a 10 ml de la solució de blanc de la corba patró.

Preparació de la corba patró: Preparar en aforat de 100 ml solucions que continguin 5, 10, 20, 30 i 40 ppm de fòsfor partint del patró de fòsfor (1000 ppm). De cada punt de la corba agafar 10 ml i afegir 10 ml de solució nitro-molibdo-vanadat. El blanc de la corba patró es prepara amb 10 ml de H₂O més el reactiu de color.

12.1.4. Càlculs.

$\% \text{ P total} = \text{ppm P} * \frac{500}{\text{pes mostra (g)}} * \frac{1}{1000} * \frac{1}{1000} * 100$
$\text{ppm P} = \frac{\text{Abs - blanc} * \text{ordenada}}{\text{pendent}}$

12.1.5. Exactitud i precisió.

La diferència entre el resultat de dues determinacions successives no pot passar de 3 % en valor relatiu, en continguts de fòsfor inferiors al 5% i del 0.15 % en valor absolut, en continguts de fòsfor igual o superior a 5.

12.1.6. Aspectes de seguretat i higiene.

S'ha de treballar sempre sota la campana extractora i guants.

Tot el que contingui solució nitro-molibdo-vanadato s'ha de llençar en l'envàs de residus n° 4.

12.2. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT FITASA EN PRODUCTES ENZIMÀTICS I EN PINSOS

Aquest mètode serveix per a determinar l'activitat fitasa present en productes enzimàtics comercials, en matèries primeres i en pinsos acabats.

12.2.1. Introducció.

La fitasa s'extreu dels pinsos o dels productes, i es determina la seva activitat deixant que l'enzim reaccioni sobre fitat sòdic (mio-inositol-hexakisfosfat) en condicions definides: 37° C de temperatura, pH 5.5, 60 minuts de temps de reacció i concentració inicial d'àcid fític 5 mM. El fòsfor inorgànic alliberat (PO_4^{3-}) es determina espectrefotomètricament (415 nm) després de la formació d'un complex amb molibdovanadat. Una unitat fitasa (FTU) es defineix com la quantitat d'enzim que en condicions estàndard (37° C, pH 5.5, temps de reacció de 60 minuts i concentració d'àcid fític 5 mM) allibera 1 μmol de fosfat (PO_4^{3-}) per minut.

El mètode no distingeix entre activitat fitasa endògena o exògena.

12.2.2. Reactius i solucions.

Reactius: àcid acètic glacial, hidròxid amònic al 30%; àcid nítric 60%; heptamolibdat amònic 4-hidrat $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$; metavanadat amònic (NH_4VO_3); clorur càlcic 2-hidrat ($\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$); dihidrògenfosfat potàsic (KH_2PO_4); acetat sòdic 3-hidrat; fitat sòdic (mio-inositol-hexakisfosfat) d'arròs Sigma P-3168

Solucions: - Solució d'àcid nítric: Diluir 500 ml d'àcid nítric (60%) a 1000 ml amb aigua. Guardar la solució a temperatura ambient. Caducitat: 3 mesos.

- Reactiu de molibdat: Dissoldre 100 grams de $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ en aproximadament 800 ml d'aigua destil lades. Afegir 10 ml d'hidròxid amònic (30%), i diluir-lo a 1000 ml amb aigua destil lada. Aquest reactiu es conserva a les fosques. Caducitat: 8 setmanes.

- Reactiu de metavanadat: Diluir 2.35 grams de NH_4VO_3 amb aprox. 400 ml d'aigua destil lada i escalfar-ho a 50-60°C fins que es dissolgui. Afegir 20 ml de la solució d'àcid nítric i portar-ho a

1000 ml amb aigua destil·lada. Aquest reactiu es conserva a les fosques a temperatura ambient.
Caducitat: 8 setmanes.

- Reactiu de “stop” de molibdovanadat: Barrejar 50 ml de la solució de molibdat amb 50 ml de la solució de vanadat i afegir 100 ml de la solució d'àcid nítric, amb agitació continua. El reactiu es conserva a temperatura ambient, però cal preparar-lo de nou cada dia, just abans de ser utilitzat.

- Tampó d'acetat 0.1 M pH 5.5: Dissoldre 1.76 grams d'àcid acètic glacial, 30.02 grams d'acetat sòdic 3-hidrat i 0.147 grams de clorur càlcic 2-hidrat en 900 ml d'aigua, ajustar el pH a 5.5 amb àcid acètic glacial i diluir a 1000 ml. Aquest tampó es conserva a temperatura ambient. Caducitat: 1 setmana.

- Solució de clorur càlcic 10%: Dissoldre 100 grams de clorur càlcic 2-hidrat en aprox. 800 ml d'aigua destil·lada i portar a 1000 ml. Aquesta solució es conserva a temperatura ambient. Caducitat 3 mesos.

- Solució de fitat sòdic (substrat): Dissoldre 8.40 grams de fitat sòdic en 900 ml de la solució tampó d'acetat, ajustar el pH a 5.5 amb àcid acètic (4M) i diluir a 1000 ml. La solució de substrat es guarda a temperatura ambient, però cal preparar-la cada dia just abans de ser emprada.

- Solució patró de fosfat 50 mM: Dissoldre 0.7 grams de KH_2PO_4 sec en 100 ml de solució tampó d'acetat. Aquesta solució mare es conserva en la nevera a 2-5°C. Caducitat: 1 setmana.

- Preparació solució estàndard de fosfat 10mM: Diluir 1 ml de la solució patró de fosfat amb 4 ml de tampó acetat. Aquesta solució es conserva a temperatura ambient però cal preparar-la cada dia.

12.2.3. Procediment analític.

Extracció de l'enzim del pinso: Pesat per duplicat 40 grams de pinso i afegir a cadascuna 800 ml d'aigua destil·lada i 16 ml de solució de clorur càlcic (Si l'absorbència final a 415 nm és superior a 0.8 unitats d'absorbència, la mostra cal diluir-la en aquesta etapa). Agitar magnèticament la solució de pinso durant 60 minuts. Després, passar uns 5 ml aproximadament de cada solució a tubs de centrífuga, i centrifugar a 3000 rpm durant 5 minuts.

Extracció de l'enzim de productes: Pesar 1 g de mostra en aforat de 100 ml, posar 90 ml d'H₂O més 2 ml de solució clorur càlcic i posar-ho en bany d'ultrasons durant 5 minuts. Enrasar amb H₂O i agitar durant 60 minuts a temperatura ambient. Agafar 1 ml, posar-lo en un aforat de 100 ml i afegir 2 ml de solució clorur de calci i enrasar amb H₂O. A partir d'aquest punt, seguir amb el mètode de pinsos.

Anàlisi de l'activitat fitasa: Cal fer l'anàlisi abans de 90 minuts de l'inici de l'extracció de l'enzim. De cadascun dels anteriors tubs de centrífuga, prendre 4 vegades 100 µlitres de sobrenadant i posar-los en 4 tubs d'assaig, que després es puguin centrifugar (tres d'aquests tubs s'utilitzaran per a la determinació de fitasa de la mostra i el quart tub s'utilitzarà com a blanc de reacció (BR)). A més, en cada tanda d'anàlisi cal posar: 4 tubs amb 100 µlitres de solució estàndard de fosfat 10 mM i 4 tubs amb 100 µlitres de tampó d'acetat. Tractar tots els tubs, excepte els marcats com (BR) (blanc de reacció: 2 tubs per mostra), de la següent forma: a t=0 s'afegeixen 3 ml de solució de substrat de fitat, s'agiten els tubs amb el vòrtex mixer, i es posen els tubs en el bany termostàtic a 37°C; a t=60 minuts, s'afegeixen 2 ml de la solució stop de molibdovanadat, s'agiten els tubs en el vòrtex mixer i es posen a temperatura ambient.

Un cop ha començat la reacció de l'enzim tal com es descriu prèviament, tractar els tubs marcats com blanc de reacció (BR) de la següent forma: afegir 2 ml de la solució stop de molibdovanadat i immediatament els 3 ml de la solució substrat de fitat sòdic. Agitar els tubs amb el vòrtex mixer i deixar-los a temperatura ambient.

A t=90-120 minuts, centrifugar tots els tubs a 3000 rpm durant 5 minuts; i a t=120-180 minuts, llegir l'absorbència a 415 nm de tots els tubs front H₂O.

12.2.4. Càlculs.

Per a cada mostra, calcular l'increment d'absorbència:

$$D_{Abs,415} = Abs_{415, mostra} - Abs_{415, BR}$$

essent: mostra = mitjana d'absorbència dels tres tubs amb mostra i enzim.

Calcular l' Abs_{fosfat} , restant-li l'absorbència del tampó.

Calcular l'activitat fitasa com μmols de fosfat alliberat per minut per gram de pinso, emprant la següent formula:

$$\text{FTU / g} = \frac{\mathbf{B \times P}}{\mathbf{A \times E \times T}}$$

essent:

$B = D_{\text{Abs},415}$ $P =$ Concentració de fosfat de l'estàndard en la reacció (normalment 1 mM)

$A = D_{\text{Abs},415,\text{fosfat}}$ $E =$ pes de la mostra de pinso en grams en reacció $T =$ temps de reacció.

12.2.5. Exactitud i precisió.

Precisió: En productes, el coeficient de variació estimat és de 2.5 %. En pinsos, el coeficient de variació estimat és entre 5-10 %. El límit de detecció està establert és de 0.004 FTU. La recuperació de fitasa hauria d'estar al voltant de $\pm 10\%$

L'absorbència a 415 nm d'una solució estàndard de fosfat 10 mM és aprox. 0.37. La resposta a la concentració de fosfat és lineal fins a una absorbència de 1.5

12.2.6. Aspectes de seguretat i higiene.

Treballar amb guants i ulleres de seguretat quan es manipuli l'àcid acètic glacial, l'àcid nítric i l'hidròxid amònic.

12.2.7. Bibliografia.

Engelen, A.J., Van der Heeft, F.C., Randsdorp, P.H.G. and Smit, E.L.C. (1994). Simple and rapid determination of phytase activity. J. AOAC, 77: 760-764.

Off. J.Eur.Comm. (1971), L279/7, 994-995