



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



USO DE FITASA Y DE UN COMPLEJO ENZIMÁTICO A BASE
DE XILANASA, α -AMILASA Y PROTEASA SOBRE VARIABLES
PRODUCTIVAS Y DIGESTIBILIDAD DE CALCIO Y FÓSFORO
EN GALLINAS COMERCIALES

BENJAMÍN GASTÓN ROBERTO DÍAZ ROJAS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Fomento de la
Producción Animal.

PROFESOR GUÍA: DR. JAVIER GONZÁLEZ F.

SANTIAGO, CHILE

2004



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



USO DE FITASA Y DE UN COMPLEJO ENZIMATICO A BASE
DE XILANASA, α -AMILASA Y PROTEASA SOBRE VARIABLES
PRODUCTIVAS Y DIGESTIBILIDAD DE CALCIO Y FÓSFORO
Y EN GALLINAS COMERCIALES

BENJAMÍN GASTÓN ROBERTO DÍAZ ROJAS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Fomento de la
Producción Animal.

NOTA FINAL: _____

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA:	DR. JAVIER GONZÁLEZ F.	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO:	DR. SERGIO CORNEJO V.	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO:	DR. HÉCTOR HIDALGO O.	_____	_____

SANTIAGO, CHILE

2004

PARA MIS PADRES, ABUELITOS Y PADRINOS

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mis padres **Benjamín Gastón Díaz Cárdenas** y **María Emelia Rojas Zepeda** por su gran apoyo en ésta extensa y dura Tesis que da término a mi etapa universitaria y da comienzo a mi etapa profesional. En segundo lugar a mi querida hermana **Beatriz** por su apoyo incondicional en los momentos más duros y a mi sobrina y ahijada **Natalie** por estar siempre dándome momentos de alegría.

A mi tía **Adriana García** por su gran sabiduría y oportunos consejos en los momentos que más los necesitaba. Realmente ha sido un puntal a lo largo de toda mi carrera y fundamental para lograr este trabajo.

Al **Dr. Javier González** por haber depositado su confianza en mí a lo largo de todo el desarrollo de la tesis en diversas tareas. Al **Dr. Sergio Cornejo** por su apoyo en los trabajos prácticos del galpón que requirieron de mucha ayuda y comprensión. Al **Dr. Néstor González** por facilitarme información bibliográfica y su gran experiencia que fueron de gran ayuda para el desarrollo de este trabajo.

A la **Dra. Valeria Rojas**, por guiarme en el desarrollo del modelo estadístico a través de la utilización del programa SAS.

Al **Dr. Nelson Barría**, por su disposición a ayudarnos a definir el modelo estadístico junto con mi profesor guía y el Dr. Sergio Cornejo.

Al **Dr. Héctor Hidalgo**, por su buena disposición en la revisión de mi tesis.

A mi amigo **Luchito Vera**, por su gran compañerismo y fraternidad en los momentos difíciles, a quien realmente no conocía, pero terminó siendo un verdadero amigo para mí. Que si no hubiera sido por su gran ayuda esta tesis no la hubiera podido terminar. Además que, sin lugar a dudas, sin su liderazgo en el galpón el trabajo con nuestras “ñoñas” no hubiera sido el mismo.

A mi gran amigo **Enrique Bombal**, por su apoyo e interés en ayudarme sirviendo siempre como un guía importante en el desarrollo de ésta.

A mi amigo **Francisco Pérez**, por su apoyo fotográfico, que sin su ayuda no hubiera podido presentar las fotos incluídas en este trabajo.

A mi amiga **Katherine Bombal**, por su apoyo incondicional especialmente al término de esta tesis.

A mis compañeros de galpón **Carlitos** y **Susan**, por su amistad y convivencia en la extensa parte práctica, que junto con Luchito fuimos el mejor Team que ha pasado por el galpón.

A **Javier Chica** por su incondicional ayuda y tiempo destinado a la entrega de conocimiento teórico y práctico en el período que estuvo en Chile.

Al **Sr. Alfredo Varela**, por su excelente disposición y ayuda constante durante el transcurso del proyecto.

A **Centrovét S.A.** por su colaboración y buena disposición al permitirme utilizar sus dependencias para la elaboración de las dietas, y su constante ayuda y entrega de información que fueron de mucha utilidad en el desarrollo de esta tesis.

A todas las personas que he olvidado mencionar y colaboraron en este trabajo.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
CALCIO Y FÓSFORO	3
Importancia del Ca y P	3
Ca y P para la formación de la cáscara	4
Interrelaciones entre Ca, P y Vitamina D.....	6
Deficiencias de Ca y P.....	6
Requerimientos y aportes de Ca y P en las gallinas ponedoras.	7
Impacto del P en el medio ambiente.	9
MATERIAS PRIMAS DE RELEVANCIA.....	12
Cereales.....	12
Maíz.....	17
Trigo.....	19
Leguminosas.....	21
Soya.....	22
FACTORES ANTINUTRICIONALES (FAN) EN LAS MATERIAS PRIMAS.....	23
POLISACÁRIDOS NO AMILÁCEOS.....	23
FITATOS.....	31
OTROS FAN DE IMPORTANCIA.....	35
DIGESTIBILIDAD ILEAL.....	38
Concepto de Digestibilidad	38
Medición de la Digestibilidad	38
Métodos Indicadores.....	39
ENZIMAS.....	41
Generalidades	41
Enzimas en Nutrición Animal.....	42
ENZIMAS EXÓGENAS UTILIZADAS EN ALIMENTACIÓN AVÍCOLA.....	48
FITASAS	50
Generalidades	50
Descripción de la Fitasa en Estudio	57
Bioeficacia de la Fitasa	57
EL COMPLEJO MULTIENZIMÁTICO	65
Mecanismos de acción del complejo Multienzimático (CME).....	65
Efecto del CME en la variabilidad de los ingredientes.	69
Efecto del CME sobre la microflora intestinal.....	70
Aplicación del CME en dietas de aves ponedoras.....	72
Descripción del Complejo Enzimático en estudio	72
Bioeficacia del CME.....	73
HIPÓTESIS DE TRABAJO	77
OBJETIVO GENERAL	77
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	78
MATERIALES Y MÉTODOS.....	78

INDICADORES PRODUCTIVOS Y DE CALIDAD EXTERNA DEL HUEVO.....	80
DIGESTIBILIDAD ILEAL APARENTE.....	84
MARGEN BRUTO.....	88
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	89
RESULTADOS.....	91
INDICADORES PRODUCTIVOS.....	91
INDICADORES DE CALIDAD EXTERNA DEL HUEVO	95
DIGESTIBILIDAD ILEAL APARENTE.....	97
MARGEN BRUTO.....	99
DISCUSIÓN	101
CONCLUSIONES.....	115
BIBLIOGRAFÍA.....	116
ANEXO A. Gráficos de comportamiento de los indicadores evaluados durante el período experimental.....	142
ANEXO B. Tablas de resultados analíticos.....	159
ANEXO C. Fotografías de manejos productivos realizados en la unidad experimental de gallinas de postura de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile	163
ANEXO D. Fotografías de insumos usados, procedimientos realizados y equipos utilizados en el estudio de digestibilidad ileal aparente.....	172

RESUMEN

Se desarrolló un estudio con el fin de evaluar el efecto de la incorporación de una enzima fitasa y de un complejo multi enzimático (CME) compuesto por α -amilasas, proteasas y xilanasas sobre los parámetros productivos, algunos indicadores de la calidad externa del huevo, margen bruto y digestibilidad ileal aparente de calcio y fósforo. Se utilizaron 144 gallinas Leghorn Hy-line W-36 durante 34 semanas a partir de las 18 semanas de edad, siendo distribuidas aleatoriamente en 36 jaulas de 4 gallinas cada una (338 cm^2 por ave) en un diseño factorial de 2×2 . El diseño tuvo 4 tratamientos con 3 repeticiones de 3 jaulas cada una, en el cual las variables evaluadas fueron la incorporación o no de 300 unidades de fitasa/kg. de alimento y la inclusión o no de 375 gr. /ton. del CME, cuya composición es de 600 u/g. xilanasas, 800 u/g. α -amilasa y 8000 u/g. proteasa. Las dietas empleadas fueron a base en maíz, soya y afrechillo de trigo. Al término del período experimental, se realizó un estudio de digestibilidad ileal aparente de calcio y fósforo.

Los resultados no mostraron un efecto significativo ($p > 0,05$) de la fitasa o del CME sobre la masa del huevo, la ECA, el porcentaje de huevos sin cáscara, huevos trizados y la digestibilidad ileal aparente de calcio.

La suplementación de fitasa aumentó significativamente ($p < 0,05$) el porcentaje de postura, disminuyó el peso de huevo, el consumo de alimento y el peso corporal ($p < 0,05$), sin embargo, no afectó significativamente ($p > 0,05$) el porcentaje de huevos quebrados o la digestibilidad ileal de fósforo. Por otra parte, la incorporación del CME aumentó ($p < 0,05$) el peso del huevo, la digestibilidad ileal del fósforo, el consumo de alimento y peso corporal ($p < 0,05$), disminuyendo ($p < 0,05$) el porcentaje de postura y el porcentaje de huevos

quebrados. También, se registró una interacción entre la incorporación de ambas enzimas para el peso de huevo, consumo de alimento, porcentaje de huevos sin cáscara y huevos quebrados. Con respecto al calculo de margen bruto, la fitasa mejoró la rentabilidad de las dietas en un 7,38%, equivalente a \$193 por ave alojada, mientras el C.M.E. disminuyó la rentabilidad de las dietas en un 4,71%, equivalente a \$120 por ave alojada.

Si bien en este estudio la fitasa ratificó su efecto mejorador de la postura y MB, y una disminución en el consumo de alimento y el peso corporal y el CME reafirmó su efecto de aumentar el peso del huevo, al usar ambos suplementos combinados no se evidenciaron mejoras superiores a los efectos producidos en forma individual, sino mas bien tendieron a atenuarse.

Por otra parte, el efecto del CME sobre la digestibilidad ileal del P fue inesperadamente alto. Este hecho genera una serie de interrogantes que aún no han sido aclaradas, por lo que se hace necesario realizar más estudios para conocer sus respuestas.

Palabras claves: Gallinas ponedoras; fitasas; α -amilasas; proteasas; xilanasas; indicadores productivos; digestibilidad de calcio y fósforo; margen bruto.

SUMMARY

This study evaluated the effect of the inclusion of the phytase enzyme and one enzymatic complex (EC) containing α -amylase, protease and xylanase, added in commercial layers diets on production parameters, some external egg quality indicators, feed costs and the ileal apparent digestibility of phosphorus and calcium.

In this experiment, one hundred and forty four Leghorn Hy-line W-36 hens were randomly assigned to 4 treatments with 3 replicates of 36 hens (9 pens with 4 hens each) and analyzed in a 2x2 factorial arrangement. The laying hens were fed diets with or without 300 units of phytase/ kilogram of feed and with or without EC (600 units/g. of xylanase, 800 u/g. α -amylase and 8000 u/g. protease).

The dietary treatments consisted of: 1.) Control without enzyme supplementation 2.) 300 FTU of phytase 3.) Avizyme 1502 (xylanase, amylase and protease) 4.) Both enzymes supplementations.

At the end of the experimental period, a determination of apparent ileal digestibility of calcium and phosphorus was made.

The addition of phytase or the CME were not significant ($p>0,05$) on the egg mass, feed conversion; percentage of cracked and shell-less eggs; and the apparent ileal digestibility of calcium.

The supplementation of phytase significantly increased ($p<0,05$) egg production, in addition egg weight, feed consumption and body weight decreased. However, the addition of phytase had not significant ($p>0,05$) effect on percentage of broken eggs or ileal phosphorus digestibility. On the other hand, the incorporation of the CME increased egg weight, feed consumption, body weight and ileal phosphorus digestibility ($p<0,05$) and significantly decreased ($p<0,05$) egg production and percentage of broken eggs. Also, an

interaction between the incorporation of both enzymes for egg weight, feed consumption, percentage of broken and shell-less eggs was registered. In the gross margin, the phytase improved the yield of the diets in a 7.38%, equivalent to \$193 by hen-housed, while the CME decreased the yield of the diets in a 4.71%, equivalent to \$120 by hen-housed.

Although in this study phytase ratified its effect enhancer of egg production and MB, and feed consumption and body weight decrease, in addition the CME reaffirmed its effect to increase the egg weight, when using both combined supplements did not show improvements over to the individual effect of each enzyme, but they tended to attenuate themselves.

On the other hand, the effect of the CME on the ileal digestibilidad of the P was unexpectedly high. This fact generates a series of questions that not yet have been clarified, reason why it becomes necessary to make more studies to know his answers.

Key Words: White Leghorn layers; corn-soy and wheat bran; phytase; α -amilase; protease; xylanase; production parameters; external egg quality; apparent ileal digestibility of calcium and phosphorus; gross margin or feed cost.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo sostenido de la industria avícola chilena, especialmente en pollos broilers y gallinas comerciales, ha llevado a las empresas a buscar alternativas alimenticias que permitan disminuir los costos de alimentación en las aves. Dentro de éstas, el empleo de diferentes enzimas exógenas suplementadas en la dieta permiten mejorar la digestibilidad del alimento actuando sobre aquellos componentes menos digestibles, haciéndolos más accesibles a la actividad de las enzimas digestivas y permitiendo una mejor asimilación de los nutrientes del alimento.

Además, las enzimas pueden mejorar la digestibilidad a través de su acción sobre la alteración de los factores antinutricionales (FAN) presentes en algunas materias primas. También se ha observado que el uso de enzimas es más efectivo cuando se usan complejos enzimáticos, los cuales incluyen más de una enzima, ya que se amplía su espectro de acción en distintos sustratos ejerciendo un efecto aditivo complementario.

La gallina ponedora moderna altamente productiva, es extremadamente sensible a las deficiencias nutritivas sean éstas severas o marginales. Es por esto que aparte de la energía y aminoácidos, también los macrominerales como el calcio (Ca) y el fósforo (P) y los minerales traza son nutrientes críticos en las raciones. Los insumos normalmente utilizados en las dietas de gallinas comerciales no aportan suficiente P como para cubrir el requerimiento de estas aves y por lo tanto su suplementación a través de fosfatos de Ca inorgánicos es una necesidad.

A pesar de lo dicho anteriormente, hace ya algunos años ha habido una reducción del uso de fosfatos inorgánicos, principalmente en Estados Unidos y Europa, sin embargo, a nivel nacional ésta reducción no ha sido tan manifiesta.

La razón radica principalmente en el negativo impacto ambiental que ocasionan las emisiones de P provenientes de las deyecciones de las aves en estos países. Por este motivo y gracias a la llegada de la Ingeniería Genética, que abarató sus costos, aumentó el uso de fitasas de origen microbial, que vendrían a reemplazar, “en parte”, el aporte de P de los fosfatos inorgánicos en la ración. Adicionalmente el uso de fitasa en algunos mercados, incluido el nacional, reduce los costos de alimentación, lo cual explica la principal razón de su empleo en las dietas en Chile.

La enzima fitasa hidroliza la unión del P a la molécula de ácido fítico o “fitato”, que es la forma de P más frecuente de encontrar en los alimentos de origen vegetal (entre 60 a 90%). Esta degradación hace que el P unido al fitato, el cual no es disponible en forma natural, tenga una mayor disponibilidad para las aves.

Actualmente a nivel nacional el uso de fitasa en la dieta de gallinas comerciales ha aumentado significativamente, siendo el uso de complejos enzimáticos orientados a dietas a base de maíz y soya solo marginal y no necesariamente combinada con fitasa. En otras naciones se elaboran raciones de gallinas comerciales con ambos suplementos, sin embargo, no existen mayores estudios que ratifiquen su eficacia. Por esta razón se ha estimado necesario evaluar la efectividad de la suplementación de un complejo enzimático a base de proteasas, α -amilasas y xilanasas junto con la administración de una fitasa microbial en dietas a base de maíz y afrecho de soya en gallinas de postura comercial.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CALCIO Y FÓSFORO

El Ca y el P son nutrientes esenciales para las gallinas ponedoras. Estos dos elementos serán estudiados juntos debido a que están íntimamente relacionados en el crecimiento y en el desarrollo estructural y metabólico (Scott *et al.*, 1982; Maynard *et al.*, 1998; Boling *et al.*, 2000a; Sohail y Roland, 2002). De hecho, más del 70% de la ceniza del organismo está formada de Ca y P. La mayoría de las veces llegan al organismo combinado uno con el otro y un aporte inadecuado de cualquiera de ellos en la dieta limita el valor nutritivo de ambos (Maynard *et al.*, 1998).

Importancia del Ca y P.

Aproximadamente el 99% del Ca y el 80% del P se encuentran presentes en los huesos, el porcentaje restante de Ca se encuentra distribuido en los otros tejidos del organismo. El Ca realiza diversas funciones en el organismo, dentro de las cuales podemos mencionar que intervienen en la formación de los huesos y en el crecimiento y desarrollo de las aves. En el crecimiento de los pollos la mayor proporción del Ca de la dieta está destinada a la formación de los huesos, mientras que en las aves adultas la mayor proporción es usada para la formación de la cáscara del huevo. El Ca también es esencial en la coagulación sanguínea (participa en la transformación de protrombina a trombina), en la contracción muscular esquelética y cardíaca (junto con el sodio y el potasio), en la excitabilidad neuronal, en la mantención del equilibrio ácido- base, en la activación enzimática y en la secreción de varias hormonas y factores de liberación hormonal (Scott *et al.*, 1982; Maynard *et al.*, 1998).

Por otra parte, el P se encuentra en los tejidos blandos del cuerpo en proporciones que oscilan entre 0,15 y 0,2 % formando parte de fosfoproteínas, núcleoproteínas, fosfolípidos, fosfocreatina y hexosafosfato (Maynard *et al.*, 1998). Es fundamental en los procesos de desarrollo óseo, metabolismo energético de carbohidratos, proteínas y grasas; transporte de Ca y de tamponamiento o buffer sanguíneo (Scott *et al.*, 1982). Se relaciona con el control del apetito, ganancia de peso, eficiencia alimenticia y calidad de la cáscara (Mc Dowell, 1992). Además, el fosfato es el componente de muchos sistemas enzimáticos, ácidos nucleicos y coenzimas (Maynard *et al.*, 1998).

Ca y P para la formación de la cáscara del huevo.

Varios estudios han revelado la importancia del Ca y el P en la formación de la cáscara. La mayoría de las cáscaras de buena calidad de las gallinas comerciales contienen aproximadamente 2,2 gramos de Ca en forma de carbonato de Ca. Alrededor del 95% de la materia seca de la cáscara es carbonato de Ca, un 0,3% de P y un 0,3% de magnesio y minerales traza (Butcher y Miles, 1990).

Se ha observado que los estrógenos actúan sobre el metabolismo del Ca antes del inicio de la producción de huevos. El estradiol-17 β aumenta el nivel de Ca sérico en la sangre por un aumento en la densidad de los receptores de la hormona paratiroidea en los riñones e indirectamente en la actividad renal de la 1- α -hidroxilasa. La 1- α -hidroxilasa se cree que es la responsable de la formación del 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25-(OH) $_2$ D $_3$), la cual está disponible para intervenir en la absorción del Ca y P a nivel intestinal por una vía transcelular saturable. Así, se ha descrito que los implantes de estradiol (E $_2$) en gallinas ponedoras mejoran la absorción de Ca a través del intestino (Franco y Beck, 2003). Por otra parte, también se ha visto que la enzima anhidrasa carbónica está

involucrada en la entrega de la porción carbonatada del carbonato de Ca para la formación de la cáscara (Scott *et al.*, 1982).

Las gallinas sólo retienen alrededor del 50% de la ingesta de Ca. A modo de ejemplo, una gallina que ingiere 3,6 gramos de Ca por día, retiene alrededor 1,8 gramos de Ca. Debido a que un huevo promedio contiene alrededor de 2,0-2,2 gramos de Ca y la gallina consume el alimento durante las 16 horas de luz disponible¹, ésta debe remover aproximadamente entre 0,2 a 0,4 gramos de Ca de sus huesos durante la noche, mientras los huevos están siendo calcificados. Una manera de atenuar este hecho es a través de la suplementación de partículas de carbonato de Ca de gran tamaño, las cuales al ser degradadas lentamente permite disponer de una fuente constante de Ca durante las 24 horas. Esto permite una absorción del Ca a una razón de 100mg por hora logrando una retención de 2,4 gramos de Ca, cifra superior a los 2,0-2,2 gramos necesarios para obtener una buena calidad de cáscara (Scott *et al.*, 1982).

El P también tiene gran relevancia en la formación de la cáscara, está presente en la cutícula, en la capa interna como hidroxapatita (Dennis *et al.*, 1996) y en la capa externa formando parte de fosfoproteínas (Nys *et al.*, 1991). Se ha encontrado la presencia de P inorgánico durante la formación de la cutícula en el fluido (Ogasawara, *et al.*, 1974) y en la mucosa de la glándula de la cáscara (Klingensmith y Hester, 1983), además de la presencia de fósforo orgánico insoluble (Nys *et al.*, 1991).

¹ Comunicación Personal Dr. Javier González

Interrelaciones entre Ca, P y Vitamina D.

La nutrición adecuada de Ca y P dependen de 3 factores que están relacionados entre sí y ellos son (Maynard *et al.*, 1998):

1. Suficiente aporte de cada elemento en las dietas.
2. Equilibrio correcto entre Ca y P en las dietas.
3. La presencia de vitamina D.

Si bien el aporte de cantidades suficientes de estos elementos es esencial, son más efectivos si se emplean en la proporción adecuada. En el caso de las aves de engorda, se ha encontrado que la relación de Ca:P necesaria para obtener un crecimiento normal de las aves varía entre 1.0:1 y 2.2:1. Una razón de 2.5:1 aparece en el límite, mientras que una razón de 3.3:1 es desastrosa, produciendo raquitismo y otras anormalidades en las patas (Scott *et al.*, 1982). En las gallinas de postura de la línea Hy-Line[®] W-36 la relación Ca:P fluctúa entre 5.55-5.70, 6.16-6.33, 7.04-7.22 y 8.13-8.33 desde el 50% de producción de huevos hasta las 32, 32-44, 44-58 y mayores a 58 semanas de edad, respectivamente². Cualquier alteración de esta relación disminuye la eficiencia de asimilación del Ca o P según corresponda, sin embargo en raciones abundantes en vitamina D, las proporciones Ca:P tendrán menor importancia, y se hace una utilización más eficiente de las cantidades de ambos minerales. En ausencia de vitamina D, la asimilación de estos dos elementos será pobre, aún cuando los otros factores sean óptimos (Maynard *et al.*, 1998).

Deficiencias de Ca y P.

Los signos de deficiencia de Ca incluyen retardo en el crecimiento, disminución del consumo de alimento, una alta tasa metabólica basal,

² Hy-Line Internacional, P.O. Box 65190, West Des Moines, Iowa 50265, E.E.U.U.

disminución de la actividad y sensibilidad, osteoporosis o raquitismo, postura y desplazamiento anormal, susceptibilidad a hemorragias internas, un gran aumento en el volumen urinario, tetania y producción de cáscaras delgadas. Los huesos de las aves deficientes están marcadamente desmineralizados y los contenidos de ceniza y Ca se reducen a la mitad de un ave normal. También, se ha observado que deficiencias de Ca por un largo período de tiempo en gallinas de postura ha disminuido la producción de huevos o la ha cesado. Sin embargo, por razones que se desconocen, algunas gallinas ocasionalmente continúan con la postura en una alta proporción aún cuando reciben dietas deficientes en Ca. Cuando esto ocurre el Ca es retirado de los huesos, predisponiendo a que las gallinas se fracturen fácilmente al no poder soportar el peso de sus cuerpos. Así, las gallinas permanecen postradas, incluso llegando a morir (Scott *et al.*, 1982).

Deficiencias severas de P en la dieta producirán una rápida pérdida del apetito, decaimiento y muerte en pollos, en un periodo de 10 a 12 días. Una deficiencia menos severa causa raquitismo y falta de crecimiento en aves jóvenes y fatiga de jaula en gallinas ponedoras con mayor incidencia en los primeros 7 meses de producción (Harms y Miles, 1977; Scott *et al.*, 1982).

Requerimientos y aportes de Ca y P en las gallinas ponedoras.

El NRC (1994) indica que los consumos mínimos de Ca para gallinas ponedoras blancas son de 3,25g/gallina/día en gallinas mayores a 18 semanas de edad para consumos de 80 a 120 g de alimento. A nivel productivo nacional los niveles de Ca utilizados son de 3,8 g, 4,0 g y 4,2 g de Ca disponible a las 17-28, 28-50 y mayores a 50 semanas de edad, respectivamente³. Con respecto al fósforo no fítico (FNF), según el NRC (1994), las aves presentan consumos de 0,25 g/gallina/día en gallinas mayores a 18 semanas de edad para consumos de

³ Comunicación Personal Dr. Javier González

80 a 120 g de alimento. En cambio, los niveles de FNF utilizados comúnmente por los productores son de 0,40 g (para 17-28 semanas de edad), 0,38 g (para 28-50 semanas) y 0,36 g (para mayores 50 semanas)⁴.

Debido a la importancia del Ca y del P como nutrientes esenciales en las dietas para gallinas ponedoras, se han realizado varios estudios con el propósito de determinar los niveles de Ca y P disponible necesarios para mantener un rendimiento óptimo. Lundeen (2000) señaló que los niveles de Ca sobre 6,5% de la dieta no produjeron un efecto adverso cuando los niveles de P disponible (FD) fueron adecuados (0,5%) durante un experimento que se realizó desde las 20 a 66 semanas de edad. Sin embargo, la producción se vió significativamente reducida y la mortalidad aumentada cuando la dieta contenía 6,5% de Ca y un nivel marginal de 0,2% de FD, lo que concuerda con lo observado por Vandepopuliere y Lyons (1992), aunque ellos trabajaron con niveles constantes de Ca de 3,44%. La dieta con 6,5% de Ca y 0,2% de FD proporcionó una relación de Ca:P de 32,5:1, enfatizando que esta relación causó un menor rendimiento y una alta mortalidad (Lundeen, 2000). Por otra parte, otros resultados descritos por el mismo autor, indican que con niveles dietarios de Ca sobre el 5,5% con un nivel constante de FD de 0,4% desde las 20 a 66 semanas de edad no produjeron efectos adversos en el rendimiento o efectos benéficos en la calidad de la cáscara en comparación con el grupo control (alimentado con una dieta con 3,5% de Ca y 0,4% de FD). Algo similar ocurrió con niveles descendentes de FD de 0,4-0,3-0,2% (a las 20-36, 36-54 y 54-66 semanas de edad, respectivamente) con un nivel constante de Ca (3,5%) (Lundeen, 2000).

Otros regímenes dietarios, incluyeron niveles de Ca ascendentes con la edad con un nivel constante de FD, niveles de FD descendentes con la edad con un nivel constante de Ca o una combinación de niveles de Ca ascendentes con

⁴ Comunicación Personal Dr. Javier González

niveles de FD descendentes, los cuales no tuvieron un efecto benéfico en la calidad de la cáscara (Lundeen, 2000).

Sohail y Roland (2002) encontraron que niveles de P disponible (FD) de 0,3 a 0,4% lograron los máximos rendimientos en gallinas ponedoras de 21 a 38 semanas de edad, utilizando dos niveles distintos de Ca (3 y 4%). Resultados similares fueron los encontrados por Kamińska *et al.* (1994) con 0,35% de FD, quién también observó una buena calidad de la cáscara usando niveles de 3 y 3,4% de Ca.

Garlich (1979) planteó la hipótesis de que la hipofosfatemia estimula la producción de vitamina D₃ y, así, la resorción ósea; la hipercalcemia resultante mejoraría la calidad de la cáscara.

Frost y Roland (1991) midieron la respuesta sobre la calcificación de la cáscara al usar distintos niveles de Ca y P dietario, sometiendo a prueba la hipótesis mencionada anteriormente, como resultado se obtuvo que el nivel de Ca dietario no afectó al del Ca total sanguíneo, ni la fosfatemia, pero sí hubo una relación positiva con el aumento del Ca ionizado (Ca⁺⁺) sanguíneo, y de éste con un aumento de la gravedad específica. Por su parte el nivel de P dietario no afecta ni la fosfatemia ni la calcemia (nivel de Ca ionizado sanguíneo); sin embargo, un menor P dietario sí disminuye la natremia y el nivel de Ca total sanguíneo. Por lo tanto, el P dietario no influyó en la calcificación de la cáscara (Frost y Roland, 1991). No obstante, los mismos autores señalan en este trabajo que el bajo nivel de P solo afecta cuando el Ca también es insuficiente, produciéndose mayor resorción ósea y, como consecuencia, huesos débiles.

Impacto del P en el medio ambiente.

Pese a que el P es un nutriente esencial en la alimentación de aves y que los insumos vegetales tienen un alto contenido de P, este se encuentra en una alta proporción en forma de fitato, que en gran medida, no está disponible para las

aves (Sutton y Lander, 2003). A modo de ejemplo, sólo un 12 a un 15% del P total presente en el maíz está disponible, mientras que la mitad del P total del trigo se encuentra en esta condición (Sutton y Lander, 2003).

El P no disponible (FND) se elimina junto con las deyecciones contaminando principalmente las fuentes de agua. Estas deyecciones contienen porciones no digeridas del fósforo fítico (FF) y fósforo no fítico (FNF) provenientes de los insumos vegetales; fracciones no digeridas de subproductos animales y suplementos minerales, además de cantidades adicionales de FD agregados en exceso a los requerimientos del animal (Waldroup, 1999; Sutton y Lander, 2003).

Coelho (2000) señala que los cuerpos de agua que permanecen en su estado natural se encuentran en condiciones oligotróficas, es decir, con una pequeña cantidad de minerales y alta en oxígeno (O_2) disuelto en las profundidades. Al recibir estos desechos ricos en minerales pasan a una condición eutrófica (rica en minerales y pobre en oxígeno). Así, al aumentar la concentración de minerales se estimula el crecimiento de las algas y cianobacterias cuya tasa de respiración agotan los niveles de O_2 disuelto en el agua provocando la muerte de la fauna acuática. Además el P, junto con el nitrógeno, es considerado como un elemento limitante en el crecimiento de las algas y plantas acuáticas, siendo así, un nutriente limitante en el proceso de eutrofización (Mühlhauser, 1983).

Como consecuencia de estos problemas, la industria ha desarrollado algunas estrategias con el fin de reducir el impacto ambiental que genera la eliminación de P:

- **Formular dietas según los requerimientos y según la disponibilidad de P dietario.** Una adecuada formulación permite reducir la excreción de P entre un 10 a un 25%, siendo la alimentación la que permite cubrir con mayor

precisión los requerimientos de las aves según la edad, evitando así, la sobresuplementación de P. Otro aspecto relevante es la selección de los insumos, donde se debe identificar el contenido de FD presente en los ingredientes, ya que este tiende a variar. Esta variación debe ser mínima, porque al momento de formular, se considera el aporte estándar de un insumo, lo que trae el riesgo de un exceso o déficit en el aporte dietario de P. También, es importante conocer el contenido de FF en los vegetales, debido a que este no se encuentra, en gran medida, disponible para ser utilizado por las aves y, por ende, ser excretado al medio ambiente (Khan, 1996; Waldroup, 1999; Wicker, 1999; Angel y Applegate, 2000; Coelho, 2000; Dozier, 2000; Sutton y Lander, 2003).

- **Uso de fuentes de fosfato con alto valor biológico:** la digestibilidad de la fuente de fósforo inorgánico también es importante en la problemática de alta excreción de fósforo. El fosfato suplementado aporta cerca del 60% de las necesidades de fósforo no fítico del ave, pequeñas diferencias en la biodisponibilidad pueden tener un gran impacto en el contenido de fósforo de las heces (Waldroup, 1999). En Chile, diversos estudios realizados con pollos broilers en la Universidad de Chile como en empresas privadas han arrojado valores de biodisponibilidad de P de 98, 96 y 96% para fosfatos bicálcico, monocálcico y tricálcico defluorinado, respectivamente⁵ (Waldroup, 1999; Coelho, 2000; Dozier, 2000).
- **Uso de insumos con bajo nivel de fósforo fítico.** Se han desarrollado variedades de granos bajas en fósforo fítico, entre ellos maíz y soya, los cuales se transforman en una herramienta útil para disminuir la ingesta de fósforo y su posterior excreción (Waldroup, 1999; Wicker, 1999; Angel y Applegate, 2000).

⁵ Comunicación Personal Dr. Javier González

- **Mantener un programa de control de calidad de los subproductos de origen animal.** Los subproductos de origen animal como las harinas de carne y hueso han sido ampliamente utilizados en nutrición animal debido a la calidad de su proteína y su nivel de fósforo, el cual es altamente disponible. Debido a restricciones recientes del uso de subproductos en rumiantes, estos insumos se encuentran disponibles para ser utilizados en dietas de aves. Debido a la gran variabilidad en los contenidos de fósforo en estos productos, el uso de valores “promedio” del contenido de fósforo al momento de formular las dietas puede resultar en una sobre estimación (llevando con ello a un aumento en la excreción de fósforo) o en una subestimación (con el riesgo potencia de un déficit de fósforo) del nivel de fósforo dietario, por lo que se haría necesario implementar programas de control del contenido mineral de cada partida de insumos antes de la fabricación del alimento (Waldroup, 1999; Dozier, 2000).
- **Uso de fitasa.** Este punto se mencionará posteriormente con más detalle.

MATERIAS PRIMAS DE RELEVANCIA.

Cereales.

Estructura y Composición Nutricional.

Las aves dependen de los granos de cereales principalmente por su fuente energética, y en ciertos estados de crecimiento más del 90% de su dieta consiste en cereales o subproductos de cereales. Los granos son una fuente concentrada de carbohidratos, siendo el principal componente (en términos de materia seca) el almidón (Mc Donald *et al.*, 2002).

Estructuralmente, los granos son muy semejantes entre sí y están formados por dos grandes partes bien diferenciadas: las cubiertas externas o

envolturas y la parte interna o endospermo. Pero, según su procesamiento, los granos se describen en 4 partes, las cuales se detallarán a continuación (Ver Figura N°1):

1. Afrecho o Salvado: Es la capa protectora más externa, dura y pardusca del grano, constituye cerca del 6% en el maíz hasta un 16% en el caso del trigo. El afrecho es una fuente concentrada de fibra que está formado por celulosa, que es indigestible para los animales de estómago simple. Es rico en vitamina B₁ y contiene una pequeña cantidad de proteínas y elementos minerales, como calcio e hierro (Mugford, 1979). Las capas del afrecho incluyen al pericarpio y la testa.

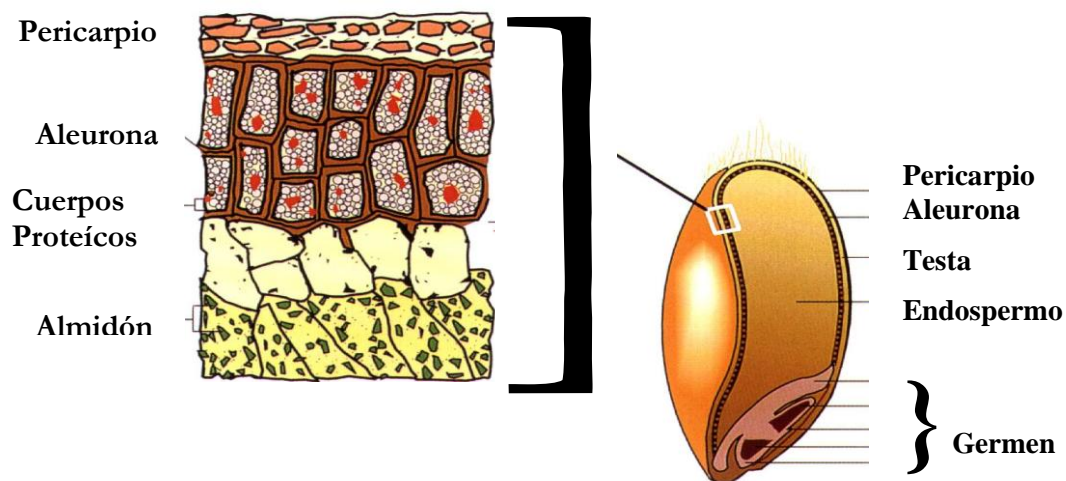
- *Pericarpio:* Su función es proteger las partes internas del grano del daño de agentes externos (insectos y microorganismos), impedir la pérdida de humedad y conducir y distribuir el agua y otros nutrientes en el proceso de germinación. El pericarpio se divide en tres capas: epicarpio, mesocarpio y endocarpio. El epicarpio a su vez se subdivide en epidermis (una capa celular gruesa, alargada y pigmentada, y presenta además una cubierta de cutina en la superficie más externa) e hipodermis (compuesto por células más pequeñas que la epidermis, de 2 ó 3 capas celulares). El mesocarpio es la capa más gruesa y se asocia a la resistencia a enmohecerse. El endocarpio se compone de células cruzadas y una capa de células cónicas que transportan la humedad al grano (F.A.O., 1995).
- *Testa:* Esta capa puede estar presente en algunos granos y ausente en otros. Se ubica inmediatamente debajo del endocarpio, siendo más gruesa en la corona del grano y más delgada al acercarse al sector del embrión. La testa, en algunos granos, puede estar altamente

pigmentada, dependiendo exclusivamente de su patrón genético previamente determinado (F.A.O., 1995).

2. **Aleurona:** Es una capa de células densas muy fina que está ubicada entre el afrecho y el endospermo. Corresponde a cerca del 8 al 10% del grano total y su número de capas puede variar de 1 célula (trigo, centeno, avena y maíz) hasta 3 células (cebada y el arroz). Además, la aleurona es rica en vitaminas, minerales y proteínas de alto valor biológico (Mugford, 1979). Durante la germinación, las células de la aleurona secretan varias enzimas hidrolíticas, siendo la más abundante la α -amilasa, que degradan el almidón presente en el endospermo, liberando azúcares simples y aminoácidos, que contribuirán al crecimiento de la futura planta (Becraft y Asuncion-Crabb, 2000).
3. **Endospermo:** Es la parte interna del grano, que forma parte de alrededor del 60% (en arroz, cebada y avena) hasta el 80% del grano (en trigo) (Mugford, 1979). El endospermo está constituido por dos capas celulares: el endospermo almidonado y las células basales de transferencia.
 - *Endospermo almidonado:* Sus células están unidas a los amiloplastos, que contienen los gránulos de almidón y cuerpos proteicos (Becraft y Asuncion-Crabb, 2000). Estos gránulos de almidón presentan diferentes tamaños y formas, dependiendo de la especie vegetal a la cual pertenezcan. Por otra parte, los cuerpos proteicos aumentan en cantidad, y por ende, en concentración desde el centro hacia la periferia del endospermo (Mc Donald *et al.*, 2002).
 - *Las células basales de transferencia:* Se ubican sobre unas células alargadas que conforman el pedículo, el cual transfiere los nutrientes desde el endospermo a la planta en desarrollo (Becraft y Asuncion-Crabb, 2000).

4. **Germen:** Forma parte, aproximadamente, del 12% del maíz y del 3% en el trigo (Mugford, 1979). Está formado por el axis embriónico y el escutelum (F.A.O., 1995). El escutelum es un tejido de reserva rico en lípidos, vitaminas E y B₁, proteínas y minerales. La mayor parte del contenido de lípidos y de vitamina E presentes en el grano, se encuentran en el germen (Mugford, 1979). Además, presenta el mayor contenido de aceite del grano, y esta constituido principalmente por ácidos grasos esenciales poliinsaturados como el ácido linoleico y linolénico (F.A.O., 1995; Mc Donald *et al.*, 2002).

Figura N°1. Corte longitudinal de un grano de trigo (Pierson, 2003)



El contenido de fibra cruda de los granos cosechados es mayor en aquellos que contienen cáscara, como la avena y el arroz, y es menor en aquellos granos desnudos, como el maíz y el trigo. Proporcionalmente, la cantidad de cáscara reduce el valor energético del grano, así la Energía Metabolizable del maíz (16 MJ/kg M.S.) será mayor que la de la avena (12 MJ/kg M.S.) (Mc Donald *et al.*, 2002).

El almidón se concentra en el endospermo, presentándose en alrededor de un 25% y 75% en forma de amilosa y amilopectina, respectivamente (Mc Donald *et al.*, 2002).

Las proteínas se encuentran en todos los tejidos del grano de cereal, pero las mayores concentraciones se encuentran en el embrión y en la aleurona. El total del contenido de proteína en el grano es muy variable, expresado como proteína cruda va en rangos de 80 a 120 g/kg de materia seca (M.S.). Las proteínas presentes en los cereales son deficientes en ciertos aminoácidos esenciales, particularmente lisina y metionina. Es por esto, que el valor proteico de los cereales que promueven el crecimiento de las aves jóvenes se priorizan de acuerdo al contenido de aminoácidos esenciales que éste tenga. Por ejemplo, la avena tiene un mayor valor proteico que el maíz y el trigo, debido a su mayor contenido de lisina (Mc Donald *et al.*, 2002).

El contenido de lípidos presente en los granos varía en todos los cereales. Por ejemplo, el trigo y el maíz contienen entre 10 a 30 g. y 40 a 60 g/kg de M.S. respectivamente. El embrión contiene más aceite que el endospermo, así en el trigo, el embrión tiene entre 100 y 170 g/kg de M.S. de aceite, mientras el endospermo contiene solo 10 a 20 g/kg de M.S. Los aceites de los cereales son insaturados, siendo los más importantes los ácidos linoleicos y oleicos, ya que estos tienden a enranciarse rápidamente (Mc Donald *et al.*, 2002).

Todos los cereales son deficientes en Ca, conteniendo menos de 1g/kg de M.S. El contenido de P es más alto, llegando a niveles de 3 a 5 g/Kg de M.S., pero parte del P está presente en forma de fitato, el que se concentra en la capa de aleurona. Los cereales también son deficientes en vitamina D, y con la excepción del maíz, en provitaminas A. Además, son una buena fuente de vitamina E y tiamina, pero tienen un bajo contenido de riboflavina. La mayoría

de las vitaminas se concentran en la aleurona y en el germen del grano (Mc Donald *et al.*, 2002).

Maíz.

En la actualidad existen diferentes tipos de maíces y los granos aparecen en una amplia variedad de colores, amarillo, blanco o rojo (Mc Donald *et al.*, 2002).

El maíz, al igual que otros granos de cereal, tiene ciertas limitaciones como alimento para los animales. Aunque es una excelente fuente de energía digestible es baja en proteína, y las proteínas presentes son de pobre calidad. Este grano contiene alrededor de 730g de almidón/ kg de materia seca, es muy pobre en fibra y tiene un alto valor de energía metabolizable. El almidón proporcionado por el maíz ingresa al intestino delgado, donde es digerido y absorbido como glucosa (Mc Donald *et al.*, 2002).

El contenido de aceite del maíz varía desde los 40 a 60 g/kg de M.S. y es alto en ácido linoleico, lo que es un factor importante en la dieta, ya que regula el tamaño del huevo de las gallinas. Sin embargo, este tiende a producir una suave capa de grasa corporal (Mc Donald *et al.*, 2002).

El contenido de proteína cruda del maíz es muy variable y generalmente los rangos van desde los 90 a los 140 g/kg de materia seca, aunque las variedades que han sido desarrolladas recientemente contienen aún niveles mayores (Mc Donald *et al.*, 2002).

El núcleo del maíz contiene dos tipos de proteína. Zeína, que se encuentra en el endospermo, es cuantitativamente la más importante, pero esta proteína es deficiente en los aminoácidos esenciales como triptofano y lisina. La otra proteína, glutelina de maíz, se encuentra en bajas cantidades en el endospermo y en el embrión, siendo esta proteína la mejor fuente de éstos dos aminoácidos (Mc Donald *et al.*, 2002).

La cantidad de energía es relativamente constante en el aceite, en el almidón y en la proteína del maíz: 9300, 4150 y 5490 kcal/kg., respectivamente. (D'Alfonso, 2003). Sin embargo, la digestibilidad entre los distintos lotes de maíz es muy variable llegando a diferencias de hasta 500 kcals/kg aproximadamente para la digestibilidad energética (Leeson *et al.* 1993; Collins *et al.* 1998; D'Alfonso, 2003).

Varios autores señalan que la variabilidad en la energía digestible del maíz puede ser tan grande como aquella determinada en el trigo, y que ésta puede ser ampliamente reducida a través de la utilización de enzimas (Bedford, 2000a; Jin, 2002). Una posible causa de ésta variación radicaría principalmente en la presencia de los llamados “almidones resistentes”, los cuales se clasifican en tres tipos (Bedford y Pack, 1998; Bedford, 2000a):

- Tipo 1: Es la porción de almidón que no es digerida por razones de accesibilidad. Aún, después de moler el grano y pasar a través del tracto digestivo, un gran número de células del endospermo permanecen intactas. Esto se debe a la protección que ejercen las paredes celulares las cuales cubren este almidón interno, evitando la exposición de éstos. Una cantidad apreciable de este almidón se escapa por esta vía, la que puede llegar a ser fermentada en el intestino grueso, principalmente en los ciegos.
- Tipo 2: Es aquella porción del almidón que no es digerida debido a la estructura física o química del gránulo nativo. El primer aspecto a considerar es el patrón cristalino del polímero lineal de glucosa α 1-4 que forman el almidón. Existen dos patrones principales en el almidón de cereales, el A que contiene 7 polímeros lineares y el B con 6. Mientras la mayoría de los cereales presenta el patrón A, el maíz de alto porcentaje de amilosa presenta el patrón B. Al poseer este patrón, el maíz de alta amilosa será más lentamente digerido que los cereales que posean el patrón A por su mayor

contenido de agua. El segundo aspecto se relaciona con el contenido de amilopectina o amilosa. La amilopectina, polímero altamente ramificado, es más fácil de digerir por su sustancia amorfa que permite una entrada más rápida de humedad, logrando así la degradación enzimática. Como resultado, mientras más alto es el contenido de amilosa más lenta es la digestión.

- Tipo 3 o almidón retrógrado: Es producido como resultado del procesamiento a alta temperatura del almidón seguido por el subsecuente almacenaje a temperaturas más bajas por horas o por días. Esta baja de temperatura provoca la cristalización formando complejos asociados a proteínas y estructuras de pared celular. Esto provoca que el almidón sea impermeable a la acción de las amilasas pancreáticas, y por esto sean susceptibles a ser fermentados en el intestino grueso.

Trigo.

El grano de trigo (*Triticum aestivum*) es muy variable en su composición nutricional (Sibbald y Slinger, 1962; Schumaier y McGinnis, 1967; Mc Donald *et al.*, 2002). Por ejemplo, el contenido de proteína cruda puede variar desde 60 a 220 g /kg. de M.S.(Mc Donald *et al.*, 2002) o de un 11 a 19 % (Sullivan y Gleaves, 1996). El clima, la fertilidad del abono y la variedad del trigo son factores que influyen en el contenido de proteína cruda del grano. Además se ha descrito que la cantidad y las características de las proteínas presentes en el trigo son muy importantes, al momento de elegir un grano para la producción de harinas. Las proteínas más importantes que están presentes en el endospermo son la gliadina y la glutenina. Todas las proteínas que están presentes en el endospermo frecuentemente se denominan gluten.

Los glútenes del trigo difieren en sus propiedades, siendo la propiedad más relevante su elasticidad (Mc Donald *et al.*, 2002). En las raciones para aves, en base a trigo, la elasticidad está directamente relacionada con la forma física del

grano. En granos finamente triturados con un alto contenido de gluten, al ser mojados, se transforman en una masa blanda muy viscosa que puede causar impactación en el pico y buche de las aves, reduciendo la ingesta de alimento (Sullivan y Gleaves, 1996; Mc Donald *et al.*, 2002). Aparentemente, el trigo recién cosechado es más dañino en este aspecto que el trigo que ha sido almacenado por algún tiempo (Mc Donald *et al.*, 2002). Es recomendable, que el trigo finamente triturado sea limitado en las raciones para aves en un 5 o 10%, especialmente en las destinadas a pollos y pollas jóvenes, ya que éstas son las más afectadas. Sin embargo, si el trigo está medianamente triturado o como grano entero, éste puede reemplazar desde la mitad a todo el maíz en las raciones de broilers y ponedoras. También se ha visto que el peletizado puede prevenir la viscosidad ocasionada por el trigo finamente triturado (Sullivan y Gleaves, 1996).

En relación a la utilización del trigo, éste es primordialmente usado en la alimentación humana y en menor cantidad en las dietas para el consumo animal (Sullivan y Gleaves, 1996; Beuerlein, 2001). Existe una gran variedad de trigos que es empleada en la elaboración de diversos productos manufacturados (harinas, masas, pastas, cereales y otros derivados).

El grano del trigo está formado por un 82% de endospermo, un 15% de afrecho (incluyendo la aleurona) y un 3% de germen. En la molienda del trigo, el principal objetivo es separar el endospermo del afrecho y el germen para poder obtener harina blanca. De hecho, cerca del 74% de la producción del trigo está destinada a la extracción de harina y el 26% restante corresponde a los subproductos o residuos, los cuales pueden ser comercializados como un solo producto (alimento de trigo directamente extraído) o como tres productos separados: germen, alimento de trigo fino y afrecho o alimento de trigo grueso (Mc Donald *et al.*, 2002).

El germen es muy rico en proteínas, bajo en fibra y es una excelente fuente de tiamina y vitamina E. Éste puede ser recolectado separadamente o puede ser incluido en el alimento de trigo fino (Mc Donald *et al.*, 2002).

El alimento de trigo fino varía considerablemente en su composición nutricional dependiendo del grano de origen y de la tasa de extracción (cantidad de harina obtenida en el proceso de molienda). Este alimento puede ser usado, sin peligro, por todos los animales (Mc Donald *et al.*, 2002).

El afrecho contiene más fibra y menos proteína que el alimento de trigo fino. Por su alto contenido de fibra, este alimento no es conveniente para aves jóvenes. Sin embargo, cantidades muy pequeñas de afrecho están ahora disponibles para la alimentación de las aves (como las aves de postura), ya que la mayoría de estos son usados en la elaboración de cereales para el desayuno (Mc Donald *et al.*, 2002). Además es relevante destacar que la mayoría de las sustancias importantes presentes en el grano entero (fibra, vitaminas, minerales, antioxidantes y fitonutrientes) se concentran en la aleurona, que es removida junto con la capa de afrecho en el proceso de molienda constituyendo este subproducto alimenticio (Laux *et al.*, 2003). Laux *et al.* (2003) también señala que la aleurona es determinante en la digestibilidad de este alimento, ya que aislados de aleurona revelaron mejores digestibilidades de proteínas y arabinoxilanos, mayores niveles de fermentabilidad y niveles más altos de radicales libres que los observados en el afrecho.

Leguminosas.

Existen también los llamados granos de leguminosas (legumbres), los cuales se caracterizan por poseer un mayor contenido de proteína que los granos de cereal (20-42% de proteína cruda). Son usados comúnmente en la alimentación humana, pero algunos como la soya y lupino son de uso animal (Camiruaga *et al.*, 2003). Además, complementan el aporte de los cereales en la

ración, cubriendo los requerimientos de producción (Rubio y Brenes, 1995) y manteniendo un adecuado balance de aminoácidos (León y Angulo, 1989).

Con respecto a su composición nutricional, las leguminosas son consideradas como fuentes de energía y proteína para las aves. El contenido de proteína de los granos de leguminosas fluctúa entre un 20 a 38% y varía entre y dentro de cada especie vegetal. Los valores de energía metabolizable medidos en pollos varían de 8 MJ/kg a 13,8MJ/kg. El contenido de aminoácidos de los granos de leguminosas varía de acuerdo a los cultivos y al medio ambiente. Cuando los requerimientos de aminoácidos de pollos broilers y gallinas ponedoras (NRC, 1994) son comparados con el contenido de aminoácidos de todas las leguminosas, los granos de leguminosas son generalmente buenas fuentes de lisina pero deficientes en metionina y cistina, mientras el triptofano es marginal (Wiryanwan, 1997). Sin embargo, los granos de leguminosas no tratados, contienen factores antinutricionales (FAN) propios del crecimiento y protección de la leguminosa, pero que deterioran a la producción de aves y cerdos cuando se ha ingerido en cantidades excesivas (Wiryanwan, 1997; Robinson y Singh, 2001). Es por esto, que su uso se ve restringido dependiendo de las cantidades de FAN que estos granos de leguminosas tengan (Robinson y Singh, 2001).

Soya.

La soya es un cereal que posee una mayor fuente de calcio y fósforo que los otros cereales (McDonald *et al.*, 2002). En el proceso de producción se limpia, se muele y se descortiza la soya. La hojuela del poroto de soya se puede hacer afrecho de soya de grasa natural o se puede extraer el aceite, rindiendo una hojuela desengrasada. El aceite es el producto primario del proceso de molienda (Godfrey, 2003), el cual además tiene un efecto laxante (McDonald *et al.*, 2002).

La digestibilidad del poroto de soya se ha visto claramente influenciada por el tipo de procesamiento entregado. En tanto, en términos generales, el

contenido de energía metabolizable (EM) oscila entre 3.300 y 4.273 kcal/kg. (Navarro, 1991).

El afrecho de soya es un concentrado proteico de origen vegetal, que se forma a partir de las hojuelas del poroto de soya o las hojuelas desengrasadas de la soya. Dependiendo del tratamiento de calor, el tamaño de partícula y la cantidad de grasa resultan distintos afrechos de soya. El procesamiento y el tratamiento térmico también afectan la funcionalidad del afrecho de soya. Los afrechos de soya típicos disponibles en el mercado son 20, 70 y 90 IDP. El IDP es el índice de la dispersabilidad de la proteína e indica que cantidad de tratamiento térmico ha recibido el afrecho (Godfrey, 2003).

El afrecho de soya presenta entre 40-50% de proteína (Godfrey, 2003), destacándose niveles altos de lectina (Maenz *et al.*, 1999). Las lectinas son resistentes a las enzimas digestivas disminuyendo la absorción de nutrientes, alterando la funcionalidad de la membrana, produciendo hiperplasia de las criptas intestinales, atrofia de las microvellosidades y consecuentemente aumento en el peso del intestino (Liener, 1994; Liener, 2000; McDonald *et al.*, 2002).

FACTORES ANTINUTRICIONALES (FAN) EN LAS MATERIAS PRIMAS.

POLISACÁRIDOS NO AMILÁCEOS

Los componentes de la fibra presente en los granos están compuestos primordialmente de polisacáridos no amiláceos (PNA), los cuales se encuentran en los cereales formando parte de las paredes celulares. Además, en los granos de leguminosas, los PNA juegan un papel importante en la reserva energética. Estos PNA aparte de tener una directa correlación con la variabilidad nutricional de algunos granos, como la cebada y el trigo (Bedford, 2000b), son muy importantes

porque poseen efectos antinutricionales, lo que se traduce en una pobre utilización de los PNA en los animales de estómago simple (Choct, 1997).

Los polisacáridos son polímeros de monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos. La clasificación de los polisacáridos se basa en consideraciones de tipo estructural, como la identidad de los monosacáridos presentes; las formas de los anillos de monosacáridos (piranosa de 6 carbonos o furanosa de cinco carbonos); las posiciones de los enlaces glucosídicos; las configuraciones (α o β) de los enlaces glucosídicos; la secuencia de los residuos de monosacáridos en la cadena y la presencia o ausencia de substituyentes que no son carbohidratos (Choct, 1997). Cuantitativamente, son los nutrientes más importantes en los alimentos de origen vegetal. Son de elevado peso molecular y la mayoría son insolubles en agua. Por hidrólisis con ácidos o enzimas se desdoblan en diversos productos intermedios y finalmente, en los monosacáridos que lo constituyen (Maynard *et al.*, 1998). Los monosacáridos presentes con mayor frecuencia en las paredes celulares de los cereales son las hexosas (D-glucosa, D-galactosa, D-manosa), pentosas (L-arabinosa, D-xilosas) y azúcares ácidos (ác. D-galacturónico, ácido D-glucurónico y su 4-O-metil éter) (Choct, 1997).

El término “polisacáridos no amiláceos” (PNA) comprende una gran variedad de moléculas de polisacáridos excluyendo los α -glucanos (almidón). Los PNA se dividen en tres grupos principales: celulosa, polímeros no celulósicos (arabinosilanos, β -glucanos, mananos, galactanos y xiloglucanos) y los polisacáridos pécticos (Choct, 1997).

A continuación se describirán los PNA más relevantes en la alimentación avícola:

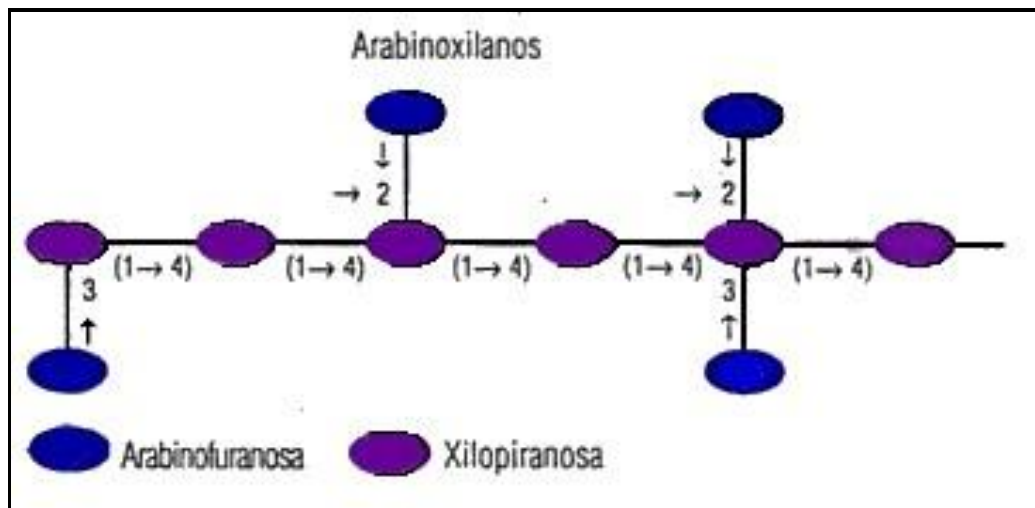
- Celulosa. Es la sustancia orgánica más abundante del reino vegetal (constituye cerca del 50% del carbono de los vegetales) y es el mayor componente estructural de las paredes celulares de las plantas. Es un

homopolímero lineal de unidades de D-glucosa (β -1,4) (Choct, 1997; Maynard *et al.*, 1998). Sus 6 átomos de carbono están en la posición trans, lo que le confiere a la celulosa una estructura plana y fibrilar. Esto es muy importante, ya que junto con los enlaces tipo β y las uniones de hidrógeno, permite que sea esencialmente insoluble (en agua, en soluciones álcalis o ácidas diluidas) y extremadamente resistente a la degradación enzimática (Maynard *et al.*, 1998).

- Pentosanos (arabinoxilanos, xilanos). Están presentes principalmente en forma de arabinoxilanos, los cuales se componen de dos pentosas, arabinosa y xilosa (Ward, 1995; Choct, 1997). Los arabinoxilanos, estructuralmente, constan de una cadena principal de β -(1,4) xilopiranososa y cadenas laterales de arabinofuranosa (Ver Figura N°2) (Bühler *et al.*, 1998). Estas cadenas laterales constituídas por arabinosa son las que dan solubilidad al polímero, ya que sin las mismas los polímeros de xilosa podría interaccionar entre sí, formando agregados de peso molecular más grande, y así, precipitar (Francesch, 1996). La mayoría de los arabinoxilanos presentes en los granos son insolubles en agua debido a que se encuentran anclados en la pared celular a través de enlaces covalentes, pero aquellos libres pueden formar soluciones altamente viscosas y absorber cerca de 10 veces su peso en agua. En presencia de agentes oxidantes (H_2O_2), pueden reestablecer los enlaces formando rápidamente una red gelatinosa. También establecen interacciones no-covalentes con uniones de hidrógeno, que pueden ser importantes en determinar sus cambios conformacionales y sus propiedades de solubilidad, y por ende, sus efectos antinutricionales (Choct, 1997).
- β -glucanos. Se encuentran presente en la mayoría de los cereales, estando en gran cantidad en la cebada y la avena. Su estructura se compone de una

cadena lineal de glucosa unida por enlaces $\beta(1-3)$ y $\beta(1-4)$ (Choct, 1997; Bühler *et al.*, 1998). Los enlaces $\beta(1-3)$ son responsables de la intensa ramificación de los β -glucanos (Bühler *et al.*, 1998), favoreciendo su solubilidad y la formación de soluciones viscosas. (Francesch, 1996).

Figura N°2. Esquema Estructural de los Arabinoxilanos (Bühler *et al.*, 1998).



- Mananos. En algunas plantas, los glucomananos y galactomananos pueden estar presentes como los principales componentes hexosanicos no celulósicos. Los glucomananos están formados por unidades de glucosa y manosa unidas por enlaces $\beta(1-4)$, mientras los galactomananos presentan una cadena de $(1-4)\text{-}\beta$ -mananos, sustituida con unidades de $(1-6)\text{-}\alpha$ -galactosa. Los galactomananos se localizan principalmente en el endospermo de las leguminosas durante el desarrollo de la semilla, mientras que los glucomananos se encuentran en una baja proporción en los granos de cereal (Choct, 1997).
- Polisacáridos pécticos. Cuando mencionamos los polisacáridos pécticos o pectinas, generalmente nos referimos a los galacturanos o más

comúnmente a los ramnagalacturanos, los cuales presentan cadenas de (1-4)- α -D-galacturanos que son interrumpidas por inserciones de (1-2)- α -L-ramnosa. También se adhieren a esta cadena otros azúcares, como D-galactosa, L-arabinosa y D-xilosa. Los polisacáridos pécticos se encuentran en la soya y en las paredes celulares de las espigas y hojas de los cereales (Choct, 1997).

La solubilidad de los PNA es muy importante, ya que afecta su propia digestibilidad y la de otros nutrientes cuando es ingerido por las aves. Esta solubilidad está determinada por el tamaño y concentración de la molécula, la cantidad y disposición de sus ramificaciones, las cargas eléctricas y la forma en que están unidos a otros componentes de la pared celular (Francesch, 1996).

Generalmente, los PNA solubles son más digestibles que la fracción insoluble (Choct y Kocher, 2000), ya que la digestión de esta fracción es prácticamente nula (Carré *et al.*, 1990). Los PNA insolubles (celulosa, xilanos puros) y la fracción insoluble de los β -glucanos y arabinoxilanos tienen la capacidad de retener gran cantidad de agua (afectando el volumen del bolo digestivo) y mantener una motilidad intestinal normal, lo que es esencial para la consistencia en las excretas de las aves (Francesch, 1996; Choct, 1997).

El contenido de PNA no sólo varía entre los distintos ingredientes sino que también varía dentro un mismo ingrediente (Choct, 1997), debido a determinados factores genéticos, ambientales y de cultivo (Francesch, 1996).

En los granos de cereal, los principales PNA son los arabinoxilanos (pentosanos), los β -glucanos y la celulosa (Francesch, 1996; Choct, 1997). Estas se encuentran tanto en el endospermo como en las cubiertas del grano, dependiendo del tipo de cereal (Annison, 1990; Ward, 1995; Francesch, 1996). Sólo una pequeña cantidad de polisacáridos pécticos se encuentran en las espigas

y hojas de los cereales. El maíz y el sorgo contienen muy bajos niveles de PNA, mientras el trigo, el centeno y el triticale contienen grandes cantidades de ambos PNA, solubles e insolubles (Choct, 1997; Chesson, 2000). El principal PNA soluble en estos granos son los arabinosilanos, mientras que en la cebada y la avena son los β -glucanos (Choct, 1997).

Los subproductos del cereal poseen un alto contenido de pared celular, las que usualmente son ricas en PNA y de baja calidad nutricional (Choct, 1997). Por ejemplo, en el trigo, la mayor parte de sus arabinosilanos se encuentran en la capa de afrecho, que junto con la aleurona, constituyen el alimento de afrecho o afrechillo de trigo (Ver Tabla N°1).

Tabla N° 1. Contribución en % de afrecho, aleurona y endospermo (fracciones de la molienda del trigo). Variedad Riband para arabinosilano total y solubles (Chesson, 2000).

	FRACCIÓN (%) DE ARABINOSILANOS	
	TOTAL	SOLUBLE
Endospermo	13,4	64,2
Aleurona	1,1	2,5
Afrecho	85,5	33,3

Con respecto a los granos de leguminosas, estos también contienen cantidades importantes de PNA (Smits y Annison, 1996; Choct, 1997). La mayor parte de las leguminosas contienen xilanos y celulosa, que se encuentran en las cáscaras y vainas de los granos, en tanto, los polisacáridos pépticos se localizan en los cotiledones de las plantas (Choct, 1997). Estos polisacáridos pépticos pueden abarcar la mayor parte de los PNA en las legumbres, es así como la soya presenta

una alta proporción de polisacáridos pécticos en sus paredes celulares (galacturanos y arabinogalactanos asociados) abarcando prácticamente la mitad de los PNA presentes en la soya (Chesson, 2000).

Efecto de los PNA

Está generalmente aceptado que el efecto negativo de los pentosanos y β -glucanos se encuentra asociado a la naturaleza viscosa de su fracción soluble y a las modificaciones fisiológicas y morfológicas del tracto digestivo que ellos producen. El principal problema lo causa la fracción soluble ya que los animales de estómago simple no tienen capacidad para sintetizar enzimas hidrolíticas de enlaces β .

Dada las propiedades físico-químicas que presentan los PNA, estos poseen diversos efectos antinutricionales que actúan simultáneamente, pero a modo descriptivo estos serán mencionados separadamente a continuación (Classen y Bedford, 1991; Choct et al., 1995; Burnett, 1996; Francesch, 1996; Simon *et al.*, 1996; Choct, 1997; Bühler et al., 1998; Chesson, 2000):

- Aumento de la viscosidad. Las partes solubles de los PNA aumentan la viscosidad del contenido intestinal, principalmente de pentosanos, β -glucanos y pectinas pues acumulan grandes cantidades de agua. Además de enlentecer el tránsito intestinal y disminuir la ingestión de alimentos, también alteran la mezcla del quimo con la bilis y las enzimas secretadas por el propio organismo. También se ha observado que la viscosidad es más alta en las aves jóvenes, la que decrece paulatinamente con la edad.
- Disminución de la absorción de nutrientes. Reducen la absorción intestinal de los nutrientes e influyen negativamente en la consistencia de los excrementos, aumentando su humedad, ocasionado principalmente por un aumento de la viscosidad. Además, esta menor absorción de nutrientes

puede provocar una desproporcionada excreción de enzimas digestivas, lo cual aumenta a su vez la pérdida de proteínas endógenas.

- Encapsulación de nutrientes. Las fracciones insolubles de los PNA presentes en las diversas estructuras de la pared celular ejercen el llamado “efecto jaula”, encapsulando nutrientes que normalmente son muy digestibles, como el almidón, grasas o proteínas formando así complejos indigestibles e impidiendo que las enzimas hidrolíticas tengan acceso a ellas.
- Impiden acción enzimática. Pueden inhibir directamente la acción de las enzimas endógenas, las cuales podrían hacer a un nutriente disponible para su absorción.
- Limitada degradación microbiana. La capacidad fermentativa de los PNA en el digestivo es variable entre los diferentes componentes que constituyen esta fracción. La celulosa es poco degradable, en tanto que las pectinas, β -glucanos, mananos y xilanos son más fácilmente fermentadas. La degradación microbiana de los PNA en aves es menos importante que en el ganado porcino, ya que las aves sólo pueden digerir de forma significativa la fracción PNA soluble en agua a través de fermentaciones bacterianas (Francesch, 1996). Esta degradación es limitada, particularmente en aves jóvenes, las cuales tienen un alto pasaje del contenido intestinal con una baja actividad microbial (Simon *et al.*, 1996)
- Disminución del valor energético de la dieta: Está directamente relacionada a la concentración de PNA contenido en el grano. Si el valor de PNA aumenta el contenido energético aprovechable por el ave disminuye.
- Aumentan el tamaño y estabilidad de la capa motora de la superficie mucosa del tracto digestivo. Este hecho ocurre, fundamentalmente porque

los PNA presentan afinidad hacia el glicocálix del borde en cepillo (Choct, 1997). Esto disminuye el contacto entre el alimento y las enzimas digestivas, lo que impide una hidrólisis homogénea de los macronutrientes (Bedford, 1995; Van der Kliss *et al*, 1995). Estos cambios en el tracto digestivo enlentecen y reducen la retención de nutrientes, siendo más afectados los lípidos que el almidón y las proteínas (Simon *et al.*, 1996).

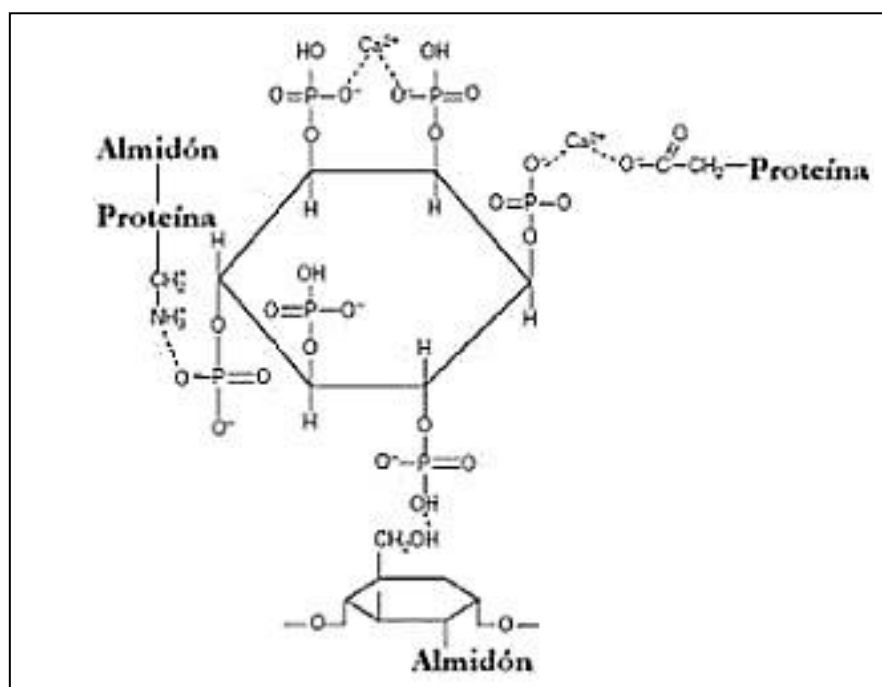
Para los productores comerciales de aves de postura, las consecuencias de la alimentación de estos granos se traduce en el aumento de la incidencia de huevos sucios, así como el deterioro de las condiciones medioambientales del galpón (aumento de excretas húmedas y pegajosas) (Simon *et al.*, 1996).

FITATOS

El ácido fítico corresponde a una molécula de inositol hexafosfato (IP_6) donde el P como grupo fosfato esta unido a un anillo de inositol (Ver Figura N°3). Constituye una reserva de P y carbohidratos para la planta durante la germinación. La molécula de ácido fítico tiene un alto contenido de P (28,2%) y sus 6 radicales de ácido fosfórico tienen una afinidad variable por los diversos cationes. La afinidad que presenta con los minerales y elementos traza varían en el siguiente orden: $Fe < Ca < Mn < Co < Cu < Zn$. Estos cationes están frecuentemente unidos al ácido fítico formando complejos denominados fitatos. Los fitatos que contienen Mg^{2+} y K^+ son los que se encuentran normalmente en la naturaleza (Adeola y Sands, 2003), pero éstos comúnmente son desplazados por otros cationes presentes en la dieta, en particular Ca, Zn y Fe (Pointillart, 1994). Este fenómeno disminuye la disponibilidad de estos cationes, principalmente de Ca y Zn, ya que son más vulnerables a formar complejos (Touchburn *et al.*, 1998). De hecho, una molécula de ácido fítico capta en

promedio 3 a 6 moles de Ca para formar los fitatos de Ca insolubles a pH intestinal (Pointillart, 1994). Otros cationes como el Cu, Mn y Mg también se han visto afectados, disminuyendo su disponibilidad, provocando con esto el retardo del crecimiento y el aumento en la mortalidad de los pollos (Touchburn *et al.*, 1998).

Figura N°3. Estructura del Fitato de Calcio y sus interacciones con proteínas y almidones.



Aproximadamente dos terceras partes del P de los granos y cereales, y la mitad del P presente en el poroto de soya, se encuentran en la forma de fitato (ver Tabla N°2). Esto constituye un problema para los animales de estómago simple, pues carecen de cantidades suficientes de fitasas endógenas, necesarias para la hidrólisis de estos complejos (Pointillart, 1994; Boling *et al.*, 2000a; Sutton y Lander, 2003).

En las semillas, casi la totalidad del ácido fítico está constituida por inositol-6-fosfato pero la trituración, la molienda y la humidificación, pueden

empezar la hidrólisis, al menos en las semillas con fuerte actividad fitásica, y a veces pueden aparecer proporciones significativas de fosfatos de inositol, como IP₅, IP₄, IP₃, IP₂ e IP₁ (ver Tabla N°2), donde los 3 últimos productos son susceptibles de pasar la barrera intestinal (Pointillart, 1994).

Con respecto a la ubicación, en los cereales, el ácido fítico está asociado a las estructuras particulares de la semilla. En el arroz y el trigo, está presente en el germen y fundamentalmente en la aleurona. En el maíz, sobre un 90% del ácido fítico se encuentra en el germen (Adeola y Sands, 2003). En las leguminosas, el ácido fítico está disperso en los cotiledones, asociado a los cuerpos proteicos (Pointillart, 1994; Adeola y Sands, 2003).

Tabla N°2. Fósforo fítico y fosfatos de inositol en las principales materias primas en alimentación animal (Pointillart, 1994).

	Fósforo fítico total (g/kg)	IP₆ (g/kg)	IP₄ + IP₅ (g/kg)	P fítico/P total (%)
Trigo	3,1	2,3	0,3	60-77
Molido de Trigo	9,7	8,9	1,1	66-85
Maíz	2,4	2,1	0,3	66-85
Poroto de Soya	2,6	1,9	0,3	40-50

Las dietas de animales de estómago simple contienen ingredientes alimenticios de origen vegetal que presentan una alta proporción de P como ácido fítico no disponible (por ejemplo: maíz, trigo y soya), y por lo tanto, la suplementación de P inorgánico (fosfatos de calcio) se hace necesaria para mantener el rendimiento óptimo del animal (NRC, 1994).

Por otra parte, los intereses económicos y medioambientales han llevado a la necesidad de aumentar la biodisponibilidad del P y reducir el uso de fosfatos de Ca. Como el P es el tercer componente dietario más caro, después de la energía y la proteína en la dieta de los animales de estómago simple, la posibilidad de disminuir esta suplementación representa, hoy en día, un ahorro substancial para los productores (Boling *et al.*, 2000a; Miles *et al.*, 2001; Boling, 2003).

Como el P que proviene del fitato (P-fitato) es considerado como indigestible en una alta proporción, los niveles de P en los alimentos y en los componentes alimenticios aprovechables por el ave son reportados como P disponible (FD) o como P no fítico (FNF) (Scott *et al.*, 1999). Es así como podemos observar que el maíz tiene un nivel de P total del orden del 0,28%, mientras que el porcentaje de FD es solamente de un 0,08%. Situación similar ocurre para la harina de soya (NRC, 1994).

La baja disponibilidad del P en los cereales y oleaginosas representa principalmente dos problemas para los productores (Petersen, 2001):

1. La necesidad de agregar suplementos de P inorgánicos en las dietas (lo que encarece el costo de la dieta)
2. La excreción de grandes cantidades de P en las heces, ya sea por la cantidad de ácido fítico no aprovechado por el animal o por la suplementación de fosfatos inorgánicos.

Además de reducir la disponibilidad de P para los animales y formar complejos con minerales, los fitatos además pueden formar complejos con carbohidratos, ácidos grasos, aminoácidos y proteínas, reduciendo así, su disponibilidad (Scott *et al.*, 1999) (Ver Figura 3). La disminución de la disponibilidad proteica es sobretodo importante en las proteínas de leguminosas, ya que éstas constituyen la principal fuente proteica de la ración. Además los complejos proteína-fitato son más resistentes a la proteólisis en comparación con

una proteína libre (Touchburn *et al.*, 1998), y por ende, menos accesibles a las enzimas (Adeola y Sands, 2003). También se ha pensado que la interacción proteínas-ácido fítico sería pH dependiente y conduciría a disminuir la solubilidad proteica. Con esto, ciertas propiedades funcionales de la proteína podrían ser afectadas negativamente, ya que dependen de una determinada hidratación y solubilidad (Touchburn *et al.*, 1998). Los complejos proteína-cation-fitado formados durante el pasaje del contenido intestinal podrían potencialmente disminuir la actividad de las proteasas, removiendo los cofactores (cationes) necesarios para una óptima actividad enzimática (Adeola y Sands, 2003).

OTROS FAN DE IMPORTANCIA.

Otros FAN de gran relevancia en la alimentación avícola son los inhibidores de proteasa, las lectinas y los taninos que se encuentran frecuentemente en los granos de leguminosas, como la soya. También son importantes los almidones resistentes que se encuentran en los granos de maíz, los cuales han sido anteriormente descritos.

Inhibidores de proteasa

Los inhibidores de proteasa, como los inhibidores de tripsina y quimiotripsina, son proteínas de amplia distribución en el reino vegetal, y son constituyentes comunes de las semillas de leguminosas. Ellos son rápidamente desnaturalizados por el calor, los ácidos o álcalis (Wiryanan, 1997).

Los inhibidores de tripsina tienen un doble efecto detrimental en la utilización de las proteínas de leguminosas, ya que ellos inhiben las actividades de la tripsina y quimiotripsina, e impiden la absorción de una alta proporción de cisteína, la cual es aún suplementada en una pequeña parte en las dietas para aves (Wiryanan, 1997).

En distintas leguminosas con niveles similares de inhibidores de tripsina y quimiotripsina pueden provocar variadas respuestas fisiológicas en los animales, entre las cuales podemos mencionar (Wiryawan, 1997):

- Interferencia con la normal digestión de proteínas. Los inhibidores de tripsina y quimiotripsina primero inactivan las enzimas proteolíticas (tripsina y quimiotripsina) secretadas por el páncreas a través de la formación de complejos enzima-inhibidor.
- Hipertrofia e hiperplasia pancreática. Como resultado de la inactivación de las enzimas proteolíticas, una gran cantidad de enzimas es secretada por el páncreas, lo que aumenta el tamaño del páncreas de las aves.
- Retardo en el crecimiento. El retardo en el crecimiento se debería a la inhibición de las proteasas, disminuyendo así la digestibilidad de las proteínas y aminoácidos. Se ha estimado que los inhibidores de tripsina de la soya cruda (no procesada) son responsables de cerca de un 40% de aumento del páncreas y de un 40% de retardo del crecimiento (Wiryawan, 1997). A pesar de esto, se ha observado que la suplementación de metionina ha mejorado el crecimiento de los pollos (Wiryawan, 1997).

Lectinas.

Las lectinas, son denominadas como “fitohemoaglutininas”, que son esencialmente glicoproteínas capaces de aglutinar los glóbulos rojos de la sangre in vitro, y de unirse a receptores en las células epiteliales de la mucosa intestinal, de este modo interfieren con la digestión (Gatel, 1994; Wiryawan, 1997). Las semillas de leguminosas, especialmente en los cotiledones, son ricas en lectinas, las cuales son termosensibles (Grant et al., 1983; Wiryawan, 1997).

Las lectinas ejercen su efecto a través del daño del tracto gastrointestinal. Éstas se unen a las células epiteliales y reaccionan con diferentes

compartimientos funcionales del intestino delgado de acuerdo a la especificidad de su azúcar. Esto conduce a un extenso daño de la membrana del borde en cepillo que conlleva a su posterior ruptura, lo que interfiere con el normal funcionamiento secretorio y absorbivo de esta región. Los efectos netos son una apreciable disminución de la absorción y digestión de los nutrientes y la pérdida del nitrógeno endógeno debido a un aumento de la descamación de las células dentro del lumen intestinal (Wiryawan, 1997). Como consecuencia de esto, las lectinas estimulan el engrosamiento de las paredes intestinales y conducen a un sobrecrecimiento de la *Escherichia coli*, traduciéndose en una mayor inhibición en la captación de nutrientes (Pusztai et al., 1993). Todos estos efectos repercuten en las respuestas productivas de las aves ocasionando, fundamentalmente, inhibición en el crecimiento (Wiryawan, 1997).

Taninos.

Los taninos se definen como los componentes fenólicos solubles en agua, los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. La mayoría se encuentra en las envolturas de las semillas (Wiryawan, 1997).

Los taninos tienen una alta capacidad para unirse a las proteínas. Los complejos proteína-tanino son extremadamente hidrofóbicos, y son en parte responsables de la baja digestibilidad proteica y baja disponibilidad aminoacídica, aumentando así la excreción de nitrógeno fecal en los pollos (Ortiz *et al.*, 1993). La adición de ácido tánico a las dietas de soya calentada para pollos también disminuye la tasa de absorción intestinal de galactosa y leucina (Santidrian y Marzo, 1989). Los taninos se pueden unir no sólo a la proteína proveniente de la dieta, sino que también a la proteína proveniente de las enzimas, como en el caso de los inhibidores de la tripsina (Wiryawan, 1997).

Otro efecto antinutricional que se produce por la ingestión de cantidades suficientes de taninos procedentes de la dieta, son la reducción de la ganancia

diaria y la peor eficiencia alimenticia debido a la disminución de la digestibilidad proteica en los pollos (Santidrian y Marzo, 1989; Longstaff y McNab, 1991).

DIGESTIBILIDAD ILEAL

Concepto de Digestibilidad

La digestibilidad del alimento se define como aquella proporción del alimento que no es excretada en las heces, y por ende, se asume que es absorbida por el animal. La digestibilidad se expresa comúnmente en términos de materia seca, como un coeficiente o porcentaje (McDonald *et al.*, 2002). Generalmente, al hablar de digestibilidad, se hace alusión a la digestibilidad aparente, la que no es la digestibilidad real o verdadera debido a que no considera las pérdidas metabólicas (Maynard *et al.*, 1998).

Aunque la distinción entre la digestibilidad verdadera y aparente es deseable para ciertos trabajos experimentales, como por ejemplo la determinación del valor biológico, tiene poco significado en la alimentación práctica (Maynard *et al.*, 1998).

Medición de la Digestibilidad

En los ensayos de digestibilidad, el alimento en estudio es dado a los animales en cantidades conocidas y con la recolección de heces medidas. Lo primero que hay que tener presente es evaluar si los animales son de la misma especie, línea genética, edad y sexo, ya que difieren en su habilidad digestiva. En segundo lugar se debe considerar el número de réplicas o repeticiones, ya que mientras más réplicas se tengan hay mayor oportunidad para detectar errores en la medición (McDonald *et al.*, 2002).

En los ensayos con mamíferos, se prefiere a los machos en desmedro de las hembras porque en los machos es más fácil la recolección de las heces y la orina en forma separada. Sin embargo, para las aves, la determinación de la digestibilidad es complicada por el hecho que las heces y la orina son evacuadas desde un solo orificio, la cloaca. Las heces y la orina pueden ser separadas químicamente, disgregando los componentes nitrogenados de la orina que están unidas a las heces. El motivo de esta separación radica en el hecho que la mayoría del nitrógeno ureico se encuentra en forma de ácido úrico y que la mayor parte del nitrógeno fecal corresponde a proteína verdadera. Esto es también posible alterando la anatomía del ave a través de la cirugía, de modo que las heces y la orina sean evacuadas separadamente (McDonald *et al.*, 2002). La otra alternativa es la recolección directa del contenido ileal, una vez que las aves han sido sacrificadas (Vogtmann *et al.*, 1974).

Métodos Indicadores

En algunas circunstancias la falta del equipo necesario o la naturaleza particular del ensayo puede hacer el estudio de digestibilidad impracticable para medir directamente cada ingesta de alimento o las excreciones de heces, o ambas. Por eso, cuando los animales son alimentados en forma grupal es imposible medir la ingesta de cada individuo. Sin embargo, si el alimento contiene algunas sustancias, las cuales son conocidas y completamente indigestibles, la digestibilidad puede ser determinada. Si las concentraciones de esta sustancia indicadora en el alimento y en las muestras pequeñas de heces de cada animal son entonces determinadas, la razón entre estas dos concentraciones dará una estimación de la digestibilidad. Por ejemplo, si la concentración del indicador aumenta de 10 g/kg de Materia Seca (MS) en el alimento a 20 g/kg de MS en las heces, eso significaría que la mitad de la MS habría sido digerida y absorbida. Para

el ejemplo anterior, la determinación de la digestibilidad se realiza mediante la siguiente ecuación (McDonald *et al*, 2002):

$$\text{Digestibilidad de MS} = \frac{\text{g. indicador/kg. MS heces} - \text{g. indicador/kg. MS alimento}}{\text{g. indicador/ kg. MS heces}}$$

El indicador puede ser un constituyente natural del alimento o un químico mezclado dentro de él. Uno de los indicadores que están en uso hoy en día son las fracciones de alimento conocidas como fibra ácido detergente indigestible y la ceniza ácido insoluble (conformada principalmente por sílice en forma de dióxido de sílice) (Ver Anexo B.4.). El indicador más comúnmente adicionado a los alimentos es el cromo en forma de óxido crómico, Cr₂O₃. El óxido crómico es muy insoluble y por ende indigestible; además, el cromo no es un componente común en las dietas de aves. También se ha visto que el óxido crómico puede ser usado para estimar las excreciones de heces. En esa aplicación el marcador es administrado durante 10 a 15 días en cantidades corregidas hasta que las excreciones son estabilizadas y así las concentraciones en las muestras de heces puedan ser determinadas. Las excreciones de MS de las heces (kg/día) son calculadas a continuación (McDonald *et al*, 2002):

$$\text{Excreciones MS heces (kg/día)} = \frac{\text{Dosis Marcador en el alimento (g por día)}}{\text{Concentración Marcador en heces (g por kg)}}$$

Por ejemplo, si a un animal se le administró 10 g de óxido crómico por día y la concentración del marcador encontrada en las heces fue de 4g /kg MS, las

heces excretadas podrían ser calculadas como $10/4 = 2,5$ kg MS/día. Si la ingesta de alimento fue conocida, la digestibilidad de la MS puede ser calculada en la vía acostumbrada (McDonald *et al.*, 2002).

Estos mismos cálculos son extrapolables a la ceniza ácido insoluble, la cual fue utilizada en el presente estudio con el nombre comercial Celite®⁶ (Ver Anexo D.1.). Este producto es hecho a base de diatomita, que es el esqueleto de algas unicelulares fosilizadas llamadas “diatomos”, siendo su composición principal dióxido de sílice (SiO₂) en aproximadamente un 90% (Ver Anexo B.4). Este compuesto es insoluble en ácido e inerte, y su inclusión en el alimento animal está autorizado por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) en alrededor de un 5 %⁷.

ENZIMAS

Generalidades

Prácticamente todas las reacciones químicas que tienen lugar en los seres vivos están catalizadas por enzimas. Las enzimas son proteínas de estructura tridimensional sumamente compleja. Actúan en el metabolismo celular sintetizando o catabolizando sustratos en reacciones bioquímicas transformando un compuesto orgánico en otro (Vargas, 1990) y una vez terminada la reacción, vuelven a su estado original sin ser alteradas químicamente por la reacción que catalizan. Esto permite que las enzimas puedan actuar varias veces produciendo una sucesión ordenada de reacciones químicas en los sistemas biológicos (Glavic y Ferrada, 1994).

⁶ Celite Corp., Lompar, CA 93436

⁷ Comunicación Personal Celite-Chile, 2003.

Las enzimas son catalizadores biológicos muy eficaces, es decir, aceleran diversas reacciones químicas que en condiciones normales se realizarían muy lentamente, o simplemente no se producirían. Además se caracterizan por su elevada especificidad frente a los sustratos actuando en determinadas condiciones de pH, temperatura y humedad (Bühler *et al.*, 1998).

Enzimas en Nutrición Animal

Origen de las enzimas

Las enzimas usadas en la alimentación animal son producidas en gran parte mediante el empleo de bacterias, hongos y levaduras; por ser más rentable que la producción de enzimas en materias primas de procedencia animal o vegetal. También podemos considerar que los microorganismos pueden sintetizar una vasta gama de enzimas que los animales son incapaces de producir.

La obtención de estas enzimas se efectúa seleccionando cepas naturales o a través de la ingeniería genética, donde se transfieren los genes adecuados para la producción de determinadas cepas de microorganismos productores de enzimas.

La producción de enzimas a nivel industrial se realiza mediante dos procedimientos: métodos de emersión y métodos de inmersión. En el primero se realiza una fermentación superficial sobre medios de cultivos sólidos con ventilación de superficie, mientras que el segundo método consiste en cultivar los microorganismos sintetizadores de enzimas en el interior de un medio de cultivo líquido produciéndose enzimas con diversas características (Bühler *et al.*, 1998).

Las características de cada enzima en particular dependen del organismo del cual provengan y de su conformación espacial. Es por eso que para que una enzima pueda ser utilizada en alimentación animal debe cumplir ciertos requisitos, como son: resistir el paso por el ambiente ácido del estómago y

además, tener una tolerancia al calor (si este alimento es sometido a un proceso térmico) (Vargas, 1990).

Para cumplir estos requisitos es importante conocer las propiedades que poseen las enzimas, para que así, éstas puedan ser utilizadas para el mejoramiento de la digestibilidad nutricional animal, ya sea en el proventrículo (estómago glandular) y/o en la molleja (estómago muscular).

Propiedades de las enzimas

Las propiedades de los enzimas derivan del hecho de ser proteínas y de actuar como catalizadores. Como proteínas, poseen una conformación natural más estable que las demás conformaciones posibles. Así, cambios en la conformación suelen ir asociados con cambios en la actividad catalítica. Los factores que influyen de manera más directa sobre la actividad de una enzima son (Glavic y Ferrada, 1994; Graham, 1994; Hernández, 2001):

- pH
- temperatura
- metales pesados

pH

La mayoría de las enzimas son muy sensibles a los cambios en la acidez o alcalinidad del medio en que actúan. De hecho, cada enzima exhibe un pH óptimo bien definido, que la capacita para desarrollar cabalmente su función catalizadora. Cuando el pH cambia más allá de ciertos límites estrechos, la enzima pierde su forma normal y se desnaturaliza afectando drásticamente su actividad (Glavic y Ferrada, 1994). Es así como la mayor parte de las enzimas originadas a partir de hongos actúan en un rango óptimo de pH más bien ácido (2,5 a 5,0). En cambio, las enzimas sintetizadas a partir de las bacterias tienen generalmente un

pH óptimo de acción sobre 6.0, lo que les permite actuar de manera muy eficiente en el pH neutro o ligeramente ácido que presenta el lumen del intestino delgado (Bühler *et al.*, 1998). Es debido a esto que en alimentación animal las enzimas provenientes de las bacterias tienen una mayor relevancia que la fúngicas. Un claro ejemplo lo constituyen las xilanasas, en donde encontramos que la endo-1,4-xilanasas de origen fúngico posee un pH óptimo ácido (2,5 a 5,0) que les permite funcionar de mejor manera en las condiciones existentes en molleja y proventrículo. Contrario a esto la endo-1,4-xilanasas producida por el *Bacillus subtilis* tiene un pH óptimo de sobre 6,0, lo que le permite a la enzima actuar muy eficientemente ante el pH neutro o levemente ácido presente en el intestino delgado o grueso, donde el tiempo de exposición del alimento frente a las enzimas es mayor, permitiendo una mejor acción de la enzima (Graham, 1994; Van de Mierop y Ghesquiere, 1998).

Como ésta característica es de gran relevancia, la industria de las enzimas ha empleado técnicas que permiten ligar las enzimas al sustrato, de manera de reducir el efecto deletéreo de la acidez en aquellas enzimas que actúan en un pH más básico (Vargas, 1990).

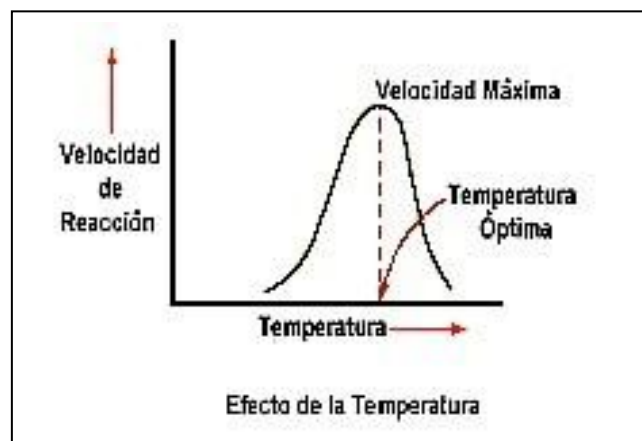
Temperatura

En general, las reacciones enzimáticas ocurren lentamente o no se efectúan a temperaturas sensiblemente inferiores a la de las células, pero la actividad catalítica reaparece cuando la temperatura celular se aproxima a su normalidad. En cambio, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas, es por esto, que por cada 10°C de incremento, la velocidad de reacción se duplica. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general. Sin embargo, por el hecho de ser proteínas, la mayoría de las enzimas son inactivadas al ser sometidas a temperaturas superiores a los 50-60°C. La razón principal a este hecho radica en

que el calor excesivo afecta los enlaces no-covalentes de la molécula proteica, tales como los enlaces de hidrógeno, causando su desnaturalización (Glavic y Ferrada, 1994).

La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama temperatura óptima (Figura N°4). Por encima de esta temperatura, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse (Hernández, 2001).

Figura N°4. Efecto de la Temperatura en la actividad catalítica enzimática (Hernández, 2001).



En la industria avícola la temperatura es de gran relevancia sobretodo cuando el alimento es peletizado, ya que las altas temperaturas usadas en éste proceso llevan a la desnaturalización de la proteína y a la ineficacia de la enzima (Vargas, 1990).

Metales pesados:

Los iones de algunos metales pesados, tales como el plomo (Pb^{++}) y el mercurio (Hg^{++}), precipitan a las proteínas y, por ende, inactivan las enzimas.

Normalmente, las enzimas están en suspensión dentro del citoplasma o unidas a una biomembrana. Si los iones de un metal pesado se combinan con una enzima en suspensión, la molécula proteica precipita, perdiendo su eficacia como enzima (Glavic y Ferrada, 1994)

Sustratos de las Enzimas

Tipo de Sustrato:

Según Vargas (1990) para entender la acción enzimática es necesario considerar la relación entre estos compuestos químicos y el complejo sustrato que representa un alimento. Así, la elección del tipo de enzima a emplear dependerá de la naturaleza del sustrato sobre el que quiere accionar. Por ejemplo, los principales componentes presentes en un grano de cereal son las proteínas, grasa, almidón, celulosa, hemicelulosa y los polisacáridos no amiláceos (PNA). Esto queda demostrado en un ensayo descrito por Graham (1994), el cual evaluó la actividad de tres enzimas en dos sustratos distintos. Estas enzimas mostraron comportamientos completamente inversos cuando se enfrentaron a estos sustratos, siendo una enzima A la mejor para un sustrato y la peor para el otro. Es por esto, que si un ave es alimentada con trigo o cebada, es lógico que la xilanasas y la β -glucanasas deberían ser dirigidas a los xilanos del trigo y a los β -glucanos de la cebada, respectivamente.

Los sustratos sobre los que pueden actuar las enzimas pueden ser clasificados en tres grandes grupos (Bühler *et al.*, 1998):

1. Sustratos para los cuales los animales de estómago simple sintetizan las enzimas adecuadas en el tracto digestivo como son el almidón, proteínas y lípidos. Normalmente los animales producen estas enzimas en cantidad suficiente para hidrolizar totalmente estos sustratos, pero en circunstancias

específicas como en animales jóvenes o en condiciones de estrés, no se producen en cantidades suficientes.

2. Sustratos para los cuales los animales no producen enzimas y cuya digestibilidad es muy pobre, como por ejemplo la celulosa (moléculas de glucosa unidas por enlaces β -glucosídicos) que es prácticamente indigestible para monogástricos.
3. Sustratos para los cuales el animal no produce enzimas, y además generan efectos antinutricionales, como por ejemplo los PNA y los fitatos.

Según Bühler *et al.* (1998), las dos categorías más importantes de productos enzimáticos que se utilizan actualmente en nutrición animal son las enzimas que hidrolizan los fitatos (fitasas) y los PNA, las cuales se verán posteriormente con mayor detención.

Concentración del Sustrato:

Este criterio está relacionado con la habilidad de la enzima para encontrar y dividir estos sustratos. Un estudio descrito por Graham (1994) muestra la actividad de dos xilanasas frente a distintas concentraciones de sustrato. Las dos enzimas tuvieron casi idénticas actividades cuando las concentraciones del sustrato excedieron los 5 mg/ml, pero en concentraciones inferiores a 3,5 mg/ml estas fueron claramente diferentes. A los 2,5 mg/ml una enzima fue virtualmente inactiva e incapaz de descubrir estos sustratos, mientras que la otra enzima dejó de estar activa cuando su concentración llegó a 1 mg/ml.

ENZIMAS EXÓGENAS UTILIZADAS EN ALIMENTACIÓN AVÍCOLA.

Uso de las enzimas

En la última década, la nutrición animal ha experimentado grandes cambios debido al desarrollo de las enzimas. La razón de su uso tan reciente radica en el hecho de que las técnicas de fermentación utilizadas antiguamente sólo permitían obtener un bajo rendimiento de enzimas producidas y, por tanto, las enzimas disponibles eran demasiado caras y poco atractivas desde el punto de vista económico. Sin embargo, la continua evolución de los métodos tras la incorporación de la ingeniería genética, han conseguido que las enzimas sean hoy un componente habitual de los modernos sistemas de nutrición animal (Bühler *et al.*, 1998).

La inmensa presión de reducir la acumulación de nutrientes en las excretas de ponedoras y la utilización mejorada de nitrógeno y minerales está traduciéndose rápidamente en una prioridad económica para las compañías productoras de huevos. Así, el uso de enzimas podría agregar valor a los alimentos actuales, permitiéndoles a los nutricionistas formular raciones menos concentradas y más baratas. El mejorar la disponibilidad de nutrientes en la ración a base de maíz y soya, mejoraría el rendimiento de las gallinas mientras se reducen los costos de alimentación (Scheideler *et al.*, 1998).

Como ya hemos visto anteriormente, la mayoría de los cereales utilizados en la nutrición animal contienen cantidades considerables de PNA. Estos, además de ser parcialmente digeribles actúan como sustancias ligantes impidiendo en alguna medida la acción de las enzimas digestivas del animal. Los carbohidratos que no han sido digeridos o que han sido solo parcialmente digeridos son una fuente energética perdida o en el mejor de los casos

pobremente utilizada. Es aquí donde la adición de enzimas al alimento puede jugar un papel importante (Vargas, 1990).

Para la digestión de los macronutrientes, almidón, proteínas y lípidos, las enzimas son secretadas por el ave dentro del tracto gastrointestinal. Estas enzimas endógenas catalizan la ruptura de los nutrientes a componentes de bajo peso molecular los cuales pueden ser absorbidos a través del intestino (Simon *et al.*, 1996). Sin embargo, aunque las aves pueden tener suficientes enzimas para degradar la mayoría de los nutrientes, la ruptura puede ser obstaculizada por la baja accesibilidad de los sustratos o las condiciones ambientales adversas para la digestión. Por ejemplo las paredes celulares de los granos y de las semillas que contienen aceites pueden servir como una barrera física entre las enzimas digestivas y los nutrientes contenidos dentro de las células, impidiendo el completo acceso a las enzimas y retardando la digestión de los nutrientes hacia la porción más posterior del intestino (Simon *et al.*, 1996).

La digestión está frecuentemente limitada por la estructura física y química del alimento, la actividad de los componentes antinutricionales, y por el tiempo establecido para la hidrólisis en el tracto gastrointestinal. La suplementación exógena de enzimas ayuda a contrarrestar estas limitaciones (Simon *et al.*, 1996).

Áreas de acción de las enzimas.

Existen varias razones por las cuales hoy en día se están utilizando las enzimas en la alimentación de aves destacando principalmente:

1. Remoción de los Factores Antinutricionales, como los fitatos, inhibidores de tripsina, lectinas y PNA. Al actuar sobre estos últimos disminuyen la incidencia de camas húmedas y huevos sucios, al reducir la viscosidad de las excretas (Graham, 1994).

2. El incremento del valor alimenticio de las materias primas, ya que permite usar este ingrediente en mayor abundancia y reduce el costo de producción de la dieta (Scheideler *et al.*, 1998).
3. La reducción de la variabilidad en la calidad de los ingredientes. Esto se presenta mayormente en las materias primas de pobre calidad. Además, se disminuye la variabilidad en el rendimiento del ave, lo que resulta en una mayor uniformidad del lote (Jin, 2002).
4. Suplementar la acción de las enzimas endógenas. La utilización de estas enzimas tiene por objeto equilibrar la síntesis de enzimas endógenas frente a situaciones de estrés, especialmente en las aves jóvenes. Las enzimas más importantes para este fin son las amilasas y las proteasas (Bühler *et al.*, 1998).

Dentro de las enzimas mas comúnmente utilizadas en dietas de gallinas de postura comercial a base de maíz y soya están las amilasas, proteasas, xilanasas y fitasas.

FITASAS

Generalidades

La fitasa es un tipo específico de fosfatasa (enzimas que hidrolizan fosfatos) que cataliza la remoción paso a paso del ortofosfato inorgánico del fitato para entregar P inorgánico y varios isómeros de inositol haciendo disponible el P para los animales (Scott *et al.*, 1999). Además, al romper el fitato logra la liberación de otros minerales (tales como el Ca, Mg, Zn, Fe y Cu), carbohidratos, proteínas y aminoácidos, los cuales están ligados al fitato (Touchburn *et al.*, 1998; Petersen, 2001). Así, la fitasa al liberar el P permite que éste se encuentre disponible para ser utilizado por el ave, mejorando su

crecimiento y eficiencia alimenticia y reduciendo la cantidad de emisiones de P al medio ambiente (Petersen, 2001).

La fitasa se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, está presente en insumos vegetales y es producida por diversos microorganismos como bacterias, hongos y levaduras (BASF, 1994). Además se ha observado su presencia en secreciones digestivas de las aves (Bühler *et al.*, 1998).

La actividad de la fitasa se mide en Unidades de Actividad de Fitasa (U) que corresponden a la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de fósforo inorgánico de 1,5 μmol de fitato de sodio por minuto, a una temperatura de 37°C y a pH de 5,5. (Pointillart, 1994; Kornegay, 2001).

Por otra parte, se ha visto que la actividad de la fitasa intestinal ha sido influenciada por la edad de las gallinas, mostrando estas mayores actividades en gallinas a las 52 semanas de edad que a edades más tempranas (36 semanas) o más tardías (72 semanas). Además se describen diferentes actividades de fitasa de acuerdo al tipo de gallina utilizada, mostrando mejores niveles en gallinas Hy-Line Brown W-36 que en gallinas Hy-Line White W-36 (Abudados *et al.*, 2002).

Al igual que en otras enzimas las fitasas dependen de diversos factores para ejercer una acción efectiva frente a sus sustratos (fitatos). Dichos factores que afectan a la actividad de la fitasa se describirán a continuación:

- pH. Es variable y depende del origen de dicha fitasa. Es así como las fitasas vegetales presentan un pH óptimo cercano a 5, inactivándose irreversiblemente en medios muy ácidos o muy alcalinos (Pointillart, 1994). En las fitasas intestinales se ha observado que la hidrólisis del fósforo fítico ocurre principalmente en un rango de pH de 5 a 6,5, con un mayor valor a pH 6 (Maenz y Classen, 1998). En cambio, las fitasas microbianas difieren de las vegetales y las intestinales en que éstas poseen

un rango de pH óptimo de 2 a 5,5, lo que las hace aptas para actuar en el tubo digestivo de los animales (Pointillart, 1994).

- Temperatura. En las fitasas endógenas que se encuentran en el trigo y el maíz la temperatura óptima se sitúa alrededor de los 50°C. Al igual que en todas las enzimas la inactivación por calor es muy importante. En el caso de la fitasa del afrecho de trigo, la inactivación puede llegar a niveles del 50% y 90% a partir de los 70°C y 72°C, respectivamente. Esto es determinante cuando el alimento es tratado térmicamente (peletización), principalmente cuando alcanzan o superan dichas temperaturas. Con respecto al frío, este no afectaría a la fitasa, sin embargo el congelamiento podría acarrear la formación de cristales de hielo, los cuales causarían la ruptura de las membranas, dejando que la enzima actúa libremente frente a su sustrato (Pointillart, 1994).
- Humedad. Al ser la fitasa una enzima hidrolítica, en condiciones ambientales que presentan aire caliente (60°C) y saturado de humedad, la fitasa vegetal puede hidrolizar hasta un 30% de los fitatos presentes en el trigo (Pointillart, 1994).
- Integridad estructural del grano. Este factor puede modificar la actividad fitásica. De hecho el grano molido posee una actividad fitásica mayor que el grano entero. Este hecho radica principalmente en que el sustrato y la enzima, separados en condiciones fisiológicas, quedan expuestos gracias a la destrucción parcial de las células y membranas. La integridad del grano genera una alta variabilidad en la actividad fitásica en los afrechos y molidos de granos como el trigo, presentando este último una mayor variabilidad (Pointillart, 1994).
- Ca y otros cationes. el calcio, junto a otros iones metálicos, forma fitatos estables, que son resistentes a la acción enzimática (Pointillart, 1994).

Además se ha observado que altos niveles de Ca y Mg disminuyen la actividad fitásica intestinal de los pollos (Touchburn *et al.*, 1998).

- Relación Ca:P total. Esta relación no sólo es muy importante para la retención de Ca y P, sino que también influyen en la actividad fitásica intestinal de las aves. Esta actividad se ha visto disminuida cuando aumentamos la relación Ca :P total (Quian *et al.*, 1997), la que depende de los niveles de Ca y P de la dieta (Quian *et al.*, 1997; Touchburn *et al.*, 1998); las uniones extra de Ca para formar complejos insolubles que son menos accesibles para la fitasa, y por último, probablemente lo más importante, la cantidad extra de Ca podría disminuir directamente la actividad de la fitasa por competencia de los sitios activos de la enzima (Quian *et al.*, 1997).
- Proteínas. La unión de los fitatos con ciertas proteínas forman complejos menos vulnerables a la acción de la fitasa (Pointillart, 1994).
- Vitamina D₃. La vitamina D al estimular la absorción de calcio a nivel duodenal, disminuye la cantidad de Ca disponible para la formación de fitatos de Ca que son insolubles a nivel intestinal (Pointillart *et al.*, 1989). Además, promueve el transporte de P de los enterocitos desde el lumen intestinal al interior del citoplasma. Ambas situaciones aumentan la absorción y retención de Ca y P en el ave (Quian *et al.*, 1997).

Pointillart (1994) describe al menos 3 tipos de actividad fitásica según la procedencia que éstas tengan: las fitasas vegetales, intestinales y microbiales, las cuales se detallarán a continuación:

1. Fitasas Vegetales.

Según su clasificación estructural las fitasas vegetales corresponden a una “6-fitasa” (E.C. 3.1.3.26). La clasificación se basa en el sitio de la molécula de ácido fítico donde la fitasa inicia la desfosforilación. Es por esto, que las fitasas

vegetales inician su hidrólisis en el grupo fosfato de la posición C6 (Adeola y Sands, 2003).

La fitasa ha sido aislada y caracterizada a partir de diferentes fuentes como trigo, maíz, cebada, triticale, habas, arroz, poroto de soya, etc. Su actividad fitásica varía considerablemente con la especie vegetal evaluada. De hecho, muy pocas semillas presentan una actividad fitásica elevada, como es el caso del trigo y sus derivados el molido de trigo y el afrecho de trigo, que presentan actividades del orden de 600 ± 60 , 1900 ± 140 y 1100 ± 120 U/Kg., respectivamente. En cuanto al poroto de soya, el afrecho de soya y el maíz su actividad fitásica es casi siempre despreciable o nula llegando a niveles de 80 ± 20 , 60 ± 30 y 30 ± 15 U/Kg., respectivamente (Pointillart, 1994).

Con respecto a su distribución anatómica, la fitasa de los granos y de las semillas se encuentra en mayor proporción en las envolturas y en el endospermo. Por ejemplo el trigo presenta sus mayores actividades en la aleurona y el endospermo en un 39,5 y 34,1%, respectivamente (Pointillart, 1994).

2. Fitasas Intestinales.

Existen dos tipos de fitasas intestinales, la primera es la fitasa propia del ave que se produce en la mucosa intestinal, y la segunda, la proveniente de la flora microbiana intestinal (Guenter, 1997).

Los rumiantes hidrolizan totalmente el P fítico gracias a la flora microbiana que presentan en su rumen, generando una alta actividad fitásica intestinal (Pointillart, 1994). En cambio en las aves, la eficacia de la fitasa intestinal es diferente, ya que su actividad fitásica es prácticamente insignificante (Bühler *et al.*, 1998). Además la presencia de bajos niveles de P fítico disponible indican que la fitasa producida por la flora microbiana presente en el tracto digestivo es de poca importancia, siendo menor aún en las aves jóvenes (Guenter, 1997).

En dos estudios realizados por Maenz y Classen (1998) y Abudados *et al.* (2000) se evaluó la actividad fitásica intestinal. Para medir esta actividad se incubó un extracto de mucosa intestinal con ácido fítico como sustrato de todas las secciones del intestino de gallinas ponedoras y pollos broilers. En ambos estudios se evidenció que la actividad fitásica era predominantemente mayor en el duodeno, y específicamente en la porción proximal, siendo hasta un 39% mayor que en su porción distal. El máximo de actividad fitásica se encontró en un rango de pH de 5.6 a 6.2 (Abudados *et al.*, 2000), con un mayor valor a pH 6 (Maenz y Classen, 1998). Sin embargo esta actividad fue muy baja, y casi imperceptible a pH 7.0. Además se observó que la actividad fitásica intestinal promedio fue mayor en las gallinas ponedoras que en los pollos broilers (Maenz y Classen, 1998). La respuesta al pH y a la actividad diferencial en el duodeno sugiere que esta no es una fosfatasa alcalina. La actividad más alta que presenta el duodeno proximal implica que el pH intestinal pueden ser un importante modulador de la actividad fitásica intestinal y de la utilización del P fítico (Abudados *et al.*, 2000).

Es importante destacar que a pesar de los estudios realizados, no ha sido posible determinar la contribución de la actividad de la fitasa endógena sobre la digestibilidad del P fítico dietario, siendo aún la presencia y eficacia de la fitasa intestinal controversial.

3. Fitاسas Microbiales Exógenas.

La fitasa microbial corresponde a una 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8), ya que ésta inicia la hidrólisis de la molécula de ácido fítico en el C₃ del anillo de inositol (Dvorakova, 1998). Diversos microorganismos son capaces de sintetizar la enzima fitasa, entre ellos bacterias, hongos y levaduras (Kornegay, 2001), pero las especies fúngicas son los microorganismos que han sido utilizados mayoritariamente para la producción de fitasas (Lui *et al.*, 1998). La fitasa producida por *Aspergillus niger* es la más estudiada y posee dos pH óptimos. El

primero a pH 2,5 y el segundo a pH 5,5, con una temperatura óptima de aproximadamente 60°C (Adeola y Sands, 2003). Alcanza su máxima actividad a pH 5 y se inactiva por completo a pH superiores a 7 (Khan, 1996). La fitasa del trigo posee un solo pH óptimo de 5,2. Al comparar ambas fitasas, la de *A. niger* ha demostrado ser más efectiva que la fitasa del trigo por unidad de actividad, probablemente debido al mayor rango de acción que ésta presenta, ajustándose mejor a las condiciones predominantes en el tracto digestivo del animal, especialmente dentro del buche (pH 5-6), la molleja y el proventrículo (pH 2-4) (Touchburn *et al.*, 1998).

A pesar que se han utilizado innumerables fitasas fúngicas de diversos géneros (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*) y especies, las fitasas del *A. niger* ha demostrado ser el mejor productor de fitasa extracelular dentro de los hongos (Volfova *et al.*, 1994). Sin embargo, el procesamiento de los alimentos a través del peletizado y extruído han volcado el interés de los investigadores hacia las fitasas bacterianas de distintos géneros (*Bacillus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*), las cuales son capaces resistir temperaturas más altas (Kerovuo, 2000). Es así, como las fitasas del *A. niger* y del *A. fumigatus*, no son termoestables, ya que no tienen la capacidad de replegarse después de ser desnaturalizadas por el calor. Sobre los 80 °C cambian su conformación estructural produciéndose la inactivación irreversible de las enzimas. Por el contrario, las fitasas bacterianas son termoestables, como es el caso de la fitasa del *Bacillus* sp. cepa DS11 (Kim *et al.*, 1998). Este presenta una temperatura óptima a los 70°C, que es la más alta temperatura óptima de todas las fitasas en general. Esta enzima presenta una alta termoestabilidad, permaneciendo 100% activa después de 10 minutos de incubación a 70°C y hasta un 50% activa después de ser sometida a 90°C. Sin embargo, su termoestabilidad depende de la presencia de CaCl₂, ya que su actividad fitásica puede verse drásticamente disminuída a los 50°C en ausencia de

CaCl₂. Esto indica que el ión Ca⁺² tiene un poderoso efecto protector sobre la enzima en contra la desnaturalización térmica (Kerovuo, 2000).

La utilización de fitasas microbianas en alimentación aviar obedece a dos razones fundamentales: Permite disminuir la cantidad de fósforo añadido a la dieta y disminuye la contaminación por fósforo al disminuir su eliminación al medio junto con las heces. (Kies *et al.*, 2001). Además de aumentar la biodisponibilidad del fósforo fítico, la fitasa libera otros nutrientes como aminoácidos, minerales, energía y cationes.

Descripción de la Fitasa en Estudio

La fitasa utilizada en este estudio corresponde al producto Phyzyme® 5000G, elaborado por la empresa Danisco⁸. La enzima es una 3-Fitasa (E.C. 3.1.3.8) producida por un hongo filamentoso llamado *Trichoderma longibrachiatum (reesei)* que aporta 5000 U/g. La dosificación de la fitasa en la dieta considerada para aves de postura es de 60g/tonelada de alimento, o sea 300 U/kg. de alimento.

Bioeficacia de la Fitasa

Parámetros Productivos

La mayoría de los estudios que han evaluado el efecto de la enzima fitasa sobre los parámetros productivos en gallinas de postura se han realizado en base a dietas maíz-soya. Estos trabajos se refieren, generalmente, a la evaluación de la incorporación de distintos niveles de fitasa (U/kg) con distintos niveles de fósforo disponible (FD). Estos niveles de FD son muy importantes, es por esto, que el NRC (1994) recomienda que las gallinas consuman diariamente entre 350 y

⁸Danisco Animal Nutrition. P.O. box 470157, St. Louis, Missouri, 63147, E.E.U.U.

400 g. de FD, lo cual significa que las dietas de estas aves deben contener entre 0,35% y 0,45% de FD.

En el porcentaje de postura, la mayoría de los estudios enfocados a la utilización de la enzima fitasa mencionan que la enzima corrige las deficiencias provocadas por un bajo nivel de FD (Gordon y Roland, 1996; Gordon y Roland 1997; Kamińska y Skraba, 1997; Punna y Roland, 1999; Boling *et al.*, 2000a; Ceylan *et al.*, 2003; Keshavarz, 2003a). Keshavarz (2003a) señaló que tanto niveles de 150 como de 300 unidades de fitasa por kg de alimento con niveles de 0,20 y 0,25% de FD fueron efectivos para aliviar las deficiencias de postura en gallinas ISA-White de 20 a 35 semanas de edad. Algo similar fue lo observado por Pescatore *et al.* (1997), los que encontraron considerables mejoras en la producción de huevos de gallinas alimentadas con 3,5% Ca y 0,2% FD. Sin embargo, en un estudio realizado por Punna y Roland (1998) mencionan que a pesar que la fitasa corrige los síntomas de deficiencia de P en las gallinas alimentadas con 0,10 y 0,20% FD, ésta no logra tener una mayor influencia en las gallinas alimentadas con dietas con niveles mayores del 0,20% de FD.

Otros estudios han demostrado que niveles menores a 300 unidades de fitasa / kg de alimento son adecuados para gallinas ponedoras alimentadas con dietas a base de maíz y soya. Un ejemplo de esto, es el estudio realizado por Boling *et al.* (2000a), en donde utilizaron una dieta basal con 17 % de proteína cruda (CP), 3.8% Ca, y 0.10% FD. Se realizaron 7 tratamientos que consistían en una dieta basal maíz – soya suplementada con 0, 100, 200, 250 ó 300 unidades de fitasa / kg, 0,05% de P inorgánico (0.15% de FD), y una dieta control positivo que contenía 0.45 % FD. Los resultados revelaron una baja significativa en la producción de huevos a las 35 semanas de edad en gallinas alimentadas con la dieta basal que contenía 0.10% FD sin suplementación de P inorgánico desde las 20 semanas de edad (51% de producción de huevos comparado con un

promedio de 88% de los otros tratamientos). Sin embargo, la suplementación de 100 U de fitasa/ kg de alimento fue suficiente para permitir que las dietas a base de maíz y soya que contenían 0.10% FD pudieran ser dadas por un tiempo de 40 semanas sin efectos negativos en los resultados productivos.

Um y Paik (1999) observaron que la enzima fitasa logró un aumento significativo en el porcentaje de postura en gallinas de 21-40 semanas de edad con niveles de FD de 0,37% y 500 U/kg en dietas a base de maíz-soya. Vallardi *et al.* (2002) también observaron un aumento del porcentaje de postura en gallinas de 64 semanas de edad al suplementar las dietas a base de sorgo-soya con 600 U/kg de dieta de fitasa.

Sin embargo, Terreros (2001) al trabajar con gallinas de 28 a 48 semanas de edad, observó que 300 U de fitasa/kg de dieta no fueron suficientes para mantener la producción del grupo control (0,44% de FD) sin suplementación de fitasa, haciéndose necesaria la inclusión de 600 U/kg para equiparar la producción de dicho grupo.

Los estudios realizados para estimar el efecto de la enzima fitasa en el peso de huevo han arrojado resultados controversiales.

Van der Klis *et al.* (1997) evaluaron 3 niveles de inclusión de la enzima fitasa (100, 200 y 300 U/kg) en gallinas de 18 a 68 semanas de edad encontrando un aumento significativo en el peso de huevo con 100 y 300 U comparado con el grupo control sin suplementación. Um y Paik (1999) también describen un aumento significativo en el peso del huevo al incorporar 500 U/kg de la enzima fitasa.

Otros resultados no observaron efectos en peso de huevo al incorporar la enzima fitasa (Kamińska y Skraba, 1997; Carlos y Edwards, 1998; Boling *et al.*, 2000b; Scheideler y Jalal, 2000; Sohail y Roland, 2000; Jalal y Scheideler, 2001;

Keshavarz, 2003a). Mientras que Terreros (2001) al incorporar 300 ó 600 U observó una disminución en el peso de huevo a mayor incorporación de fitasa.

Para la masa de huevo Ceylan *et al.* (2003) y Keshavarz (2003a) señalan que a bajos niveles de FD (0,2 y 0,25%, respectivamente) la adición de fitasa (300 y 150 U/kg de alimento, respectivamente) restaura la masa de huevo a niveles de las dietas control (0,35 y 0,40% FD en el caso de Ceylan *et al.* (2003) y 0,45% FD en el caso de Keshavarz (2003a). Algo similar es lo observado por Keshavarz (2003b) con niveles de 0,08 a 0,18% de FD en gallinas Babcock y Hy-Line.

Scheideler y Jalal (2000) describieron que al adicionar 2 fitasas distintas al menor nivel de FD (0,10%) la fitasa mejoró los valores de masa de huevo de 45,16 a 48,93 y 49,80g, respectivamente.

Varios autores describen mejoras en el consumo de alimento en aves alimentadas con 0,10 a 0,20% de FD con niveles que fluctúan de 150 a 300 U/kg de fitasa en gallinas desde las 18 a las 70 semanas (Gordon y Roland, 1997; Punna y Roland, 1999; Boling *et al.*, 2000a; Scheideler y Jalal, 2000; Keshavarz, 2003a). Estos aumentos no solo se obtuvieron con niveles bajos de FD sino que también con niveles de 0,37% de FD al suplementar con 500U/kg de fitasa (Um y Paik, 1999). Además Van der Klis *et al.* (1997) también encontraron aumentos de consumo con niveles de 0,33% de P en la dieta e inclusiones de 250 y 500, y 100, 200 y 300 U/kg de dieta en aves de 22-35 semanas y 20-68 semanas, respectivamente.

Sin embargo, Carlos y Edwards (1998) y Ceylan *et al.* (2003) no observaron efectos en el consumo de alimento con inclusiones de 600 y 300 U de fitasa/kg de dieta, respectivamente. Estos últimos autores utilizaron gallinas desde las 20 hasta las 65 semanas de edad con niveles de 0,20 hasta 0,33% de FD. Sohail y Roland (2000) al evaluar 3 niveles de Ca (3,1, 3,4 y 3,7%) con inclusiones

de 300 U de fitasa/kg, éstos no influyeron en el consumo de gallinas Hy-Line W-36 de las 17 a las 38 semanas de edad.

En relación a la eficiencia de conversión alimenticia (ECA) Scott *et al.* (1999) y Lim *et al.* (2003) observaron mejoras significativas al agregar fitasa a las dietas con niveles de 0,20% de FD. Sin embargo, cuando se agregó la fitasa a niveles más altos de FD (0,40%), tuvo un efecto levemente negativo (Scott *et al.*, 1999). Resultados similares se encontraron en un estudio realizado por Keshavarz (2003a) en donde la adición de la enzima pudo restaurar la conversión en dietas deficientes en FD (0,25-0,2-0,15%) llegando a niveles del control (0,45% de FD). Keshavarz (2003b) encontró idénticos resultados en gallinas de 18 a 26 semanas de edad, al adicionar 300 U de fitasa/kg de dieta con niveles secuenciales de FD de 0,15-0,10-0,08%.

La mayor parte de los estudios describen una ausencia de efecto al incorporar la fitasa sobre la ECA (Van Der Klis *et al.*, 1997; Um y Paik, 1999; Boling 2000a, b; Keshavarz, 2003a; Ceylan *et al.*, 2003) desde niveles de 100 hasta 500 U de fitasa/kg de dieta.

Con respecto al peso corporal, varios autores señalan que al administrar fitasa a niveles de 100 hasta 600 U/kg en dietas bajas en FD (0,10-0,25%), las aves restauran el peso perdido llegando a niveles del control (0,40% FD) (Van der Klis *et al.*, 1997; Carlos y Edwards, 1998; Scott *et al.*, 1999; Keshavarz, 2000a; Keshavarz, 2003b) o lo superan usando niveles de 0,10% FD con 300U/kg de fitasa (Punna y Roland, 1999). Mientras, otros autores no observaron efectos significativos sobre el peso corporal al utilizar bajos niveles de FD (0,10-0,25%) y distintos niveles de fitasa (100 a 300U/kg) (Scheideler y Jalal, 2000; Boling *et al.*, 2000a, b; Jalal y Scheideler, 2001; Ceylan *et al.*, 2003; Keshavarz, 2003a). Keshavarz (2003a) encontró que con niveles secuenciales de 0,2-0,1-0,1% de FD

ambos niveles de fitasa (150 y 300U/kg) no fueron suficientes para recuperar el peso corporal perdido por la deficiencia de FD (0,1%).

En el estudio realizado por Scott *et al.* (1999), también trabajaron con niveles altos de FD (0,40%) y con 500U/kg de fitasa, observando una disminución significativa en el peso corporal. En cambio, Keshavarz (2000a) al utilizar los mismos niveles de FD observó que el peso corporal aumentaba significativamente ($p < 0,05$).

Indicadores de Calidad Externa del Huevo

Varios trabajos han evaluado el efecto de la enzima fitasa sobre los indicadores de calidad externa del huevo, encontrándose resultados contradictorios.

Terreros (2001) evaluó dos niveles de incorporación de fitasa a las dietas, 300 y 600 U/kg de dieta, sobre el porcentaje de huevos defectuosos (trizados y quebrados), donde no encontró diferencias significativas al incorporar 300 ó 600 U/kg de alimento. Um y Paik (1999) tampoco encontró diferencias al utilizar 500 U/kg.

Sin embargo, Kamińska y Skraba (1997) señalan una disminución significativa en el porcentaje de huevos trizados y quebrados totales de 10, 32% a 8 y 12% al incorporar 300 U/kg de dieta y con niveles de 0,25% de FD. Algo similar es lo observado por Lim *et al.* (2003) quienes también describen una disminución de los porcentajes de huevos quebrados y sin cáscara con niveles de 0,25% de FD y 3% de Ca durante todo el período experimental.

Digestibilidad Ileal Aparente de Ca y P

Como el ácido fítico forma complejos con diversos nutrientes, como el Ca y el P, varios estudios han evaluado el efecto de la fitasa en la liberación de estos nutrientes, los cuales podrían mejorar su digestibilidad una vez que la enzima ha

sido incorporada a la dieta. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han realizado en pollos broilers indicando mejoras substanciales en las digestibilidades de Ca y P (Schöner *et al.*, 1991; Broz *et al.*, 1994; Sebastian *et al.*, 1996b; Quian *et al.*, 1997; Touchburn *et al.*, 1998; Johnston y Southern, 2000; Paik *et al.*, 2000; Lan *et al.*, 2002; Viveros *et al.*, 2002).

La mayor parte de la literatura enfocada al estudio de la enzima fitasa en aves de postura describe un efecto benéfico al adicionar la enzima sobre la biodisponibilidad (Gordon y Roland, 1997; Van der Klis *et al.*, 1997; Carlos y Edwards, 1998; Um y Paik, 1999; Sohail y Roland, 2000) y la retención de Ca y P (Sebastian *et al.*, 1996a; Carlos y Edwards, 1998; Leske y Coon, 1999; Um y Paik, 1999; Um *et al.*, 1999; Scheideler y Jalal, 2000; Jalal y Scheideler, 2001).

Así, tanto en estudios realizados por Um y Paik (1999) como Jalal y Scheideler (2001) describen aumentos significativos en la retención de Ca y P al incluir la enzima fitasa a niveles de 500 y 250 a 300U/kg de alimento, respectivamente. Aunque, Um y Paik (1999) trabajaron con FD del orden de un 0,37% y Jalal y Scheideler (2001) con niveles de 0,25, 0,15 y 0,10%, los últimos encontraron un efecto mayor con el menor nivel de FD. Además Um y Paik (1999) observaron que al utilizar niveles de fitasa de 500 U/kg, junto con un 1,4% de fosfato tricálcico, obtuvieron las mayores retenciones de P al compararlo con el grupo control (con 1,4% de fosfato tricálcico) sin suplementación de fitasa. Cuando evaluaron las retenciones de Ca, éstas fueron más altas que el control cuando utilizaron 500 U/kg de fitasa, pero sin suplementación de fosfato tricálcico.

Sohail y Roland (2000) señalan que la administración de 300 U/kg de fitasa mejora la biodisponibilidad del Ca a niveles marginales de Ca de 3,4% en gallinas Hy-Line W-36 de 18 a 38 semanas de edad.

Keshavarz (2003a) al evaluar dos niveles de fitasa (150 y 300U/kg) en pollitas de postura hasta las 18 sem de edad, observó que ambos niveles aumentaron la ingesta diaria de P total en la dieta con niveles de 0,15% de FD. Además el porcentaje de excreción de P del grupo control alimentado con 0,15% de FD sin fitasa fue significativamente más alto que los grupos alimentados con 0,10 o 0,15% de FD más fitasa. Este hecho muestra la efectividad de la fitasa en aumentar la retención del P proveniente del fitato.

Keshavarz (2000a) y Keshavarz (2000b) mencionan que la enzima fitasa no mejoró significativamente la retención del fósforo. Keshavarz (2000b) al evaluar pollos de desde las 0 a 18 semanas de edad alimentados con niveles de 300 U/kg de fitasa y de 0,10 a 0,40% de FD, no observó diferencias significativas en la retención de P total, salvo en la ingesta diaria de P total, la que aumentó a las 5 semanas de edad.

Carlos y Edwards (1998) indican que al utilizar 600U de fitasa/kg de alimento aumentó la retención de P-fítico, y junto con la administración de 5 μ g de 1,25(OH)₂D₃ aumentó la retención de P total ($p < 0,05$) en gallinas de 24 semanas de edad. Sin embargo, ante la ausencia de 1,25(OH)₂D₃, la fitasa fue incapaz de mejorar las retenciones de Ca y P.

Costos Alimenticios

Gran parte de los estudios mencionan la reducción de los costos de alimentación al utilizar la enzima fitasa (Latshaw, 1999; Coetzee, 2000; Oderkirk, 2001), sin embargo, en casi la totalidad de los trabajos revisados los autores no buscaban evaluar el efecto de la incorporación de fitasa sobre el costo de la ración. Salvo un estudio realizado por Terreros (2001), el cual indicó que el margen bruto (MB) calculado benefició al grupo control por sobre los

tratamientos que incorporaban fitasa en dos niveles (300 y 600 U/kg de alimento).

EL COMPLEJO MULTIENTZIMÁTICO

La eficacia de los productos multienzimáticos suele ser muy superior al de la acción de una sola enzima. La razón de esta situación radica en el hecho que estas diversas enzimas actúan en las mismas condiciones de reacción ejerciendo su acción simultáneamente, y por ende, favoreciendo la digestibilidad del alimento (Bühler *et al.*, 1998).

Se han elaborado una serie de productos multienzimáticos dependiendo del ingrediente a utilizar en las dietas. Enzimas como celulasas, hemicelulasas, β -glucanasas, galactosidasas, pentosanas, pectinasas, lipasas, amilasas, proteasas, xilanasas, entre otras, han sido combinadas para optimizar los rendimientos productivos de las aves y disminuir los FAN presentes en las dietas (Classen y Bedford, 1991; Brenes *et al.*, 1993; Bryden *et al.*, 1994; Annison *et al.*, 1995; Jeroch *et al.*, 1995; Wiryawan, 1997; Zanella *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000; Brenes *et al.*, 2002; Gracia *et al.*, 2003).

Uno de los complejos multienzimáticos más utilizados en dietas a base de maíz-soya es el formado por la combinación de las enzimas α -amilasa, xilanasas y proteasa, que corresponde al producto que se evaluará en el presente trabajo.

Mecanismos de acción del complejo Multienzimático (CME).

Las amilasas son enzimas que catalizan la escisión del almidón y actúan sobre la digestibilidad energética al exponer más rápidamente el almidón a la digestión intestinal (Bedford y Pack, 1998). Se distinguen, entre otras, la α -amilasa, que escinde los enlaces α -glucosídicos en el interior de la molécula del almidón y la β -amilasa que escinde las moléculas de maltosa (Bühler *et al.*, 1998).

Las xilanasas catalizan específicamente la hidrólisis del xilano por escisión de los enlaces β -1,4 entre las moléculas de xilosa (Bühler *et al.*, 1998). Las xilanasas actúan principalmente sobre la fracción de arabinoxilanos (Classen y Bedford, 1991), hidrolizándolos en polímeros más pequeños (arabinosa y xilanos) lo que permite que no se forme el gel que aumenta la viscosidad del contenido intestinal (Grimes y Crouch, 1997) y de este modo se liberan los nutrientes encapsulados en la pared celular, como los carbohidratos complejos, quedando más accesibles para las enzimas endógenas de las aves aumentando la disponibilidad de energía y el consumo de alimento (Wyatt y Newcombe, 1999).

Las proteasas catalizan la hidrólisis de las proteínas presentes en las dietas (Bühler *et al.*, 1998).

Los mecanismos de acción de las enzimas antes mencionadas en dietas a base de granos poco viscosos como maíz-soya, tiene el propósito de aumentar la digestibilidad de los nutrientes, principalmente el almidón presente en los cereales y las proteínas vegetales (Wyatt y Newcombe, 1999). Las amilasas y xilanasas favorecen la exposición del almidón en el intestino delgado, mejorando la digestibilidad energética. Las proteasas degradan las proteínas exponiendo los gránulos de almidón incrustados en proteínas estructurales del grano (Bedford y Pack, 1998).

Se especula que la flora microbiana presente en los ciegos aporta parte de la energía obtenida de la dieta de ponedora debido al proceso fermentativo que ocurre en ésta sección del intestino (Wyatt y Newcombe, 1999). Al suplementar las dietas con el CME (a base de α -amilasa, xilanasas y proteasa) se logra una mayor degradación de las paredes celulares, liberando de este modo carbohidratos complejos, los cuales tendrán un impacto directo sobre el tipo de microflora microbial presente en el intestino, la cantidad y perfil de ácidos grasos

volátiles (AGV), afectando de esta manera la disponibilidad de energía y el consumo de alimento (Wyatt y Newcombe, 1999).

Por su parte el CME disminuiría las pérdidas endógenas provenientes de una mayor secreción de enzimas pancreáticas y de un mayor recambio de enterocitos y mucosa intestinal, más que de mejorar la digestión de aminoácidos dietarios (Bedford y Pack, 1998). Aunque el efecto total es un aumento de la digestibilidad de la proteína total, no todos los aminoácidos contribuyen de igual modo en esta digestibilidad. Sakomura *et al.* (1998) informan que el CME en pollos broilers de 32 a 37 días de edad aumenta la digestibilidad ileal de la proteína total, cisteína y treonina, con un efecto marginal sobre la lisina y metionina. Mientras el contenido intestinal de treonina y cisteína tiende a asociarse principalmente con las secreciones endógenas del ave, el contenido de lisina se asocia con la fuente dietaria y endógena, mientras que el contenido de metionina se relaciona casi en forma directa al aporte dietario (Wyatt y Newcombe, 1999). Otros autores también señalan aumentos significativos en las digestibilidades proteicas y energéticas en pollos broilers (Danisco 1997b, c; Wiryawan, 1997; Danisco 1998b, c), sin embargo, las mejoras de estas digestibilidades y de las respuestas productivas en las aves, no sólo dependen de la enzima a adicionar, sino también de los ingredientes a utilizar en dichas dietas. Así, cuando se evalúan los parámetros productivos en pollos broilers alimentados con dietas a base de lupino, estos responden de mejor manera a la acción de las xilanasas, en cambio cuando se utilizan dietas a base de soya la respuesta es mejor frente a la acción de las proteasas (Wiryawan, 1997).

En vegetales viscosos como el trigo, cebada y centeno la acción de enzimas como la xilanasas consistiría en degradar las paredes celulares y disminuir la viscosidad intestinal (Bedford y Schulze, 1998).

Con respecto a la utilización del afrecho de soya, los FAN como los inhibidores de tripsina y lectinas, serían degradados por las proteasas del CME pero faltan mayores estudios in vivo que confirmen esta aseveración (Wiryan, 1997; Bedford y Pack, 1998).

Variados son los efectos del CME a nivel intestinal entre los cuales tenemos:

1. Reduce la viscosidad intestinal asociada con el trigo, resultando en un aumento en el pasaje del alimento, lo que contribuye a dejar un sustrato menos disponible para “alimentar” a las bacterias patógenas (Hruby, 2003).
2. Aumenta los nutrientes digeridos por el ave, quedando menos nutrientes disponibles para el crecimiento de las bacterias patógenas (Hruby, 2003).
3. La reducción de la incidencia de camas húmedas, al actuar sobre los PNA que incrementan la viscosidad de las heces (Graham, 1994) y reducir la excesiva excreción de nutrientes al medio ambiente. (Simon *et al.*, 1996).
4. Altera el perfil de los carbohidratos en el intestino resultando en más sustrato transportado por las cepas bacterianas benéficas, como los *Lactobacillus* (Hruby, 2003).
5. Remueve los factores antinutricionales, como los arabinosilanos presentes en los alimentos (Simon *et al.*, 1996).
6. Devuelve ciertos nutrientes más rápidamente disponibles para su absorción (Simon *et al.*, 1996).
7. Mejora la energía y el valor nutricional de materiales brutos en menor grado (Simon *et al.*, 1996).

Efecto del CME en la variabilidad de los ingredientes.

Una de las razones por la cual se utilizan enzimas en nutrición avícola es la variabilidad presente en los alimentos. Es un hecho que existen variaciones importantes en los insumos vegetales como el maíz, sorgo y la soya, pese a que éstos son homogéneos y de alta digestibilidad nutricional. Las fábricas de alimento reciben semanalmente distintas partidas de un mismo cereal, en muchas de las cuales sus antecedentes son desconocidos. Si bien la formulación de las dietas no varía, la calidad de las materias primas utilizadas en la fabricación de dietas de aves si difieren. Como resultado, la densidad de nutrientes en las dietas, y por ende el consumo de alimento, varía directamente según la calidad de los insumos recibidos, contribuyendo de manera importante a la variación en el rendimiento en dietas de idéntica formulación, pero con distinto origen de las materias primas (Wyatt y Newcombe, 1999).

El grado de variabilidad de un cereal dentro de distintas partidas depende no solamente de la variedad del grano y condiciones de crecimiento, sino que también de las condiciones a que es sometido durante el procesamiento (Pack *et al.*, 1998, Wyatt y Newcombe, 1999). Un ejemplo de esta situación es lo informado por Hruby y Pierson (2002) que indican que un elevado porcentaje de humedad presentado en una cosecha de maíz necesitó la aplicación de altas temperaturas y condiciones de secado, lo que al final significó una reducción del valor de energía metabolizable esperado de hasta un 3%.

Mientras las condiciones de secado extremos se pueden asociar a cambios estructurales relacionados al proceso de gelatinización del almidón (Brown, 1996), otros factores propios del maíz como el contenido de almidón, amilopectina y el índice de dispersión de la proteína podrían explicar la variabilidad en maíz proveniente de diversos países (D'Alfonso, 2002). Leeson *et*

al. (1993) encontró una diferencia de ± 162 kcal/kg en los valores de energía metabolizable al comparar distintas partidas de maíz.

En cereales viscosos, como el trigo y la cebada, los polisacáridos no amiláceos (PNA) son responsables del 70 a 80% de la variación en el valor nutritivo (Choct *et al.*, 1996). Este amplio rango de variación puede ser reducido con la aplicación de las enzimas, siendo éstas más efectivas cuando la viscosidad aumenta (Bedford, 2000a). En el maíz y sorgo, al ser cereales poco viscosos, la responsabilidad en la variabilidad recaería en la estructura del gránulo de almidón (Brown, 1996). La tasa de digestión del almidón presente en el maíz se ve afectada por diversos factores, entre los cuales tenemos la cristalinidad del almidón, procesamiento y secado del grano y la formación de almidón retrógrado, como ha sido antes mencionado (Brown, 1996). Además, el grado de incrustación en proteínas podría tener algún efecto sobre el acceso al almidón por parte de las enzimas (Wyatt y Newcombe, 1999).

En el caso de la soya, su composición proteica, aminoacídica e incluso la concentración de factores anti nutricionales como los inhibidores de tripsina y lectinas son totalmente dependiente de las condiciones de cultivo, variedad de la soya y de las condiciones y técnicas de procesamiento (Wiryanawan, 1997; Elliot, 2004). Dudley-Cash (2001) mencionó que al comparar 12 fuentes distintas de soya sobre la digestibilidad de nutrientes en pollos broilers encontró que la digestibilidad ileal de energía de las dietas basadas en maíz y soya (siendo esta última la única fuente de variación) variaba de 2816 a 3104 kcal/kg de materia seca.

Efecto del CME sobre la microflora intestinal.

Como ya es sabido, los arabinosilanos provenientes de la dieta se vuelven solubles produciendo un aumento de la viscosidad digestiva (Burnett, 1996). El aumento de la viscosidad intestinal promueve la proliferación bacteriana

patógena, pues los nutrientes permanecen por más tiempo en el intestino delgado provocando un aumento de la fermentación por parte de dicha flora patógena (Chesson, 2000). Esto perjudica la eficacia digestiva global, viéndose afectada por la mayor competitividad por los nutrientes producida por las bacterias, y la disminución de la solubilidad y absorción de los ácidos grasos por aumento de la desconjugación de los ácidos biliares (Campbell y Bedford, 1992).

Bedford (1996) y Revington (2002) indican que el uso de la enzima xilanasa altera dichos patrones de fermentación, reduciendo este proceso en el íleon y estimulándolo en los ciegos. La reducción de la fermentación sería beneficiosa ya que el material que es sometido a la fermentación correspondería a almidón y proteínas sin digerir, los cuales estarían disponibles para ser utilizados por el ave en condiciones normales (Bedford, 1996). La estimulación de la fermentación de los ciegos estaría dada por la presencia de oligosacáridos de pequeño peso molecular provenientes de la acción de la xilanasa, los cuales ingresarían a los ciegos y se transformarían en una excelente fuente de fermentación para la población microbiana (Bedford, 1996; Revington, 2002; Huyghebaert, 2003). La producción de ácidos grasos volátiles (AGV) por parte de la flora microbiana es en sí una ganancia energética de ser absorbidos y utilizados por el ave, ya que son producidos a partir de fibra que en condiciones normales no estaría disponible para el animal (Bedford, 1996, Pack *et al.*, 1998; Wyatt y Newcombe, 1999, Tucker *et al.*, 2000). La producción de ácido láctico en el íleon y de ácido propiónico en los ciegos promueve una mejor salud intestinal, debido a que la producción y el cambio del perfil de AGV favorece el desarrollo de bacterias productoras de lactato (por ejemplo *Bifidobacteria*), favoreciendo el proceso de exclusión competitiva de la flora patógena. Por su parte, el propionato ha sido identificado como un elemento tóxico para organismos patógenos como *Salmonella*, *Campylobacter* y *Clostridium* (Revington, 2002; Hruby,

2003). Este cambio en la microflora aumenta la utilización de nutrientes por parte del huésped al reducir la competencia de la microflora patógena por los sustratos disponibles en intestino delgado (Tucker *et al.* 2000; Hruby, 2003), además de mejorar el estado inmunitario del animal y debido a todo esto, favorece una mayor productividad (Bedford, 1996; Hruby, 2003; Jin, 2003).

Este ambiente desfavorable ocasionado por el CME, en pollos broilers, ha llevado a la reducción de hasta un 33% y 66% del *Campylobacter* en dietas a base de maíz y de trigo, respectivamente. Con respecto a la *Salmonella* estas reducciones han llegado hasta el orden de un 60% en dietas a base de maíz (Hruby, 2003).

Aplicación del CME en dietas de aves ponedoras.

El complejo enzimático puede ser incorporado a las raciones de aves de dos formas (Bühler *et al.*, 1998; Wyatt y Newcombe, 1999; Scheideler y Weber, 2003):

1. “Over the top”: el complejo enzimático se agrega a las dietas sin realizar ajustes en los niveles de energía metabolizable y otros nutrientes, como proteínas, aminoácidos, etc., con el objeto de obtener mejoras en el rendimiento del ave.
2. “Down-Specification”: En este caso, al formular las dietas se considera el aporte que realiza el complejo enzimático de los distintos nutrientes. Esta práctica permite reducir la densidad de nutrientes, alcanzando un ahorro importante en los costos de formulación, sin sacrificar el rendimiento del ave.

Descripción del Complejo Enzimático en Estudio

En el presente estudio se evaluara el producto comercial Avizyme 1502 ®, elaborado por Danisco⁹, el cual esta compuesto de: 600 U/g. de xilanasa proveniente de *Trichoderma longibraquiatum* EC 3.2.1.8, 8000 U/g. de proteasa

⁹ Danisco Animal Nutrition. P.O. box 470157, St. Louis, Missouri, 63147, E.E.U.U.

proveniente de *Bacillus subtilis* EC 3.4.21.62 y 800 U/g. de α -amilasa proveniente de *Bacillus amyloliquifaciens* EC.3.2.1.1. La dosificación es 375g /tonelada, o sea, 225 U de xilanasas, 3000 U de proteasa y 300 U de α -amilasa por kg de alimento.

Bioeficacia del CME

Indicadores Productivos

En estudios recientes se han observado resultados favorables con el uso del CME a base de α -amilasa, proteasa y xilanasas en dietas para aves de postura. La mayoría de estos estudios muestran un aumento en el porcentaje de postura al adicionar el CME sobre los requerimientos de una “dieta base” sin deficiencias nutricionales (Danisco, 1997d; Danisco, 1997e; Scheideler y Abudabos, 1998; Scheideler *et al.*, 1998; Danisco, 1998a; Danisco, 1999c; Danisco 1999d; Danisco, 1999e; Scheideler, 2000) o con bajos niveles nutricionales (Danisco, 1997e; Danisco, 1998a; Danisco, 1999c). Scheideler *et al.* (1998) al trabajar con contenidos de energía metabolizable (EMAn) de 2800 Kcal/Kg, observaron una mejora en la producción de huevos (del orden del 1,5%) en gallinas Hy-Line W-36 de 25 a 40 semanas de edad

Además se ha descrito que el CME mantiene el porcentaje de postura al ser suplementado en niveles de 2650 hasta 2805 kcal/kg EM alcanzando producciones similares a la de los controles energético altos de 2750 a 2890 kcal/kg EM (Danisco, 1997a; Danisco, 1999a; Danisco, 1999b; Scheideler y Webber, 2003) o incluso superándolas (Danisco, 1999f).

Con respecto al peso de huevo, los estudios muestran un aumento de este indicador al incorporar a la dieta el CME (Danisco, 1997e; Scheideler y Abudabos, 1998; Lorenzoni, 2001). Lorenzoni (2001) trabajó con dos niveles de EM, el primero con una EM considerada normal (2800 kcal/kg de 23 a 26 semanas y 2750 kcal/kg de 36 a 44 semanas) y el segundo con una EM

considerada baja (2710 kcal/kg de 23 a 26 semanas y 2670 kcal/kg de 36 a 44 semanas) sin y con la adición de un complejo enzimático a base de α -amilasa, xilanasas y proteasa. Los resultados de este estudio demostraron que el uso del CME provocó aumentos significativos ($P < 0.05$) en el peso del huevo de 60.58 a 62.02 g independiente del nivel energético de la dieta.

Otros estudios no muestran diferencias en el peso de huevo desde niveles de 2650 a 2810 kcal/kg (Danisco, 1997a; Danisco, 1997d; Danisco, 1998a; Danisco, 1999a, b, d, e). Un ejemplo, es un estudio realizado en Italia, (Danisco, 1997a), el cual no mostró diferencias en peso de huevo al usar un grupo control con 2810 kcal/kg y otro grupo con 2710 kcal/kg de alimento con la incorporación del CME en gallinas de 36 y 40 semanas de edad.

Sin embargo, un estudio realizado en Francia muestra que al suplementar el CME a una dieta con 2630 kcal/kg, éste disminuía el peso de huevo de 62,4 a 62,1g (Danisco, 1999f).

En el caso de la masa de huevo, Scheideler (2000) al utilizar el CME., evidenció un aumento en la masa de huevo en dietas de baja energía metabolizable. Mientras que en un estudio realizado en Australia (Danisco, 1997d) mostró que con una dieta de baja energía (2610 Kcal/kg de alimento) al ser suplementada con el CME, este igualó los niveles de masa de huevo de la dieta control de alta energía (2750 Kcal/kg de alimento). Sin embargo, Scheideler y Abudabos (1998) y Lorenzoni (2001) no encontraron diferencias en la masa de huevo al utilizar el CME.

Con respecto al consumo de alimento, Scheideler y Webber (2003) describen un aumento en el consumo de alimento al adicionar el complejo en dietas de crianza y postura en gallinas ponedoras, cercano a 4,0 gramos por día. En otro estudio, Scheideler y Abudabos (1998) no encontraron efectos en el

consumo de alimento, lo que concuerda con un estudio australiano en dietas con 2750 kcal/kg de dieta (Danisco, 1997d).

Para la ECA la mayoría de los estudios indican beneficios significativos al suplementar el CME en dietas bajas en energía metabolizable del orden de las 2600 a 2700 kcal/kg (Danisco, 1997a; Danisco 1997d; Danisco, 1998a; Danisco, 1999d) y altas en energía metabolizable del orden de 2800 kcal/kg (Danisco1999b). Otros mencionan una mejora en la ECA al ser suplementados sobre los requerimientos de una “dieta base” (Danisco, 1999e; Cook *et al.*, 2000).

Scheideler y Abudabos (1998) no observaron diferencias significativas ($p>0,05$) para la ECA, a pesar de que numéricamente, la ECA fue mejorada con el aporte del CME.

Existe escasa literatura que informe sobre el efecto del complejo en gallinas ponedoras en el peso corporal. La literatura existente indica una ausencia de efectos significativos en este parámetro (Scheideler y Abudabos, 1998; Danisco, 1999d; Lorenzoni, 2001; Scheideler y Webber, 2003).

Indicadores de Calidad Externa del Huevo

Se ha encontrado escasa información relacionada al efecto del CME sobre los parámetros de calidad externa del huevo. Sin embargo un estudio realizado por Danisco (1999c), hace referencia a la reducción del porcentaje de huevos quebrados en gallinas de 24 a 36 semanas de edad al incorporar el CME. Mientras que Jiménez (2001) no observó diferencias significativas ($p>0,05$) sobre los huevos quebrados y sin cáscara al agregar el CME.

Digestibilidades Ileaes de Ca y P

La mayor parte de la literatura que hace referencia a las digestibilidades de Ca y P evalúa a la enzima fitasa, más que a otras enzimas o complejos enzimáticos. Los escasos estudios que evaluaban otras enzimas o complejos

enzimáticos generalmente han encontrado aumentos en dichas digestibilidades (Van der Klis *et al.*, 1995; Rostagno *et al.*, 2000; Scheideler y Weber, 2003).

En el estudio realizado por Van der Klis *et al.* (1995) en pollos broilers de 4,5 semanas de edad alimentados con dietas a base de trigo suplementadas con xilanasas, se midió la absorción de Ca, P y Mg (% de ingesta) en el quimo del yeyuno. En este estudio demostraron que la adición de la xilanasas produjo un aumento significativo en la absorción de Ca y Mg.

Rostagno *et al.* (2000) al utilizar celulasa, α -amilasa y proteasa encontraron un aumento de la digestibilidad ileal del Ca y P de un 4,7% y 7,9%, respectivamente, al ser incorporadas en dietas de pollos broilers. Scheideler y Weber (2003) evaluaron el efecto del CME con dos niveles de energía (2900 y 2770 kcal/kg de dieta), sobre la digestibilidad del fósforo en gallinas en etapa de crianza y postura. El estudio encontró que la adición del CME en dietas altas en energía metabolizable mejoró significativamente la retención de fósforo en la etapa de crianza, sin embargo, no encontraron diferencias significativas sobre la digestibilidad del calcio en las etapas de crianza y de postura.

Costos Alimenticios

Varios autores indican una baja en los costos de alimentación al usar el C.M.E. ya sea por una baja en el consumo o por una mejora en la producción o en el peso de huevo (Danisco, 1998a; Danisco, 1999a, b; Danisco, 1998a; Cook *et al.*, 2000; Lorenzoni, 2001)

Lorenzoni (2001) indica mejoras en el M.B. al utilizar el CME. Estos resultados se obtuvieron con niveles de energía de 2800 y 2750 kcal (en los períodos de 22 a 36 semanas y 36 a 44 semanas, respectivamente), mientras que al utilizar niveles de 2750 y 2670 kcal (para los mismos períodos), éstos mostraron una baja en el MB al incorporar el CME.

Los estudios mencionados anteriormente nos revelan la eficiencia que estas enzimas (CME y fitasas) han logrado en la mejora de los parámetros productivos. Sin embargo, ninguno de estos estudios ha probado el uso combinado de estas enzimas y su posible efecto potenciador, el cual se podría explicar teóricamente por la liberación de cadenas de carbohidratos que pudieran estar ligadas al fitato, las cuales podrían ser aprovechadas por el CME. Es por esto, que se ha hecho necesario plantear la siguiente hipótesis de trabajo.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La suplementación de dietas de gallinas de postura comercial a base de maíz, soya y afrechillo de trigo con fitasa y un suplemento enzimático a base de α -amilasa, xilanasa, y proteasa resulta en un mejoramiento de los indicadores productivos que el uso de ambos productos enzimáticos por separado.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la suplementación combinada de dos tipos de enzimas en dietas de gallinas de postura comercial sobre los indicadores productivos y la digestibilidad de nutrientes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el resultado productivo del uso combinado de enzima fitasa y un complejo enzimático a base de α -amilasa, xilanasas y proteasa en la dieta de gallinas de postura comercial a base de maíz, soya y afrechillo de trigo.
2. Determinar la conveniencia económica del uso combinado de enzima fitasa y un complejo enzimático a base de α -amilasa, xilanasas y proteasa en dietas de gallinas ponedoras.
3. Calcular la digestibilidad ileal aparente del fósforo y el calcio en la dieta de gallinas de postura comercial suplementadas con fitasa y un complejo enzimático a base de α -amilasa, xilanasas y proteasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ciento cuarenta y cuatro (144) gallinas Hy-Line^{®10} W-36 de 18 semanas de edad, fueron distribuidas aleatoriamente en 36 jaulas de 4 gallinas cada una. Las jaulas se encuentran ubicadas en un pabellón experimental de tipo convencional localizado en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. La densidad fue de 338 cm² por gallina. Este experimento consistió de un diseño factorial de 2x2, siendo las variables estudiadas adición o no de fitasa (Phyzyme^{®11}, 0.06 kg por tonelada de alimento) y adición o no de un complejo enzimático a base de α -amilasa, xilanasas y proteasa (Avizyme 1502^{®11}, 0.375 kg

¹⁰ Hy-Line Internacional, P.O. Box 65190, West Des Moines, Iowa 50265, E.E.U.U.

¹¹ Danisco Animal Nutrition. P.O. Box 470157, St. Louis, Missouri, 63147, E.E.U.U.

por tonelada de alimento). El diseño tuvo 4 tratamientos, con 3 repeticiones cada una. Cada repetición consistió de 3 jaulas con 4 gallinas cada una.

El período experimental tuvo una duración de 34 semanas (18 a 52 semanas de edad de las gallinas). Las aves fueron alimentadas *ad libitum* dos veces por día, a las 9:00 AM y a las 5:00 PM. El régimen de luz fue de 16 horas por día.

Las dietas fueron elaboradas a base de maíz, soya y afrechillo de trigo, siendo isoenergéticas e isonitrogenadas para todos los tratamientos. Durante el estudio, se utilizaron 3 formulas de alimento mientras las aves aumentaban su consumo de alimento para 80, 95 y 100 g de consumo de alimento/ave/día. Las dietas fueron formuladas para aportar entre un 80 y 85% del requerimiento diario de EM y un 87 a 92% del requerimiento diario de proteína por gallina por día. Para los distintos aminoácidos, se consideró una formulación que consideraba un menor consumo del orden del 6 a 8% en relación al requerimiento diario para lisina, metionina, metionina más cistina, treonina y triptofano.

De esta forma, se pretende observar con mayor claridad el posible efecto de las enzimas sobre un mejor aprovechamiento de los nutrientes mencionados.

Las dietas con fitasa, fueron formuladas de tal forma que la enzima aportaba 0,1% de FD y de Ca. La descripción de las dietas, los tratamientos y su composición se presentan en la Tabla 1.

Durante el período experimental las dietas fueron preparadas en 9 fabricaciones (aproximadamente una por cada mes), de las cuales 2 correspondieron a la dieta de 80g, 2 a la de 95g y 5 a la de 100g. De cada preparación, se tomó una muestra representativa (200 g) de cada tratamiento para análisis químico proximal, actividad de fitasa y actividad de la α -amilasa. El análisis químico proximal fue realizado de acuerdo a los procedimientos analíticos estandarizados (AOAC, 1995). Las actividades de la α -amilasa y de la

fitasa se realizaron por la empresa proveedora de las enzimas, Danisco¹², Finlandia. Los resultados fueron expresados como el valor promedio de cada tratamiento dietario, los cuales se muestran en la Tabla 2.

INDICADORES PRODUCTIVOS Y DE CALIDAD EXTERNA DEL HUEVO

Durante el período experimental, se registraron las siguientes variables por repetición:

1. Porcentaje de huevos producidos y porcentaje de producción de huevos gallina día. Para esto, los huevos fueron recolectados 1 vez por día inmediatamente después de la primera alimentación y contabilizados por repetición (Anexo C.5).
2. Peso de huevo: se pesó la totalidad de los huevos producidos en el día una vez por semana y por repetición (Anexo C.6).
3. Masa de huevo: se calculó multiplicando el peso promedio de los huevos por el porcentaje de postura promedio de la semana.
4. Consumo de alimento promedio por gallina día: se determinó dividiendo el consumo total de alimento de la semana por siete y por el número de gallinas de cada repetición (Anexo C.10).
5. Conversión (kg de alimento/ kg de huevos): se calculó dividiendo el consumo de alimento de la semana (kg) por el peso de los huevos producidos durante la semana (kg).

¹² Danisco Animal Nutrition. P.O. Box 470157, St. Louis, Missouri, 63147, E.E.U.U.

6. Peso vivo de las aves, para lo cual se pesó la totalidad de las aves cada 4 semanas (Anexo C.11.).

7. Porcentaje de huevos trizados (Anexo C.12.), quebrados (Anexo C.13.) y sin cáscara (Anexo C.14.), los cuales fueron contabilizados diariamente y expresados como porcentaje por semana de producción.

Tabla 1: Composición de las dietas experimentales para los consumos alimenticios de 80 g, 95 g y 100 g/ave/día para las 18 a 26 semanas, 27 a 32 semanas y 33 a 52 semanas de edad, respectivamente:

Consumo de alimento	80 g				95 g				100 g			
	C ¹	F	CME	F+CME	C	F	CME	F+CME	C	F	CME	F+CME
INGREDIENTES (%)												
Maíz	45.90	45.40	45.90	45.40	45.57	45.24	45.57	45.24	44.40	44.30	44.40	44.30
Afrecho de Soya (48%)	12.70	12.40	12.70	12.40	11.00	11.40	11.00	11.40	13.00	13.30	13.00	13.30
Afrechillo de Trigo	8.50	9.80	8.50	9.80	16.90	17.70	16.90	17.70	21.45	22.20	21.45	22.20
Poroto de Soya	10.00	10,0	10.00	10,0	8.00	8.00	8.00	8.00	7.00	7.00	7.00	7.00
Gluten de Maíz 60	4.43	4.40	4.43	4.40	4.50	4.10	4.50	4.10	1.30	0.84	1.30	0.84
Harina de Salmon	3.00	3.00	3.00	3.00	-	-	-	-	-	-	-	-
Aceite (pescado:vegetal, 50:50)	2.50	2.50	2.50	2.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.00	1.00	1.00	1.00
Fosfato (FDF/FBC)	1.65	0.98	1.65	0.98	1.54	0.87	1.54	0.87	1.37	0.70	1.37	0.70
Conchuela	10.70	10.90	10.70	10.90	10.30	10.50	10.30	10.50	9.85	10.00	9.85	10.00
Vitaminas ²	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Minerales ³	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Cloruro de Sodio	0.26	0.26	0.26	0.26	0.29	0.29	0.29	0.29	0.26	0.25	0.26	0.25
DI Metionina	0.088	0.088	0.088	0.088	0.101	0.104	0.101	0.104	0.1133	0.1160	0.1133	0.1160
Avizyme 1502®	-	-	0.0375	0.0375	-	-	0.0375	0.0375	-	-	0.0375	0.0375
Phyzyme®⁴	-	0.006	-	0.006	-	0.006	-	0.006	-	0.006	-	0.006
Análisis Calculado⁵												
Protein, %	19.0	19.0	19.0	19.0	17.0	17.0	17.0	17.0	16.2	16.2	16.2	16.2
EMAn, kcal/kg.	2750	2750	2750	2750	2600	2600	2600	2600	2500	2500	2500	2500
Lys, %	1.097 (.94)	1.092 (.95)	1.097 (.96)	1.092 (.94)	.926 (.78)	.935 (.75)	.926 (.76)	.935 (.79)	.944 (.79)	.952 (.83)	.944 (.82)	.952 (.78)
Met, %	.432 (.45)	.432 (.44)	.432 (.43)	.432 (.44)	.40 (.38)	.40 (.36)	.40 (.38)	.40 (.41)	.380 (.34)	.380 (.38)	.380 (.36)	.380 (.38)
Met + Cys, %	.760 (.77)	.761 (.77)	.760 (.76)	.761 (.77)	.716 (.70)	.716 (.65)	.716 (.67)	.716 (.72)	.681 (.63)	.681 (.67)	.681 (.66)	.681 (.66)
Trp, %	.205 (.22)	.205 (.22)	.205 (.21)	.205 (.22)	.183 (.18)	.185 (.19)	.183 (.19)	.185 (.20)	.187 (.19)	.189 (.19)	.187 (.21)	.189 (.20)
Thr, %	.715 (.70)	.713 (.70)	.715 (.71)	.713 (.71)	.620 (.60)	.620 (.58)	.620 (.60)	.620 (.61)	.590 (.56)	.590 (.59)	.590 (.59)	.590 (.58)
Arg, %	1.17 (1.17)	1.16 (1.17)	1.17 (1.16)	1.16 (1.16)	1.03 (1.02)	1.04 (.98)	1.03 (.98)	1.04 (1.02)	1.09 (1.02)	1.05 (1.06)	1.09 (1.04)	1.05 (1.0)
Ile, %	.75 (.75)	.75 (.77)	.75 (.74)	.75 (.75)	.66 (.67)	.66 (.63)	.66 (.62)	.66 (.65)	.63 (.62)	.63 (.64)	.63 (.63)	.63 (.60)
Val, %	.894 (.91)	.894 (.93)	.894 (.89)	.894 (.90)	.802 (.81)	.802 (.76)	.802 (.76)	.802 (.80)	.765 (.78)	.766 (.78)	.765 (.78)	.766 (.75)
Ca, %	4.47	4.47	4.47	4.47	4.2	4.2	4.2	4.2	4.0	4.0	4.0	4.0
P Disp., %	0.47	0.47	0.47	0.47	0.40	0.40	0.40	0.40	0.38	0.38	0.38	0.38
Na, %	0.180	0.180	0.180	0.180	0.180	0.180	0.180	0.180	0.170	0.170	0.170	0.170
Cl, %	0.220	0.218	0.220	0.218	0.211	0.209	0.211	0.209	0.190	0.189	0.190	0.189
K, %	0.747	0.755	0.747	0.755	0.752	0.767	0.752	0.767	0.820	0.835	0.820	0.835
Grasa, %	6.83	6.85	6.83	6.85	5.17	5.19	5.17	5.19	4.58	4.6	4.58	4.6
Fibra cruda, %	2.8	2.9	2.8	2.9	3.40	3.50	3.40	3.50	3.9	3.9	3.9	3.9
Ácido linoleico, %	3.26	3.26	3.26	3.26	2.14	2.15	2.14	2.15	1.98	1.99	1.98	1.99

¹ Tratamientos: C= Control; F= fitasa (Phyzyme®); CME= complejo multienzimático (Avizyme®); F + CME= Phyzyme® + Avizyme®

² Premezcla vitamínica (suplementada por kg de dieta): Vitamina A: 8000 UI; Vitamina D₃: 2500 UI; Vitamina E: 10 mg; Vitamina K₃: 1 mg; Vitamina B₁: 1 mg; Vitamina B₂: 4.5 mg; Vitamina B₆: 3 mg; Vitamina B₁₂: 8 ug; Niacina: 30 mg; Ácido Pantoténico: 10 mg; Ácido Fólico: 1 mg; Biotina: 50 ug; y Colina: 300 mg.

³ Premezcla Mineral (suplementada por kg de dieta): manganeso como sulfato: 80 mg; zinc como sulfato: 80 mg; hierro: 40 mg; cobre como sulfato: 5 mg; yodo: 0.5 mg; y selenio: 0,3mg.

⁴ La fitasa contribuye con 0.1% FD y 0.1% Ca en las dietas F y F + CME.

⁵ Los valores de amino ácidos en paréntesis corresponden a los valores analizados (Universidad de Missouri – Columbia).

Tabla 2: Análisis de actividades de fitasa y α -amilasa analizada en los alimentos de los distintos tratamientos¹.

Alimento	Tratamiento*			
	Control (C)	Fitasa (F)	CME	F + CME
Fitasa (U/Kg)	187	257	165	265
α -Amilasa (U/Kg)	94	55	2270	2100

¹ Valores promedios correspondientes a los tres análisis de alimento realizados durante las 18 a 52 semanas de edad.

* Los valores esperados en el alimento para ambas enzimas fueron de 300U/kg para la fitasa y 300U/kg para la α -amilasa.

DIGESTIBILIDAD ILEAL APARENTE

Al término del ensayo se realizó un estudio de digestibilidad del Ca y P a nivel ileal, el cual fue determinado en tres gallinas por jaula (27 gallinas por tratamiento) de acuerdo al procedimiento descrito por Vogtmann *et al.* (1974). Para este propósito se incluyó un material inerte llamado Celite®¹ (Anexo D.1.) a razón de 1,5% de la dieta (15 kg/ton de alimento), el cual fue usado como fuente de ceniza ácido insoluble (ver Tabla 3). El Celite fue usado como marcador, el cual se administró una semana antes del ensayo de digestibilidad en las gallinas sobrantes (ajenas al estudio) para su ajuste (verificación). A la semana siguiente se administró el marcador en las dietas de todas las gallinas en estudio con el propósito de acostumbrarlas a su textura y de que no hubiera rechazo en el día del ensayo de digestibilidad.

El día antes del ensayo de digestibilidad, las gallinas fueron agrupadas en tres grupos de tal forma de alcanzar los plazos establecidos para las 108 gallinas que fueron sacrificadas. El Grupo 1 correspondió a las repeticiones 1 de cada tratamiento, el Grupo 2 a la repeticiones 2 de cada tratamiento y el Grupo 3 las repeticiones 3 de cada tratamiento.

¹ Celite Corp., Lompar, CA 93436.

Tabla 3: Composición de las dietas experimentales usadas para el ensayo de digestibilidad formuladas para un consumo de alimento de 100g.

INGREDIENTES (%)	C ¹	F	CME	F + CME
Maíz	46.25	45.76	46.25	45.76
Afrechillo de Trigo	16.87	18.16	16.87	18.16
Harina de Soya (48%)	14.45	14.13	14.45	14.13
Conchuela	9.81	10.02	9.81	10.02
Poroto de Soya	7.00	7.00	7.00	7.00
Celite	1.50	1.50	1.50	1.50
Fosfato desfluorinado	1.42	0.76	1.42	0.76
Aceite (pescado:vegetal, 50:50)	1.00	1.00	1.00	1.00
Gluten de Maíz 60	1.00	1.00	1.00	1.00
Sal	0.27	0.27	0.27	0.27
Vitaminas ²	0.20	0.20	0.20	0.20
Minerales ³	0.10	0.10	0.10	0.10
Dl-Metionina	0.12	0.12	0.12	0.12
Avizyme 1502®	-	-	0.0375	0.0375
Phyzyme® ⁴	-	0.006	-	0.006
Composición Calculada				
Proteína, %	16.2	16.2	16.2	16.2
EMAn, kcal/kg.	2500	2500	2500	2500
Lisina, %	0.968	0.963	0.968	0.963
Metionina, %	0.380	0.380	0.380	0.380
Met + Cis, %	0.679	0.679	0.679	0.679
Triptofano, %	0.189	0.189	0.189	0.189
Treonina, %	0.600	0.597	0.600	0.597
Arginina, %	1.054	1.053	1.054	1.053
Isoleucina, %	1.226	1.213	1.226	1.213
Valina, %	0.766	0.766	0.766	0.766
Calcio, %	4.0	4.0	4.0	4.0
Fósfor disp., %	0.38	0.38	0.38	0.38
Sodio, %	0.170	0.170	0.170	0.170
Cloro, %	0.196	0.194	0.196	0.194
Potasio, %	0.799	0.807	0.799	0.807
Grasa, %	4.52	4.54	4.52	4.54
Fibra Cruda, %	3.5	3.6	3.5	3.6
Acido linoleico, %	1.96	1.97	1.96	1.97

¹ Tratamientos: C= Control; F= fitasa (Phyzyme®); CME= complejo multienzimático (Avizyme®); F + CME= Phyzyme® + Avizyme®

² Premezcla vitamínica (suplementada por kg de dieta): Vitamina A: 8000 UI; Vitamina D₃: 2500 UI; Vitamina E: 10 mg; Vitamina K₃: 1 mg; Vitamina B₁: 1 mg; Vitamina B₂: 4.5 mg; Vitamina B₆: 3 mg; Vitamina B₁₂: 8 ug; Niacina: 30 mg; Ácido Pantoténico: 10 mg; Ácido Fólico: 1 mg; Biotina: 50 ug; y Colina: 300 mg.

³ Premezcla Mineral (suplementada por kg de dieta): manganeso como sulfato: 80 mg; zinc como sulfato: 80 mg; hierro: 40 mg; cobre como sulfato: 5 mg; yodo: 0.5 mg; y selenio: 0,3mg.

⁴ La fitasa contribuye con 0.1% Pd y 0.1% Ca en las dietas F y F + CME.

El procedimiento que se describe a continuación fue realizado con lapso de 2 horas de diferencia entre cada grupo, por lo que las horas descritas corresponden al Grupo 1.

Una vez establecidos los grupos, el alimento fue retirado a las 12:30, 14:30 y 16:30 PM, para los grupos 1,2 y 3 respectivamente. Así, se les dejó un lapso de 17 horas de ayuno para asegurar el completo vaciamiento del tracto intestinal (Anexo D.2.). Al día siguiente, a las 5:30 de la madrugada (momento que se encienden las luces) se inició la alimentación con la dieta con Celite en el grupo 1, la que continuó posteriormente a las 7:30 y 9:30 para los grupos 2 y 3, respectivamente. Aproximadamente 4 horas después de iniciada la alimentación el alimento fue retirado (Anexo D.3.) y tres gallinas por jaula fueron sacrificadas por dislocación cervical (Anexo D.4.). A los dos minutos post-dislocación se realizó la necropsia accediendo directamente a la cavidad abdominal y se extrajo completamente el intestino, para así, localizar con mayor facilidad la unión ileocecal y el divertículo de Meckel (Anexo D.5. y D.6.). Se realizaron dos ligaduras con sutura de lino en el divertículo de Meckel y otra a 1 cm. antes de la llegada de la unión ileocecal, procediendo luego a la sustracción del ileón (Anexo D.7.). Posteriormente se retiraron las ligaduras y mediante presión mecánico-digital suave el contenido ileal fue depositado en bandejas de aluminio previamente rotuladas para cada repetición, obteniendo un pool de contenidos ileales de 9 gallinas por cada bandeja (Anexo D.8.). Esto se repitió con espacios de 2 horas de diferencia para los grupos 2 y 3.

Las bandejas fueron depositadas en un “cooler” con hielo para el traslado de las muestras (Anexo D.9.), las que inmediatamente fueron mantenidas a -18°C para ser analizadas posteriormente en el laboratorio. Una vez que el contenido ileal fue sometido a esta temperatura, se procedió a liofilizarlo, es decir, fue “congelado en seco” (Anexo D.10.). La liofilización es el proceso en el cual el

agua es removida como vapor directamente desde el hielo, sin pasar a través de su estado líquido. Este proceso es llamado sublimación y requiere de presiones y temperaturas muy bajas para que ocurra. La liofilización detiene el crecimiento de microorganismos (hongos, moho, etc.), inhibe el deterioro por reacción química (cambio de color y sabor, ranciedad, pérdida de propiedades fisiológicas, etc.), y facilita la distribución y el almacenamiento. También reduce el peso y volumen del material liofilizado, ya que los libera de una elevada cantidad de agua (Pebley y Baglien, 2001).

El contenido ileal liofilizado fue analizado para la determinación de ceniza ácido insoluble (Celite®) a través de una mufla (Anexo D.11.), P y Ca total mediante un espectrofotómetro (Anexo D.12.) usando procedimientos analíticos estandarizados (AOAC, 1995) (McCarthy *et al.*, 1974).

La relación entre los distintos minerales y la ceniza ácido insoluble en el alimento y contenido ileal fue usada para calcular la digestibilidad ileal aparente del P y el Ca mediante la siguiente fórmula (Scott y Hall, 1998):

$$D = 100\% - [100\% \times (Ca/Cf) \times (Mf/Ma)]$$

donde,

D = digestibilidad ileal aparente

Ca = concentración del marcador en el alimento en base a Materia Seca (M.S.)

Cf = concentración del marcador en el contenido ileal en base a M.S.

Mf = concentración del mineral en el contenido ileal en base a M.S.

Ma = concentración del mineral en el alimento.

MARGEN BRUTO

La evaluación económica fue realizada a través de la determinación del margen bruto (MB) económico para cada tratamiento de la forma:

$$M_{bi} = [Y_i - CV_i]$$

donde,

Y = ingreso

Cv = costo variable

i = 1-4 tratamientos

El margen bruto indica la diferencia entre las ventas (ingresos netos) y los costos variables (Stanton *et al.*, 1992). El margen bruto fue calculado considerando el número total de huevos vendidos, el peso promedio de los huevos y el costo de la dieta por tratamiento.

Los ingresos por concepto de venta de huevos se calcularon teniendo en cuenta el peso ponderado de los huevos de cada tratamiento y su respectivo precio de venta. Este último se determinó por medio de la construcción de una ecuación de regresión lineal, usando como variable dependiente el precio por categoría de los huevos para Octubre del año 2003, según la información aportada por ASOHUEVO (2003), y como variable independiente el peso promedio de cada una de estas categorías, por lo tanto el precio final de venta, resultó de reemplazar el valor de la variable peso promedio del huevo en dicha ecuación.

Por otra parte, los costos variables se calcularon teniendo en cuenta el consumo total del alimento y el correspondiente costo del alimento de cada tratamiento. El costo del alimento fue determinado a través de los precios de mercado de los insumos utilizados en las fórmulas de alimentos. Como cada tratamiento consumió tres fórmulas distintas a lo largo de todo el período, el precio de cada fórmula se ponderó con el consumo total de cada período

correspondiente a las semanas 18 a 26, 27 a 32 y 33 a 52, respectivamente, en los cuales se administró cada dieta. Estos valores fueron sumados para obtener los costos variables totales de cada tratamiento.

Finalmente con los ingresos y costos calculados, se aplicó la fórmula de “margen bruto” (MB) descrita anteriormente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los parámetros productivos se realizó bajo un diseño estadístico de tipo factorial de 2x2, donde el primer factor correspondió al efecto de la enzima fitasa y el segundo factor al efecto del complejo multienzimático (CME). Los valores evaluados fueron analizados a través del tiempo considerando a la semana como factor. La descripción corresponde al siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \tau_k + (\alpha \times \beta)_{ij} + \Sigma_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = respuesta observada

μ = media poblacional

α_i = efecto del i-ésimo tratamiento (i = presencia y ausencia de fitasa)

β_j = efecto del j-ésimo tratamiento (j = presencia y ausencia del CME)

τ_k = efecto del k-ésimo tratamiento (k = tiempo en semana)

$(\alpha \times \beta)_{ij}$ = Interacción entre el i-ésimo y el j-ésimo tratamiento

Σ_{ijk} = error experimental

La digestibilidad ileal del Ca y el P fueron analizadas mediante un diseño factorial 2x2, donde los factores analizados fueron el efecto de la enzima fitasa y el efecto del CME, cuya descripción corresponde a:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha \times \beta)_{ij} + \Sigma_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = respuesta observada

μ = media poblacional

α_i = efecto del i-ésimo tratamiento (i = presencia y ausencia de fitasa)

β_j = efecto del j-ésimo tratamiento (j = presencia y ausencia del CME)

$(\alpha \times \beta)_{ij}$ = Interacción entre el i-ésimo y el j-ésimo tratamiento

Σ_{ij} = error experimental

Los valores obtenidos para cada una de las variables fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA), utilizando el paquete estadístico SAS (1996). Los indicadores de expresión porcentual se transformaron según la función de arcoseno mediante la ecuación de Bliss, previo al ANDEVA. Las variables que presentaron un efecto significativo ($p < 0.05$) fueron comparadas con la prueba de rangos múltiples de Tukey (Sokal y Rohlf, 1981).

RESULTADOS

INDICADORES PRODUCTIVOS

Los resultados del período experimental obtenidos para los indicadores productivos “porcentaje de postura”, “peso de huevo” y “masa de huevo” se muestran en la Tabla N° 4.

La enzima fitasa aumentó significativamente ($p < 0,05$) el porcentaje de postura en un 1,16%. Sin embargo, la presencia del CME disminuyó significativamente ($p < 0,05$) esta variable en 0,66%.

El peso de huevo disminuyó significativamente ($p < 0,05$) con la enzima fitasa en 0,62g (de 57,91 a 57,29g). En cambio, la presencia del CME aumentó el peso del huevo ($p < 0,05$) en 0,52g (de 57,34 a 57,86g). También se observó una interacción significativa ($p < 0,05$) entre la enzima fitasa y el CME para este indicador. El efecto del CME de aumentar el peso de huevo fue menor al adicionar fitasa.

La masa de huevo, no fue afectada significativamente por los tratamientos ($p > 0,05$). A pesar de lo anterior, es importante destacar que hubo un aumento numérico del orden de 0,27g cuando fue suplementado con fitasa y una disminución de 0,15g cuando fue suplementado con el CME.

Tabla 4: Efecto de la suplementación de fitasa (F) y complejo multienzimático (CME) sobre el porcentaje de postura, peso del huevo y masa del huevo, para el período de 18 a 52 semanas de edad¹.

Tratamiento	F	CME	Porcentaje de Postura (%)	Peso del Huevo (g)	Masa del Huevo (g)
1	No	No	83,87	57,52	51,13 ± 10,56
2	Si	No	84,83	57,17 ± 6,34	51,04 ± 10,91
3	No	Si	83,00	58,30 ± 6,90	50,62 ± 11,98
4	Si	Si	84,38	57,41 ± 6,24	51,24 ± 10,38
F	No		83,44 ^b	57,91 ^a ± 6,74	50,87 ± 11,28
	Si		84,60 ^a	57,29 ^b ± 6,28	51,14 ± 10,63
CME	No		84,35 ^a	57,34 ^b ± 6,45	51,08 ± 10,71
	Si		83,69 ^b	57,86 ^a ± 6,58	50,93 ± 11,20
F			0,0003	0,0001	0,3517
CME			0,0472	0,0001	0,5768
F x CME			0,7656	0,0001	0,4904

^{ab} : Los superíndices diferentes dentro de la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P < 0,05).

¹ : Los valores corresponden al promedio de 3 réplicas con 12 gallinas cada una por tratamiento.

El comportamiento durante todo el período experimental de los resultados obtenidos para los indicadores “porcentaje de postura”, “peso de huevo” y “masa de huevo” se observa en los gráficos de los anexos A.1. a A.5.

Los resultados de los indicadores productivos consumo de alimento, conversión alimenticia y peso corporal se muestran en la Tabla N°5.

La enzima fitasa produjo una disminución significativa ($p < 0,05$) del consumo de 1,3g/ave/día (de 103,85 a 102,50 g). Sin embargo, la adición del CME incrementó significativamente ($p < 0,05$) el consumo en 1,49g/ave/día (de 102,43 a 103,92 g). Además, se observó una interacción entre la enzima fitasa y el CME ($p < 0,05$) para esta variable. En la ausencia del CME, la adición de fitasa no modifica el consumo de alimento, sin embargo, en la presencia del CME, la inclusión de fitasa disminuye el consumo de alimento.

La “eficiencia de conversión alimenticia” (ECA) expresada en kg de alimento por kg de huevo, no se vió influenciada por los tratamientos ($p > 0,05$).

El “peso corporal” disminuyó significativamente ($p < 0,05$) en un 0,47% con la presencia de fitasa. Mientras que la adición del CME aumentó el peso en un 1,01% ($p < 0,05$). No se observó una interacción significativa para esta variable ($p > 0,05$).

El comportamiento de los indicadores productivos “consumo de alimento”, “eficiencia de conversión alimenticia” y “peso corporal” se observan en los gráficos presentados en los Anexos A.6., A.7., A.8., A.9. y A.10.).

Tabla 5: Efecto de la suplementación de fitasa (F) y complejo multienzimático (CME) sobre el consumo de alimento, eficiencia de conversión alimenticia (ECA), peso corporal, para el período de 18 a 52 semanas de edad¹.

Tratamiento	F	CME	Consumo de alimento (g/gallina/día)	Eficiencia de Conversión Alimenticia (kg de alimento/kg de huevo)	Peso Corporal (kg)
1	No	No	102,36	2,47	1,482
2	Si	No	102,50	2,40	1,490
3	No	Si	105,34	2,68	1,511
4	Si	Si	102,49	2,35	1,491
F	No		103,85 ^a	2,58	1,497 ^a
	Si		102,50 ^b	2,38	1,490 ^b
CME	No		102,43 ^b	2,43	1,486 ^b
	Si		103,92 ^a	2,52	1,501 ^a
F			0,0001	0,9418	0,0001
CME			0,0001	0,6928	0,0016
F x CME			0,0015	0,5615	0,0555

^{ab} : Los superíndices diferentes dentro de la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P< 0,05).

¹ : Los valores corresponden al promedio de 3 réplicas con 12 gallinas cada una por tratamiento.

INDICADORES DE CALIDAD EXTERNA DEL HUEVO

Los resultados obtenidos para las variables “porcentaje de huevos sin cáscara”, “porcentaje de huevos quebrados” y “porcentaje de huevos trizados” se presentan en la Tabla N°6.

Para la variable porcentaje de huevos sin cáscara se observó una interacción significativa ($p < 0,05$). En presencia del CME, al incorporar fitasa aumentó el porcentaje de huevos sin cáscara, sin embargo en ausencia de complejo, la adición de fitasa disminuyó el porcentaje de huevos sin cáscara.

Con respecto al porcentaje de huevos quebrados no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) al adicionar fitasa, aunque numéricamente al incorporar dicha enzima aumentó el porcentaje de huevos quebrados (de 1,79% en ausencia de fitasa a un 2,02% en presencia de fitasa). Sin embargo, al adicionar el CME se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en el porcentaje de huevos quebrados. Cabe destacar, que a pesar de que la magnitud del aumento al adicionar la enzima fitasa es mayor que al suplementar el CME., la mayor variabilidad que obtuvo el primero no permitió que se obtuvieran diferencias significativas ($p > 0,05$).

Para el porcentaje de huevos trizados se observó una interacción significativa entre fitasa y el CME ($p < 0,05$). En ausencia del CME, al agregar la enzima fitasa disminuyó el porcentaje de huevos trizados, pero en presencia del CME la fitasa no influyó mayormente en este indicador.

Los gráficos correspondientes al comportamiento de la calidad externa de los huevos se muestran desde los Anexos A.11.a A.16.

Tabla 6: Efecto de la suplementación de fitasa (F) y complejo multienzimático (CME) sobre el: porcentaje de huevos sucios, sin cáscara, quebrados y trizados desde las 18 a 52 semanas de edad¹.

Tratamiento	F	CME	Huevos Sin Cáscara (%)	Huevos Quebrados (%)	Huevos Trizados (%)
1	No	No	1,94	1,93	9,18
2	Si	No	1,67	1,92	8,18
3	No	Si	1,09	1,64	9,04
4	Si	Si	2,55	2,13	9,01
F	No		1,52	1,79	9,11
	Si		2,11	2,02	8,60
CME	No		1,80	1,93 ^a	8,68
	Si		1,82	1,87 ^b	9,03
F			0,9719	0,2248	0,1135
CME			0,0585	0,0482	0,0620
F x CME			0,0464	0,3812	0,0001

^{ab} : Los superíndices diferentes dentro de la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P< 0,05).

¹ : Los valores corresponden al promedio de 3 réplicas con 12 gallinas cada una por tratamiento.

DIGESTIBILIDAD ILEAL APARENTE

Los valores de digestibilidad ileal obtenidos para fósforo (P) y calcio (Ca) se presentan en la Tabla N° 7.

La enzima fitasa no produjo diferencias significativas ($p>0,05$) en la digestibilidad ileal del P. Sólo se obtuvo un aumento numérico del orden del 6%. En cambio, el CME aumentó significativamente ($p<0,05$) la digestibilidad del P en un 31,68% (de 26,23 a 34,54%).

En el caso de la digestibilidad ileal del Ca, a pesar de que la fitasa y el CME aumentaron la digestibilidad del Ca en un 5,12% y en 15,88%, respectivamente, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p>0,05$). No se presentaron interacciones significativas ($p>0,05$) para la digestibilidad de P y Ca.

Tabla 7: Efecto de la suplementación de fitasa (F) y complejo multienzimático (CME) en la digestibilidad ileal de P (%) y Ca (%)¹.

Tratamiento	F	CME	Digestibilidad Ileal (%)	
			P	Ca
1	No	No	25,85	42,42
2	Si	No	26,62	49,22
3	No	Si	33,16	54,03
4	Si	Si	35,91	52,17
F	No		29,50	48,23
	Si		31,27	50,70
CME	No		26,23 ^b	45,82
	Si		34,54 ^a	53,10
F			0,6338	0,7157
CME			0,0483	0,2985
F x CME			0,7884	0,5272

^{ab} : Los superíndices diferentes dentro de la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

¹ : Los valores corresponden al promedio de 3 réplicas con 12 gallinas cada una por tratamiento.

MARGEN BRUTO

Los rangos promedios utilizados para calcular los ingresos en el análisis de margen bruto (MB) se presentan en la Tabla N° 8.

Tabla 8: Precio del huevo según categoría de peso comercial en Chile:

Categoría	Rango de peso del huevo por categoría (g)	Peso promedio del huevo según rango (g)	Precio (\$)¹
Super	Más de 68	71,5	36,2
Extra	61-68	64,5	29,6
Primera	54-61	57,5	27,8
Segunda	47-54	50,5	25,8
Tercera	40-47	43,5	22,5

¹ Precios de venta a Octubre de 2003, suministrados por ASOHUEVO-Chile.

En la Tabla N° 9 se presentan los resultados del MB para los cuatro tratamientos evaluados.

Al analizar todo el período experimental por tratamientos, el mejor desempeño por ave alojada lo obtiene el T2 (\$ 2632,01), seguido por el T4 (\$ 2503,38) y el T1 (\$ 2485,75). La menor rentabilidad la obtuvo el T3 (\$ 2373,51), el cual contenía sólo el CME.

Al evaluarlo a través de la suplementación enzimática, se observa que la administración de fitasa tuvo una mejor respuesta económica que la suplementación del CME. Así, al administrar la enzima fitasa, ésta aumentó el MB en alrededor de un 7,38% como MB total (\$ 6970,37 por dieta) y MB por ave alojada (\$ 193,62 por ave). En cambio, al adicionar el CME se observa una disminución del orden de un 4,71% como MB total (\$ 4335,55 por dieta) y MB por ave alojada (\$ 120,43 por ave) (ver Tabla N° 10)

Tabla 9: Cálculo de margen bruto por ave alojada entre las 18 y las 52 semanas de edad al aplicar CME y/o fitasa:

ITEM	Tratamiento											
	1			2			3			4		
1. Costos Variables												
1.1 Alimento	80¹	95	100	80	95	100	80	95	100	80	95	100
Consumo alimento (kg)	184,59	142,99	575,15	183,97	145,97	573,47	181,45	145,57	577,48	181,88	146,25	576,68
Costo alimento (\$/kg)	121,44	106,98	97,72	120,28	105,92	96,62	123,45	108,98	99,72	121,89	107,52	98,23
Costo Variable Por Formulación	22416,25	15297,50	56204,05	22127,67	15461,25	55408,28	22400,54	15863,89	57586,70	22169,23	15724,48	56647,37
Costo Variable Total	93917,80			92997,20			95851,13			94541,08		
2. INGRESOS												
2.1 Venta de huevos												
Peso promedio huevo	57,52			57,17			58,30			57,41		
Huevos vendibles	6457,91			6646,00			6306,00			6511,38		
Precio huevo (\$) ²	28,40			28,25			28,75			28,36		
Ingresos totales (\$)	183404,64			187749,50			181297,50			184662,74		
Margen Bruto (\$)	89486,84			94752,30			85446,37			90121,66		
Margen Bruto por ave alojada (\$)	2485,75			2632,01			2373,51			2503,38		

¹Consumo de alimento de 80, 95 y 100g a las siguientes edades: 18 a 26, 27 a 32 y 33 a 52 semanas, respectivamente.

²Ecuación de regresión usada para calcular precio de venta de huevo: $Y = 2.751 + 0.446X$, donde X = peso de huevo.

Tabla 10: Efecto de la suplementación de fitasa (F) y complejo multienzimático (CME) en el margen bruto (MB) de la producción de huevos durante las 18 a las 52 semanas de edad:

Tratamiento	Suplementación	Margen Bruto Total (\$)	Margen Bruto por gallina alojada (\$)
F	No	87466,61	2429,63
	Si	94436,98	2623,25
CME	No	92119,57	2558,88
	Si	87784,02	2438,45

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, las dietas que no contenían enzima fitasa fueron formuladas con 0,47, 0,40 y 0,38% de FD para los períodos de 18 a 26, 27 a 32 y 33 a 52 semanas, respectivamente. Los tratamientos con adición de fitasa fueron formulados con los mismos niveles de FD asignándole, sin embargo, a la fitasa un aporte equivalente a 0,1% de FD a la dieta. Por lo tanto, las dietas con fitasa contenían 0,37, 0,30 y 0,28% de FD aportado por los ingredientes de la dieta, más un 0,1% de FD de la fitasa, respectivamente.

En el presente trabajo, la adición de 300 U de fitasa/kg de alimento mejoró la producción de huevos al compararla con los tratamientos formulados con los mismos niveles nutricionales pero sin la adición de la enzima. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Um y Paik (1999), los cuales utilizaron niveles de FD de 0,37% y 500 U/kg de dieta, observando un aumento significativo en el porcentaje de postura.

Sin embargo, los resultados del presente estudio no concuerdan con los obtenidos por Terreros (2001), en los cuales 300 U de fitasa/kg de alimento no

fueron suficientes para mantener la producción del grupo control sin suplementación de fitasa, haciéndose necesaria la inclusión de 600 U para equiparar la producción de dicho grupo.

Aparentemente, el efecto de la enzima fitasa sobre la producción de huevo se debería a la liberación de fósforo fítico y otros nutrientes como aminoácidos, proteína, energía, carbohidratos y minerales que forman parte del fitato, los cuales se encontrarían disponibles para ser utilizados en la producción de huevos. Un estudio realizado por Ravindran *et al.* (1999), indica que la fitasa aumenta la digestibilidad de proteína y aminoácidos, lo que podría avalar la anterior aseveración. En el ensayo de digestibilidad ileal de P la incorporación de fitasa no afectó significativamente este parámetro. Sin embargo, los valores de los tratamientos que contenían fitasa fueron numéricamente superiores a los valores de los tratamientos que no poseían la enzima. Adicionalmente, en este estudio, la adición de fitasa aumentó la digestibilidad de proteína en forma numérica ($p > 0,05$) (datos no mostrados) (Vera, 2004).

La adición del CME a las dietas produjo un efecto adverso sobre el porcentaje de postura. No se ha encontrado literatura que coincida con estos resultados. La mayoría de los estudios revisados muestran un aumento en el porcentaje de postura (Sheideler y Abudabos, 1998; Danisco, 1998a; Danisco, 1999c; Danisco 1999d; Scheideler, 2000) al suplementar una dieta adecuada nutricionalmente con el CME evaluado en este estudio. Además, se ha descrito que el CME mantiene el porcentaje de postura al ser suplementado en dietas con bajos niveles nutricionales comparado con un control adecuado en los niveles de energía metabolizable (EM) (Danisco, 1997a; Danisco, 1999a; Danisco, 1999b; Scheideler y Webber, 2003) o lo superan (Danisco, 1999f).

En el presente estudio, las dietas contenían un nivel energético menor a las recomendaciones diarias para este tipo de ave. A pesar de esto, la inclusión del

CME no se tradujo en una mayor producción de huevos como se esperaba al compararla con las dietas sin suplementación del CME. Paralelamente, el CME aumentó significativamente el tamaño del huevo y el peso de las aves al final del período experimental. Estos resultados sugieren que al adicionar el CME se estaría destinando una mayor cantidad de nutrientes para cubrir los requerimientos energéticos de mantención dados por un mayor peso corporal y para peso de huevo, en desmedro de una mayor producción de huevos. Cabe destacar además que el porcentaje de postura del tratamiento control (sin suplementación de enzimas) no fue estadísticamente diferente al tratamiento suplementado con el CME. Esto no era lo esperado, debido a que la literatura revisada y los resultados de este estudio indican que el CME empleado aumenta la disponibilidad de EM de la dieta a las aves (Danisco 1997b, c; Wiryawan, 1997; Danisco 1998b, c; Wyatt y Newcombe, 1999). El buen resultado del grupo control se podría explicar debido a que las aves de este tratamiento presentaron un consumo de EM/ave/día de 263 kcal, nivel cercano al requerimiento de estas aves. Es decir, a pesar de que el nivel de EM de las dietas del grupo control fueron inferiores al requerimiento, las aves lograron compensar esta diferencia a través del consumo de alimento, el cual fue ad limitum.

La disminución en el peso de huevo al incorporar la enzima fitasa concuerda con los resultados obtenidos por Terreros (2001), estudio que observó que la inclusión de 300 y 600 U de fitasa/kg de alimento disminuían el peso de huevo, siendo mayor el peso de huevo del control sin suplementación. Otros estudios muestran la ausencia de efecto de la fitasa sobre el peso de huevo (Kamińska y Skraba, 1997; Boling *et al*, 2000b; Scheideler y Jalal, 2000; Jalal y Scheideler, 2001; Keshavarz, 2003a) o una mejora en el peso de huevo (Van der Kliss *et al*, 1997; Um y Paik, 1999).

Además, se observó que la fitasa corrige los efectos sobre el peso de huevo en dietas con bajos niveles de FD (Gordon y Roland, 1996; Gordon y Roland, 1997; Coon y Leske, 1999). El estudio realizado por Gordon y Roland (1997) observó que para un mismo nivel de FD, al incorporar fitasa, el peso del huevo aumentaba 2,2 gramos.

El menor peso de huevo debido a la adición de fitasa se puede explicar debido a la presencia de cáscaras más delgadas (estadísticamente significativo) y al menor peso de yema y albúmina (resultados que no fueron estadísticamente significativos y que no se muestran en el presente trabajo) (Vera, 2004).

El aumento en el peso del huevo observado al incorporar el CME concuerda con los resultados de Scheideler y Abudabos (1998) y Lorenzoni (2001). Este efecto se explicaría por la degradación de las paredes celulares de uno o más ingredientes de la dieta por la acción enzimática, liberándose nutrientes que fueron aprovechados para aumentar el tamaño del huevo. El aumento de peso comienza a ser manifiesto a partir de la semana 26 de edad, lo cual coincidió con el cambio de dieta a una con mayor contenido de afrechillo de trigo (Ver Anexo A.2.). Es precisamente sobre este insumo donde la xilanasa actuaría, liberando mediante la degradación de las paredes celulares nutrientes esenciales como metionina y ácido linoleico. El afrechillo de trigo contiene un mayor contenido de metionina que el maíz (Grimes y Crouch, 1997), por lo que es posible que la metionina podría ser liberada por la acción de la xilanasa lo cual aumentaría su disponibilidad para ser utilizada, pudiendo de esta forma contribuir al aumento del peso de huevo. Hay que tener en cuenta que la hipótesis dicha anteriormente no fue estudiada en este trabajo. Bedford (1997) menciona un aumento significativo en la digestibilidad ileal de metionina al suplementar dietas basadas en trigo con 3000 U de xilanasa/kg. de alimento en pollos broilers de 21 días de edad. Un estudio realizado por Wolford *et al.* (2002) en cerdos, describió

un aumento en la digestibilidad ileal de la metionina en dietas suplementadas con xilanasa.

Además de lo anterior, hay que considerar, que en el presente estudio se observó que el CME originó aumentos en la digestibilidad ileal aparente de EM, de proteína (Vera, 2004) y P, todos nutrientes que participan en el tamaño del huevo.

En este estudio existió una interacción significativa para peso de huevo entre fitasa y CME. Al adicionar el CME se produjo un aumento en el peso de huevo, pero al ser suministrado en conjunto con la enzima fitasa, esta enzima disminuye la magnitud del efecto del CME sobre esta variable. Este hecho, se originaría posiblemente, por la presencia de cáscaras más delgadas y menores pesos de yema y albúmina (datos no mostrados), que aunque no fueron significativos, si pudieron haber contribuido, numéricamente, a la disminución de dicho efecto (Vera, 2004).

La masa de huevo no mostró diferencias significativas atribuidas a la incorporación de fitasa o del CME. La explicación de este comportamiento radica en que pese al aumento en el porcentaje de postura obtenido en las dietas con la enzima fitasa, el menor peso de huevo de estos tratamientos afectó negativamente la masa de huevo. Lo inverso ocurre en el caso del CME, el cual se vio perjudicado por el menor porcentaje de postura, pese a tener un mayor peso de huevo.

Ceylan *et al.* (2003) y Keshavarz (2003a) indican que a bajos niveles de FD (0,2% y 0,25%, respectivamente) la adición de fitasa (300 y 150 U/kg dieta, respectivamente) restaura la masa de huevo a niveles de las dietas control (0,35-0,40% FD en el caso de Ceylan *et al.* (2003) y 0,45% FD en el caso de Keshavarz(2003a)). Algo similar ocurrió en este estudio, al comparar el

tratamiento 2 (fitasa) con el tratamiento 1 (control) con niveles de FD de 0,37-0,30-0,28% y 0,47-0,40-0,38% para las distintas dietas, respectivamente.

Scheideler y Abudabos (1998) y Lorenzoni (2001) no encontraron diferencias en la masa de huevo al utilizar el CME, concordando con los resultados del presente estudio. Un estudio realizado en Australia presentado por Danisco (1997d) mostró que con una dieta de baja energía (2610 Kcal/kg de alimento) al ser suplementada con el CME, este igualó los niveles de masa de huevo de la dieta control de alta energía (2750 Kcal/kg de alimento). Scheideler (2000) al utilizar el CME, evidenció un aumento en la masa de huevo en dietas de baja energía metabolizable. Como se explicó anteriormente en este estudio, a pesar de que las dietas fueron formuladas con un bajo contenido de EM, las aves no consumieron un nivel deficitario de este nutriente (ver Anexo B.3.).

La adición de la enzima fitasa disminuyó el consumo de alimento. Gordon y Roland (1997) y Keshavarz (2003a) utilizando 150 y 300 U de fitasa/kg de alimento lograron a menor inclusión de fitasa restaurar el consumo de alimento en dietas bajas en FD. Punna y Roland (1999) informaron que 300 U de fitasa aumentan el consumo deprimido de las dietas bajas en FD (0,1% y 0,2%).

El presente estudio no trabajó con dietas tan bajas en FD, por lo que la liberación de fósforo y otros nutrientes contenidos en el fitato (por ejemplo aminoácidos esenciales, ácidos grasos, proteínas y carbohidratos) generarían una mayor disponibilidad de energía, cubriendo antes los requerimientos energéticos de las aves, traduciéndose en una disminución del consumo de alimento. Cabe aclarar, sin embargo, que en el presente trabajo el efecto de la enzima fitasa sobre la digestibilidad de proteína y energía fue positivo (datos no mostrados) pero no estadísticamente significativo ($p > 0,05$) (Vera, 2004).

La incorporación del CME aumentó significativamente el consumo de alimento. Scheideler y Webber (2003) describen un aumento en el consumo de

alimento al adicionar el CME en dietas de crianza y postura de gallinas ponedoras, cercano a 4,0 gramos por día. En otro estudio, Scheideler y Abudabos (1998) no encontraron efectos significativos en el consumo de alimento, lo que concuerda con un estudio australiano con dietas con 2750 kcal/kg de alimento (Danisco, 1997d).

El aumento en el consumo debido al CME puede ser explicado por el aumento en el peso de huevo. Como ha sido descrito anteriormente, a partir de la semana 26 se observó un incremento en el peso de huevo, lo que elevaría los requerimientos de producción, llevando a un aumento en el consumo de alimento (Ver Anexos A.2. y A.6.).

Se observó una interacción significativa en este parámetro, donde la adición del CME aumenta el consumo de alimento en la ausencia de fitasa pero no en su presencia. Lo anterior concuerda con el comportamiento del peso de huevo.

Para la ECA el efecto de los tratamientos no fue estadísticamente significativo ($p > 0,05$). Esto concuerda con numerosos estudios realizados con distintos niveles de fitasa que van desde los 100 a 500 U/kg de dieta (Van der Kliss *et al.*, 1997; Um y Paik, 1999; Boling, 2000a y b; Ceylan, 2003).

En otros estudios realizados por Scott *et al.* (1999) y Lim *et al.* (2003) se observaron mejoras significativas en la ECA al agregar fitasa a dietas con niveles de 0,20% de FD, pero al agregar la fitasa con niveles más altos de FD (0,40%), en el primer caso tuvo un efecto levemente negativo. Resultados similares se encontraron en un estudio realizado por Keshavarz (2003a) en donde la adición de la enzima fitasa pudo restaurar la ECA en dietas deficientes en FD (0,25-0,2-0,15%) llegando a niveles del control (0,45% de FD).

La razón por la cual no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) radica en que la mayor producción de huevo observada en los tratamientos

suplementados con fitasa fue atenuada por el alto peso de huevo alcanzado por los grupos no suplementados con fitasa. Sin embargo, hay que mencionar, que si bien estos resultados no fueron estadísticamente significativos ($p>0,05$), las conversiones fueron numéricamente más eficientes en los tratamientos con fitasa, lo que la hace más rentable al compararla con los otros tratamientos.

Con respecto a la suplementación del CME, el presente estudio tampoco arrojó diferencias significativas para la ECA ($p>0,05$). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio de Scheideler y Abudabos (1998), a pesar de que en este último hubo mejoras que no fueron significativas. Sin embargo, la mayoría de los estudios indican beneficios significativos al suplementar el CME en dietas bajas en EM del orden de las 2600 a 2700 kcal/kg. (Danisco, 1997a; Danisco 1997d; Danisco, 1998a; Danisco, 1999d) y altas en EM del orden de 2800 kcal/kg. (Danisco, 1999b).

Por otro lado, hay que tener en cuenta que a pesar que en este estudio no hubo diferencias significativas ($p>0,05$), si se produjo un deterioro numérico en la ECA debido al uso del CME. Scheideler y Abudabos (1998) tampoco encontraron diferencias significativas ($p>0,05$) en esta variable, pero numéricamente la ECA fue mejorada con el aporte del CME.

El hecho de que no se hayan encontrado diferencias en la ECA se debe a que el mayor peso de huevo observado en los tratamientos con el CME coincide con un mayor consumo de alimento, neutralizando de este modo el efecto del mayor peso de huevo sobre la ECA.

En el presente estudio, la incorporación de la enzima fitasa produjo una disminución significativa ($p<0,05$) en el peso corporal.

La mayoría de los autores señalan que al agregar fitasa en dietas bajas en fósforo disponible (0,15 – 0,25%), las aves recuperan el peso perdido llegando a niveles del control (0,40 % F.D.) (Scott *et al.*, 1999; Keshavarz, 2000a; Keshavarz,

2003b). Similar a lo observado en este estudio, Scott *et al.* (1999) utilizando niveles de FD de 0,40% y 500 U de fitasa/kg de dieta, observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en el peso corporal. En contraste, Keshavarz (2000a) observó que el peso corporal aumentaba significativamente al adicionar fitasa en dietas con 0,40% de FD. Cabe destacar que los niveles de FD, anteriormente mencionados, no consideraron los aportes de la fitasa, lo que si fue realizado en el presente estudio.

La disminución observada en el peso corporal al incorporar la enzima fitasa puede ser explicado por el menor consumo de alimento que presentaron las aves.

La adición del CME aumentó significativamente el peso corporal, lo que se explica por el mayor consumo de alimento de las gallinas alimentadas con el CME. Existe escasa literatura que informe sobre el efecto de este CME en gallinas ponedoras, indicando la ausencia de efectos significativos en el peso corporal (Scheideler y Abudabos, 1998; Danisco, 1999d; Lorenzoni, 2001; Scheideler y Webber, 2003).

La incorporación de la enzima fitasa no arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) para ninguno de los indicadores de calidad externa de los huevos. En forma similar, Terreros (2001) evaluó el porcentaje de huevos defectuosos (trizados y quebrados) y no encontró diferencias al incorporar 300 ó 600 U/kg de alimento. Um y Paik (1999) tampoco encontraron diferencias al utilizar 500 U de fitasa/ kg de alimento. Kamińska y Skraba (1997) señalan una disminución en el porcentaje de huevos trizados y quebrados totales de 10, 32% a 8, 12% al adicionar 300 U/kg de alimento.

La adición del CME disminuyó significativamente ($p < 0,05$) el porcentaje de huevos quebrados. Estos resultados concuerdan con los informados por Danisco (1999c), que encontró una reducción en el porcentaje de huevos

quebrados en gallinas de 24 a 36 semanas de edad al incorporar el CME. A pesar de lo anterior, el CME no influyó significativamente ($p > 0,05$) sobre el porcentaje de huevos sin cáscara o trizados.

Se observó una interacción ($p < 0,05$) entre la enzima fitasa y el CME para los huevos sin cáscara y huevos trizados. Al incorporar la fitasa en presencia del CME, ésta aumentó el porcentaje de huevos sin cáscara, sin embargo en ausencia del CME, la fitasa disminuyó este indicador. Al agregar la enzima fitasa, en ausencia del CME, el porcentaje de huevos trizados no varió mayormente, sin embargo, en presencia del CME la fitasa disminuyó este indicador. Lamentablemente no fue posible encontrar una explicación satisfactoria para estas observaciones.

En el presente trabajo, la adición de la enzima fitasa no mejoró significativamente ($p > 0,05$) la digestibilidad del P, lo que coincide con los resultados descritos por Keshavarz (2000a y 2000b).

La mayor parte de la literatura describe un efecto benéfico al adicionar la enzima fitasa sobre la digestibilidad de P. En el estudio realizado por Jalal y Scheideler (2001), en el cual evaluaron dos fitasas comerciales, se describió que una de las fitasas utilizadas en este estudio (la misma que fue empleada en el presente ensayo) mejoró significativamente ($p < 0,05$) las digestibilidades de Ca y P en comparación con el otro tipo de fitasa, a niveles de 0,10 y 0,25% de FD.

Otros estudios (Sebastian *et al.*, 1996; Carlos y Edwards, 1998; Um y Paik, 1999) observaron que la fitasa aumentaba la retención de fósforo por un aumento de la liberación del P ligado al fitato, disminuyendo la excreción de fósforo en las heces.

Si bien numéricamente la adición de la fitasa se tradujo en un aumento de la digestibilidad del fósforo, éste no fue estadísticamente significativo ($p > 0,05$). De acuerdo al modelo experimental utilizado en este trabajo, no se esperaba un

mayor efecto sobre la digestibilidad del P, debido al uso de fitasa. Lo anterior se explicaría por el hecho de que la inclusión de fitasa a las dietas básicamente reemplazó el aporte de P del fosfato de Ca, equivalente a un 0,11% del FD. Los fosfatos utilizados en el presente trabajo tienen una alta biodisponibilidad (>95%) de P¹, de tal forma que la liberación de P fítico por parte de la fitasa sería equivalente al P aportado por los fosfatos de Ca. Esto se puede observar más claramente en el Anexo B.2., donde se muestra que el aporte de FD es el mismo en las dietas con y sin fitasa. No obstante, hay que recalcar que al revisar la literatura existente, los efectos beneficiosos de la fitasa se manifestaron a niveles de fósforo no fítico bajos (0,1 a 0,25%).

En el presente estudio, la incorporación del CME aumentó significativamente ($p < 0,05$) la digestibilidad del P. La causa de este hecho es aún desconocida, pero este trabajo postula la siguiente hipótesis: “La enzima xilanasa actuó a nivel de las paredes celulares de los granos, liberando indirectamente el P presente en la aleurona del grano. El P liberado por la xilanasa en su mayor parte correspondería a FD, ya que el tratamiento 3 (con CME) presentó una digestibilidad de P mayor que el tratamiento 2 (con fitasa). Cabe destacar que el mayor valor de digestibilidad lo obtuvo el tratamiento 4, el cual contenía ambos suplementos enzimáticos. Este hecho podría ser explicado por la presencia de P fítico en las paredes celulares de los granos y en los cuerpos proteicos del poroto de soya (Pointillart, 1994; Adeola y Sands, 2003), los cuales al ser degradados por la acción de la xilanasa y proteasa, respectivamente, dejarían disponible el fitato para ser hidrolizado por la fitasa, traducándose esto en una mayor digestibilidad de P. Adicionalmente, las fitasas endógenas de los granos se ubican en el endospermo (Pointillart, 1994), donde también se encuentra el almidón. Es posible, por lo tanto, que la acción de la α -amilasa sobre el almidón del grano

¹ Comunicación Personal Dr. Javier González

podiera aumentar la disponibilidad de fitasa endógena, aumentando así la digestibilidad de P”.

Scheideler y Weber (2003) evaluaron el efecto del CME con dos niveles de energía (2900 y 2770 kcal/kg de dieta), sobre la digestibilidad del P en gallinas en etapa de crianza y postura. El estudio encontró que la adición del CME en dietas altas en EM, el cual se evaluó en la etapa de crianza, mejoró significativamente la retención de fósforo. Rostagno *et al.* (2000) utilizando celulasa, α -amilasa y proteasa en dietas de pollos broilers encontraron un aumento en la digestibilidad ileal de P de un 4,7%. Lamentablemente, estos dos ensayos no dan explicación a este fenómeno, por lo que se hace necesario realizar más estudios en este aspecto.

La digestibilidad del calcio no tuvo diferencias significativas ni con la suplementación de fitasa ni con la adición del CME, aun cuando estas diferencias sí fueron numéricas.

Tanto Um y Paik (1999) como Jalal y Scheideler (2001) describen aumentos significativos en la retención de calcio al incluir la enzima fitasa. Aunque, Um y Paik (1999) trabajaron con niveles de FD del orden de un 0,37% y Jalal y Scheideler (2001) con niveles de 0,25, 0,15 y 0,10% de FD, estos últimos autores encontraron un efecto mayor al utilizar el menor nivel de FD.

Rostagno *et al.* (2000) al utilizar celulasa, α -amilasa y proteasa encontraron un aumento de la digestibilidad ileal del Ca en un 7,9% al ser incorporadas en dietas de pollos broilers. Sin embargo, Scheideler y Weber (2003) no encontraron diferencias significativas al utilizar el CME sobre la digestibilidad del Ca en las etapas de crianza y de postura, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este ensayo.

Las dietas fueron formuladas considerando los aportes de Ca provenientes de la enzima fitasa (0,1%) y de los insumos, por lo que no se esperaba un

aumento en la digestibilidad de este mineral en ningún tratamiento. Es importante mencionar que los aumentos en la digestibilidad del Ca fueron, numéricamente, de un 5,12% y de un 15,9% con la fitasa y el CME, respectivamente.

A pesar de que la mayor parte de los estudios mencionan la reducción de los costos al utilizar la enzima fitasa (Latshaw, 1999; Coetzee, 2000; Oderkirk, 2001), en casi la totalidad de los trabajos revisados los autores no buscaban evaluar el efecto de la incorporación de fitasa sobre el costo de la ración. Salvo un estudio realizado por Terreros (2001), el cual indicó que el MB calculado benefició al grupo control por sobre los tratamientos que incorporaban fitasa en dosis de 300 y 600 U/kg de alimento. Estos resultados no concuerdan con los encontrados en el presente estudio, donde la incorporación de fitasa aumentó el MB en \$193 por gallina alojada. Los efectos económicos observados en este estudio se encuentran mayormente determinados por el número de huevos producidos y secundariamente, por el consumo de alimento y el peso de los huevos. Este hecho es muy importante, ya que los tratamientos suplementados con fitasa presentaron las mayores producciones, y por ende, los valores de MB más altos.

Con respecto a la inclusión del CME, en el presente estudio, éste disminuyó el MB en \$120 por gallina alojada. Este hecho se debe fundamentalmente a la baja producción de huevos y al alto consumo de alimento que presentaron los tratamientos suplementados con el CME. A pesar que el tratamiento 3 (que contenía sólo el CME) mostró los pesos promedios de huevo más altos (58,30g), éstos no fueron suficientes para lograr un mejor MB. Si bien un estudio realizado por Lorenzoni (2001) indica mejoras en el MB al utilizar el CME, estos resultados se obtuvieron sólo con niveles de energía de 2800 y 2750 kcal (en los períodos de 22 a 36 semanas y 36 a 44 semanas, respectivamente),

mientras que al utilizar niveles de 2750 y 2670 kcal (en los mismos períodos), éstos mostraron una baja en el MB al incorporar el C.M.E., muy similar a lo observado en este estudio.

Si bien en este estudio la fitasa ratificó su efecto mejorador de la postura y MB, y una disminución en el consumo de alimento y el peso corporal y el CME reafirmó su efecto de aumentar el peso del huevo, al usar ambos suplementos combinados no se evidenciaron mejoras superiores a los efectos producidos en forma individual, sino más bien tendieron a atenuarse.

CONCLUSIONES

1. El uso combinado de la enzima fitasa y el CME no obtuvo mayores beneficios por sobre el efecto individual de cada enzima en los indicadores evaluados en el presente estudio.
2. En este trabajo, se ratificó la mejora de la enzima fitasa sobre el porcentaje de postura y la reducción del consumo de alimento y peso corporal. Mientras que la administración del CME confirmó su influencia en el aumento en el peso del huevo.
3. El uso combinado de la enzima fitasa y el CME no obtuvo mejoras por sobre el efecto individual de cada enzima sobre el retorno económico de los tratamientos. Los tratamientos suplementados con la enzima fitasa tuvieron un mayor retorno económico que los tratamientos suplementados con el CME, debido principalmente al aumento en la producción de huevos.
4. El efecto del CME sobre la digestibilidad ileal del P fue inesperadamente alto. La causa de este hecho es aún desconocida, por lo que se hace necesario realizar más estudios para corroborar las hipótesis planteadas previamente.

BIBLIOGRAFÍA

- **ADEOLA, O.; SANDS, J.S.** 2003. Does supplemental dietary microbial phytase improve amino acid utilization? A perspective that it does not. *J. Anim. Sci.* 81(E. Suppl. 2): E78-E85.
- **ANGEL, R; APPLGATE, T.** 2000. Feeding strategies to reduce phosphorus output. **In:** Proceedings of the XXI World's Poultry Congress, Montreal, Canada. August 20-24, 2000. pp. 176-186.
- **ASOHUEVO.** 2003. Tabla vigente de precios de huevos para el productor sin IVA año 2003. Santiago, Chile. [en línea] <<http://www.asohuevo.cl/precio.html>> [consulta: 22-10- 2003].
- **ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST (A.O.A.C.).** 1995. Methods of analysis. Washington D.C.
- **ANNISON, G.** 1990. Polysaccharides composition of the Australian wheat and the digestibility of their starches in broilers chicken diets. *Aust. J. Expt. Agric.* 30: 183-186.
- **ANNISON, G.; CHOCT, M.; HUGHES, R.J.** 1995. Enzymes and the nutritive value of lupins. **In:** Proceedings of the Australian Poultry Science Symposium 7: 126-129.
- **ABUDADOS, A.; LIGHTSEY, S.F.; TOLER, J.E.; MAURICE, D.V.** 2000. Intestinal phytase activity in meat type chickens. *Poultry Science Abstracts* 79 (Suppl. 1): 12(48).
- **ABUDADOS, A.; LIGHTSEY, S.F.; BRIDGES, W.C.; MAURICE, D.V.** 2002. Phytate Phosphorus Utilization and Intestinal Phytase Activity in Laying Hens. *Poultry Science Abstracts* 81 (Suppl. 1): 70 (298).

- **BASF.** 1994. Sobre el tema de la fitasa: lo que hay que saber acerca del Natuphos[®].29. BASF (ed.), Química fina. 11p. (Investigación y práctica, 29).
- **BECRAFT, P.W.; ASUNCION-CRABB, Y.** 2000. Positional cues specify and maintain aleurone cell fate in maize endosperm development. *Development* 127:4039-4048.
- **BEDFORD, M. R.** 1995. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 53:145-155.
- **BEDFORD, M.R.** 1996. The effect of enzymes on digestion. *J. Appl. Poultry Res.* 5: 370-378.
- **BEDFORD, M.R.** 1997. Reduced viscosity of intestinal digesta and enhanced nutrient digestibility in chickens given exogenous enzymes. [en línea]. International Development Research Center. <http://web.idrc.ca/fr/ev-30916-201-1-DO_TOPIC.html>[Consulta: 05-01-2004]
- **BEDFORD, M.R.** 2000a. Enzymes for cereals which do not pose viscosity problems. **In:** Proceedings from the Third European Symposium on Feed Enzymes. May 8-10, 2000. Netherlands.
- **BEDFORD, M.R.** 2000b. Influence of corn quality on response to enzymes in poultry diets. **In:** Proceedings from AFMA Symposium 2000. October 10-13, 2000. Pretoria, South Africa.
- **BEDFORD, M.R.; PACK, M.** 1998. Mechanism of action and nutritional benefits from feed enzymes in low-viscous poultry diets. **In:** Proceedings AFMA Forum 98: 6-8. May 1998. Sun City, South Africa.

- **BEDFORD, M.R.; SCHULZE, H.** 1998. Exogenous enzymes for pigs and poultry. *Nutrition Research Reviews* 11: 91-114.
- **BEUERLEIN, J.** 2001. Classes and Uses of Wheat. [en línea] <<http://ohioline.osu.edu/agf-fact/pdf/0146.pdf>> [consulta: 11-04-2004]
- **BOLING, S. D.** 2003. The effect of phytate in nutrient utilization. [en línea] <<http://traill.outreach.uiuc.edu/porknet/paperDisplay.cfm?ContentID=513>> [consulta: 20-09- 2003].
- **BOLING, S.D.; DOUGLAS M.W.; JOHNSON, M. L.; WANG, X.; PARSONS, C.M.; KOELKEBECK, K.W.; ZIMMERMANT, R.** 2000a. The Effects of Dietary Available Phosphorus Levels and Phytase on Performance of Young and Older Laying Hens. *Poultry Sci.* 79: 224-230.
- **BOLING, S.D.; DOUGLAS, M.W.; SHIRLEY, R.B.; PARSONS, C.M.; KOELKEBECK, K.W.** 2000b. The effects of various dietary levels of phytase and available phosphorus on performance of laying hens. *Poultry Science* 79: 535-539.
- **BRENES, A.; MARQUARDT, R.R.; GUENTER, W.; ROTTER, B.A.** 1993. Effect of enzyme supplementation on the nutritional value of raw, autoclaved, and dehulled lupins (*Lupinus albus*) in chicken diets. *Poultry Science* 72: 2281-2293.
- **BRENES, A.; MARQUARDT, R.R.; GUENTER, W.; VIVEROS, A.** 2002. Effect of enzyme addition on the performance and gastrointestinal tract size of chicks fed lupin seed and their fractions. *Poultry Science* 81: 670-678.

- **BROWN, I.** 1996. Complex carbohydrates and resistant starch. Nutrition Reviews 54: S115-S119.
- **BROZ, J; OLDALE, P; PERRIN-VOLTZ, A.H.; RYCHEN, G.; SCHULZE, J; SIMOES NUNES, C.** 1994. Effect of supplemental phytase on performance and phosphorus utilisation in broiler chickens fed a low phosphorus diet without addition of inorganic phosphates. Br. Poult. Sci. 35:273-280.
- **BRYDEN, W.L.; GILL, R.J.; BALNAVE, D.** 1994. Feed enzyme supplement improves the apparent metabolisable energy of lupins for broiler chickens. **In:** Proceedings of the Australian Poultry Science Symposium 6: 115.
- **BÜHLER, M.; LIMPER, J.; MÜLLER, A.; SCHWARZ, G.; SIMON, O.; SOMMER, M.; SPRING, W.** 1998. Las enzimas en la nutrición animal. Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernährung (Ed), Alemania. pp. 1-46.
- **BURNETT, G.S.** 1966. Studies of viscosity as the probable factor involve in the improvement of certain barleys for chicken by enzymes supplementation. Br. Poultry Sci. 7:55-75.
- **BUTCHER, G.D.; MILES R.** 1990. Concepts of Eggshell Quality. Fact Sheet VM-69. University of Florida Cooperative Extension Service. [en línea] < http://edis.ifas.ufl.edu/BODY_VM013 > [consulta: 23-02-2004].
- **CAMIRUAGA, M.; CLAURE, C.; HIRSCH, P.** 2003. Granos y sus Subproductos [en línea] <http://www.puc.cl/sw_educ/prodanim/digestiv/fii4c.htm> [consulta: 6-11-2003].

- **CAMPBELL, G.L.; BEDFORD, M.R.** 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: A review. *Can. J. Anim. Sci.* 72 (3): 449-466.
- **CARLOS A.B; EDWARDS, H.M.** 1998. The effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and phytase on the natural phytate phosphorus utilization by laying hens. *Poultry Science* 77:850-858.
- **CARRÉ, B. ; DEROUET, L. ; LECLERCQ, B.** 1990. The digestibility of cell-wall polysaccharides from wheat (bran or whole grain), soybean meal, and white lupin meal in cockerels, muscovy ducks, and rats. *Poultry Science* 69:623-633.
- **CELITE®-CHILE S.A.** 2003. Datos Técnicos del producto Celite®. <http://www.infomine.com/index/suppliers/Celite_Chile_S.A..html> [consulta: 20-09- 2003].
- **CEYLAN, N.; SCHEIDELER, S.D.; STILBORN, H.L.** 2003. High available phosphorus corn and phytase in layers diets. *Poultry Science* 82:789-795.
- **CHESSON, A.** 2000. Non-starch polysaccharide degrading enzymes- types and methods of action. **In:** XXI World Poultry Congress. Montreal, Canada. August 21-24, 2000. Rowett Research Institute. pp. 1-12
- **CHOCT, M.** 1997. Feed non-starch polysaccharides: chemical structures and nutritional significance. *Feed Milling International*, June Issue, pp. 13-26.
- **CHOCT, M.; HUGHES, R.J.; WANG, J.; BEDFORD, M. R.; MORGAN, A.J.; ANNISON, G.** 1995. Feed enzymes eliminate antinutritive effect of non-starch polysaccharides and modify fermentation in broilers. **In:** Proceedings of the Australian Poultry Science Symposium 7: 121-125.

- **CHOCT, M.; HUGES, R.J.; WANG, J.; BEDFORS, M.R.; MORGAN, A.J.; ANNISTON, G.** 1996. Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chicken. *Brit. Poult. Sci.* 37: 609-621.
- **CHOCT, M.; KOCHER, A.** 2000. Non-starch carbohydrates: digestion and its secondary effects in monogastrics. **In:** Proceedings of the 24th Annual Meeting of the Nutrition Society of Australia. December 2000. Fremantle, Perth, Australia. pp. 31-38.
- **CLASSEN, H.L.; BEDFORD, M.R.** 1991. The use of enzymes to improve the nutritive value of poultry feeds. **In:** Recent advances in animal nutrition. Batterworth-Heinemann. Ltd., Oxford R. U. pp. 95-116.
- **COELHO, M.B.** 2000. Positive, negative traits of phosphorus examined. *Feedstuffs* 7 Feb. 2000: 12-15, 23.
- **COETZEE, C.** 2000. Phytase update. [en línea] <<http://www.spesfeed.co.za/Spring%202000.htm>> [consulta: 23-02-2004]. pp 12-14.
- **COLLINS, N.E.; MORAN, E.T.; STILBORN, H.L.** 1998. Corn hybrid and bird maturity affect apparent metabolizable energy values. *Poultry Science Abstracts* 77: 42-42.
- **COOK, M. E.; DRAKE, B. M.; PIERSON, E. E.** 2000. A blend of xylanase, amylase and protease (Avizyme 1500) improves laying hen egg production, feed efficiency, and livability when supplemented in corn-soy bases diets. *Poultry Science Abstracts* 79 (Suppl. 1): 21 (86).
- **D'ALFONSO, T.H.** 2002. Global corn quality variability. [en línea] Multi-state Feeding and nutrition publication.

<http://ag.ansc.purdue.edu/poultry/multistate/GLOBAL%20CORN%20QUALITY%20SURVEY.pdf> [consulta: 15-02-2004]

- **D'ALFONSO, T.H.** 2003. Corn quality: what are we including in our poultry diets? **In:** 50th Maryland Nutrition Conference for feed manufacturers. Maryland, USA. March 27-28, 2003. University of Maryland. pp. 52-58.
- **DANISCO.** 1997a. Avizyme[®] 1500 allows dietary energy specifications and formulation cost to be reduced in a corn-soybean layer diet. 1500.03. Market trial report-Italy. 2 p.
- **DANISCO.** 1997b. Avizyme[®] 1500 improves ileal digestibility of energy in broilers. 1500.22. Trial report-USA. 3 p.
- **DANISCO.** 1997c. Avizyme[®] 1500 improves ileal digestibility of energy and protein in broilers. 1500.23. Trial report-Brazil. 3p.
- **DANISCO.** 1997d. Avizyme[®] 1500 improves egg production and feed efficiency in a sorghum-based layer diet. 1500.26. Trial report-Australia. 3 p.
- **DANISCO.** 1997e. Avizyme[®] 1500 allows nutrient reductions in corn based layer diets without affecting production. 1500.27. Trial report-Australia. 3 p.
- **DANISCO.** 1998a. Avizyme[®] 1500 allows reductions in nutrient specifications of a corn-based layer diet without affecting performance. 1500.28. Trial report-Philippines. 3 p.

- **DANISCO.** 1998b. Avizyme[®] 1500 improves ileal digestibility of energy and starch in different sources of corn in broiler diets. 1500.38. Trial report-United Kingdom. 4 p.
- **DANISCO.** 1998c. Avizyme[®] 1500 improves ileal digestibility of energy and starch in different sources of brazilian corn. 1500.41. Trial report-Brazil. 4 p.
- **DANISCO.** 1999a. Avizyme[®] 1500 maintained performance in layers fed a reduced energy corn/soy-based diet. 1500.05. Market Trial report-Italy.4 p.
- **DANISCO.** 1999b. Avizyme[®] 1500 maintains performance in white egg layers when added to a reduced energy diet. 1500.06. Market Trial report-USA. 3 p.
- **DANISCO.** 1999c. Avizyme[®] 1500 improves egg production and daily egg mass in brown egg layers fed corn-based diets. 1500.42. Trial report-Spain. 3 p.
- **DANISCO.** 1999d. Avizyme[®] 1500 improves production persistency and cumulative egg numbers in layers fed a sorghum-based diet. 1500.43. Trial report-Mexico. 4 p.
- **DANISCO.** 1999e. Avizyme[®] 1500 added over the top (OTT) of a medium energy specification corn/soy-based layer diet improved egg production and feed efficiency. 1500.44. Trial report-USA. 3 p.
- **DANISCO.** 1999f. Avizyme[®] 1500 improves production persistency and cumulative egg numbers in layers fed a corn-based diet. 1500.45. Trial report-France. 4 p.

- **DENNIS, J.E.; XIAO, S.; AGARWAL, M.; FINK, D. J.; HEUER, A. H.; CAPLAN, A.I.** 1996. Microstructure of matrix and mineral components of eggshells from white leghorn chickens (*Gallus gallus*). *Journal of Morphology* 228: pp. 287-306.
- **DOUGLAS, M.; PARSONS, C. M; BEDFORD, M. R.** 2000. Effect of various soybean meal sources and Avizyme on chick growth performance and ileal digestible energy. *J. Appl. Poultry Res.* 9:74-80.
- **DOZIER, W.A.** 2000. How to manage dietary phosphorous in enviromentally sensitive areas. *Feed Management* 51(10): pp. 27-29.
- **DUDLEY-CASH, W.A.** 2001. Soybean meal source, added enzyme affect nutritional value for chicks. *Feedstuffs* 73(41): 1-3.
- **DVORAKOVA, J.** 1998. Phytase: Sources, preparation and exploitation. *Folia Microbiology* 43: 323-338.
- **ELLIOT, M.** 2004. Enzymes may unlock hidden energy in laying hen diets. [en línea] *Feedstuffs* 76(1). January 2004. Reprint <http://animalnutrition.danisco.com/Web/an/common/files/attachments_tech_publications/2004/Enzymes_may_unlock_hidden_energy.pdf> [Consulta : 21/02/2004]
- **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO).** 1995 [en línea] <<http://www.fao.org/livestock/agap/frg/afris/espanol/document/tfeed8/Data/405.HTM>> [consulta: 20-03-2004].
- **FRANCESCH, M.** 1996. Bases de la utilización de complejos enzimáticos en avicultura. **In:** XII Curso de Especialización FEDNA. Madrid, España. 7-8 de Noviembre, 1996. FEDNA. Pp 1-13.

- **FRANCO, D.J.; BECK, M.M.** 2003. Intestinal Calcium Uptake and Reproductive Hormones Levels of Three Laying Hen Varieties After Prolonged Egg Production. University of Nebraska Cooperative Extension MP81. pp 15-17. [en línea]
<<http://ianrpubs.unl.edu/poultry/MP81%202003%20Poultry.pdf>>
[consulta: 3-03-2004].
- **FROST, T.J.; ROLAND, D.A.** 1991. The influence of various calcium and phosphorus levels on tibia strength and eggshell quality of pullets during peak production. Poult. Sci. 70: 963-969.
- **GARLICH, J.D.** 1979. The phosphorus requirement of laying hens **In:** Georgia Nutr. Conf. Athens, Grecia. 1979. University of Georgia. pp. 104-113.
- **GATEL, F.** 1994. Protein quality of legume seeds for non-ruminant animals: a literature review. Animal Feed Science and Technology 45: 317-348.
- **GLAVIC N.; FERRADA G.** 1994. Biología: Tercero Medio. 3ª Edición. Ediciones Pedagógicas Chilenas S.A. Santiago, Chile. Pp 148-153.
- **GODFREY, P.** 2003. Soy Protein to Combat Obesity [en línea]
<http://www.preparedfoods.com/archives/2003/2003_4/0403rd_soy.htm> [consulta 19-11-2003].
- **GORDON, R.W.; ROLAND, SR., D. A.** 1996. Influence of phytase on calcium utilization of laying hens. **In:** Parr, J. (Ed.) Use of Natuphos® phytase in layer nutrition and management. BASF. Cornell. E.E.U.U. pp. 31-42.

- **GORDON, R.W.; ROLAND, SR., D. A.** 1997. Performance of commercial laying hens fed various phosphorous levels, with and without supplemental phytase. *Poultry Science* 76: 1172-1177.
- **GRACIA, M.I.; LATORRE, M.A.; GARCÍA, M.; LÁZARO, R.; MATEOS, G.G.** 2003. Heat processing of barley and enzyme supplementation of diets for broilers. *Poultry Science* 82: 1281-1291.
- **GRAHAM, H.** 1994. Selecting your feed enzyme. *European Milling Directory*, 1994 Finnfeeds International Ltd.
- **GRANT, G.; MOREE, L.J.; McKENZIE, N. H.; STEWART, J.C.; PUSZTAI, A.** 1983. A survey of the nutritional and haemagglutination properties of legume seeds generally available in the UK. *British Journal of Nutrition* 50: 207-214.
- **GRIMES, J.; CROUCH, A.N.** 1997. Enzymes supplementation may improve bird performance. *Feedstuffs* 69(22): 31-34.
- **GUENTER, W.** 1997. Phytases in cereals and hemicelluloses in canola (rapeseed) meal and lupins. [en línea] <http://web.idrc.ca/en/ev-30966-201-1-DO_TOPIC.html> [consulta: 3-03-2004].
- **HARMS, R.H.; MILES, R.D.** 1977. Phosphorus and laying hen nutrition. *Feedstuffs* 49(26):18-19.
- **HERNÁNDEZ, R.** 2001. Enzimas v. 2.0 [en línea] <<http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/enzimas/>> [consulta: 25-09-2003].
- **HRUBY, M.** 2003. Enzymes reduce food poisoning bacteria. *Feed Mix* .Volume 11, number 1. [en línea] <<http://animalnutrition.danisco.com/web/an/common/files/attachment>

[_tech_publications/Enzymes_reduce_food_poisoning_bacteria.pdf](#) >
[consulta: 25-11-2003].

- **HRUBY, M.; PIERSON, E.M.** 2002. Implications of enzyme use in corn/sorgum/soy poultry diets on performance, nutrient utilization and gut microflora. [en línea] Multi-state Feeding and nutrition publication. <<http://ag.ansc.purdue.edu/poultry/multistate/HrubyPiersonFinnfeeds.pdf>> [consulta:15-02-2004].
- **HUYGHEBAERT, G.** 2003. Replacement of antibiotics in poultry. **In:** Proceedings of the Eastern Nutrition Conference. May 8-9, 2003. Quebec, Canada. p. 55-78.
- **JALAL, M.A.; SCHEIDELER, S.E.** 2001. Effect of Supplementation of Two Different Sources of Phytase on Egg Production Parameters in Laying Hens and Nutrient Digestibility. Poultry Science 80: 1463-1471.
- **JEROCH, H.; HAUSCHILD, A.; MULLER, A.** 1995. Influence of mechanical treatment and enzyme supplementation on nutritive value of peas (*Pisum sativum* L.) for broiler chickens. Bodenkultur 46: 263-268.
- **JIMÉNEZ, F.** 2001. Evaluación del empleo de xilanasas, α -amilasas y proteasas (Avizyme 1500®) en dietas de gallinas de postura. II: Efectos en indicadores de la calidad del huevo. Memoria título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 54 p.
- **JIN, G.** 2002. Do you really know the feeding value of your corn? Asian Poultry. July, 2002. [en línea] <<http://animalnutrition.danisco.com/searchindex.asp>> [consulta: 20-10-2003].

- **JIN, G.** 2003. Enzymes release extra energy in corn-based duck feeds. Asian Poultry Magazine. July, 2003. [en línea] <http://danisco.mondosearch.com/cgi-bin/MsmGo.exe?grab_id=66&EXTRA_ARG=&CFGNAME=MssFind%2Ecfg&host_id=42&page_id=16386048&query=Avizyme+1502> [consulta: 16-05-2004].
- **JOHNSTON, S.L.; SOUTHERN, L.L.** 2000. The effect of varying mix uniformity (simulated) of phytase on growth performance, mineral retention, and bone mineralization in chicks. Poultry Science 79:1485-1490.
- **KAMIŃSKA, B.Z.; SKRABA, S.; KORELESKI, J.** 1994. Effect of dietary phosphorus levels and phytase supplement on performance of laying hens and eggshell quality. **In:** Proceedings of the 9th European Poultry Conference, Glasgow, U.K. 1994. pp. 383-384.
- **KAMIŃSKA, B.Z.; SKRABA, S.** 1997. Beneficial effect of supplementing laying-hen diets with microbial phytase on the eggshell quality. **In:** Proceedings of the 7th European Symposium of quality of egg and egg products. Poznan, Poland. 1997. pp. 89-94.
- **KEROVUO, J.** 2000. A Novel Phytase from *Bacillus* Characterization and Production of the Enzyme. Faculty of Science of the University of Helsinki, Helsinki, Finlandia. May 23, 2000. [en línea] <<http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/mat/bioti/vk/kerovuo/anovelph.pdf>> [consulta: 3-03-2004].
- **KESHAVARZ, K.** 2000a. Nonphytate phosphorus requirements of laying hens with and without phytase on a phase feeding program. Poultry Science 79:748-763.

- **KESHAVARZ, K.** 2000b. Re-evaluation of nonphytate phosphorus requirements of growing pullets with and without on phytase. *Poultry Science* 79:1143-1153.
- **KESHAVARZ, K.** 2003a. The effects of different levels of nonphytate phosphorus with and without phytase on the performance of four strains of laying hens. *Poultry Science* 82: 71-91.
- **KESHAVARZ, K.** 2003b. Effects of continuous feeding of low-phosphorus diets with and without phytase during the growing and laying on performance of two strains of leghorns. *Poultry Science* 82: 1444-1456.
- **KHAN, N.** 1996. Tackling the phosphate burden. *Feed Mix* 4 (3): 22-26.
- **KIES A.K.; VAN HEMERT K.H.F.; SAUER W.C.** 2001. Effect of phytase on protein and amino acid digestibility and energy utilization. *World's Poultry Science Journal.*, 57 (2): 109-126.
- **KLINGENSMITH, P.M.; HESTER, P.Y.** 1983. The relationship of dietary levels of phosphorus to the production of soft-shelled and shell-less eggs. *Poultry Science* 62: 1860-1868.
- **KORNEGAY, E.T.** 2001. Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytase and factors influencing their activity. **In:** *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. Bedford, M.R. and Patridge, G.G. (eds.).CAB. International, 2001) Capítulo 10, p. 237-271.
- **LAN, G.Q.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S.; HO, Y.W.** 2002. Efficacy of a phytase-producing bacterial culture on the performance and nutrient use of broiler chickens fed corn-soybean meal diets. *Poultry Science* 81: 1522-1532.

- **LATSHAW, D.** 1999. Paying attention to maximum production and minimum nutrients in the manure when feeding layers. [en línea] <<http://ag.ansc.purdue.edu/poultry/multistate/latshaw1.htm>> [consulta : 16-05-2004].
- **LAUX, J.J.; VON REDING, W.; BURI, R.C.** 2003. Isolation and characterization of aleurone from wheat bran. IFT Annual Meeting- Chicago. Session 44-6. [en línea] <http://ift.confex.com/ift/2003/techprogram/paper_20624.htm> [consulta:11-04-2004].
- **LEÓN, A.; ANGULO, I.** 1989. Fuentes Proteicas. [en línea] cap. II. Maracay, Venezuela. **In:** Materias primas alternativas para la producción de alimentos concentrados para animales en Venezuela. FONAIAP Divulga N°32 Julio-Diciembre 1989. <<http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd32/texto/materias.htm>> [consulta: 02-03-2004].
- **LESKE, K.L.; COON, C.N.** 1999. A bioassay to determine the effect of phytase on phytate phosphorus hydrolysis and total phosphorus retention of feed ingredients as determined with broilers and laying hens. Poultry Science 78: 1151-1157.
- **LESSON, S.; YERSIN A.; VOLKER L.** 1993. Nutritive value of the 1992 corn crop. J. Appl. Poultry Res. 2: 208-213.
- **LIENER, I.E.** 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 34: 31-67.
- **LIENER, I.E.** 2000. Non-nutritive factors and bioactive compounds in soy. **In:** Drackley, J.K. (Ed.) Soy in Animal Nutrition. Federation of Animal Science Societies. Savoy, Illinois, USA. pp 13-45.

- **LIM, H.S.; M; NAMKUNG, H.; PAIK, I.K.** 2003. Effects of phytase supplementation on the performance, egg quality, and phosphorus excretion of laying hens fed different levels of Dietary Calcium and Nonphytate Phosphorus. *Poultry Science* 82: 92-99.
- **LIU, B. L.; RAFIQ, A; TZENG, Y.M.; ROB, A.** 1998. The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme Microb. Technol.* 22: 415-424.
- **LONGSTAFF, M.; McNAB, J.M.** 1991. The inhibitory effects of hull polysaccharides and tannin of faba beans (*Vicia faba* L.) on the digestion of amino acids, starch and lipid and on digestive enzyme activities in young chicks. *British Journal of Nutrition* 65: 199-216.
- **LORENZONI, A.** 2001. Evaluación del empleo de xilanasa, α -amilasa y proteasa (Avizyme 1500®) en dietas de gallinas de postura en producción. I: Efectos en indicadores productivos. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 55p.
- **LUNDEEN, T.** 2000. Proper calcium, phosphorus nutrition important for egg shell quality. *Feedstuffs*, October 2, 2000. pp 10-23.
- **MAENZ, D.D.; CLASSEN, H.L.** 1998. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poultry Science* 77:557-563.
- **MAENZ, D.D.; IRISH, G. G.; CLASSEN, H.L.** 1999. Carbohydrate-binding and agglutinating lectins in raw and processed soybean meals. *Animal Feed Sci. And Technology.* 76:335-343.
- **MAYNARD, L.A.; LOOSLI, J.K.; HINTZ, H.F.; WARNER, R.G.** 1998. *Nutrición Animal.* 4ª Edición. McGraw-Hill, México. Pp 237-242.

- **MCCARTHY, J.F.; AHERNE, F.X.; OKAI, D.B.** 1974. Use of HCl insoluble ash as an index material for determining apparent digestibility with pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 54:107-109.
- **MCDONALD, P.; EDWARDS, R.A.; GREENHALGH, J.F.D.; MORGAN, C.A.** 2002. *Animal Nutrition*. 6th ed. Pearson Education Limited. London, United Kingdom. pp. 245-262.
- **McDOWELL, L.R.** 1992. Calcium and phosphorus. **In:** *Minerals in animal and human nutrition*. Academic Press. Inc., San Diego, U.S.A. pp. 26-77.
- **MILES, R.D.; WARD, N.E.; WILSON, J.W.; LEDOUX, D.** 2001. The Evaluation of RonozymeTM P (CT) in Layer Diets. *Poult. Sci. Annual Meeting Abstracts (Suppl. 1)* 80: 479.
- **MUGFORD, C.C.** 1979. Principles of grains processing systems. [en línea] <http://www.gograins.grdc.com.au/grainsnutrition/ns/6_3.html> [consulta: 6-11-03].
- **MÜHLHAUSER, H.** 1983. Nutrientes y productividad primaria. **In:** *Embalses, fotosíntesis y productividad primaria*. Editado por N. Bahamonde, S. Cabrera. Programa sobre el hombre y la biosfera. UNESCO. Curso taller realizado en la Universidad de Chile, Enero 1983. pp. 149-153.
- **NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC).** 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9 Rev. Ed. National Academic Press, Washington, DC.

- **NAVARRO, H. A.** 1991. Nuevos conceptos de la soya integral en la alimentación avícola. México: Asociación Americana de Soya. 6p. (Boletín Técnico, 102).
- **NYS, Y; ZAWAZKI, J.; GAUTRON, J.; MILLS, A.D.** 1991. Whitening of brown-shelled eggs: mineral composition of uterine fluid and rate of protoporphyrin deposition. *Poultry Science* 70: 1236-1245.
- **ODERKIRK, A.** 2001. Phytase Enzyme for Layers. [en línea] <<http://www.gov.ns.ca/nsaf/elibrary/archive/lives/poultry/laypull/phytase.htm>> [consulta: 02-03-2004]. Poultry Fact Sheet. pp 1-3.
- **OGASAWARA, T.; KOGA, O.; NISHIYAMA, H.** 1974. Effect of a shell gland irritant on the secretion rate, calcium and inorganic levels of the shell gland fluid in the laying hen. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 45: 668-673.
- **ORTIZ, L.T.; CENTENO, C.; TREVINO, J.** 1993. Tannins in faba beans seeds; effects on the digestibility of protein and amino acids in growing chicks. *Animal Feed Science and Technology* 41: 271-278.
- **PACK, M.; BEDFORD, M.; HARKER, A.; Le NY, P.** 1998. Alleviation of corn variability with poultry feed enzymes: Recent progress in development and practical application. **In:** Proceedings AFMA Forum 98, Sun City, South Africa.
- **PAIK, I.K.; UM, J.S.; LEE, S.J.; LEE, J.G.** 2000. Evaluation of the efficacy of crude phytase preparations in broiler chickens. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* 13(5): 673-680.
- **PESCATORE, A. J.; CANTOR, A. H.; STRAW, M. L.; FORD, M. J.; DUNLAP, M. K.** 1997. Influence of Phytase with Different Levels of Calcium and Phosphorus in Diets of Laying Hens on Egg Production and Shell Quality. *Poult. Sci. Annual Meeting Abstracts (Suppl. 1)* 76: 142.

- **PEBLEY, W.S.; BAGLIEN, J.S.** 2001. What are the benefits of freeze drying?.[en línea] <http://www.klamathbluegreen.com/whyfreezedry.htm>>. [consulta: 02-03-2004].
- **PETERSEN, S.T.** 2001. The benefits of phytase addition to poultry diets. *International Poultry Production* 9(6): 17-20.
- **POINTILLART, A.** 1994. Fitatos, fitasas: su importancia en la alimentación de los monogástricos. *INRA Prod. Anim.* 7(1): 29-39.
- **PUNNA, S.; ROLAND, D.A.** 1998. Influence of supplemental microbial phytase on first cycle (Phase 1) laying hens fed phosphorus-deficient diets from day one of age. *Poult. Sci. Annual Meeting Abstracts (Suppl. 1)* 77: 118.
- **PUNNA, S.; ROLAND, D.A.** 1999. Influence of supplemental microbial phytase on first cycle laying hens fed phosphorus-deficient diets from day one of age. *Poult. Sci.* 78:1407-1411.
- **PUSZTAI, A.; GRANT, G.; SPENCER, R.J.; DUGUID, T.J.; BROWN, D. S.; EWEN, S.W.B.; PEUMANS, W.J.; VANDAMME, E.J.M.; BARDOCZ, S.** 1993. Kidney bean lectin induced *Escherichia coli* overgrowth in the small intestine is blocked by GNA a mannose specific lectin. *Journal of Applied Bacteriology* 75: 360 – 368.
- **QUIAN, H.; KORNEGAY, E.T.; DENBOW, D.M.** 1997. Utilization of Phytate Phosphorus and Calcium as Influenced by Microbial Phytase, Cholecalciferol, and the Calcium: Total Phosphorus Ratio in Broilers Diets. *Poultry Science* 76: 37-46.
- **RAVIDRAN, V.; CABAUG, S.; RAVIDRAN, G.; BRYDEN, W.L.** 1999. Influence of microbial phytase on apparent ileal aminoacid digestibility of feedstuffs for broilers. *British Poultry Science* 78: 699-706.

- **REVINGTON, B.** 2002. Feeding poultry in the post-antibiotic era. [en línea] **In:** Proceedings of the Multi-state Poultry Meeting. May 14-16, 2002. Indianapolis, Indiana. U.S.A. <<http://ag.ansc.purdue.edu/poultry/multistate/Multi-state.pdf> > [consulta:15-02-2004]
- **ROBINSON, D.; SINGH, D.N.** 2001. Alternative protein sources for laying hens. [en línea]. <<http://www.rirdc.gov.au/reports/EGGS/00-144sum.html>> [consulta: 02-03-2004].
- **ROSTAGNO, H.S.; TEJEDOR, A.A.; ALBINO, L.F.T; SILVA, J.H.V.** 2000. Enzyme supplementation of corn-soybean meal diets improves nutrient ileal digestibility in broiler chicks. **In:** Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's 16^o Annual Symposium.pp. 101-107.
- **RUBIO, L. A.; BRENES, A.** 1995. Utilización de leguminosas-grano en nutrición animal: problemas y perspectivas. **In:** XI curso de especialización F.E.D.N.A. 7 y 8 de noviembre de 1995. Barcelona, España.
- **SANTIDRIAN, S.; MARZO, F.** 1989. Effect of tannic acid and kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) on the intestinal absorption of d-galactose and l-leucine in chickens. Journal of the Science of Food and Agriculture 47: 435-442.
- **SAKOMURA, N.K.; ZANELLA, I.; PACK, M.; SALANOVA, M. S.; ROSA, A. P.; MAGON, L.** 1998. Effect of soybean processing and enzyme addition on nutrient digestibility in corn-soybean broiler diets. **In:** Proceedings of the Southeastern Poultry Science Symposium, Jan. 1998. Atlanta, Georgia.

- **SAS INSTITUTE, COPYRIGHT©.** 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, Nc, USA. SAS® Proprietary Software Release 6.12 TS020. Licensed to Universidad de Chile, Site 0003329002.
- **SCHEIDELER, S.E.** 2000. Effects of feed enzymes in corn-soy layer diets on digestion and nutrient availability. The Nebraska Poultry Report 2000-2001. University of Nebraska Cooperative Extension, MP75, pp. 12-13.
- **SCHEIDELER, S. E.; ABUDABOS, A.** 1998. Enzyme supplementation in Corn/Soy-Based Layer Diets. University of Nebraska Cooperative Extension MP70, UNL Poultry Reports. pp 1-4.
- **SCHEIDELER, S.E.; JALAL, M.A.** 2000. The effect of phytase supplementation on A: egg production parameters in laying hens; B: nutrient digestibility in laying hens. The Nebraska Poultry Report 2000-2001. University of Nebraska Cooperative Extension, MP75, pp. 14-21.
- **SCHEIDELER, S.E.; WEBER, T.** 2003. Supplementation of pullet and layer diets with a multi-enzyme product. The Nebraska Poultry Report 2003. University of Nebraska Cooperative Extension, MP81, pp. 24-27.
- **SCHEIDELER, S.E.; ABUDABOS, A.; WYATT, C.** 1998. Enzyme supplementation in corn/soy-based layer diets. Poultry Science Annual Meeting Abstracts 77:55.
- **SCHÖNER, F.J.; HOPPE, P.P.; SCHWARZ, C.** 1991. Comparative effects of microbial phytase and inorganic phosphorus on performance and on retention of phosphorus, calcium and crude ash in broiler. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 66:248-255.
- **SCHUMAIER, G.; McGINNIS, J.** 1967. Metabolizable energy values of wheat and some by-product feedstuffs for growing chicks. Poultry Science 46: 79-82.

- **SCOTT, T.A.; HALL J.W.** 1998. Using acid insoluble ash marker ratios (diet: digesta) to predict digestibility of wheat and barley metabolizable energy and nitrogen retention in broiler chicks. *Poultry Science* 77: 674-679.
- **SCOTT, M.L., NESHEIM, M.C.; YOUNG, R.C.** 1982. Nutrition of the chicken. 3^a ed. New York. W.F. Humphrey Press. Inc. 562 p.
- **SCOTT, T.A.; KAMPEN, R.; SILVERSIDES, F. G.** 1999. The Effect of Phosphorus, Phytase Enzyme, and Calcium on the Performance of Layers Fed Corn-Based Diets. *Poultry Science* 78:1742-1749.
- **SEBASTIAN, S.; TOUCHBURN, S.P.; CHAVEZ, E.R.; LAGUE, P.C.** 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. *Poultry Science* 75: 729-736.
- **SEBASTIAN, S.; TOUCHBURN, S.P.; CHAVEZ, E.R.; LAGUE, P.C.** 1996b. Efficacy of supplemental microbial phytase at different dietary calcium levels on growth performance and mineral use of broiler chickens fed corn-soybean diets. *Poultry Science* 75: 1516-1523.
- **SIBBALD, I.R.; SLINGER, S.J.** 1962. The metabolizable energy of materials feed to growing chicks. *Poultry Science* 41: 1612-1613.
- **SIMON, O; GRRUPPEN, H.; CLASSEN, H.L.; CLOSE, W; KHAN, N.; ACAMOVIC, T.; MCCLEARY, B.V.; MORGAN, A; COWAN, D.** 1996. Enzymes in Action. *World Poultry* 12(11):62-71.
- **SMITS, C.H.M.; ANNISON, G.** 1996. Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition - towards a physiologically valid

approach to their determination. World's Poultry Science Journal 52: 203 - 221.

- **SOKAL, R.; ROHLF, F.J.** 1981. Principles and Practices of Statistics in Biological Research. 2nd edition. New York. Freeman and Company. pp. 859.
- **SOHAIL, S.S.; ROLAND SR, D.A.** 2000. Influence of phytase on calcium utilization in commercial layers. J. Appl. Poultry Res. 9:81-87.
- **SOHAIL, S.S.; ROLAND SR, D.A.** 2002. Influence of dietary phosphorus on performance of Hy-Line W36 hens. Poultry Science 81: 75-83.
- **STANTON, W.J.; ETZEL; B.J WALKER.** 1992. Fundamentos del Marketing. 9th Ed. México, McGraw-Hill. pp. 291-303.
- **SULLIVAN, T.W.; GLEAVES, E.W.** 1996. Wheat in Poultry Rations. [en línea] <<http://ianrpubs.unl.edu/poultry/g386.htm>> [consulta:11-04-2004].
- **SUTTON, A.; LANDER, C.H.** 2003. Feed and Animal Management for Poultry. NRCS. Nutrient Management Technical Note N°4. pp1-4. October 2003 [en línea] <<http://www.ctic.purdue.edu/CTIC/Nutrient/Management/NMtn4.pdf>> [consulta: 02-03-2004].
- **TERREROS, M.C.** 2001. Efectos del uso de una fitasa (Natuphos®) sobre indicadores de la calidad del huevo y la dinámica de excreción fecal de fósforo en gallinas Leghorn. Memoria título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 88 p.

- **TOUCHBURN, S.P.; SEBASTIAN, S.; CHAVEZ, E.R.** 1998. Exploring the side-benefits of phytase. *Feed Mix* 6(4): 32-34.
- **TUCKER L.; WYATT C.; BEDFORD M.R.** 2000. Feed enzymes and betaine in antibiotic free poultry diets. *AFMA Matrix* 9 (1):1-3.
- **UM, J.S.; PAIK, I.K.** 1999. Effects of microbial phytase supplementation on egg production, eggshell quality, and mineral retention of laying hen fed different levels of phosphorus. *Poultry Science* 78: 75-79.
- **UM, J.S.; PAIK, I.K.; CHANG, M.B.; LEE, B.H.** 1999. Effect of microbial phytase supplementation to diets with low non-phytate phosphorus levels on the performance and bioavailability of nutrients in laying hens. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 12(2): 203-208.
- **VAN DE MIEROP, L.; GHESQUIERE, H.** 1998. Enzymes have a long life ahead. *World Poultry* 14 (11): 16-18.
- **VANDEPOPULIERE, J.M.; LYONS, J. J.** 1992. Effect of inorganic phosphate source and dietary phosphorus level on laying hen performance and eggshell quality. *Poultry Science* 71: 1022-1031.
- **VAN DER KLIS, J.D., KWAKERNAAK, C.; DE WIT, W.** 1995. Effects of endoxylanase addition to wheat-based diets on physiochemical chyme conditions and mineral absorption in broilers. *Anim Feed Sci. Technol.* 51: 15-27.
- **VAN DER KLIS, J.D.; VERSTEEGH, H.A.J.; SIMONS, P.C.M.; KIES, A.K.** 1997. The efficacy of phytase in corn-soybean meal-based diets for laying hens. *Poultry Science* 76: 1535-1542.

- **VALLARDI, M.; MORALES, R.; ÁVILA, E.** 2002. Efecto de la adición de fitasa como fuente de fósforo inorgánico en dietas para gallinas de postura. *Téc. Pecu. Méx.* 40(2):181-186.
- **VARGAS, J.** 1990. Más nutrientes usando enzimas. *Industria Avícola* Abril, 1990. pp 8-12.
- **VERA, L.** 2004. Uso de una fitasa y de un complejo multi enzimático en dietas de gallinas ponedoras comerciales. Efectos sobre indicadores de productividad, calidad interna y externa del huevo y sobre la digestibilidad de energía y proteína. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 184p.
- **VIVEROS, A.; BRENES, A.; ARIJA, I.; CENTENO, C.** 2002. Effects of microbial phytase supplementation on mineral utilization and serum enzyme activities in broilers chicks fed different levels of phosphorus. *Poultry Sci.* 81:1172-1183.
- **VOGTMANN, H.; PFIRTER, H.P.; PRABUCKI, A.L.** 1975. A new method of determining metabolizability of energy and digestibility of fatty acids in broiler diets. *Br. Poult. Sci.* 16: 531-534.
- **VOLFOVA, O.; DVORAKOVA, J.; HANZLIKOVA, A.; JANDERA, A.** 1994. Phytase from *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol.* 39: 481-484.
- **WALDROUP, P.W.** 1999. Nutritional approaches to reducing phosphorus excretion by poultry. *Poultry Science* 78: 683-691.
- **WARD, N.E.** 1995. With dietary modifications, wheat can be used for poultry. *Feedstuffs* 67: 14 -16.

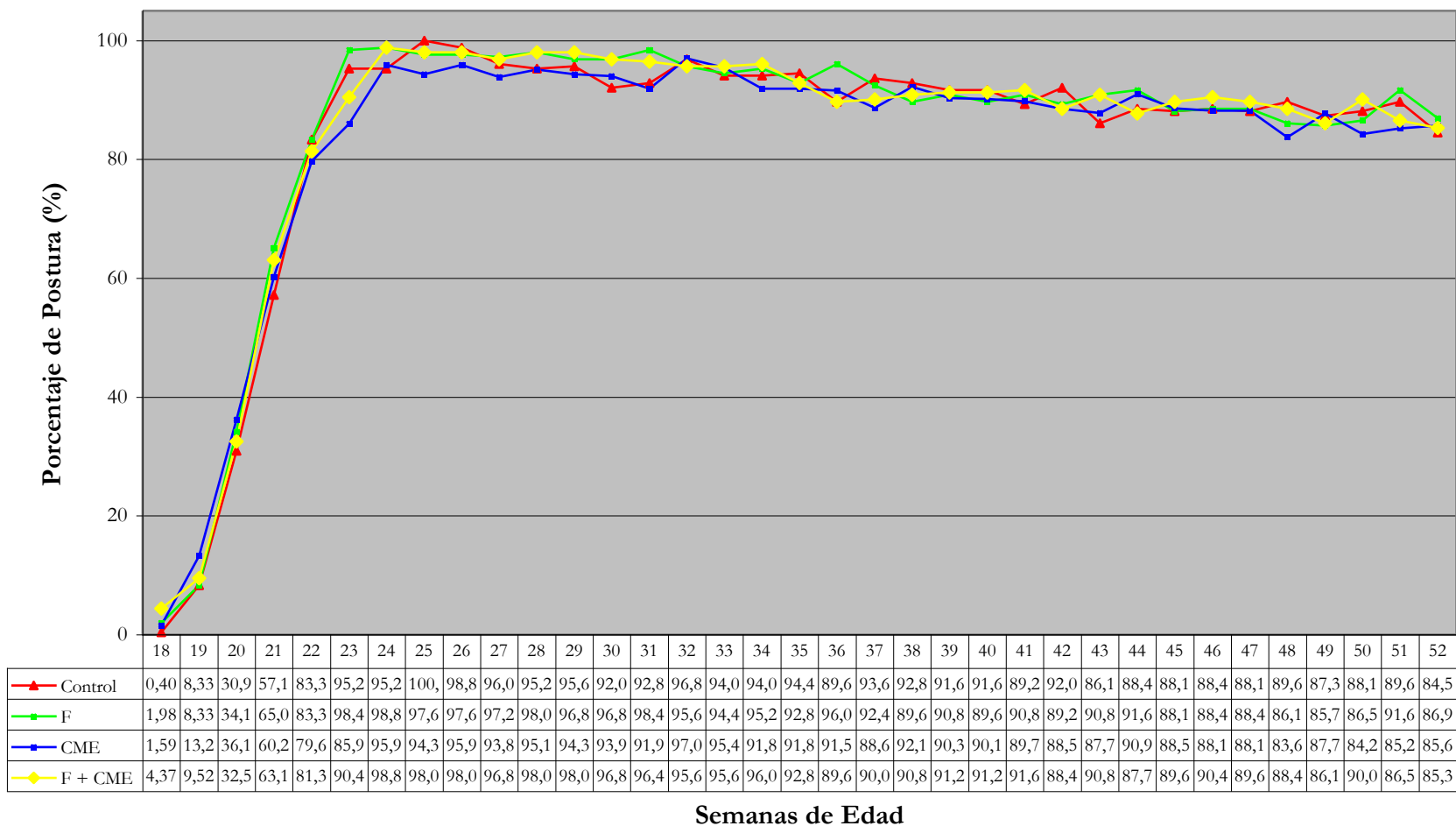
- **WICKER, D.L.** 1999. Phosphorus reduction techniques examined. *Feedstuffs* 71(32):12-14.
- **WIRYAWAN, K.G.** 1997. New vegetable protein for layers. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Queensland, Australia. Department of Animal Production. The University of Queensland. 128p.
- **WOLFORD, S.C.; SIMMINS, P.H.; VAN KEMPEN, T.** 2002. Xylanase improves the ileal energy and nitrogen digestibility of high wheat finisher diets in swine. *Extension Swine Husbandry Annual Swine Report 2002*. [en línea]
<<http://mark.asci.ncsu.edu/SwineReports/2002/wolford.htm>>
[consulta: 20-10-2003].
- **WYATT, C.L.; NEWCOMBE, M.** 1999. Enzyme utilization in corn soy diets for laying hens. **In:** Eastern Nutrition Conference. Niagara Falls, Ontario, Canada. May 1999.
- **ZANELLA, I.; SAJOMURA, N.K.; SILVERSIDES, F.G.; FIQUEIRDO, A.; PACK, M.** 1999. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. *Poultry Science* 78: 561-568.
- **ZHANG, Z.; MARQUARDT, R.R.; GUENTER, W.** 2000. Evaluating the efficacy of enzyme preparations and predicting the performance of leghorn chicks fed rye-based diets with a dietary viscosity assay. *Poultry Science* 79: 1158-1167.

ANEXO A

**GRÁFICOS DE COMPORTAMIENTO DE LOS INDICADORES
EVALUADOS DURANTE EL PERÍODO EXPERIMENTAL.**

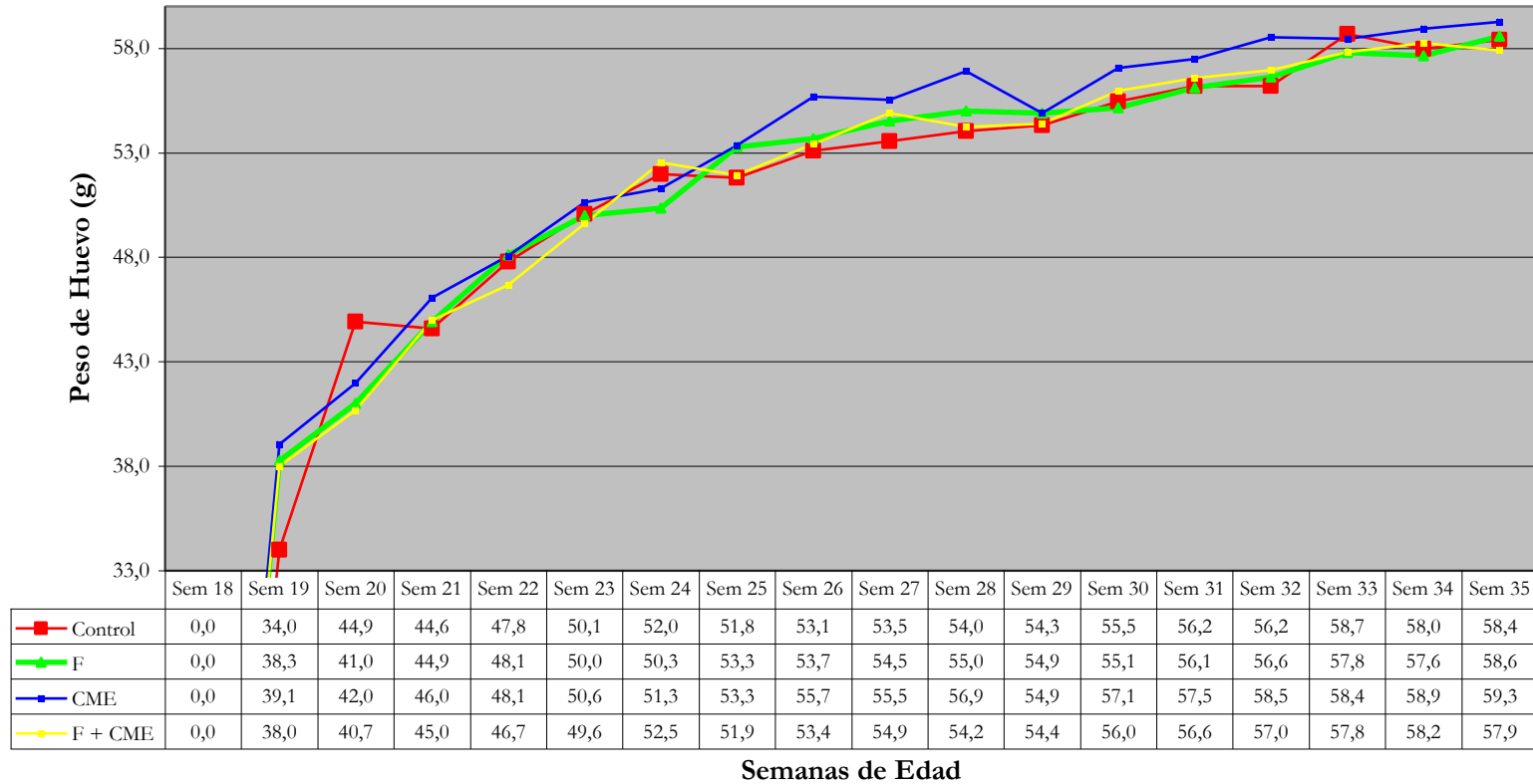
A.1. Resultados de porcentaje de postura gallina día desde las 18 a 52 semanas de edad.

Porcentaje de Postura Semana 18 a 52



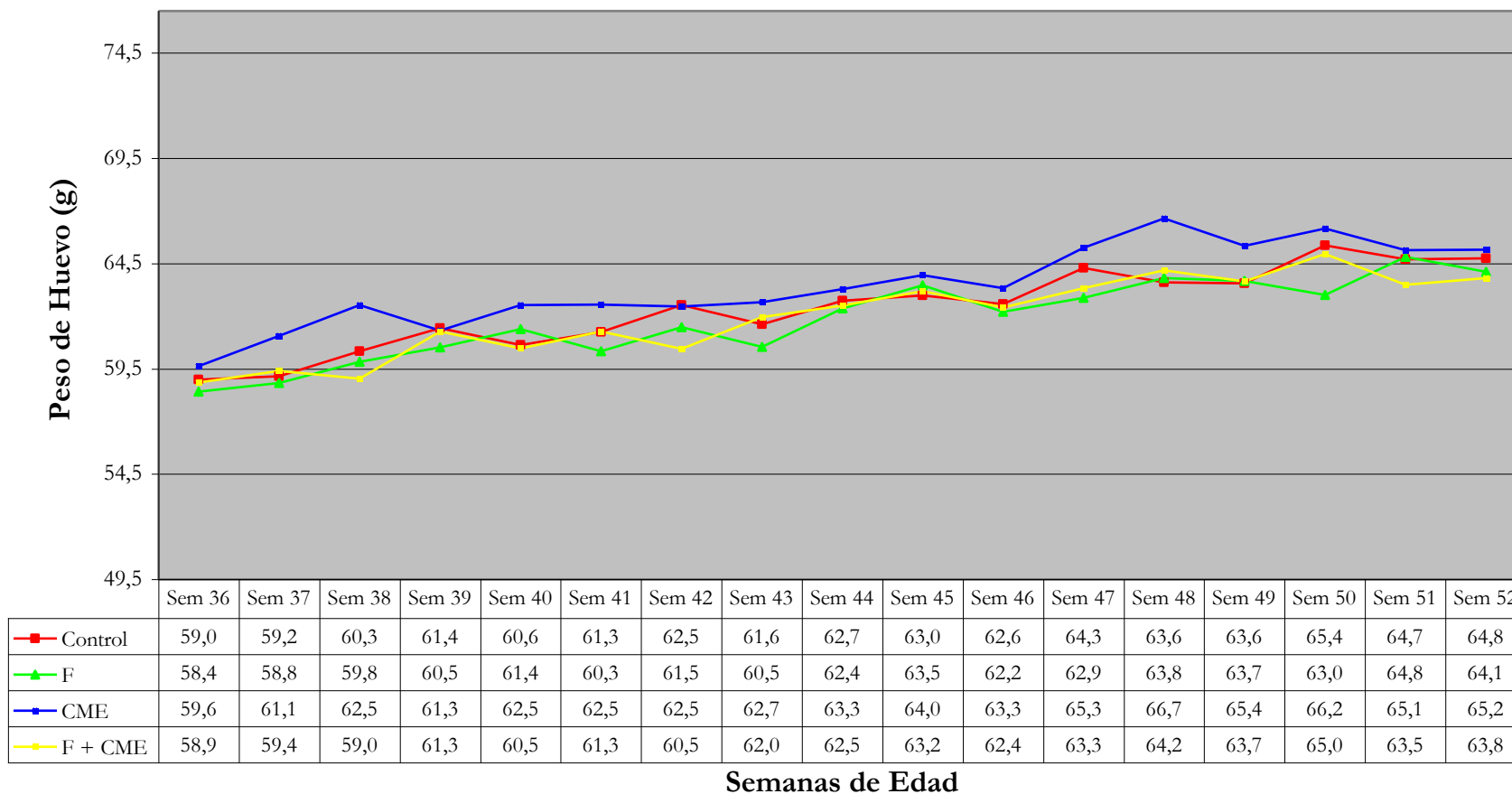
A.2. Comportamiento del peso de huevo desde las 18 a 35 semanas de edad.

Peso de Huevo Semana 18 a 35



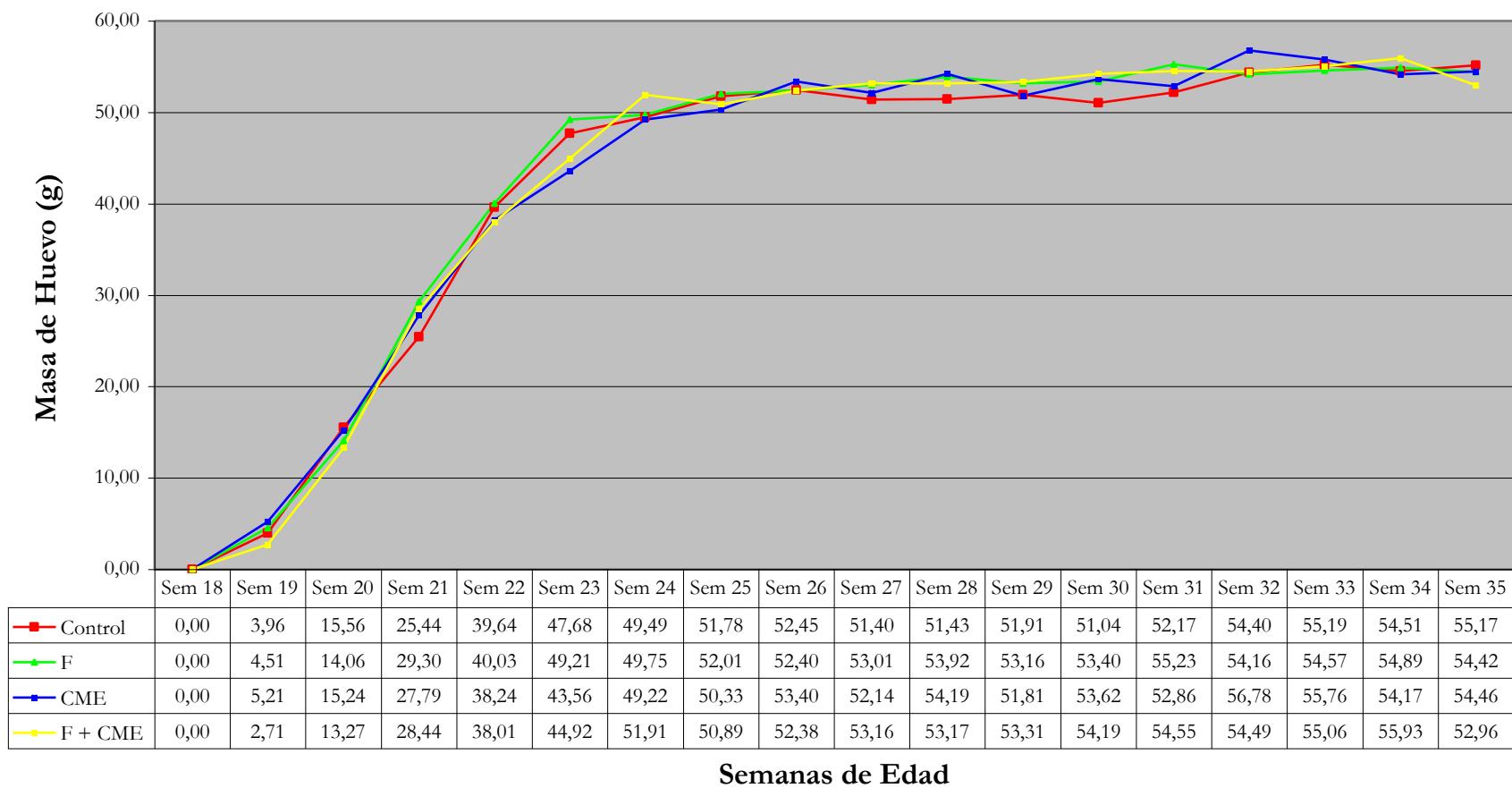
A.3. Comportamiento del peso de huevo desde las 36 a 52 semanas de edad.

Peso de Huevo Semana 36 a 52



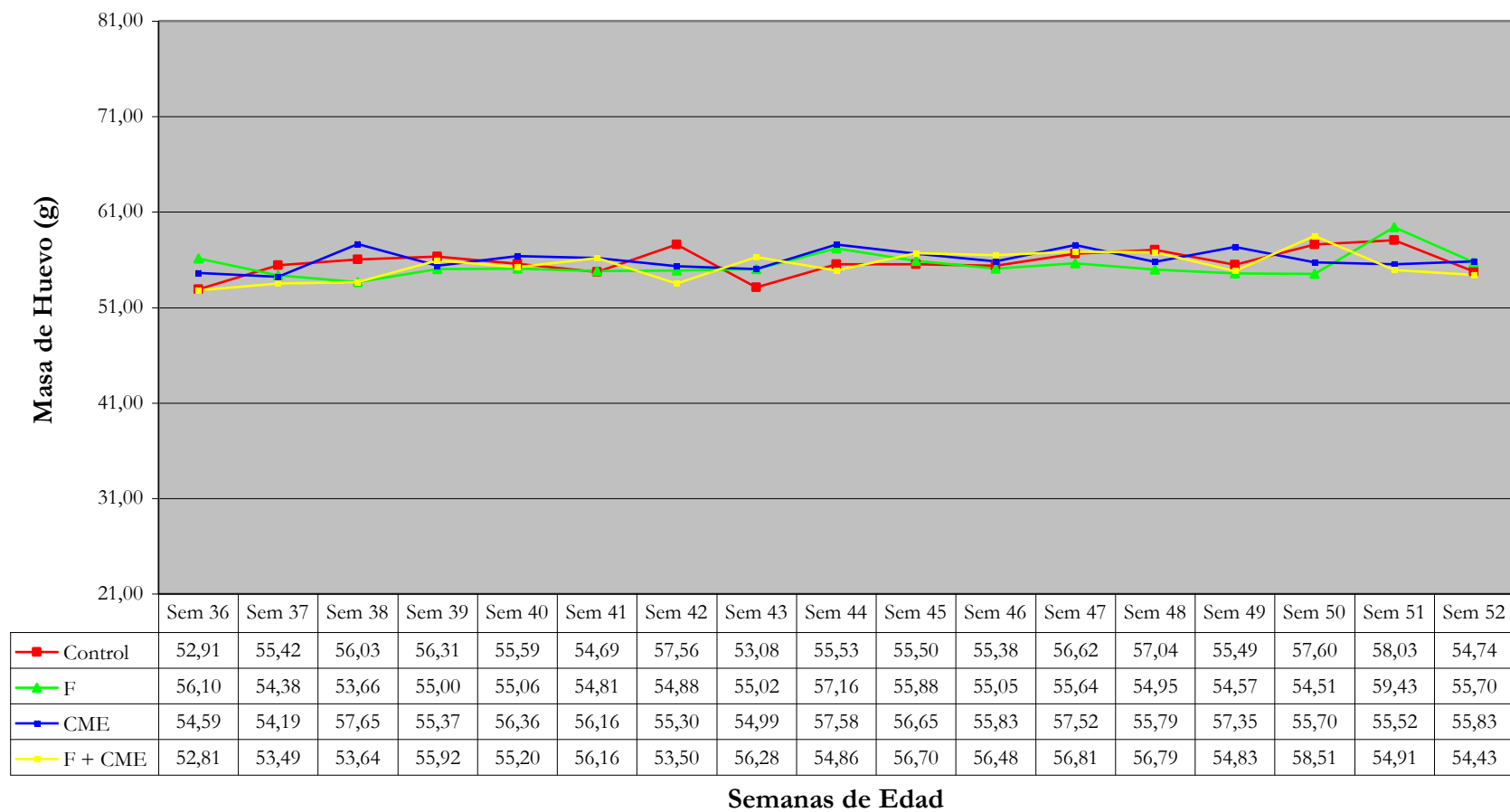
A.4. Resultados de masa de huevo desde las 18 a 35 semanas de edad.

Masa de Huevo Semana 18 a 35



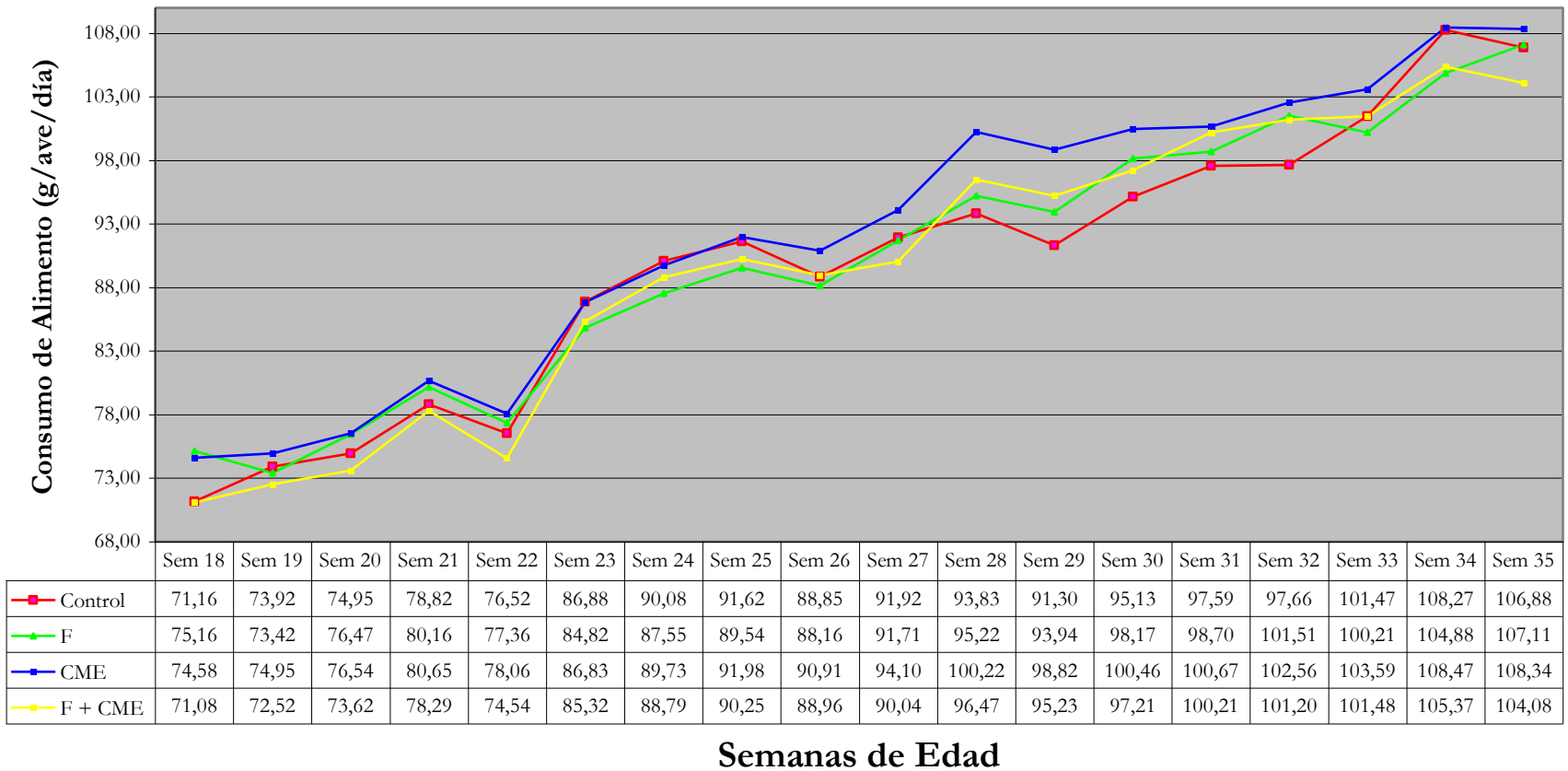
A.5. Resultados de masa de huevo desde las 36 a 52 semanas de edad.

Masa de Huevo Semana 36 a 52



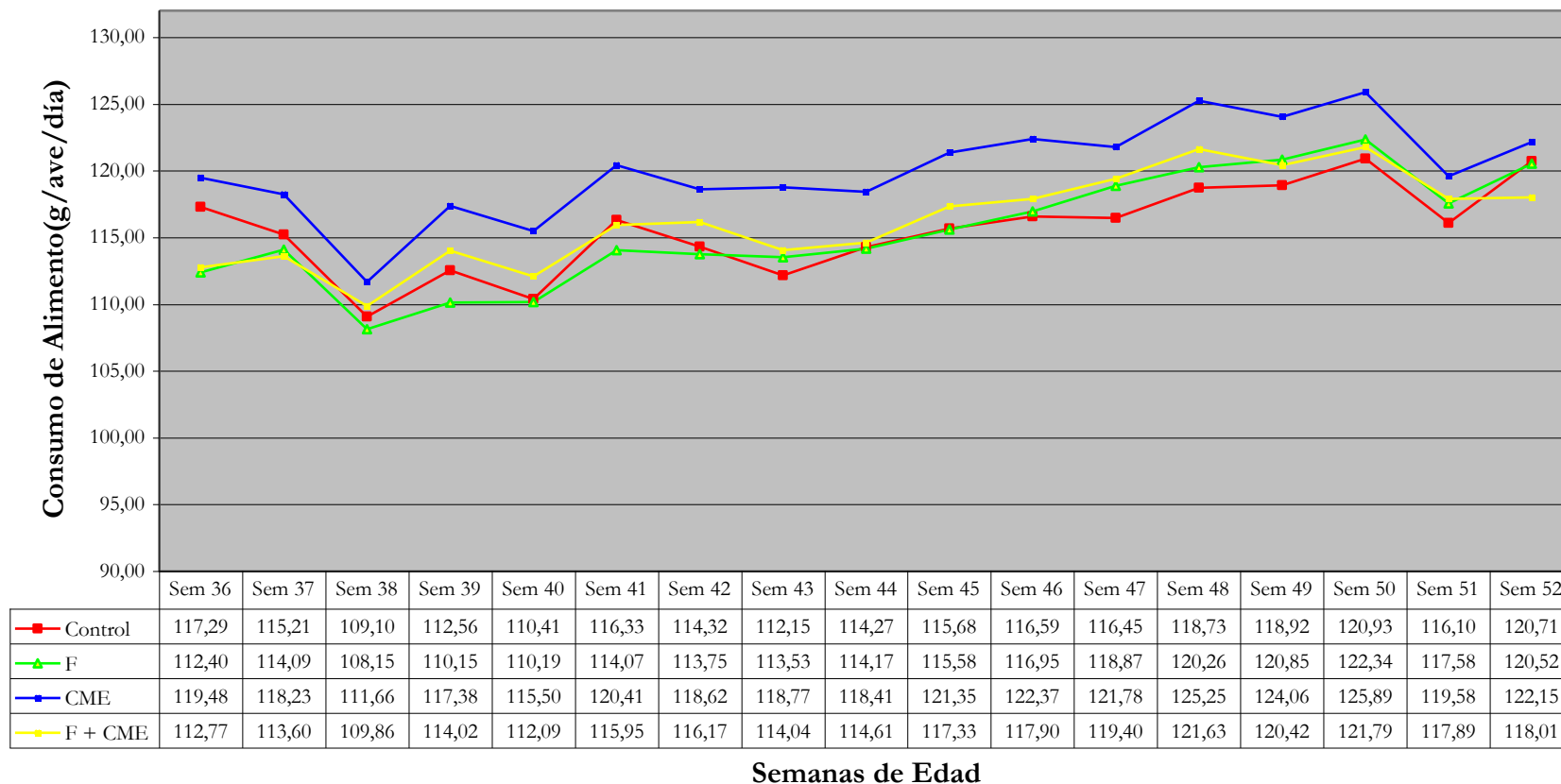
A.6. Comportamiento del consumo de alimento desde las 18 a 35 semanas de edad.

Consumo de Alimento Semana 18 a 35



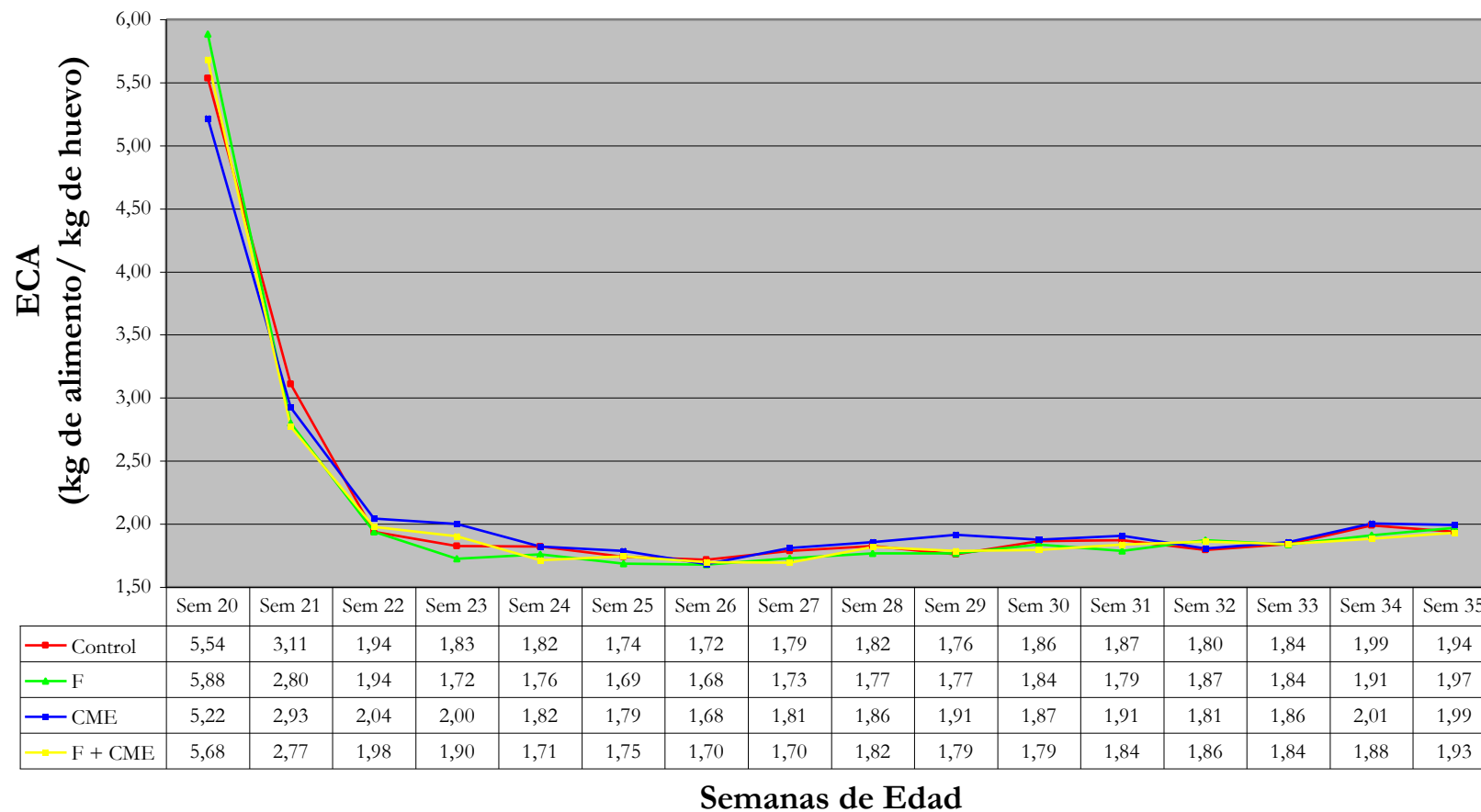
A.7. Comportamiento del consumo de alimento desde las 36 a 52 semanas de edad.

Consumo de Alimento Semana 36 a 52



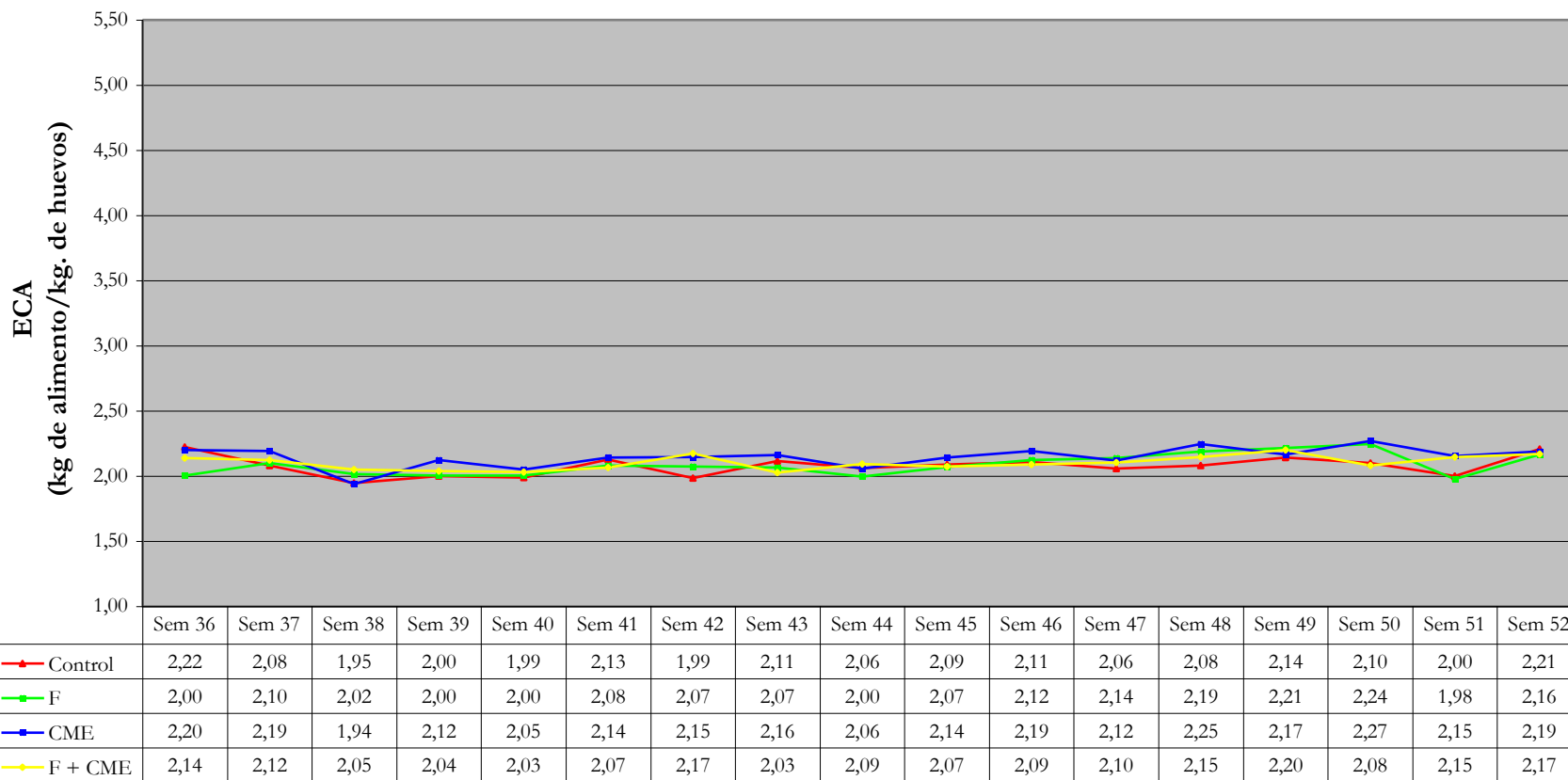
A.8. Resultados de la ECA desde las 20 a 35 semanas de edad.

Eficiencia de Conversión Alimenticia (ECA) Semana 20 a 35



A.9. Resultados de la ECA desde las 36 a 52 semanas de edad.

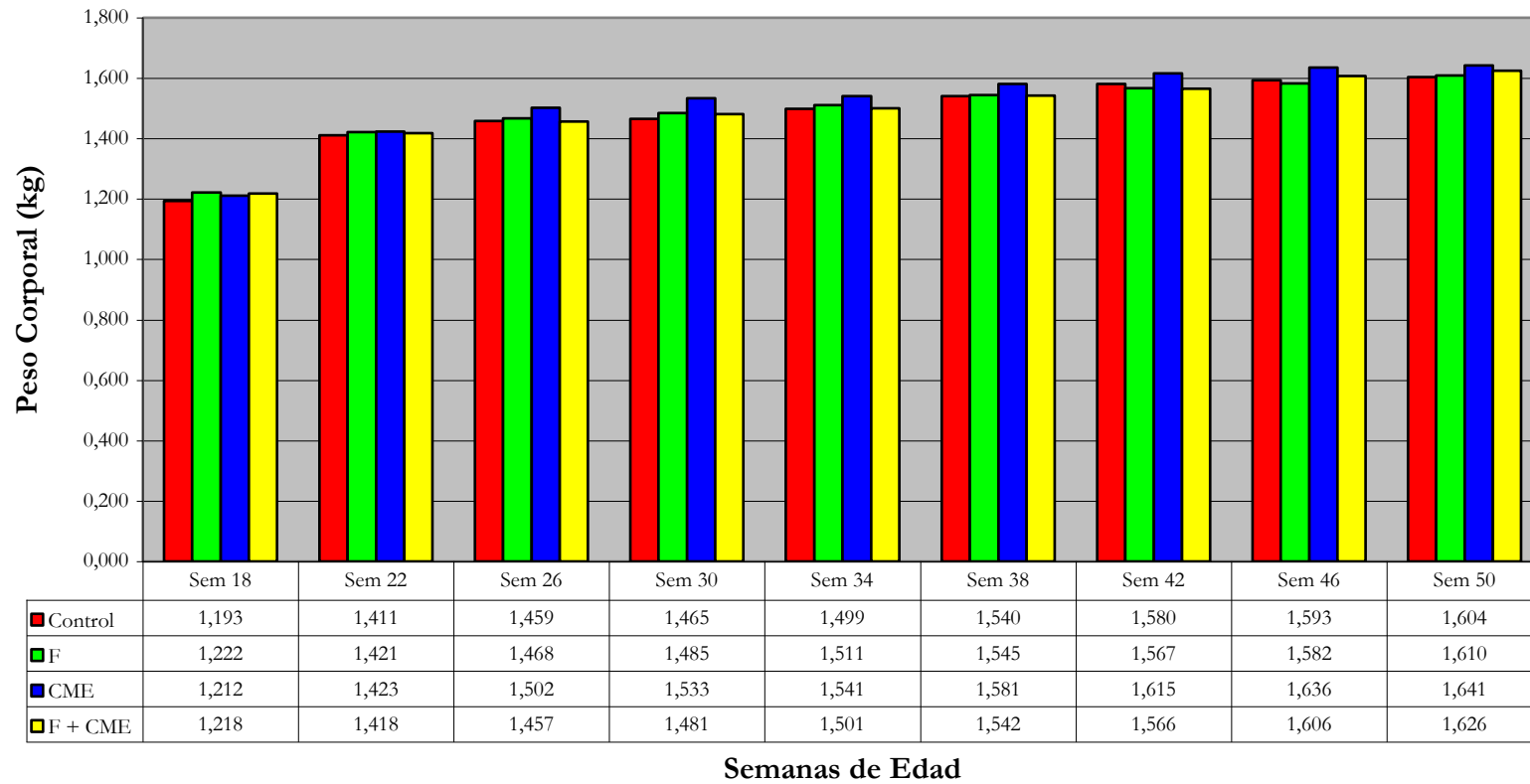
Eficiencia de Conversión Alimenticia (ECA) Semana 36 a 52



Semanas de Edad

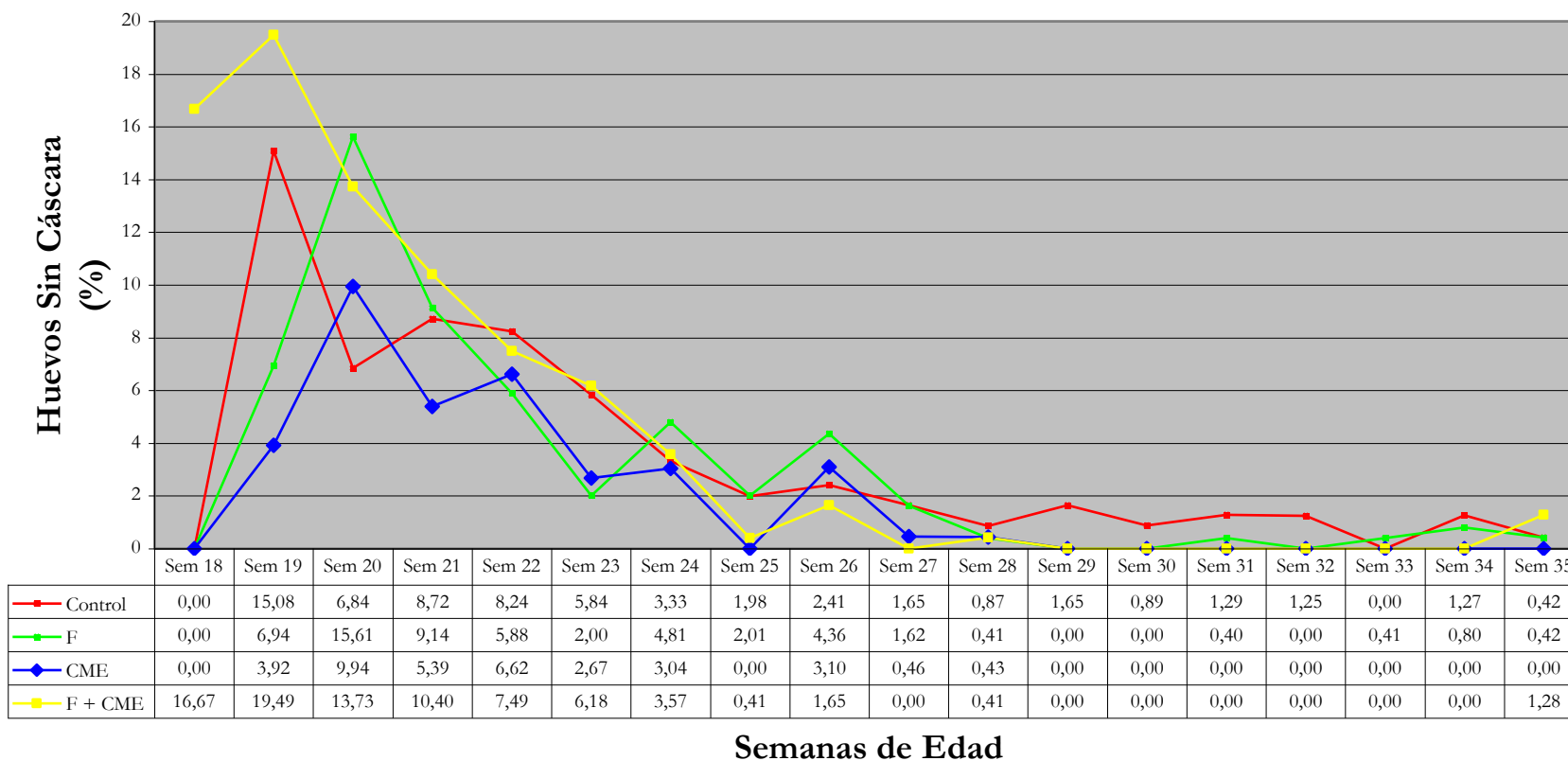
A.10. Resultados de peso corporal desde las 18 a 50 semanas de edad.

Peso Corporal Semana 18 a 50



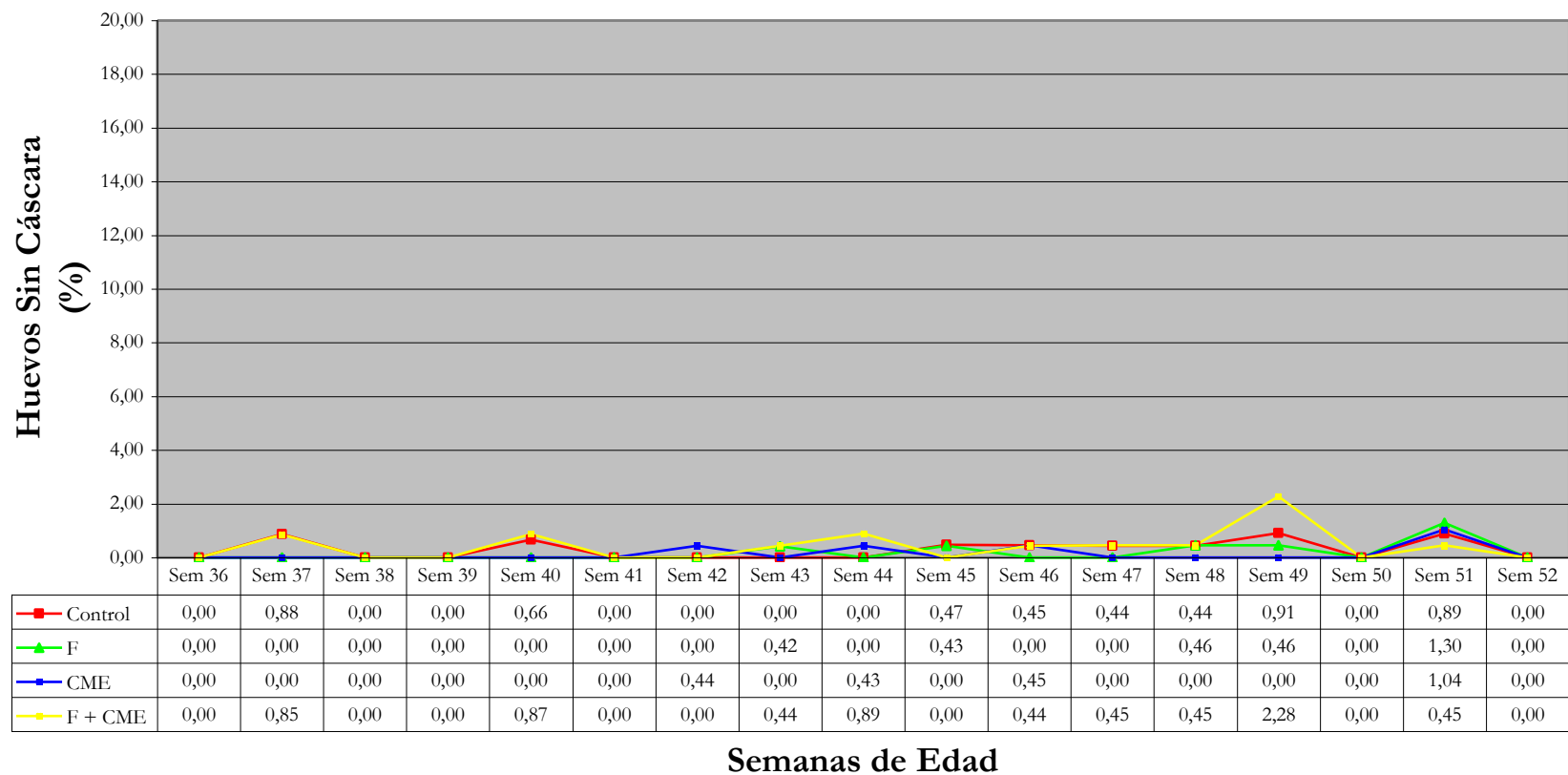
A.11. Comportamiento del porcentaje de huevos sin cáscara desde las 18 a 35 semanas de edad.

Porcentaje de Huevos Sin Cáscara Semana 18 a 35



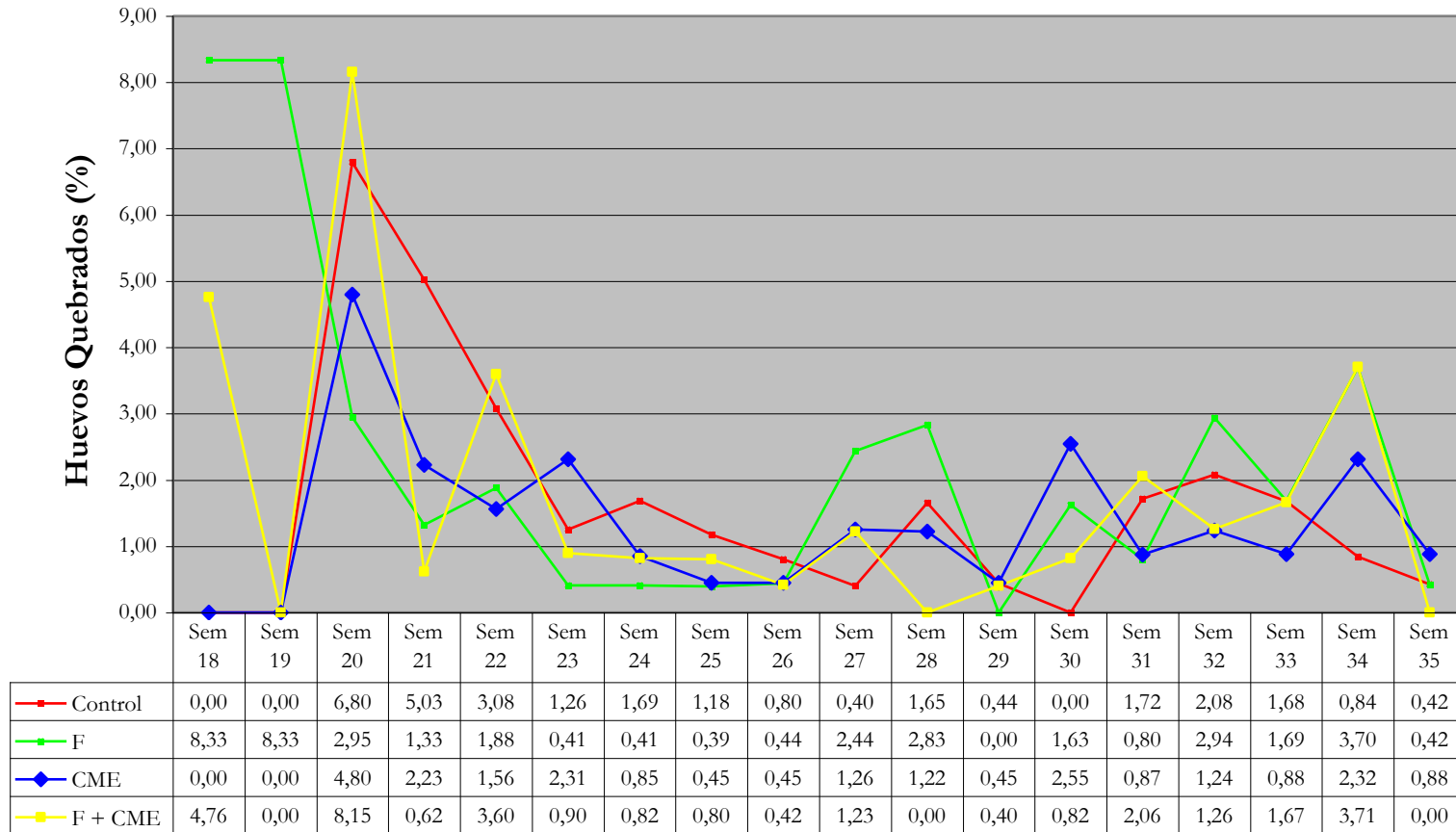
A.12. Comportamiento del porcentaje de huevos sin cáscara desde las 36 a 52 semanas de edad.

Porcentaje de Huevos Sin Cáscara Semana 36 a 52



A.13. Comportamiento del porcentaje de huevos quebrados desde las 18 a 35 semanas de edad.

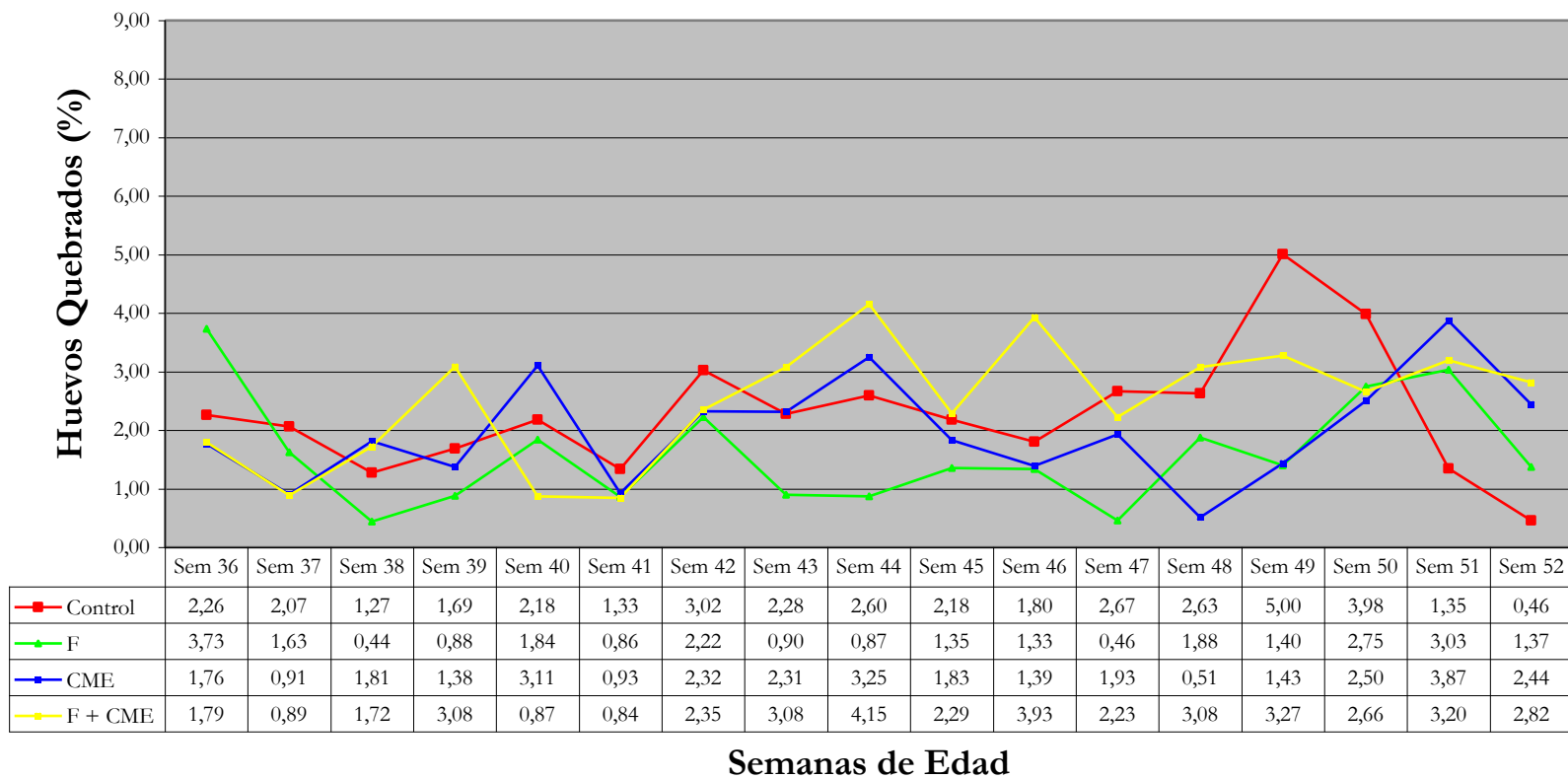
Porcentaje de Huevos Quebrados Semana 18 a 35



Semanas de Edad

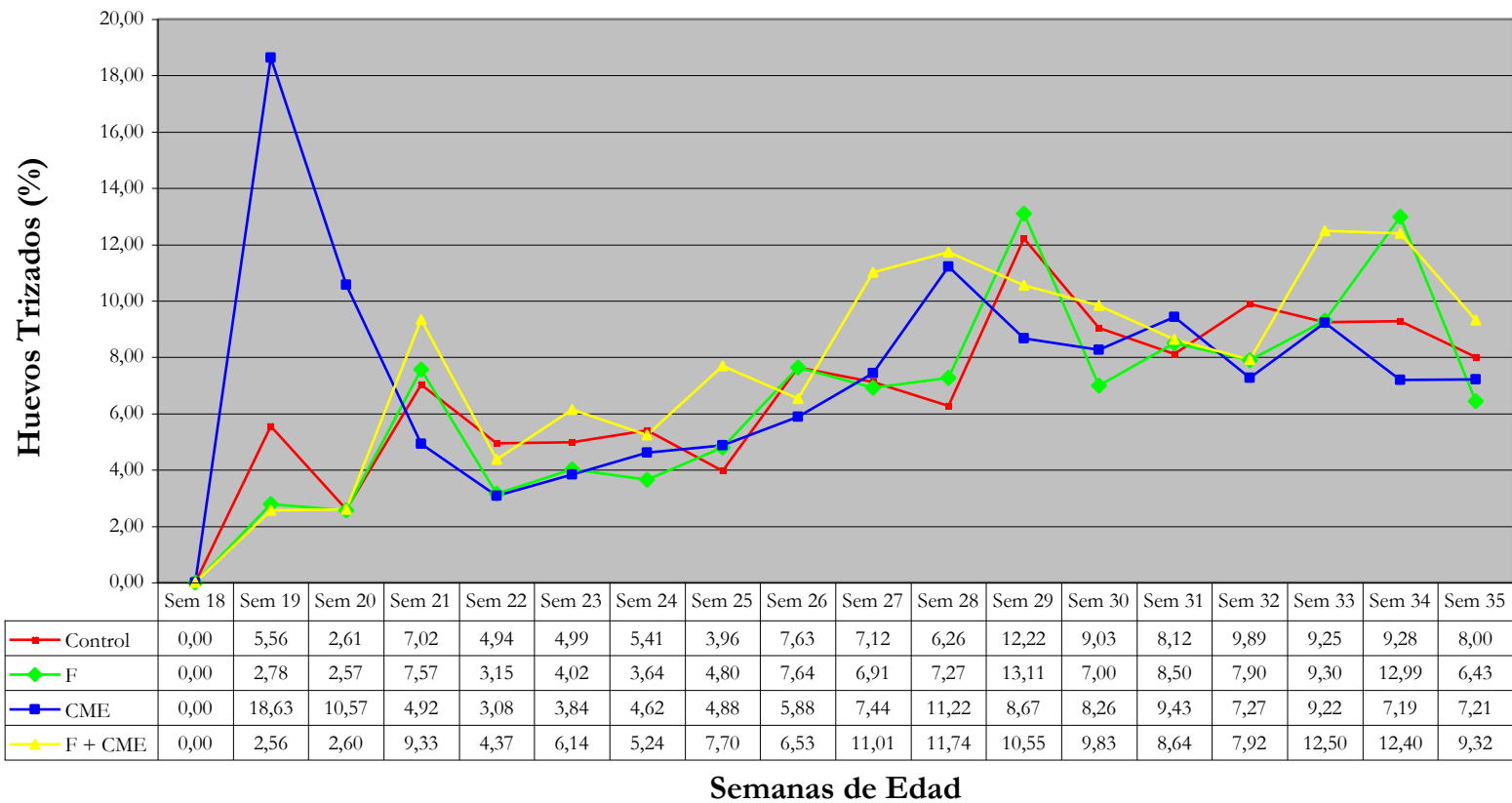
A.14. Comportamiento del porcentaje de huevos quebrados desde las 36 a 52 semanas de edad.

Porcentaje de Huevos Quebrados Semana 36 a 52



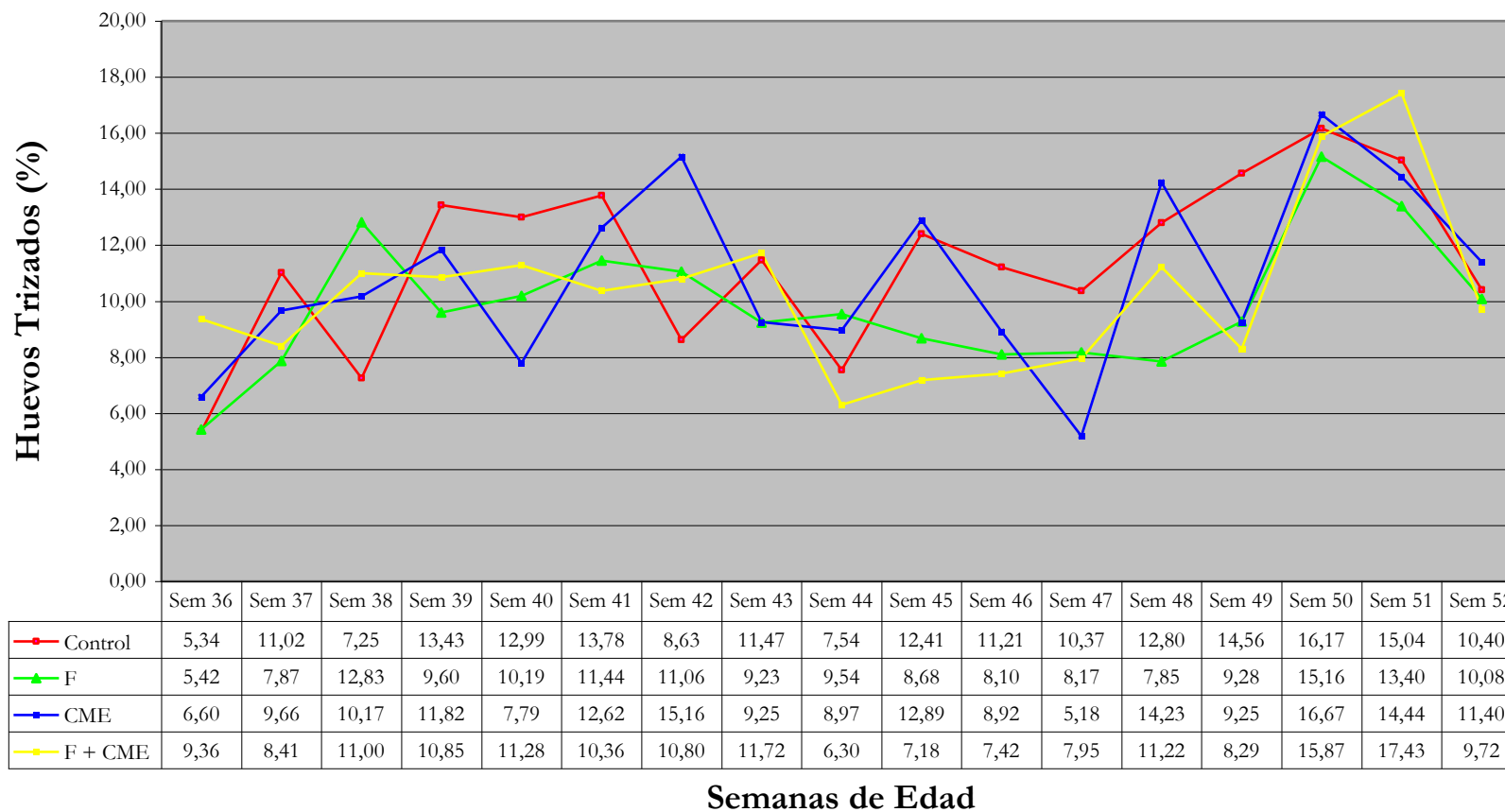
A.15. Comportamiento del porcentaje de huevos trizados desde las 18 a 35 semanas de edad.

Porcentaje de Huevos Trizados Semana 18 a 35



A.16. Comportamiento del porcentaje de huevos trizados desde las 36 a 52 semanas de edad.

Porcentaje de Huevos Trizados Semana 36 a 52



ANEXO B

TABLAS DE RESULTADOS ANALÍTICOS

B.1. Resultados obtenidos en el análisis químico proximal realizado a las dietas.

Consumo de Alimento	80 g				95 g				100 g			
	C	F	CME	F+CME	C	F	CME	F+CME	C	F	CME	F+CME
Proteína (%)	19,78	19,84	19,01	19,65	17,55	17,99	17,79	16,02	16,37	16,35	17,46	16,13
Humedad (%)	9,36	9,54	9,56	9,36	9,88	10,12	10,10	10,93	11,09	11,15	11,12	11,66
Grasa Total (%)	7,29	7,48	7,18	7,07	6,24	6,26	6,05	5,99	5,20	5,19	5,57	5,08
Cenizas (%)	11,88	11,45	11,79	10,13	10,24	12,32	10,45	8,36	8,98	8,26	9,05	8,22
Fibra Cruda (%)	3,27	3,26	2,80	3,07	3,45	3,24	3,43	3,00	3,80	3,65	3,62	3,51

B.2. Aporte de fósforo desde las distintas fuentes en las dietas.

Tratamiento	Fosfato (%)	Fitasa (%)	P disponible Dieta Basal (%)	P disponible (%)	P no disponible (%)	P total (%)
Sin fitasa	0,25	-	0,13	0,38	0,28	0,66
Con fitasa	0,14	0,11	0,13	0,38	0,17	0,66

B.3. Consumos promedios de energía y proteína obtenidos durante todo el período experimental.

Tratamiento	EMAn (kcal/ave/día)	Proteína (g/ave/día)
C	262.75	17.30
F	263.14	17.32
CME	271.47	17.87
F + CME	263.41	17.34

B.4. Descripción de las características típicas y análisis químico del marcador CELITE® HYFLO SUPERCEL^{1,2}

CARACTERISTICAS FISICAS TIPICAS	
Color	Blanco
Apariencia	Polvo
Origen	Diatomita Lacustre
Descripción	Diatomita Calcinada
Densidad	
Seca, g/cc(lb./cu.ft)	0.18(11.3)
Húmeda, g/cc(lb/cu.ft)	0.32(20.0)
Retenido en malla 150, %	4,4
pH	9,6
Humedad, %	< 1.0
Permeabilidad, Darcy	1,18
ANALISIS QUIMICO TIPICO, %	
SiO ₂	92,0
Al ₂ O ₃	1,9
Fe ₂ O ₃	1,5
CaO	0,7
Na ₂ O+K ₂ O	2,0
TiO ₂	0,2

¹Fuente: **Celite®-Chile S.A.**

²Las propiedades físicas y químicas del producto aquí señalado, representan los promedios típicos obtenidos de acuerdo a pruebas y métodos aceptados y están sujetos a variaciones normales de todo proceso industrial.

ANEXO C

**FOTOGRAFÍAS DE MANEJOS PRODUCTIVOS REALIZADOS EN LA
UNIDAD EXPERIMENTAL DE GALLINAS DE POSTURA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS DE LA
UNIVERSIDAD DE CHILE**

C.1. Unidad experimental de gallinas ponedoras en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.



C.2. Gallinas Leghorn Hy-Line W-36 utilizadas en el estudio.



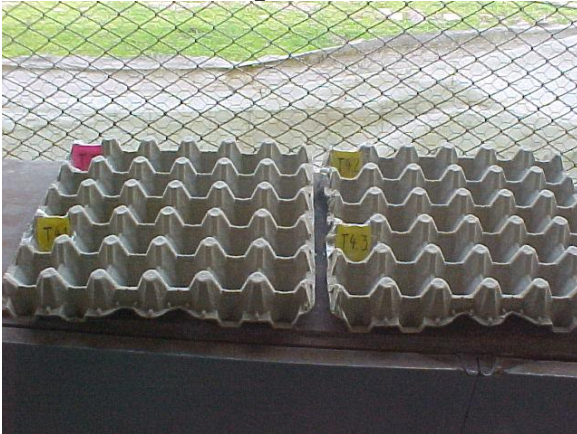
C.3. Control de la temperatura a través de la apertura y cierre de cortinas.



C.4. Reloj programado para el control de las horas luz.



C.5. Recolección de huevos en bandejas identificadas según tratamientos y repeticiones correspondientes. Clasificación mediante el uso de un ovoscopio.



C.6. Balanza con sensibilidad de 1g para el pesaje del huevo.



C.7. Fabricación de alimento utilizando una maquina mezcladora.



C.8. Tarros para cada tratamiento.



C.9. Tarros para cada repetición.



C.10. Manejos para determinar el consumo de alimento.



C.11. Manejos para determinar el pesaje corporal.



C.12. Clasificación de huevos trizados en bandeja y mediante transiluminación.



C.13. Clasificación de huevos quebrados en bandeja y mediante transiluminación.



C.14. Clasificación de huevos sin cáscara.



ANEXO D

**FOTOGRAFÍAS DE INSUMOS USADOS, PROCEDIMIENTOS
REALIZADOS Y EQUIPOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DE
DIGESTIBILIDAD ILEAL APARENTE.**

D.1. Marcador utilizado como ceniza ácido insoluble en las dietas destinadas para la evaluación de la digestibilidad ileal.



D.2. Aves en ayuno de 17 horas.



D.3. Retiro del alimento con el marcador después de 4 horas de consumo.



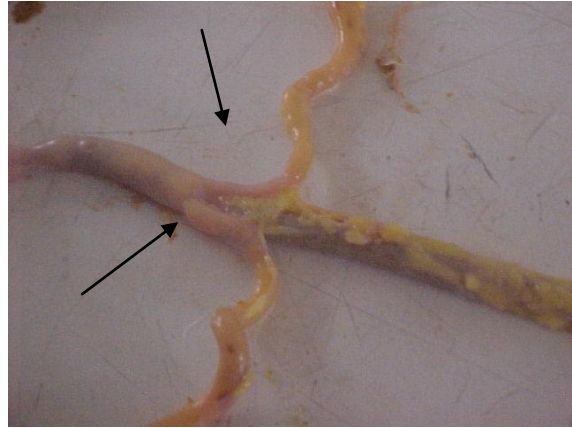
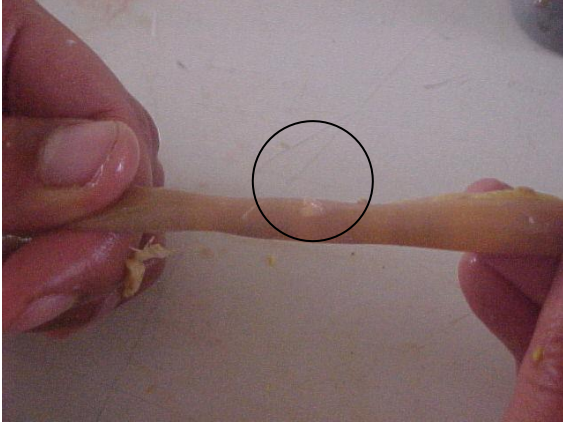
D.4. Sacrificio de aves a través de la dislocación cervical.



D.5. Acceso a cavidad abdominal y extracción completa del intestino.



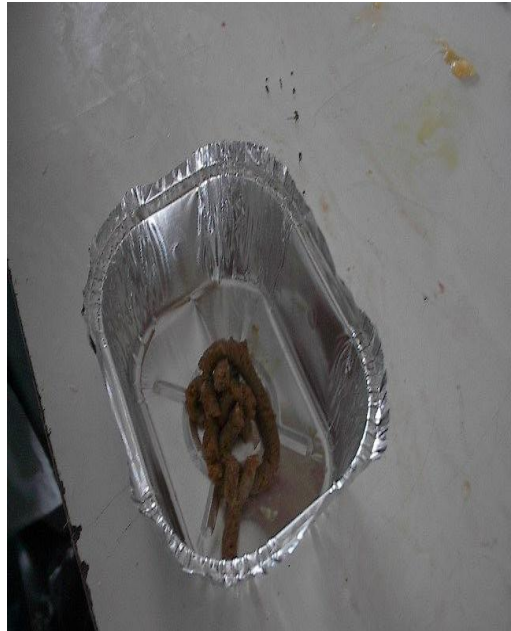
D.6. Localización del divertículo de Meckel y la unión ileocecal.



D.7. Ligadura y corte del ileon.



D.8. Extracción del contenido ileal mediante presión mecánica digital y almacenamiento en bandejas de aluminio para su posterior análisis.



D.9. Cooler para mantención de temperatura y traslado de muestras.



D.10. Máquina liofilizadora, proceso de liofilización y contenido ileal liofilizado.



D.11. Mufla utilizada para determinar el contenido de ceniza ácido insoluble en las muestras liofilizadas.



D.12. Espectrofotómetro utilizado para determinar el contenido de calcio y fósforo en las muestras liofilizadas.

