



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



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.

LUIS ALBERTO VERA KELLET

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

PROFESOR GUÍA: DR. SERGIO CORNEJO V.

SANTIAGO, CHILE

2004



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



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.

LUIS ALBERTO VERA KELLET

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

NOTA FINAL: _____

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA:	DR. SERGIO CORNEJO V.	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO:	DR. JAVIER GONZÁLEZ F.	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO:	DR. JOSÉ LUIS ARIAS B.	_____	_____

SANTIAGO, CHILE
2004

**A MIS PAPÁS.
LO QUE NO TE MATA, TE FORTALECE.**

AGRADECIMIENTOS.

Quisiera agradecer a mis padres **Luis Alberto Vera Muñoz, Ana María Kellet Oyarzún**, y a mis hermanos **Cristián, Rodrigo y Francisco** por su apoyo y por creer firmemente en mí, manteniendo una fe estricta pese a todos los contratiempos que se presentaron en este largo camino.

Al **Dr. Sergio Cornejo**, mi profesor guía, por la enorme confianza depositada en mí, por sus consejos en el desarrollo de esta memoria y su amistad, espero no haberlo defraudado.

Al **Dr. Javier González**, mi profesor consejero, por todo el trabajo realizado durante el proyecto, sus consejos y por confiar en mis capacidades.

A mi compañero de trabajo y amigo **Benjamín Díaz**, por su gran camaradería y trabajo en equipo, todo este trabajo no hubiera sido posible sin tu ayuda.

A mis compañeros de galpón **Susan Miranda y Carlos Larenas**, por su amistad y apoyo constante durante nuestra permanencia en la unidad experimental.

A **Rodrigo Gamba**, mi mejor amigo, compañero de colegio y universidad. Tu apoyo fue crucial durante el transcurso de la carrera y de esta memoria. A **María Cristina Terreros** por su apoyo en el desarrollo de esta memoria, facilitarme parte importante de la bibliografía y por su preocupación en los momentos difíciles. A **Katherine Tapia**, mi amiga, por todo el apoyo brindado.

A la **Dra. Valeria Rojas**, por instruirme en el uso del S.A.S. y por su aporte en la definición del modelo estadístico. A la **Dra. María Angélica Morales** y al **Dr. Nelson Barría**, por su buena disposición y aporte en la definición del modelo estadístico.

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

A todas las personas que he olvidado mencionar y aportaron su grano de arena.

En especial a las **159 “ñoñas”**, sin ellas este experimento no hubiese sido posible.

ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN.	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	3
VALOR NUTRITIVO DEL HUEVO.	3
CALIDAD DEL HUEVO.	4
Calidad de cáscara.	5
Calidad de albúmina.	7
Calidad de yema.	8
Calidad del huevo vista por el consumidor.	8
FORMACIÓN DE LA CÁSCARA.	9
FÓSFORO.	12
Fósforo, productividad y calidad del huevo.	13
Fósforo y el medioambiente.	16
INSUMOS VEGETALES EN LA INDUSTRIA AVÍCOLA.	20
Morfología de los granos.	20
Generalidades de granos y leguminosas.	22
Maíz.	24
Soya.	26
Trigo.	28
FACTORES ANTINUTRICIONALES EN ALGUNOS ALIMENTOS UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA AVÍCOLA.	29
Fósforo fítico y fósforo inorgánico.	30
Polisacáridos no amiláceos.	33
Efecto antinutricional de los PNA solubles.	36
Almidón como factor antinutricional.	39
FAN presentes en alimentos proteicos vegetales.	41
ENZIMAS.	42
Clasificación de las enzimas.	43
Origen de las enzimas.	43
Aplicaciones de las enzimas.	45
ENZIMAS EN ALIMENTACIÓN AVÍCOLA.	45
Clasificación de los sustratos.	46
FITASA.	48
Clasificación de las fitasas.	49
Fitasa utilizada en este estudio.	54
Fitasa y productividad.	54
Fitasa y calidad del huevo.	56
Fitasa y digestibilidad de nutrientes.	59
Fitasa y medio ambiente.	61
α-AMILASAS, PROTEASAS Y XILANASAS.	62
Descripción del complejo multi enzimático en estudio.	63
Variabilidad de los insumos utilizados en la alimentación de aves.	63
Áreas de acción del complejo multi enzimático.	65
Mecanismos de acción de α -amilasas, proteasas y xilanasas.	69
Aplicación del complejo multi enzimático en dietas de aves ponedoras.	71
Complejo multi enzimático y productividad.	72
Complejo multi enzimático y calidad de huevo.	75
Complejo multi enzimático y digestibilidad de nutrientes.	78
Complejo multi enzimático y medio ambiente.	81
Complejo multi enzimático y microflora intestinal.	82

OBJETIVOS.....	89
MATERIALES Y MÉTODOS.....	90
VARIABLES A CONTROLAR.....	95
Productivas generales.....	95
Calidad interna y externa del huevo.....	95
Digestibilidad ileal aparente de proteína y energía.....	97
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	98
RESULTADOS.....	100
Indicadores productivos.....	100
Calidad externa del huevo.....	101
Calidad interna del huevo.....	106
Digestibilidad ileal aparente de proteína y energía.....	110
DISCUSIÓN.....	112
Porcentaje de Postura.....	112
Peso de huevo.....	113
Huevos sin cáscara, trizados y quebrados.....	115
Calidad de la cáscara.....	116
Color de la yema.....	119
Peso y volumen de yema y albúmina, y sus razones.....	120
Unidades Haugh.....	121
Digestibilidad ileal de energía.....	121
Digestibilidad ileal de proteína.....	122
CONCLUSIONES.....	124
BIBLIOGRAFÍA DE TEXTO.....	125
ANEXO A. Fotografías de procedimientos realizados en la unidad experimental de gallinas de postura.....	153
ANEXO B. Fotografías de procedimientos realizados en CERPRAN.....	158
ANEXO C. Fotografías de procedimientos y equipos utilizados en el estudio de digestibilidad ileal aparente...	163
ANEXO D. Gráficos del comportamiento de los indicadores evaluados durante el estudio y tablas anexas.....	167

RESUMEN.

El presente estudio evaluó el efecto de la incorporación de una enzima fitasa y de un complejo multi enzimático compuesto por α -amilasas, proteasas y xilanasas, adicionadas en dietas de gallinas ponedoras comerciales sobre algunos parámetros productivos, indicadores de la calidad interna y externa del huevo y digestibilidad ileal aparente de proteína y energía.

Ciento cuarenta y cuatro gallinas Leghorn Hy-line W-36 fueron agrupadas en la unidad experimental de postura, constituyendo cuatro tratamientos con 36 gallinas cada uno, con tres repeticiones de 12 ponedoras por tratamiento. Se utilizó un diseño factorial de tratamientos de 2 x 2, en el cual las variables evaluadas fueron la incorporación o no de la enzima fitasa (60 gr. /ton.) y la inclusión o no del complejo multi enzimático (375 gr. /ton.) en dietas basadas en maíz, soya y afrechillo de trigo desde las 18 a las 52 semanas de edad. Al final del período experimental, se realizó un ensayo de digestibilidad ileal aparente de proteína y energía, utilizando el método del marcador (Celite®).

Los parámetros registrados fueron el porcentaje de postura, peso de huevo, porcentaje de huevos sin cáscara, trizados y quebrados, gravedad específica, grosor de cáscara, deformación y resistencia de la cáscara previa a la fractura, unidades Haugh, color de yema, peso y volumen de yema y albúmina y razones yema/albúmina expresadas como volumen y peso.

Ni la adición de fitasa ni la del complejo afectaron significativamente ($p > 0,05$) el porcentaje de huevos sin cáscara, huevos trizados, deformación de la cáscara y unidades Haugh. Se registró una interacción entre la incorporación de ambas enzimas para el peso de huevo, el porcentaje de huevos sin cáscara y huevos quebrados. La incorporación de la fitasa significativamente ($p < 0,05$) aumentó el porcentaje de postura y disminuyó el peso de huevo, grosor de

cáscara y resistencia a la fractura. La adición del complejo disminuyó significativamente ($p < 0,05$) el porcentaje de postura, porcentaje de huevos quebrados y las unidades Haugh, pero aumentó el peso de huevo, color de la yema, peso y volumen de yema y las razones yema/albúmina expresadas como peso y volumen significativamente ($p < 0,05$). Además, la incorporación del complejo multi enzimático aumentó la digestibilidad ileal aparente de energía y proteína significativamente ($p < 0,05$).

Palabras claves: Gallinas ponedoras blancas; maíz-soya-afrechillo de trigo; fitasa; α -amilasas; proteasas; xilanasas; parámetros productivos; calidad interna y externa del huevo; digestibilidad ileal aparente de energía y proteína.

SUMMARY.

The present study evaluated the effect of including a phytase and an enzyme complex containing α -amylase, protease and xylanase to a commercial layer diets on some production parameters, internal and external egg quality indicators and ileal apparent digestibility of protein and energy.

One hundred and forty four leghorn Hy-Line W-36 hens were caged in the laying hen experimental unit, establishing four treatments with 36 hens each, with 3 replicates of 12 hens per treatment. A 2x2 factorial design was used, being the two factors the dietary supplementation (yes and no) of phytase (60 grs./ton of feed) and the enzyme complex containing (375 grs./ton of feed) in corn-soy-wheat bran based diets from 18 to 52 weeks of age. At the end of the experimental period, an ileal apparent digestibility assay for energy and protein was carried out using the acid insoluble ash marker (Celite®).

The recorded parameters were egg production (%), egg weight, shell-less, cracked and broken eggs (%), specific gravity, shell thickness, shell strength and deformation before fracture, Haugh units, yolk color yolk and albumen weight and volume and yolk/ albumen ratio (weight and volume).

Neither phytase and the enzyme complex significantly affected ($p>0,05$) the percentage of shell-less and cracked eggs, eggshell deformation and Haugh units. An interaction was observed when both enzymatic additives were combined in egg weight, percent of shell-less and broken eggs. The use of phytase increased significantly ($p<0,05$) egg production and decreases egg weight, eggshell thickness and strength. The enzyme complex significantly decreases ($p<0,05$) egg production, percent of broken eggs and the Haugh units, but increases the egg weight, yolk color, yolk weight and volume and yolk/albumen ratio (weight and volume) significantly ($p<0,05$). Moreover, the use of the

enzyme complex increased the apparent ileal digestibility of energy and crude protein significantly ($p < 0,05$).

Key words: White laying hens; corn-soy-wheat bran; phytases, α -amylases, proteases, xylanases, production parameters, internal and external egg quality, ileal apparent digestibility of energy and crude protein.

.

INTRODUCCIÓN.

En la industria avícola los costos de alimentación son fundamentales para mantener la rentabilidad del sistema productivo. Las raciones son formuladas a mínimo costo, por lo que la relación entre aporte nutricional y precio es de vital importancia al momento de elegir insumos para formular dietas.

Las enzimas exógenas son utilizadas en diversos campos. Su empleo como aditivos en alimentación de aves ha abierto una nueva manera de abordar la formulación de dietas en los últimos años.

En gallinas de postura, la calidad del huevo medida a través de indicadores de normalidad de cáscara y del contenido químico y nutricional del producto, son determinantes en el éxito de la industria.

Estos conceptos surgen del mercado industrial y del sector consumidor. En este contexto, enzimas como fitasas, xilanasas, proteasas, α -amilasas, β -glucanasas, entre otras, son utilizadas para optimizar los indicadores de calidad interna y externa del huevo, para suplementar la acción de enzimas endógenas del ave y remover factores anti nutricionales presentes en algunos insumos. Además, permiten mejorar el valor nutricional de los ingredientes utilizados en las dietas al liberar nutrientes y potenciar los valores energéticos y nutritivos de insumos considerados de menor calidad. También las enzimas contribuyen a reducir la excreción de algunos nutrientes, disminuyendo así el impacto sobre el medio ambiente y a mantener los niveles de producción intensiva en niveles rentables.

Las enzimas han cambiado la manera de seleccionar los alimentos a utilizar en la formulación de dietas. Gracias a ellas, insumos de origen vegetal de menor valor nutricional para las aves como la cebada, lupino y centeno entre otros, pueden aumentar sus niveles de incorporación en alimentación de aves. Además, el uso de enzimas puede aliviar el problema de contaminación medioambiental asociado a la producción animal y puede ayudar a controlar algunas

enfermedades, por lo que su importancia y futuro papel en el desarrollo de la producción animal del siglo 21 son incuestionables.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

VALOR NUTRITIVO DEL HUEVO.

La recomendación de una alimentación saludable entre la población, es uno de los principales objetivos de salud pública para combatir la presencia de enfermedades crónicas en nuestro país.

La imagen negativa que tradicionalmente ha acompañado a diversos alimentos, entre ellos el huevo, ha ido cambiando al aparecer nuevas evidencias que confirman a este producto como un alimento con altos estándares nutricionales.

El huevo aporta cerca de 75 calorías, lo que corresponde a menos del 4% de la ingesta diaria para una persona que consume un total de 2000 calorías al día.

Un huevo promedio entrega 6,25 gramos de proteína, encontrándose la mitad de esta en la albúmina. La albúmina es considerada una proteína ideal (vale decir aquella proteína con la cual se compara el resto de las proteínas) debido a que posee todos los aminoácidos esenciales en las proporciones adecuadas para la nutrición humana (Meister, 2002).

Del total de la grasa del huevo (5 gramos), sólo 1,5 gramos corresponden a grasas saturadas (Meister, 2002).

El huevo constituye una excelente fuente de vitaminas. Aporta vitamina A (317 U.I.), vitamina D (24 U.I.), vitamina E (0,7 mg), vitamina B6 (0,07 mg.) vitamina B12 (0,5 mcg.), riovoflavina (0,254mg.), ácido fólico (23 mcg.), tiamina (0,031 mg) y colina (280 mg). Cabe destacar que el aporte de vitamina D es importante debido a que el huevo es uno de los pocos alimentos que aportan este elemento (Meister, 2002). El único nutriente que no aporta el huevo es la vitamina C. En cuanto al aporte de minerales, es una fuente significativa de hierro (0,72 mg.), fósforo (89 mg.) y zinc (0,5 mg.).

Basándose en la densidad calórica, el huevo es una fuente concentrada de vitaminas y minerales esenciales para una buena nutrición. Los alimentos calóricamente densos, son aquellos que proveen un mayor porcentaje de los requerimientos diarios de nutrientes de uso humano, que las necesidades diarias de calorías (McNamara, 1999). Dos huevos grandes entregan 155 calorías o bien aproximadamente el 6% de la necesidad energética de un hombre adulto. Aportan el 21 % de los requerimientos diarios de proteína, 30% de la riboflavina, 62% de la vitamina K, 12% de la vitamina D, 16% de la vitamina B-12, 12% del ácido fólico, 12% de la vitamina A , así como 34% de las necesidades de selenio, 8% de los requerimientos de hierro y 8 % de los de zinc (McNamara, 1999).

CALIDAD DEL HUEVO.

La Real Academia Española (2001) define calidad como propiedad o conjunto de propiedades inherentes a algo, que permite juzgar su valor. El huevo, cuya función biológica es servir de cámara embrionaria, ha sido utilizado desde siempre como fuente alimenticia, y es precisamente esta función la que demanda el cumplimiento de ciertos estándares de calidad.

El consumidor es cada vez más exigente al demandar productos de buena calidad y la industria avícola no queda ajena a estas peticiones. La calidad del huevo se enmarca dentro de indicadores considerados importantes por el consumidor, como por ejemplo la frescura, calidad de cáscara, albúmina y color de yema (Overfield, 1995).

Los defectos en la calidad del huevo de consumo son uno de los mayores problemas en la industria avícola. Cerca del 10% de los huevos producidos no cumplen con los estándares de calidad, por lo que no llegan al consumidor. (Overfield, 1995). Defectos como trizaduras, quebraduras, suciedades en cáscara, manchas de sangre y carne, decoloración de cáscara, entre otros, causan una gran

pérdida a la industria, y si el huevo de inferior calidad llega al consumidor, se genera una pérdida de confianza en el producto.

Calidad de cáscara.

El proceso de formación de la cáscara toma más del 80% del tiempo que demora la formación total del huevo y por lo tanto abarca un período altamente susceptible de recibir diversas influencias que alteran su calidad (Arias, 1998). Las principales consecuencias de los defectos de la cáscara van desde la franca rotura de ella y consecuente pérdida o contaminación del contenido hasta el debilitamiento casi imperceptible de la resistencia mecánica de esta la que la hace frágil al menor impacto o penetrable por bacterias patógenas (Arias, 1998).

La calidad de cáscara ha sido estudiada por décadas mediante diversas metodologías. Para el productor y el consumidor, interesa que la cáscara sea gruesa, resistente, carente de trizaduras e impurezas y que tenga un color homogéneo.

Los métodos tradicionales para medir la calidad de la cáscara son las metodologías directas e indirectas. Entre las mediciones directas tenemos la aplicación de presión directa hasta el quiebre, ruptura y punción del huevo, presión parcial (deformación) de la cáscara, o simplemente lanzar pesos a los huevos. Entre las mediciones indirectas tenemos la estimación de la cantidad o densidad de la cáscara, que incluyen el grosor de cáscara, densidad de cáscara, porcentaje de cáscara y la gravedad específica (Overfield, 1995).

Hoy se encuentran disponibles equipos computacionales capaces de medir la calidad de cáscara. Estos equipos aplican un peso al huevo y miden la dimensión de la deformación de la cáscara y la resistencia a la fractura. Estas mediciones se aplican a nivel de laboratorio y no son aún utilizados rutinariamente por el sector productivo.

Una técnica utilizada para estimar los defectos no evidentes en la cáscara es la transiluminación o encandilamiento (candling). Esta prueba consiste en transiluminar un huevo con una fuente de luz artificial. Con este método pueden apreciarse fracturas filiformes o estrelladas y parches de translucidez. Las fracturas filiformes se encuentran a lo largo y a lo ancho de la cáscara y corresponden a largas zonas de hileras paralelas de mamilas tardíamente fusionadas que aunque no alcanzan la superficie de la cáscara, constituyen zonas de alta fragilidad a los impactos (Arias, 1998).

Existe otra prueba, la gravedad específica, que mide en forma indirecta el grosor de cáscara. Dado que la gravedad específica (G.E.) de un huevo se relaciona con el porcentaje de cáscara, el aumento de aquella se correlaciona bastante con un incremento en el espesor y resistencia de la cáscara (Arias, 1998). La incidencia de fracturas en los huevos aumenta a medida que disminuye la G.E. por debajo de 1,087 (Arias, 1998).

La G.E. se puede medir utilizando dos métodos: la flotación en soluciones de creciente salinidad o por el principio de Arquímedes. El primer método consiste en sumergir el huevo en agua con distintas concentraciones de sal común, correspondiendo la G.E. del huevo a la solución salina en la que el huevo flota por primera vez (Arias, 1998). Entre mayor sea la proporción de cáscara en el huevo, mayor cantidad de sal se debe disolver en el agua para que flote (Zumbado, 1983). En la determinación de la G.E. por el método de Arquímedes, el huevo se pesa primero en el aire y luego se pesa sumergido en agua a temperatura ambiente. La diferencia de estos dos pesos corresponde al peso de agua desplazada por el volumen del huevo. La fórmula del cálculo es: $G.E. = \frac{\text{Peso huevo en aire}}{[\text{Peso huevo en aire}] - [\text{Peso huevo en agua}]}$. La G.E. se encuentra afectada a numerosos errores sistemáticos. La G.E. es dependiente de la temperatura del agua, por lo que debe ser mantenida constante durante y entre

las mediciones. Además, debido a la evaporación del agua, se debe ajustar regularmente la salinidad de las soluciones. Además, la G.E. se ve afectada por la temperatura de almacenaje y el tamaño de la cámara de aire, por lo que los huevos deben ser medidos a un mismo tiempo de ser ovipuestos o cuando el tamaño de la cámara de aire se haya estabilizado. Esta prueba tiene la ventaja de ser rápida, simple, económica, no es necesario romper el huevo y es aplicable a cualquier plantel avícola, sin importar su tamaño.

Calidad de albúmina.

La calidad de albúmina posee una gran influencia en la calidad del huevo. La albúmina en un huevo intacto controla la posición de la yema (Overfield, 1995). El deterioro de la albúmina se manifiesta por la licuefacción de la albúmina densa lo que trae como consecuencia la pérdida de la estructura interna y de la organización espacial de las capas de albúmina y yema (Arias, 1998). Este proceso comienza desde que el huevo es puesto, debido a las modificaciones físicas y químicas de las proteínas constituyentes de la albúmina. La liberación de anhídrido carbónico desde el interior del huevo produce un aumento del pH, lo que produce cambios fisicoquímicos en las proteínas de la albúmina, desligándose el agua asociada a estas (Arias, 1998). Debido a este proceso, el vapor de agua se escapa a través de la cáscara, resultando en una pérdida de peso del huevo, contracción de su contenido y aumento del tamaño de la cámara de aire.

En un huevo fresco, al quebrarse en una superficie plana, se puede observar a la yema sobresaliendo en una posición central, rodeada de una capa de albúmina gruesa con líquido, seguido por una capa externa más delgada. Al quebrarse un huevo añejo, la yema se observa flácida, desplazada hacia un extremo, y la albúmina gruesa que la rodeaba se encuentra colapsada y aplanada, formando una amplia capa acuosa.

El método más utilizado para evaluar la calidad de la albúmina es la “unidad Haugh”, que se basa en las propiedades mecánicas de la albúmina. Involucra el peso del huevo, la altura de la albúmina densa alrededor de la yema, medida por un micrómetro trípode (Overfield, 1995). El rango va desde 0 a 100, siendo el nivel de resistencia del consumidor 60 (Arias, 1998). Mientras más fresco es el huevo, mayor es la unidad Haugh.

La mayoría de los componentes de calidad del huevo, a excepción del color de la yema, se deterioran y se hacen más variable con la edad de las aves. La calidad de albúmina promedio disminuye y la variabilidad aumenta con la edad (Overfield, 1995).

Calidad de yema.

El color de la yema es uno de los aspectos de calidad más mencionados por los consumidores y las preferencias difieren entre países. En Chile, el principal defecto de la yema se relaciona desde el punto de vista estético, a la presencia de manchas de carne, sangre y la coloración.

Para evaluar la calidad de la yema, se han utilizado técnicas subjetivas que se basan en la comparación del color con soluciones coloreadas estándares, discos, anillos y escalas (Overfield, 1995). Estos métodos dependen de la percepción del operador y, por lo tanto, poseen cierto grado de error potencial, sobre todo si existen más de un operador (Overfield, 1995). Este error se ha corregido al utilizar equipos de colorimetría reflectiva, que estima de manera más consistente el color de la yema.

Calidad del huevo vista por el consumidor.

Los requerimientos del consumidor se basan en una serie de atributos, sobre todo los del contenido comestible del huevo. En este sentido, la industria debe estar atenta a lo que demanda el consumidor, canalizando sus esfuerzos para garantizar la máxima calidad del producto.

En un estudio realizado por la Asociación Española de Productores de Huevos (ASEPRHU) el año 2001, el consumidor español evaluó como primer aspecto la frescura y seguridad del producto, seguido de su valor nutritivo, alimentación de las gallinas, características sensoriales, forma de crianza de las gallinas, comodidad del uso, origen, información del empaquetado, impacto medioambiental de la producción, el precio y la marca, respectivamente.

En Chile no existen estudios que determinen los indicadores considerados importantes por los consumidores. El consumidor chileno se basa en parámetros como el peso del huevo, tamaño del huevo y el color de la cáscara al momento de elegir, prefiriendo un huevo grande y de cáscara de color. Estos parámetros son subjetivos y denotan la poca madurez del mercado local en comparación con otros mercados más exigentes y más informados.

FORMACIÓN DE LA CÁSCARA.

La cáscara es un compartimiento micro ambiental que sirve para alojar embriones en desarrollo en numerosas especies. No solamente otorga protección física al embrión, sino que además regula el intercambio de gases, iones y agua, constituyendo además una fuente de calcio para la formación del esqueleto del embrión (Arias *et al.*, 1993).

La cáscara es una estructura altamente ordenada, compuesta por múltiples capas de membranas y una matriz calcificada. Las capas son: membranas de la cáscara, capa mamilar, capa en empalizada y cutícula (Arias *et al.*, 1993).

Membranas de la cáscara.

Las membranas son la capa más interna de la cáscara y están formadas por dos subcapas fibrilares no mineralizadas: la membrana externa (de aproximadamente 48 μm de espesor) y la interna (de aproximadamente 22 μm de espesor) (Arias *et al.*, 1993). Ambas capas se encuentran firmemente adheridas

entre sí en casi la totalidad de la superficie de la cáscara, pero se separan en el extremo romo, definiendo así el límite de la cámara de aire (Arias *et al.*, 1993). Los componentes predominantes de las membranas son proteínas altamente insolubles de naturaleza colagenosa.

La función precisa de las membranas no ha sido bien comprendida, pero se sabe que son esenciales para la normal calcificación de la cáscara. (Arias *et al.*, 1993).

Capa Mamilar.

La capa mamilar es rica en mucopolisacáridos neutros, hexosaminas, hexosas y ácido siálico (Arias *et al.*, 1993). Se ha detectado por inmunohistoquímica keratán sulfato (Fernández *et al.*, 1997) y posee un grosor cercano a los 100 μm (Arias *et al.*, 1993). Se sugiere que es el sitio donde se inicia el depósito de cristales (Dieckert *et al.*, 1989 citado por Fernández *et al.*, 1997).

Capa en empalizada.

Es la capa sobre el estrato mamilar y corresponde a la porción calcificada de la cáscara. Es la capa más gruesa, de 200 a 350 μm de espesor (Arias *et al.*, 1993) y tiene componentes orgánicos e inorgánicos integrados entre sí, siendo de estos últimos, más frecuente los cristales de calcita en aves (Arias *et al.*, 1993). La matriz de la cáscara, que corresponde a la porción descalcificada de la capa en empalizada, se relaciona estrechamente con los cristales de calcita y forman una banda continua sobre el huevo (Arias *et al.*, 1993).

Cutícula.

La cutícula corresponde a la capa más externa de la cáscara. Cubre toda la porción calcificada de la cáscara, siendo su grosor de entre 0,5 a 12,8 μm (Arias *et al.*, 1993). La función de la cutícula es la de proteger al huevo de la pérdida excesiva de humedad y de la invasión microbiana, mediante los mecanismos de

reconocimiento y unión de la bacteria a residuos de carbohidratos (Arias *et al.*, 1993).

Aunque se ha considerado que la cutícula posee una composición similar a las membranas de la cáscara, se sabe está compuesta principalmente por mucina y fósforo, además de galactosa, manosa, fucosa y hexosamina, pero no ácido urónico (Baker y Balch, 1962 citado por Arias *et al.*, 1993).

Las diferentes capas de la cáscara se forman durante el paso del huevo por el oviducto. El oviducto transporta el óvulo desde el ovario, promueve su fertilización y controla el depósito de la albúmina y la formación de la cáscara (Arias *et al.*, 1993). El oviducto se organiza en cinco regiones: el infundíbulo, que recibe al óvulo y en donde se realiza la fecundación, permaneciendo ahí entre 15 a 30 minutos; el magnum, que secreta la albúmina, ocupando 2 a 3 horas; el istmo, que secreta precursores de las membranas de la cáscara (1 a 2 horas de permanencia); la glándula de la cáscara, donde ocurre el depósito de carbonato de calcio, lugar en que el huevo permanece la mayor cantidad de tiempo (unas 20 a 26 horas) y la vagina, desde la cual el huevo es expulsado (Arias *et al.*, 1993).

Las células involucradas en la formación de la cáscara no constituyen parte de ella. El depósito mineral se lleva a cabo por células del oviducto especializadas como una “línea de ensamblaje” (Arias *et al.*, 1993).

Parece ser que en primer lugar, los componentes necesarios se acumulan en las células mucosas de la glándula de secreción, la cuál se ve estimulada mecánicamente por la rotación del huevo sin cáscara (Cuart, 2003). Tras el depósito de la matriz, la formación de los cristales de carbonato de calcio sólo se produce en condiciones no ácidas, lo que requiere que también se segregue amoníaco, y que será posteriormente eliminado por el oviducto al poner el huevo, juntamente con elementos tóxicos como berilio, mercurio o cadmio (Cuart, 2003). Tras la deposición de los primeros cristales gracias a la acción del

enzima anhidrasa carbónica se produce la fase de crecimiento de la cáscara. Se depositan aproximadamente 5 gramos de carbonato de calcio en la cáscara en un tiempo menor a las 20 horas requeridas para formar la cáscara, transformando a este proceso en uno de los modelos de biomineralización más veloces existentes (Arias *et al.*, 1993).

El término de la mineralización de la cáscara es una materia de controversias. No se ha establecido si el término de la mineralización se debe al término de la secreción de calcio, cambios en la composición del fluido uterino o inhibición del crecimiento de calcita (Klingensmith y Hester, 1983).

FÓSFORO.

El fósforo es un nutriente esencial y crítico para la producción animal. Junto con el calcio, constituyen un 70% del componente mineral total del cuerpo y es esencial para el desarrollo óseo, metabolismo energético (de carbohidratos, proteínas y grasas), transporte de calcio, forma parte de los ácidos nucleicos y de varias coenzimas (Scott *et al.*, 1982) y es un componente fundamental en los sistemas de buffer sanguíneo (Scott *et al.*, 1982; Coelho, 2000). En aves se relaciona con el control del apetito, ganancia de peso, eficiencia alimenticia y la calidad de la cáscara (McDowell, 1992).

El fósforo, además de formar parte de la cáscara, posee un rol fundamental en el proceso de calcificación. Se encuentra presente en la cutícula, la cual se compone por una capa interna, rica en minerales, encontrándose el fósforo como hidroxapatita (fosfato de calcio) (Dennis *et al.*, 1996) y una externa, compuesta por matriz orgánica, donde se encuentran fosfoproteínas y pigmentos en los huevos de color (Nys *et al.*, 1991).

Estudios han detectado la presencia de fósforo 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, 1985), además de la presencia de fósforo orgánico insoluble (Nys *et al.*, 1991).

Simkiss (1964) sostiene que el ión fosfato interferiría en la calcificación de la cáscara, actuando como un elemento tóxico debido a que se adhiere a la superficie de los cristales de calcita, cambia el ordenamiento de los iones, inhibiendo de esta manera el depósito y el crecimiento de los cristales de calcita. La base de esta teoría radica en la capacidad del ión fosfato de sustituir a un ión carbonato, lo que remueve el potencial electrostático necesario para la absorción de otra capa de iones de calcio. Además, los iones fosfato se anclan a los cristales de manera bidimensional, y no de manera tridimensional como lo harían los iones de calcio, lo que trae como consecuencia el término del proceso de crecimiento de la capa de cristales de calcita (Simkiss, 1964). En este contexto, al inyectar ortofosfato o pirofosfato en la glándula de la cáscara, se produjo oviposición prematura en gallinas ponedoras (Ogasawara *et al.*, 1975; Klingensmith y Hester, 1983) y codornices japonesas (Soh *et al.*, 2002).

Fósforo, productividad y calidad del huevo.

El fósforo es un nutriente crítico en la alimentación de las aves. Económicamente, el fósforo es el tercer componente dietario más caro después de la energía y proteína en la dieta de animales de estómago simple (Boling *et al.*, 2000a; Boling, 2003).

En el transcurso de los años, los requerimientos de fósforo disponible han ido variando. El NRC (1994) indica que los requerimientos mínimos de fósforo no fítico para gallinas ponedoras blancas son de 0,32%(de las 18 semanas al primer huevo), 0,31%(para un consumo diario de 80 grs. de alimento), 0,25% (para un consumo de 100 grs. al día) y de 0,21% (para un consumo diario de 120 grs. de alimento).

Diversos estudios se han realizado para determinar el nivel de fósforo disponible necesario para mantener niveles de productividad óptimos y una buena calidad de cáscara. En este sentido, Sohail y Roland (2002) concluyeron que el máximo rendimiento en gallinas ponedoras de 21 a 37 semanas de edad se obtuvo a niveles de fósforo disponible de 0,3 a 0,4%, lo que contrasta con lo encontrado por Vandepopuliere y Lyons (1992) quienes indican que niveles de 0,4% de fósforo total no fueron suficientes para mantener un rendimiento óptimo en ponedoras. Kamińska *et al.* (1994) encontraron que niveles de 0,35% de fósforo disponible es suficiente para mantener altos niveles productivos y buena calidad de cáscara.

Diversos estudios han evaluado el efecto de distintos niveles de fósforo dietario sobre la productividad de gallinas ponedoras. En un experimento con gallinas ponedoras de 38 semanas de edad llevado a cabo por Vandepopuliere y Lyons (1992) en el cual se evaluó niveles de fósforo dietario totales de 0,4; 0,5; 0,6 y 0,7% (0,2; 0,3; 0,4 y 0,5% de fósforo disponible respectivamente) se encontró que al menor nivel de fósforo total (0,4%) disminuyó el porcentaje de postura, el peso de huevo y la masa de huevo significativamente. Gordon y Roland (1997) también mencionan una disminución en el consumo de alimento, porcentaje de postura, peso vivo, menor aumento de peso de huevo y una mayor mortalidad en gallinas alimentadas con 0,1% de fósforo disponible. Dagher *et al.* (1985) informan efectos adversos sobre el porcentaje de postura, consumo de alimento y una menor ganancia de peso al utilizar niveles de 0,15% de fósforo disponible.

La calidad de la cáscara es un factor determinante al momento de considerar el requerimiento de fósforo. Garlich (1979 citado por Frost y Roland, 1991) especula que la hipofosfatemia estimularía la actividad de la enzima 1- α -hidroxilasa en riñón, enzima que hidroxila la 25-OH colecalciferol,

transformándola en 1-25 (OH)₂ colecalciferol, el metabolito activo de la vitamina D₃. Esto se traduce en un aumento en la absorción intestinal de fósforo, un incremento en la resorción ósea de calcio y fósforo debido a la activación de los osteoclastos y un aumento en la reabsorción de calcio y fósforo en riñón (McDowell, 1992). La hipercalcemia resultante mejoraría la calidad de la cáscara (Garlich, 1979 citado por Frost y Roland, 1991).

Diversos estudios avalan esta relación inversa entre los niveles de fósforo dietario y calidad de la cáscara. Miles *et al.* (1983) indicaron que la gravedad específica disminuye al aumentar los niveles de fósforo dietario sobre 0,50%. Vandepopuliere y Lyons (1992) obtuvieron el mayor valor de gravedad específica a niveles dietarios de fósforo disponible de 0,2% y el menor valor a niveles de 0,5%. Dagher *et al.* (1985) encontraron que las aves alimentadas con el mayor nivel de fósforo disponible (0,45%) presentaron una disminución significativa en el grosor de la cáscara. Otros parámetros que manifiestan esta relación inversa entre niveles dietarios de fósforo y calidad de cáscara son la resistencia de la cáscara a la fractura (Antillon, 1976 citado por Kamińska y Skraba, 1997) y calcificación de la cáscara (Frost y Roland, 1991).

A pesar que los resultados de varios estudios avalan esta relación inversa entre los niveles de fósforo dietario y calidad de cáscara, existen experiencias contradictorias. Kamińska *et al.* (1994) encontraron que parámetros como la gravedad específica, porcentaje de cáscara, peso de cáscara y grosor de cáscara disminuyeron al utilizar el menor nivel de fósforo disponible (0,25%), mejorando a niveles mayores o al suplementar las dietas con la enzima fitasa. Gordon y Roland (1997) encontraron el menor valor de gravedad específica en dietas con 0,1% de fósforo disponible.

Cowan y Kahn (1999) señalan que la deficiencia de fósforo en gallinas ponedoras tiene como efecto una disminución en el porcentaje de postura,

cáscaras más delgadas y a la larga fatiga de jaula. Keshavarz y Nakajima (1993) afirman que tanto la deficiencia como el exceso de fósforo pueden llevar a anomalías óseas, disminución en la producción y a un deterioro en la calidad de la cáscara.

Sohail y Roland (2002) evaluaron distintos niveles dietarios de fósforo en dos experimentos, el primero con gallinas ponedoras de 21 a 37 semanas de edad y el segundo con aves de 45 a 53 semanas de edad. En aves jóvenes, el menor nivel de fósforo disponible (0,1%) disminuyó significativamente el porcentaje de postura a la semana 12 de estudio, consumo de alimento y peso corporal, aumentó la mortalidad y presentó el mayor peso y masa de huevo. Además presentó el mayor valor de gravedad específica. En el segundo experimento, el mismo nivel de fósforo disponible redujo el porcentaje de postura en un 7% dentro de las dos primeras semanas del ensayo, disminuyó el consumo de alimento en 6,6 gramos, aumentó la mortalidad y presentó el menor peso y masa de huevo, sin tener efecto sobre la gravedad específica. La diferencia en la magnitud de la respuesta obtenida en ambos estudios se atribuye a que la capacidad de utilizar el fósforo fítico (no disponible) disminuye con la edad de las gallinas, lo que explicaría la rápida disminución en el porcentaje de postura en aves viejas (Sohail y Roland, 2002).

El metabolismo del fósforo se encuentra íntimamente ligado al del calcio. Harms y Miles (1977) señalan que niveles adecuados de calcio, pero excesivos de fósforo, causan un deterioro en la calidad de cáscara en gallinas ponedoras. Este hecho puede ser explicado debido a que la hiperfosfatemia resultante aumentaría la excreción renal de calcio (Keshavarz y Austic, 1990).

Fósforo y el medioambiente.

Debido al aumento en la intensificación de la producción animal, la eliminación de sus desechos al medio ambiente ha generado una creciente

preocupación. Las fuentes de agua dulce usualmente reciben estos desechos, que contienen altas cantidades de minerales, entre ellos fósforo y nitrógeno.

El fósforo contenido en las deyecciones está compuesto de porciones no digeridas del fósforo fítico, fósforo no fítico proveniente de los insumos vegetales, fracciones no digeridas de subproductos animales y suplementos minerales, además de cantidades adicionales de fósforo disponible agregados en exceso a las necesidades del animal (Waldroup, 1999).

Los cuerpos de agua en su estado natural se encuentran en condiciones oligotróficas, es decir, con pequeña cantidad de minerales y alta en oxígeno disuelto en las profundidades. Al recibir estos desechos ricos en minerales, pasan a una condición mesotrófica para llegar finalmente a la condición eutrófica, vale decir, rica en minerales y pobre en oxígeno (Coelho, 2000). Al aumentar la concentración de minerales, se estimula el crecimiento de algas y cianobacterias, cuya tasa de respiración agota los niveles de oxígeno disuelto en el agua, causando la muerte de la fauna acuática (Coelho, 2000). El fósforo, junto con el nitrógeno, es un elemento limitante en el crecimiento de algas y plantas acuáticas, y por ende, es el nutriente limitante en el proceso de eutrofización (Mühlhauser, 1983). El proceso de eutrofización es irreversible, y afecta el abastecimiento de agua en centros urbanos, al turismo, a la natación y a la pesca de salmónidos de fondo.

Debido a que el efecto del fósforo sobre las aguas es visible, se han realizado esfuerzos para reducir la excreción de fósforo en los desechos derivados de la producción animal. Las técnicas de reducción en la industria avícola se han enfocado en las siguientes áreas:

1. **Formular raciones en forma precisa según los requerimientos del ave** (Wicker, 1999; Angel y Applegate, 2000; Coelho, 2000). Esto permite reducir la excreción de fósforo entre un 10 a un 25%. Dentro de esta categoría, la

alimentación por fases permite cubrir con mayor exactitud los requerimientos puntuales de las aves según su edad y evita así la sobre suplementación de fósforo.

2. **Considerar la disponibilidad del fósforo dietario** (Kahn, 1996; Waldroup, 1999; Wicker, 1999; Angel y Applegate, 2000; Dozier, 2000): la selección de los ingredientes puede jugar un papel importante en la reducción del exceso de fósforo. Se hace necesario conocer el contenido de fósforo fítico presente en los vegetales, ya que este no se encuentra disponible para ser utilizado por las aves y es eliminado al medio ambiente. Otro aspecto importante a considerar es la variabilidad del contenido de fósforo disponible existente dentro de un mismo insumo, la cual debe ser mínima, debido a que 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 fósforo. Lo importante es que el fósforo disponible contenido en las dietas no debe exceder los requerimientos del ave para maximizar la producción (Waldroup, 1999).
3. **Uso de fuentes de fosfato con alto valor biológico** (Wadroup, 1999; Coelho, 2000; Dozier, 2000): 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). Coelho (2000) estimó la digestibilidad del fosfato mono cálcico (fuente menos utilizada en la producción animal) del 78 al 82%, mientras que los fosfatos di y tri cálcicos, los más utilizados, tienen una digestibilidad de 58 al 73%.

4. **Potenciar el uso del fósforo fítico** (Waldroup, 1999; Wicker, 1999; Dozier, 2000): una porción significativa de fósforo excretado en las deyecciones corresponde al fósforo unido al ácido fítico, por lo que el uso de la enzima fitasa, permitiría reducir la cantidad de fósforo necesaria para cubrir los requerimientos del ave entre un 20 y un 50%.(Wicker, 1999). Además, el uso de isómeros de la vitamina D como el α -hidroxicolecalciferol, ayudarían a incrementar el uso del fósforo fítico por la fitasa (Waldroup, 1999).
5. **Uso de insumos con bajo nivel de fósforo fítico** (Waldroup, 1999; Wicker, 1999; Angel y Applegate, 2000): 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.
6. **Mantener un programa de control de calidad de los subproductos de origen animal.** (Waldroup, 1999; Dozier, 2000): 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 sub estimación (con el riesgo potencial 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).

7. **Mejorar el manejo de los animales** (Wicker, 1999): buenas prácticas de manejo de los animales, como por ejemplo el uso de coccidiostatos, uso de vacunas, uso de enzimas, preocupación por la salud y un buen alojamiento permitirían aumentar la ganancia de peso, la eficiencia de conversión y uniformidad del lote, lo que al final se traduce en una menor excreción de fósforo por kilo de carne producido.

INSUMOS VEGETALES EN LA INDUSTRIA AVÍCOLA.

La base de la alimentación de aves la constituyen los insumos vegetales. La correcta elección del vegetal a incorporar a las dietas se hace teniendo en cuenta una serie de factores, entre los cuales se destacan el aporte nutricional, el precio actual de mercado, los factores anti nutricionales presentes en ellos y las características morfológicas del vegetal, entre otras. A continuación se hace mención a algunos aspectos generales de granos y leguminosas y a los insumos vegetales más utilizados en dietas de aves ponedoras en Chile: el maíz, la soya y el trigo.

Morfología de los granos.

En la figura N°1 se puede observar las estructuras morfológicas de un grano. Las principales estructuras morfológicas del grano se pueden dividir en: pericarpio, testa, aleurona, endosperma y germen o embrión.

1. Pericarpio.

El pericarpio es la estructura más externa del grano y su función es la de proteger el grano de agentes externos como insectos y microorganismos, impedir la pérdida de humedad y conducir y distribuir el agua y otros nutrientes durante el proceso de germinación. Se puede distinguir tres capas: epicarpio, mesocarpio y endocarpio. El epicarpio a su vez se subdivide en epidermis (una capa celular gruesa, alargada con una cubierta de cutina en superficie más externa y posee

además pigmentos) e hipodermis (compuesto por células más pequeñas que la epidermis, de 2 ó 3 capas celulares). El mesocarpo es la capa más gruesa y se asocia a la resistencia a enmohecerse. El endocarpo se compone de células cruzadas y una capa de células cónicas que transportan la humedad al grano (F.A.O., 1995).

2. Testa.

La testa se encuentra ubicada debajo del endocarpo. Puede encontrarse presente en algunos granos y ausente en otros. En algunas especies vegetales, la testa puede estar altamente pigmentada, característica que se encuentra determinada genéticamente. El grosor de la testa no es homogéneo, siendo más gruesa en la corona del grano y más delgada en el sector cercano al embrión (F.A.O., 1995).

3. Aleurona.

La aleurona es una capa de células citoplasmáticas densas que rodean al endosperma de la planta. Durante el proceso de germinación, las células de la aleurona secretan varias enzimas hidrolíticas, siendo la más abundante la α -amilasa, que degradan los componentes de reserva contenidos en el endosperma almidonado, liberando de esta manera aminoácidos libres y azúcares simples, los cuales se encuentran disponibles para ser utilizados en el proceso de crecimiento de la semilla. (Becraft y Asuncion-Crabb, 2000)

4. Endospermo.

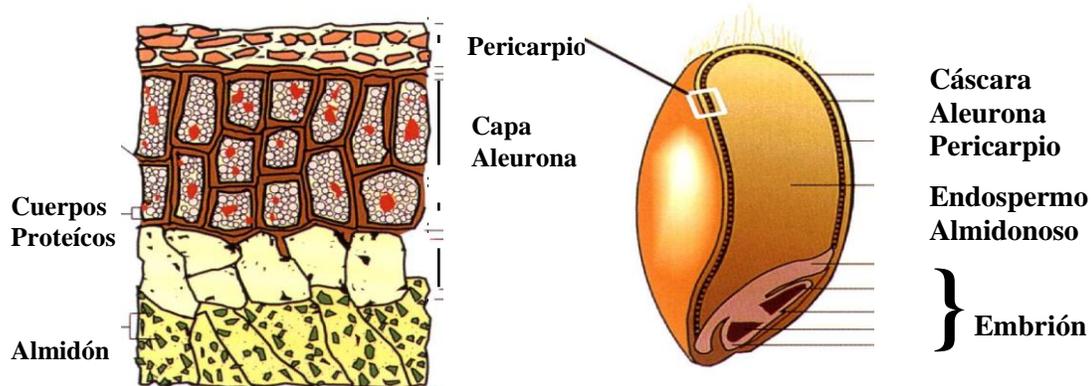
El endospermo es un tejido estructural simple, compuesto por dos capas celulares: el endospermo almidonado y las células basales de transferencia (Becraft y Asuncion-Crabb, 2000). El endospermo almidonado constituye el cuerpo del endospermo y se encuentra en la zona central del grano. Estas células se encuentran unidas a amiloplastos, los cuales contienen gránulos de almidón y cuerpos proteicos. Las células basales de transferencia se encuentran sobre el

pedículo, son células alargadas cuya función es la transferencia de nutrientes desde la planta al endospermo en desarrollo (Becraft y Asuncion-Crabb, 2000).

5. Germen.

El germen se compone por el escutelum y el axis embriónico (F.A.O., 1995). El escutelum es un tejido de reserva rico en lípidos, proteínas, enzimas y minerales. El contenido de aceite en el germen es mayor que el presente en el endospermo, y esta compuesto principalmente por ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico y oleico (F.A.O., 1995).

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



Generalidades de granos y leguminosas.

1.- Granos.

Los animales en general utilizan los granos como su principal fuente de energía, y en algunas etapas de crecimiento, hasta un 90% de la dieta puede llegar a estar constituida por ellos o por sus subproductos (McDonald *et al.*, 2002).

Los granos son principalmente una fuente concentrada de carbohidratos. El principal componente de la materia seca lo constituye el almidón, el cual se concentra en el endosperma (McDonald *et al.*, 2002). El almidón se encuentra en forma de gránulos, y su tamaño y forma varían según la especie. Un 25% del

almidón presente en los cereales se encuentra en forma de amilosa, mientras que el 75% restante se presenta como amilopectina (McDonald *et al.*, 2002).

Del contenido total de nitrógeno, un 85-90% corresponde a proteínas. Las proteínas se encuentran distribuidas por todo el grano, pero las mayores concentraciones se encuentran en el embrión y en la aleurona (McDonald *et al.*, 2002). Las proteínas contenidas en los cereales son deficientes en algunos aminoácidos esenciales como lisina y metionina.

El contenido de lípidos varía según la especie vegetal, encontrándose en mayor cantidad en el embrión. Los lípidos de los cereales son insaturados, en su mayoría corresponden al ácido linoleico y ácido oleico. Estos ácidos grasos tienden a enranciarse rápidamente y producen una grasa corporal suave (McDonald *et al.*, 2002).

El contenido de fibra cruda de los granos cosechados es mayor en aquellos que contienen cáscara (por ejemplo la avena y el arroz) y es menor en aquellos “desnudos” como el trigo y el maíz (McDonald *et al.*, 2002).

En cuanto a los minerales, los granos son en su totalidad deficientes en calcio, conteniendo menos de 1 gr. de este mineral en la M.S. El contenido de fósforo por su parte es alto, pero una parte importante de él se encuentra como fósforo fítico, el cual no se encuentra habitualmente disponible para ser utilizado por el ave (McDonald *et al.*, 2002). Los granos son deficientes en vitamina D y salvo el maíz amarillo, también carecen de pro vitamina A (McDonald *et al.*, 2002). Los granos son una excelente fuente de vitamina E y tiamina, pero poseen un bajo porcentaje de riboflavina. La mayor parte de las vitaminas se encuentran en la aleurona y en el germen del grano (McDonald *et al.*, 2002).

2.- Leguminosas.

Aunque los granos constituyen la mayor parte de los insumos utilizados en la alimentación animal, su nivel de proteína y su balance aminoacídico son

insuficientes para cubrir los requerimientos de producción, por lo que deben ser complementados con fuentes proteicas vegetales (Rubio y Brenes, 1995).

En cuanto a su composición química, destaca el alto contenido de proteína, el cual oscila entre el 25-42% de la materia seca, dependiendo de la especie vegetal. El contenido de fibra cruda se sitúa en torno al 6-7% y el contenido de extracto etéreo es muy variable, incluyendo un rango desde un 1,4% en el caso del guisante hasta un 21,2% para la soya (Rubio y Brenes, 1995).

Si bien durante los últimos años la incorporación de las leguminosas en raciones para aves ha aumentado, no se ha llegado a los niveles potenciales de inclusión. La utilización neta de la proteína (valor NPU) alcanza entre el 65-70%, mientras que los valores observados en animales alimentados con proteína de origen animal suelen superar el 90% (Rubio y Brenes, 1995). Entre las causas que originan esta ineficiencia en el uso de la proteína vegetal durante el crecimiento se mencionan la presencia de factores anti nutricionales como pectinas, inhibidores de tripsina y lectinas; desequilibrio aminoacídico en la proteína y problemas en la digestibilidad de la proteína vegetal (Rubio y Brenes, 1995).

Maíz.

El grano de maíz es uno de los principales ingredientes en las dietas de aves, siendo particularmente apreciado por su alto valor energético, palatabilidad, escasa variabilidad de su composición química y bajo contenido en factores antinutritivos. Existen diferentes tipos de grano: dentado, flint (duro), harinoso, dulce, pop y ornamental (pod), de los cuales el más utilizado en alimentación animal es el primero. Se han seleccionado además líneas de alto contenido en grasa (10%), en azúcar (10%, maíz dulce), en amilosa (80%, amilomaíz), en proteína (26%), o en lisina y triptófano (opaco-2), pero su uso comercial está limitado por su baja productividad (Fedna, 1999).

Los granos de maíz contienen como media un 83% en peso de endospermo, un 11% de germen y un 6% de pericarpio. Alrededor del 50% del endospermo es de tipo córneo, más denso y con mayor contenido en proteína que el endospermo harinoso (Fedna, 1999).

El maíz es el grano de mayor valor energético, debido a su alto contenido en almidón y grasa, y su bajo nivel de fibra. El maíz posee 750 g/kg de M.S. de almidón (McDonald *et al.*, 2002) y la proporción media de amilosa y amilopectina es 25:75 pero en variedades de tipo céreo la proporción de amilopectina alcanza casi el 100%, mientras que en las de tipo amilomaíz se reduce hasta el 20% (Fedna, 1999).

La fracción fibrosa corresponde a un 8 a 9% del grano y está concentrada en el salvado (82-92%) e incluye principalmente celulosa y pentosanos, siendo su grado de lignificación muy bajo. Debido a lo anterior, el coeficiente de digestibilidad de su fibra es superior al de otros cereales, como la cebada y el trigo, especialmente en animales de estómago simple (Fedna, 1999).

El maíz tiene un contenido apreciable de grasa y es una buena fuente de ácido linoleico (1,8%). El ácido linoleico es importante en aves ponedoras debido a que tiene una relación directa con el peso del huevo (McDonald *et al.*, 2002).

Aunque el maíz es una excelente fuente de energía digestible, su contenido de proteína es bajo, y esta es de baja calidad. El grano de maíz posee dos tipos de proteína: la zeína, presente en el endospermo, que es cuantitativamente la más importante, pero presenta una deficiencia de los aminoácidos esenciales lisina y triptófano; y la glutelina, que se encuentra en menor cantidad en el endosperma y en el germen, pero posee una mayor concentración de lisina y triptofano (McDonald *et al.*, 2002). Se han desarrollado variedades de maíz con una mayor cantidad de los aminoácidos deficitarios, por ejemplo la variedad opaca-2 que posee un contenido de lisina superior al maíz

normal y la variedad floury-2 con incremento en el contenido de metionina y lisina (McDonald *et al.*, 2002).

Al igual que otros cereales, el maíz es deficitario en calcio, sodio, microminerales y vitaminas hidrosolubles. El contenido en fósforo es aceptable (0,27%) pero en gran parte se encuentra en forma de fitatos poco disponibles. Además, el grano no contiene fitasas activas (Fedna, 1999).

El maíz es una buena fuente de vitamina A y de xantófilas (McDonald *et al.*, 2002). Posee mono y dihidroxi pigmentos (luteína y zeaxantina) que otorgan color a la carne de pollo y a yema de los huevos (Fedna, 1999).

El maíz se cosecha con alrededor de un 28% de humedad. A menos que se deseque rápidamente existe un riesgo de infestación con hongos. Las principales toxinas fúngicas son la zearalenona, tóxica a niveles superiores a 200 ppm en aves, y las aflatoxinas, las más peligrosas, con umbrales de tolerancia entre 10 y 40 ppb según la especie animal. Por otra parte, las partidas que se cosechan con un alto contenido en humedad requieren un mayor tratamiento térmico para su desecación, lo que tiende a reducir la digestibilidad de la lisina si el procesado no es correcto (Fedna, 1999).

Además de utilizar el grano de maíz, se puede aprovechar algunos de sus subproductos derivados de la fabricación del almidón y glucosa, dando origen a tres subproductos: el germen (rico en aceite, de uso frecuente en alimentación humana), el afrecho y el gluten (rico en proteínas y en pigmentos) (McDonald *et al.*, 2002).

Soya.

El poroto de soya es considerado una de las mejores fuentes de proteína en la alimentación animal (McDonald *et al.*, 2002). Constituye una excelente fuente de energía y proteína, en particular lisina, conteniendo además

proporciones importantes de nutrientes esenciales tales como ácido linoleico y colina altamente disponibles (Fedna, 1999).

La fracción hidrocarbonada de la soya contiene, además de los oligosacáridos, un 6-8% de azúcares solubles (principalmente sacarosa) y alrededor de un 12% de pared celular poco lignificada. Aunque su contenido en almidón es muy bajo (<1%), la calidad energética de esta fracción es elevada en rumiantes, intermedia en porcino y conejos y más reducida en aves (Fedna, 1999). La soya posee mayor contenido de calcio y fósforo que los cereales (McDonald *et al.*, 2002).

El poroto de soya entero contiene un 18-20% de grasa altamente insaturada (54% de linoleico y 8% de linolénico). La molienda o extrusión del poroto de soya facilita la liberación del aceite, lo que aumenta su digestión en el intestino delgado. Por ello, el valor energético en animales de estómago simple del poroto extruido es un 2-5% superior al del poroto tostado (Fedna, 1999).

La soya contiene todos los aminoácidos esenciales, es rica en lisina pero la concentración de cistina y metionina se encuentra por debajo de los requerimientos (McDonald *et al.*, 2002). El contenido en proteína de la soya varía desde un 38% en la poroto entero hasta el 90% en el aislado de proteína (Fedna, 1999). La utilización digestiva de proteína y aminoácidos es alta en todas las especies animales, aumentando ligeramente con el descascarillado y la extracción con etanol, especialmente en animales jóvenes. Sin embargo, un tratamiento excesivo reduce su digestibilidad intestinal, especialmente la de lisina (Fedna, 1999).

Entre los productos de la soya utilizados en la alimentación animal se encuentra el poroto de soya extruido (fullfat) y el concentrado proteico de soya. El poroto de soya extruido posee mayor contenido de energía metabolizable y el

concentrado proteico de soya posee un contenido alto de proteína, llegando a niveles de un 70% (McDonald *et al.*, 2002).

Trigo.

El trigo es el cereal que presenta una composición química más variable, debido a que diversos factores como las condiciones climáticas y fertilización del suelo influyen en su composición nutritiva (McDonald *et al.*, 2002).

En términos generales, el grano posee un 2-3% de germen, un 13-17% de salvado (incluyendo la aleurona) y un 80-85% de endospermo (Fedna, 1999).

El principal hidrato de carbono del trigo es el almidón (66% MS) y también posee una cantidad significativa de carbohidratos simples y oligosacáridos solubles (4%). La proporción de fibra (12% FND) es algo superior a la del maíz, pero está también poco lignificada (Fedna, 1999). El mayor contenido en fibra, junto a un menor contenido en grasa (2%), ácido linoleico (0,8%) y la ausencia de pigmentos, implican que la calidad nutritiva del trigo sea levemente inferior a la del maíz (Fedna, 1999).

El contenido de proteína cruda en el trigo es mayor que la presente en el maíz, cantidad que puede variar de 60 a 220 g/kg de M.S. (McDonald *et al.*, 2002). Las proteínas más importantes presentes en el endospermo son la prolamina (gliadina) y glutelina (glutenina) (McDonald *et al.*, 2002). La composición aminoacídica varía entre estas dos proteínas, tienen un contenido mayor de ácido glutámico (330 g/kg) y prolina (120 g/kg) que las proteínas solubles del germen y salvado (albúminas y globulinas). La concentración de éstas últimas (más ricas en lisina que las proteínas del endospermo) es ligeramente superior en el trigo (15%) que en el maíz, y en el trigo blando que en el trigo duro (Fedna, 1999).

El trigo presenta carencias en minerales y vitaminas similares a otros cereales. La utilización del fósforo de este cereal en animales de estómago simple

es relativamente alta (50%), al poseer el grano fitasas endógenas. En cambio, la disponibilidad de la biotina es muy baja en aves (10% comparado con el 100% observado en el caso del maíz) (Fedna, 1999).

La utilización de trigos recién cosechados se ha relacionado con una mayor incidencia de enteritis necrótica y deyecciones pastosas en aves., lo que puede explicarse por un mayor desarrollo de clostridios en el aparato digestivo debido al mayor contenido de fibra soluble y a la mayor viscosidad del quimo intestinal (Fedna, 1999). Los problemas de enteritis parecen ser mayores cuando el grano tiene un alto contenido en humedad, por lo que se recomienda dejar que este tipo de trigos se "asiente" antes de ser utilizados.

El uso de subproductos del procesamiento del trigo en alimentación avícola es una práctica común. En la producción de harina de trigo, al procesar el trigo se separan el endospermo del germen y el afrecho y se obtienen diversos subproductos, como el afrechillo de trigo, los cuales poseen un menor valor nutritivo (McDonald *et al.*, 2002) pero se encuentran disponibles a un menor precio para ser incorporados en las dietas de aves.

FACTORES ANTINUTRICIONALES EN ALGUNOS ALIMENTOS UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA AVÍCOLA.

Pese a que los insumos vegetales utilizados en las dietas de aves son una excelente fuente de nutrientes, poseen además diversas moléculas que le confieren propiedades antinutricionales. Estos factores antinutricionales (FAN), además de ser pobremente digeridos por los animales de estómago simple debido a la carencia de enzimas adecuadas y de disminuir el valor nutritivo del alimento, son capaces de alterar la fisiología del tracto digestivo. Entre los FAN encontramos el ácido fítico y sus sales, fósforo inorgánico adicionados a la dieta, polisacáridos no amiláceos, pectinas e inhibidores de tripsina, entre otros.

Entre los efectos negativos de polisacáridos no amiláceos (PAN) y fitatos contenidos en los insumos vegetales, se encuentran la reducción de la densidad de energía del alimento, encapsulación de nutrientes, aumento de la viscosidad intestinal, formación de complejos (por ejemplo fitato con calcio, magnesio, zinc, etc.) y reducción de la absorción de nutrientes (por el aumento de la viscosidad, modificación en la composición de la microflora intestinal, mayor absorción de ácidos biliares, e influencia sobre la mucosa intestinal) (Bühler *et al.*, 1998).

Fósforo fítico y fósforo inorgánico.

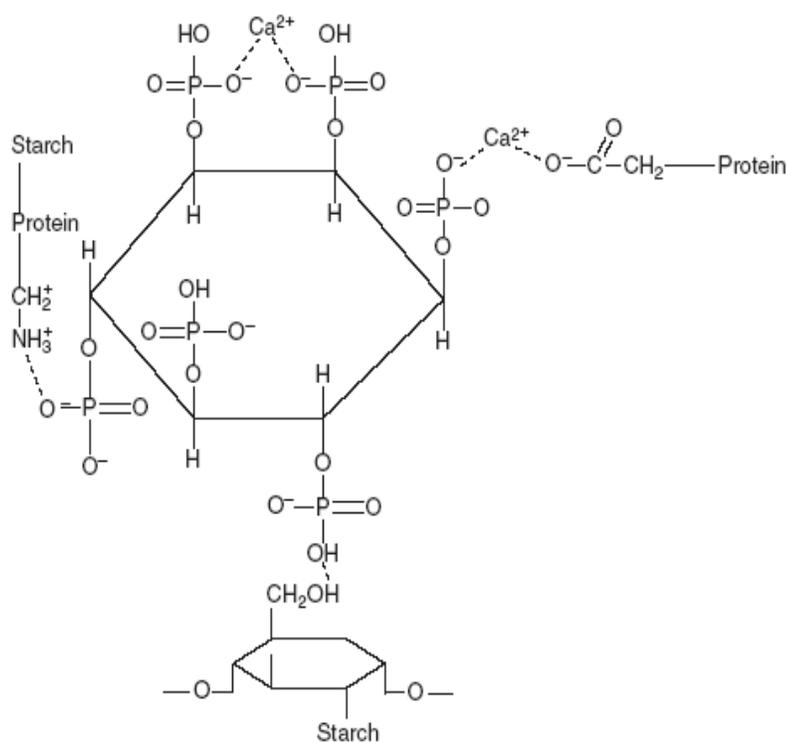
Los insumos vegetales utilizados en nutrición avícola poseen un alto contenido de fósforo, sin embargo, dos tercios del fósforo contenido en las plantas corresponden a fósforo fítico (éster de mio inositol hexafosfato o IP_6) el cual no se encuentra disponible para las aves (Leeson y Summers, 1997; Coelho, 2000). La digestibilidad del fósforo en aves es baja, estimándose en un 10-30% para el maíz y el poroto de soya (Cromwell, 1992 citado por Kornegay, 2001).

Esta molécula tiene un alto porcentaje de fósforo (28,32%) y sus 6 radicales fosfato poseen una afinidad por varios cationes, formando sales del ácido fítico o fitatos (Pointillart, 1994; Kornegay, 2001).

Es un componente esencial de los granos y constituye una reserva de fósforo y carbohidratos utilizables en la etapa de germinación (Pointillart, 1994; Kornegay, 2001). El ácido fítico se encuentra asociado a estructuras específicas de los cereales. Por ejemplo, en los granos como el trigo, se encuentra en su mayor parte presente en la cáscara (aleurona, testa y pericarpo); en el maíz se encuentra principalmente en el germen y en las leguminosas como el poroto de soya (dicotiledóneas) el IP_6 se encuentra en cuerpos proteicos dispersos en los cotiledones (Pointillart, 1994; Kornegay, 2001).

El IP_6 tiene la capacidad de formar complejos insolubles en el tubo digestivo con cationes di y trivalentes (como el fierro, magnesio, potasio, cobre, calcio y zinc) a pH neutro, ácidos grasos, carbohidratos, proteínas y aminoácidos, evitando o disminuyendo su absorción, y reduciendo con ello su biodisponibilidad en los alimentos (Cheyran, 1980; Pointillart, 1994; Bühler *et al.*, 1998; Scheideler y Jalal, 2000; Boling, 2003). La estructura del ácido fítico y sus posibles interacciones con otros nutrientes se pueden observar en la figura N°2.

Figura N°2.- Estructura del ácido fítico y sus posibles interacciones con proteínas, minerales y almidón (Thompson, 1988).



La estabilidad de los fitatos y su afinidad por los cationes pueden ordenarse de la siguiente forma, de menor a mayor afinidad: Fe<Ca<Mn<Co<Cu<Zn (Pointillart, 1994). En este contexto, a modo de ejemplo, una molécula de ácido fítico capta entre 3 a 6 moles de Ca para formar

fitato de calcio, el cual es insoluble a pH intestinal. (Leeson y Summers, 1997; Kornegay, 2001). Además, el fitato de calcio se une a ácidos grasos en el intestino, forma jabones insolubles que disminuyen la digestibilidad de los ácidos grasos (Coelho, 2000). Similar mecanismo se describe en la unión del fitato de calcio y carbohidratos (Thompson, 1988) produciendo con esto una disminución en la acción de la α -amilasa (Deshpande y Cheyran, 1984) y de la solubilidad de los carbohidratos (Knuckles y Betschart, 1987). Thompson (1986) demostró que la hidrólisis *in vitro* del almidón del trigo incubado con saliva humana se retrasó al incorporar a la mezcla fitato de sodio.

El ácido fítico al unirse a aminoácidos, disminuye la solubilidad de las proteínas y la acción de las pepsinas y tripsinas (De Rahm y Jost, 1979; Singh y Krikorian, 1982). Bajo condiciones ácidas, los grupos básicos del ácido fítico pueden formar complejos con grupos aminos como el lisil, histidil y arginina (Fretzdorff *et al.*, 1995) y a Ph neutro, los grupos carboxilos de algunos aminoácidos pueden unirse al ácido fítico mediante un mineral di o trivalente (Kornegay, 2001). Los complejos fitato-proteína o fitato-mineral-proteína pueden disminuir la utilización de la proteína (Kornegay, 2001).

El ácido fítico posee a su vez, un efecto sobre la digestibilidad de energía, debido a que afecta la digestión del almidón de dos formas (Ravidran, 1999):

1. se une a la α -amilasa directamente o la afecta indirectamente debido a que el fitato se une al calcio, elemento necesario para la actividad de la α -amilasa.
2. Unión directa del almidón al fitato mediante enlaces proteicos.

Frente a esta situación, para cubrir los requerimientos de las aves, las dietas usualmente son suplementadas con fuentes de fósforo inorgánico, lo que encarece el costo de la fórmula, llevando a un riesgo de sobre suplementación

con el problema de una potencial contaminación ambiental en el suelo y aguas subterráneas (Scheideler y Jalal, 2000) como ya ha sido comentado.

El fósforo inorgánico es considerado a su vez un factor antinutricional. Aumentar los niveles dietarios de fósforo disponible mediante la inclusión de fuentes inorgánicas de fósforo disminuye considerablemente los niveles de digestibilidad de energía metabolizable y aminoácidos debido a que también forma jabones insolubles con el calcio y lípidos, los cuales reducen la digestibilidad de diversos nutrientes (Coelho, 2000). Además, la excreción de fósforo también consume energía. Por otro lado, estas fuentes inorgánicas de fósforo forman complejos junto al ácido fítico presente en los alimentos que afectan el proceso de absorción de otros nutrientes. El ácido fítico, junto al fosfato cálcico se une directamente al almidón (Thompson, 1988) e inhibe la acción de la α -amilasa (Deshpande y Cheyran, 1984), disminuyendo así la solubilidad y digestibilidad del almidón. Además, dicho complejo puede unirse a los ácidos grasos para formar jabones insolubles, lo que disminuye la digestibilidad de las grasas (Coelho, 2000).

Polisacáridos no amiláceos.

Los componentes de la fibra poseen importancia en la dieta de animales de estómago simple debido a que poseen efectos antinutricionales y a que su aprovechamiento es escaso (Choct, 1997). Se componen básicamente en polisacáridos no amiláceos (PNA), que son componentes de las paredes celulares de los granos. En el caso de las leguminosas, juegan además un rol de reserva energética. (Choct, 1997).

Generalidades de los polisacáridos.

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 del monosacárido presente; formas de los

anillos de monosacáridos (piranosa de 6 carbonos o furanosa de cinco carbonos); posición de los enlaces glucosídicos; configuraciones (α o β) del enlace glucosídico; secuencia de los residuos de monosacáridos en la cadena y la presencia o ausencia de substituyentes no carbohidratados (Choct, 1997). Los monosacáridos más frecuentemente encontrados en las paredes celulares 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).

Polisacáridos no amiláceos.

El término polisacáridos no amiláceos (PNA) abarca una serie de polisacáridos excluyendo a los α -glucanos (almidón). La clasificación de los PNA se basó en un inicio en la metodología empleada en la extracción y aislamiento de estos polisacáridos (Choct, 1997). Los PNA se dividen en tres grandes grupos: Celulosa, polímeros no celulósicos (arabinoxilanos, β -glucanos, mananos, galactanos y xiloglucanos) y los polisacáridos pécticos (Bailey, 1973, citado por Choct, 1997).

A continuación se hace referencia a algunos de los PNA más relevantes en la alimentación avícola:

- a) Celulosa: es el componente orgánico más abundante, constituyendo cerca del 50% del carbono de las plantas (Choct, 1997). Es un homopolímero lineal de unidades de glucosa (β -1,4). Es insoluble en agua, en soluciones alcalis o ácidas diluidas.
- b) Pentosanos (arabinoxilanos, xilanos): se componen de dos pentosas, arabinosa y xilosa. Los arabinoxilanos poseen una cadena principal de β -(1,4) xilopiranososa y cadenas laterales de arabinofuranosa (Bühler *et al.*, 1998). La mayoría de los arabinoxilanos presentes en los granos son insolubles debido a que se encuentran anclados en la pared celular, pero aquellos libres pueden

formar soluciones altamente viscosas y absorber cerca de 10 veces su peso en agua (Choct, 1997).

- c) 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 gran ramificación de los β -glucanos y de su gran capacidad de acumular agua (Bühler *et al.*, 1998).
- d) Mananos: En algunas plantas los glucomananos y galactomananos constituyen los componentes hexosanos no celulósicos principales. Los glucomananos se componen de unidades de glucosa y manosa unidas por enlaces $\beta(1,4)$, mientras los galactomananos poseen una cadena de $\beta(1,4)$ mananos, sustituidas con unidades de 1, 6 α -galactosa. Los galactomananos se encuentran principalmente en las leguminosas en el endosperma durante el desarrollo de la semilla, mientras que los glucomananos constituyen un componente menor en los granos (Choct, 1997).

La solubilidad de los PNA afecta su digestibilidad en aves. En general, los PNA solubles son más digestibles que la fracción insoluble (Choct y Kocher, 2000). La porción insoluble de los PNA posee como característica su capacidad de absorber gran cantidad de agua y mantener una motilidad intestinal normal, lo que es fundamental en las deyecciones de los animales (Choct, 1997).

El contenido de PNA no varía solamente entre los distintos ingredientes, sino que además varía dentro de un mismo ingrediente debido a la variedad de este y la ubicación geográfica donde es cosechado (Choct, 1997). Nos enfocaremos en la variabilidad existente entre las dos grandes categorías de plantas utilizadas en la alimentación de las aves.

- ◆ Cereales y sus subproductos. Los PNA presente en estos productos son principalmente arabinosilanos (pentosanos), β -glucanos y celulosa. El maíz y el sorgo poseen pequeñas cantidades de PNA, mientras que el trigo, centeno y el triticale contiene altos contenidos de PNA solubles e insolubles (Choct, 1997). Así, mientras los arabinosilanos predominan en el trigo, centeno y triticale, los β -glucanos se encuentran mayoritariamente en avena y cebada (Chesson, 2000). Los subproductos de estos granos contienen altos niveles de paredes celulares, por lo que son ricos en PNA y poseen una baja calidad nutritiva.
- ◆ Leguminosas. Se utilizan como aporte de proteína en las dietas de animales no rumiantes, aportando además cantidades variables de PNA. Los xilanos y la celulosa se encuentran en la cáscara y vaina de la mayoría de las leguminosas, mientras que en el cotiledón encontramos polisacáridos pécticos (Choct, 1997).

Efecto antinutricional de los PNA solubles.

Debido a la amplia variedad de PNA, cada uno con distintas propiedades físico químicas, sus efectos sobre los animales no rumiantes son diversos. Entre los efectos adversos de los PNA se pueden mencionar los siguientes:

1. Aumento de la viscosidad del contenido intestinal.

La viscosidad de los PNA depende de su peso molecular y de su solubilidad, y esta última depende de la estructura química del PNA y de su asociación con el resto de los componentes de la pared celular (Choct, 1997). Algunas fracciones de PNA (principalmente las fracciones solubles de los β -glucanos y pentosanos) aumentan la viscosidad del contenido intestinal, debido a su capacidad de acumular grandes cantidades de agua (Bühler *et al.*, 1998). Una alta viscosidad intestinal disminuye la tasa de difusión de nutrientes y de enzimas digestivas, altera la interacción enzima-sustrato en la superficie de la mucosa

intestinal (Ikegami *et al.*, 1990), enlentece el tránsito intestinal e influyen sobre la consistencia de las deyecciones, causando signos de diarrea (Bühler *et al.*, 1998, Iji, 1999). Los PNA solubles interactúan con el glicocáliz del borde en cepillo (Johnson y Gee, 1981 citado por Choct, 1997), aumentando el tamaño y la estabilidad de la fracción no mezclada del contenido en la superficie de la mucosa (Chesson, 2000). Esto reduce el contacto entre el alimento y las enzimas digestivas y enlentece la absorción de los carbohidratos, lípidos y aminoácidos liberados previamente, reduciendo así la eficiencia del proceso digestivo (Chesson, 2000).

2. Modificación de la fisiología intestinal.

Además de actuar como una barrera física al aumentar la viscosidad, los PNA alteran la función intestinal al modificar las secreciones endógenas de agua, proteínas, electrolitos y lípidos (Johnsson y Gee, 1981, citado por Choct, 1997). Entre los cambios producidos por los PNA en el tracto digestivo se encuentran el aumento en el tamaño de los órganos (Iji, 1999) y el incremento en la secreción de jugos digestivos, acompañados de una disminución en la digestibilidad de nutrientes (Choct, 1997). Rakowska *et al.*, (1993) observó un daño extenso en las vellosidades y mucosa en intestino delgado de pollos broilers alimentados con dietas compuestas por 80% de centeno. Estos efectos pueden deberse a un efecto físico propiamente tal o puede ser resultado de la incapacidad del epitelio intestinal para regenerar las células muertas (Iji, 1999). Además, algunos PNA poseen la propiedad de ligar las sales biliares, lípidos y colesterol, aumentando con esto la secreción de ácidos biliares en intestino, lo que resulta en una pérdida de estos componentes en las heces (Ikegami *et al.*, 1990). Esta pérdida de ácidos biliares y lípidos por secuestro y el aumento en la eliminación fecal como esteroides puede al final alterar la absorción de lípidos y colesterol en el intestino,

lo que llevaría a mayores cambios en la dinámica digestiva disminuyendo la eficiencia en el uso de los alimentos por parte del animal (Choct, 1997).

3. Interacción con la microflora.

Los carbohidratos que llegan a intestino grueso determinan en gran medida el tipo y la actividad de la microflora. Bajo circunstancias normales, la población microbiana predominante en el intestino delgado se compone de anaeróbicos facultativos, mientras que en el ciego predominan los anaeróbicos estrictos (Salanitro *et al.*, 1978). Los PNA aumentan el tiempo de residencia del quimo en el intestino, lo cual hace disminuir la tensión de oxígeno, posibilitando el desarrollo de la microflora anaeróbica (Choct, 1997). Choct *et al.* (1996) demostraron un gran aumento del proceso fermentativo en intestino delgado de pollos broilers, los cuales fueron suplementados con PNA solubles en sus dietas. La fermentación de los PNA y producción de ácidos grasos volátiles por parte de la microflora intestinal reduciría la cantidad de carbohidratos necesarios para estimular la producción de enzimas a nivel intestinal (Iji, 1999). Este fenómeno, a su vez, puede ser compensado mediante un aumento en los procesos hipertróficos e hiperplásicos de la mucosa (Ikegami *et al.*, 1990), pero estos mecanismos compensatorios no serían suficientes para compensar la pérdida de función digestiva (Iji, 1999). Aunque podría pensarse que el aumento en la producción de ácidos grasos volátiles por parte de la microflora debiera aumentar el contenido de energía de las dietas, debido al cambio drástico en el ecosistema intestinal, el efecto total es una disminución en la digestibilidad de nutrientes, acompañado de un empeoramiento en el rendimiento del animal (Choct y Kocher, 2000). La proliferación de algunos microorganismos anaeróbicos posee efectos directos sobre la digestibilidad de nutrientes como los lípidos, debido a que estos patógenos producen toxinas y degradan las sales biliares, las cuales son

esenciales para la digestión de las grasas, lo que se traduce en una menor digestión de ellas (Bedford y Pack, 1998).

Almidón como factor antinutricional.

En vegetales como el trigo, cebada, centeno y triticale, entre otros, es un hecho que el principal factor antinutricional es su contenido de PNA, pero en el maíz y el sorgo debido a la baja proporción de estos carbohidratos, el principal FAN sería el propio almidón (Pack *et al.*, 1998). La digestibilidad del almidón presente en el maíz es considerada por los nutricionistas tan buena como en un 98%, lo que sería cierto si se evaluara a nivel de las deyecciones, pero Noy y Sklan (1995) indican que a nivel ileal la digestibilidad del almidón rara vez sobrepasa el 85%, a pesar de que la secreción de amilasa aumenta con la edad del ave. Choct *et al.*, (1996) informan que utilizando sorgo en pollos broilers se alcanzó una digestibilidad ileal del almidón de sólo un 90%. El almidón que escapa a la digestión del ave constituye una fuente de fermentación para la microflora intestinal (Wyatt y Newcombe, 1999).

Brown (1996) llama a esta fracción no digerida como almidón resistente (AR) y lo divide en tres grupos:

- **AR1:** este almidón no es digerido por problemas de accesibilidad, incluso después que el alimento ha sido sometido a procesamiento. La causa de esto es que una gran cantidad de células del endosperma permanecen intactas después del procesamiento, protegiendo de este modo a parte del almidón de la acción enzimática. Este almidón será mayoritariamente fermentado en intestino grueso y ciegos.
- **AR2:** la resistencia estaría dada por la estructura química y física del grano propiamente tal. Para poder explicar este fenómeno se debe considerar dos aspectos. El primero corresponde al patrón de cristalización de los polímeros lineales de glucosa que conforman el almidón. Existen dos

patrones principales en el almidón de cereales, el A que contiene 7 polímeros lineares y el B con 6. El patrón A es digerido más rápido que el B, debido a que este último posee una mayor cantidad de agua. El segundo factor a considerar es la relación amilosa y amilopectina. La amilopectina se digiere a mayor velocidad dada su naturaleza amorfa, la que permite un mayor ingreso de humedad al gránulo, facilitando la degradación enzimática.

- **AR3:** se produce como consecuencia del procesamiento del almidón, a altas temperaturas, seguido por su almacenamiento a bajas temperaturas por horas o días. Después del procesamiento, una fracción del almidón se gelatiniza, es decir, su forma de cristal se destruye y se crea un gel amorfo e hidratado. El almacenamiento a bajas temperaturas en forma consecutiva bajo cierta cantidad de tiempo favorecerá a que una porción de esta fracción gelificada se re-asocie en complejos cristalinos con proteínas y estructuras de la pared celular, formando un complejo llamado almidón retrógrado, el cual no es digestible en intestino delgado, pero es susceptible a ser fermentado en el intestino grueso y ciegos.

Además de las características antes mencionadas, otra característica física del almidón que afecta la tasa relativa de digestibilidad es el tamaño del gránulo de almidón. A mayor tamaño del gránulo, su digestión será más lenta (Bedford y Pack, 1998).

Se ha hecho énfasis en la importancia en la tasa de digestión debido a que la gallina no retiene alimento por más de dos horas, por lo que cualquier factor que atrase la digestión del almidón llevará la digestión de este elemento desde el intestino delgado a intestino grueso y ciegos (Bedford y Pack, 1998). Este almidón será fermentado por la microflora del intestino grueso, parte de la cual

sobrevive gracias a su capacidad de degradar componentes bactericidas como los ácidos biliares. Como resultado de este mecanismo de defensa, se afecta a su vez la digestión de las grasas debido a una emulsificación incompleta (Bedford y Pack, 1998). Debido a esto, cualquier método que mejore la tasa de digestibilidad del almidón, mejorará a su vez la digestibilidad de las grasas al quitar el sustrato a estos microorganismos y disminuir su capacidad de degradar los ácidos biliares.

FAN presentes en alimentos proteicos vegetales.

Además de los FAN ya mencionados, los insumos vegetales poseen además otras sustancias con propiedades anti nutritivas. Huisman y Tolman (1992) clasificó los FAN presentes en alimentos proteicos vegetales basándose en el efecto nutricional y la respuesta biológica en el animal en:

1. Factores que tienen un efecto adverso sobre la digestión proteica y en la utilización de la proteína. Aquí encontramos los inhibidores de la proteasa, lectinas, saponinas y componentes fenólicos.
2. Factores que ejercen un efecto negativo en la digestión de carbohidratos. Entran en esta clasificación los inhibidores de la amilasa, componentes fenólicos y factores de flatulencia.
3. Factores que tienen un efecto adverso en la utilización de minerales. Aquí se mencionan los glucosinolatos, ácido oxálico y el gosispol.
4. Factores que inactivan vitaminas o causan un aumento en los requerimientos de vitaminas.
5. Factores que estimulan el sistema inmunológico que puede causar reacciones de hipersensibilidad, como es el caso de proteínas antigénicas.
6. Factores en el alimento que poseen un efecto tóxico, por ejemplo las lectinas y componentes que poseen cianuro.

Los FAN en estos insumos pueden ser disminuidos o eliminados mediante el correcto procesamiento del alimento, haciéndose necesario distintos

tratamientos debido a las diferencias en las estructuras de los FAN y sus efectos biológicos. Así, el tratamiento térmico que se aplica de rutina al poroto de soya es eficaz en reducir los niveles de inhibidores de tripsina y lectinas (Thorpe y Beal, 2001).

Algunos de los FAN no PNA con mayores implicancias en la alimentación de aves son (Thorpe y Beal, 2001):

- a) **Inhibidor de las proteasas:** sus efectos son los de inhibir la actividad de la quimiotripsina, lo que causa crecimiento desuniforme, hipertrofia pancreática y efectos carcinogénicos en páncreas. Se encuentran presentes en la mayoría de las leguminosas.
- b) **Lectinas:** se encuentran también en la mayoría de las leguminosas. Entre los efectos adversos encontramos daño en la pared intestinal, hipersensibilidad y un aumento en las pérdidas endógenas de nitrógeno.
- c) **Polifenoles y Taninos:** interfieren con la digestibilidad de proteínas y carbohidratos al formar complejos con ellos. También presentes en la mayoría de las leguminosas.
- d) **Saponinas:** presentes en la soya, producen hemólisis y alteran la permeabilidad intestinal.
- e) **Proteínas antigénicas:** presentes en la soya, inducen hipersensibilidad e interfieren con la integridad de la pared intestinal.

ENZIMAS.

Las enzimas son proteínas de estructura tridimensional sumamente compleja. Actúan sólo en condiciones específicas de temperatura, pH y humedad, y sólo frente a sustratos específicos (Bühler *et al.*, 1998). Se encuentran presentes en todos los sistemas biológicos y son catalizadores muy eficaces, acelerando o posibilitando diversas reacciones químicas.

Clasificación de las enzimas.

Según la Comisión Internacional de Enzimas (E.C.), las enzimas se clasifican en 6 grupos principales según el tipo de reacción que catalizan (Bühler *et al.*, 1998): oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. En alimentación animal se utilizan exclusivamente las hidrolasas, que producen la escisión hidrolítica de los enlaces C-O, C-N, C-C y de otro tipo. Entre las hidrolasas más usadas en la alimentación animal encontramos las fosfatasas, glucosidasas y proteasas (Bühler *et al.*, 1998).

Otra clasificación hace referencia al punto de escisión del sustrato, clasificando a las enzimas en endoenzimas y exoenzimas. (Bühler *et al.*, 1998). Las exoenzimas rompen solamente elementos externos de la cadena molecular, mientras que las endoenzimas rompen los enlaces internos (Bühler *et al.*, 1998). Las endoenzimas pueden gracias a esta propiedad dividir las cadenas moleculares grandes en fragmentos más pequeños, lo que importa en enzimas que actúan sobre los polisacáridos no amiláceos, que influyen directamente en la viscosidad del contenido intestinal (Bühler *et al.*, 1998).

Propiedades de las enzimas.

La eficacia de las enzimas no depende solamente del sitio de acción, sino que además de otros factores como las condiciones de reacción existentes en el lugar de acción, por ejemplo el pH, temperatura, contenido de agua, presencia de activadores o inhibidores y concentración del sustrato (Bühler *et al.*, 1998).

Además, las enzimas no son consumidas durante la reacción catalítica y al finalizar esta, vuelve a su estado original, por lo que la cantidad de enzimas es pequeña en comparación a la cantidad de sustrato (Bühler *et al.*, 1998).

Origen de las enzimas.

En la producción de enzimas se utilizan principalmente microorganismos como hongos, bacterias y levaduras. Las enzimas sintetizadas por hongos actúan

en un rango de pH ácido (2,5 a 5,0), el cual se ajusta a las condiciones predominantes en el proventrículo (estómago glandular) y en la molleja (estómago muscular). Las enzimas de origen bacteriano poseen un pH óptimo de acción sobre 6,0, propiedad que las hace más eficiente en las condiciones neutras presentes en intestino delgado (Van de Mierop y Ghesquiere, 1998).

La producción de enzimas a partir de estos microorganismos se debe a que resulta un proceso más económico que utilizar materias primas de origen vegetal o animal. Además, los microorganismos son capaces de sintetizar una amplia gama de enzimas hidrolíticas que los organismos animales son incapaces de producir. Otra ventaja es que al tener algunos microorganismos una gran capacidad adaptativa frente a condiciones extremas de pH, temperatura y osmolaridad, en muchos casos sus enzimas son más estables frente a estas condiciones que las producidas por materias primas animales o vegetales (Bühler *et al.*, 1998). Existen cepas seleccionadas o modificadas genéticamente para producir mayor cantidad de enzimas.

La producción de enzimas a nivel industrial es realizada mediante dos procedimientos: el método de emersión, que consiste en una fermentación superficial sobre medios de cultivos sólidos con ventilación de superficie y el método de inmersión, en el cual se cultiva los microorganismos sintetizadores de enzimas en el interior de un medio de cultivo líquido (Bühler *et al.*, 1998).

El grupo de microorganismos con mayor participación en la producción de enzimas lo constituyen los hongos, en especial los del género *Aspergillus* (ej. *A. niger*), *Penicillium*, *Humicola* (ej. *H. insolens*) y *Trichoderma* (ej. *T. longibrachaiatum*). Estos hongos tienen como característica en común producir enzimas que escinden los hidratos de carbono poliméricos de la pared celular. Entre las bacterias, importa en nutrición animal el género *Bacillus* para la obtención de α -

amilasas y proteasas (*Bacillus lincheniformis* y *Bacillus subtilis*) y otras del mismo género para la obtención de β -glucanasas y xilanasas (Bühler *et al.*, 1998).

Aplicaciones de las enzimas.

La industria de las enzimas, tal como se conoce hoy, es el resultado de un rápido desarrollo en las últimas cuatro décadas gracias a la evolución de la biotecnología. Las enzimas, que han estado presentes desde siempre, han sido utilizadas desde la antigüedad en numerosas áreas, como la producción de alimentos como quesos, levaduras, cerveza, vinos y vinagre, y en la elaboración de productos como cuero, índigo y lienzos. El avance logrado en los procesos de fermentación permitió incorporar a las enzimas a los procesos industriales, entre los cuales destacan industria de los detergentes, producción de almidones, textil, láctea y de producción y conservación de alimentos (Kirk *et al.*, 2002). Además se encuentran en otras áreas como la industria papelera, cosméticos, diagnóstico y tratamiento médico y la nutrición animal.

ENZIMAS EN ALIMENTACIÓN AVÍCOLA.

El uso de enzimas para mejorar la disponibilidad de nutrientes en las raciones de gallinas ponedoras es una práctica de creciente interés. Nutrientes como fósforo, energía metabolizable y calcio, contenidos en los alimentos de origen vegetal como cereales, poroto de soya y granos de maíz son aprovechados de manera inadecuada por parte de las aves, quedando ellos atrapados y posteriormente eliminados en las heces, lo que produce una pérdida de nutrientes y en algunos casos, contaminación del medio ambiente

El efecto benéfico del uso de enzimas en otras áreas es de fácil medición, pero en la alimentación animal los efectos sólo pueden ser medidos en forma indirecta, como estimar la digestibilidad de nutrientes o calcular la energía metabolizable aparente obtenida del alimento. Aún más importante es considerar

que las condiciones para las reacciones no pueden ser modificadas. Las enzimas al ser ingeridas junto a la dieta, son sometidas a una serie de influencias, como la presencia de enzimas endógenas, sustancias químicas como el ácido clorhídrico, microflora intestinal, contracciones intestinales, temperatura, siendo dichos factores difíciles de controlar (Van de Mierop y Ghesquiere, 1998).

Las enzimas utilizadas en la alimentación animal deben adaptarse a las condiciones existentes en el tubo digestivo del animal, deben actuar en presencia del pH gástrico y resistir la acción de la pepsina gástrica para poder actuar en intestino. Llegan al tubo digestivo y son digeridas como el resto de las proteínas, por lo que no dejan residuos en heces y orina, haciéndose innecesario esperar un período de resguardo (Bühler *et al.*, 1998).

Dado que cada reacción catalítica requiere su enzima específica, es aconsejable agregar a los alimentos una mezcla de diversas enzimas para que descompongan a igual tiempo los alimentos y los factores anti nutricionales contenidos en ellos.

Clasificación de los sustratos.

Los sustratos sobre los cuales actúan las enzimas se pueden dividir en tres grandes categorías (Bühler *et al.*, 1998):

- A. Sustratos para los cuales los propios animales de estómago simple sintetizan las enzimas adecuadas en el tracto digestivo, como el almidón, proteínas y lípidos. Los animales producen las enzimas en cantidad suficiente para producir la degradación total de los sustratos, pero bajo ciertas circunstancias, como estrés o en animales jóvenes, la producción endógena no es suficiente.
- B. Sustratos para los cuales el animal no produce enzimas y cuya digestibilidad es muy reducida. Un ejemplo concreto es la celulosa, constituida por cadenas de glucosa unidas entre sí por enlaces β -

glucosídicos. Estos enlaces son prácticamente indigestibles para los animales de estómago simple.

- C. Sustratos para los cuales el animal no produce enzimas propias y poseen además efectos anti nutricionales. Los β -glucanos, pentosanos y las sales del ácido fítico son ejemplos de esta situación.

Así como se utilizan distintas materias primas en alimentación de aves, existen muchas enzimas que actúan sobre los nutrientes contenidos en los alimentos. Entre las enzimas más utilizadas en la alimentación animal tenemos (Bühler *et al.*, 1998):

- Fitasa: cataliza la hidrólisis del ácido fítico. Se utiliza para aumentar la disponibilidad del fósforo vegetal.
- Amilasa: cataliza la hidrólisis del almidón. En este grupo tenemos la α -amilasa, que escinde los enlaces α -glucosídicos en el interior de la molécula del almidón y la β -amilasa, que hidroliza la molécula de maltosa. La amilasa se emplea en dietas basadas en maíz.
- Celulasa: cataliza la hidrólisis de la celulosa. Se utiliza en dietas que presentan subproductos de molinería como los afrechos debido al alto contenido de paredes celulares que estos presentan.
- Proteasa: participa en la hidrólisis de las proteínas dietarias. Muy utilizadas en dietas basadas en soya, debido a su acción al degradar los inhibidores de tripsina y lectinas.
- Xilanasa: enzima que hidroliza los enlaces internos β -1,4 de los arabinosilanos. Se utilizan en dietas que contienen trigo y centeno, aunque también se ha descrito un efecto positivo al ser incorporadas en dietas con maíz.

- β -glucanasa: cataliza la hidrólisis de los β -glucanos presentes en insumos como la cebada y el centeno.
- Lipasa: cataliza la hidrólisis de los lípidos. Debido a que los animales jóvenes no sintetizan lipasa endógena en cantidades adecuadas, esta enzima constituye una buena alternativa para ser incorporada a las dietas.

Para efecto descriptivo se agruparán las enzimas en dos categorías: la fitasa y complejo multi enzimático compuesto por α -amilasas, proteasas y xilanasas.

FITASA.

Los mayores constituyentes de las dietas de aves son los granos y sus subproductos. Aproximadamente un 60-80% del fósforo presente en las plantas se encuentra como ácido fítico o sus sales (Kornegay, 2001).

La liberación de este fósforo en aves es sólo posible mediante la acción de la enzima “Fitasa”. La hidrólisis del ácido fítico (IP_6) genera productos como el inositol-5 fosfato (IP_5), luego el inositol-4 fosfato (IP_4), inositol-3 fosfato (IP_3), inositol-2 fosfato (IP_2) y para terminar el inositol-1 fosfato (IP_1), siendo estos últimos tres capaces de atravesar la barrera intestinal (Pointillart, 1994).

La enzima fitasa se encuentra presente en algunos alimentos de origen vegetal como el trigo y el centeno lo que explicaría las diferencias observadas en la digestibilidad del fósforo contenido en diversos vegetales, pero su actividad es muy baja y las aves no poseen una actividad de fitasa en su sistema digestivo (Khan, 1996; Bühler *et al.*, 1998; Boling, 2003). Debido a lo anterior, el fitato no es asimilado por el organismo y es eliminado con las heces, constituyendo uno de los agentes contaminantes más importantes para el medio ambiente.

La fitasa es una enzima fosfatasa, que escinde el fósforo fítico presente en los alimentos. Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, presente en insumos vegetales y es producida por diversos microorganismos como bacterias, hongos y levaduras (BASF, 1994). La actividad de la enzima 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. (Kornegay, 2001).

Clasificación de las fitasas.

Según Nys *et al.* (1995), existen 4 tipos de actividad fitásica: la fitasa intestinal presente en las secreciones digestivas, fitasa presente en algunos ingredientes vegetales, fitasa obtenida de la flora residente y la fitasa producida por microorganismos exógenos.

1. La fitasa vegetal.

La fitasa de origen vegetal es una hidrolasa 6-fitasa (E.C. 3.1.3.26) que escinde primero el grupo fosfato de la posición C6 (Pallauf y Rimbach, 1995). La actividad fitásica vegetal es variable según la especie vegetal utilizada. Con la excepción del trigo, centeno y triticale, la mayor parte de los granos poseen baja actividad fitásica, siendo casi despreciable en el maíz y la soya (Kornegay, 2001). En los granos y semillas, la fitasa se encuentra presente en las envolturas, al igual que los fitatos, pero además el endosperma presenta una alta actividad fitásica, lo que no coincide con el contenido de ácido fítico presente en dicha estructura anatómica (Pointillart, 1994). En el caso del trigo, la mayor actividad fitásica se encuentra en la aleurona.

En este sentido, dietas formuladas con ingredientes que poseen una alta cantidad de actividad fitásica como cáscara de trigo, afrechillo de trigo, triticale, cáscara de centeno, poseen una mayor digestibilidad del fósforo fítico (Pointillart, 1993 citado por Kornegay, 2001).

La actividad fitásica vegetal se ve influenciada por diversos factores, entre los cuales tenemos:

- **Humedad:** Fourdin, (1984 citado por Pointillart, 1994) señala que la acción conjunta de aire caliente (60°C) y un ambiente saturado de humedad logra que la fitasa vegetal degrade hasta un 30% del fitato contenido en el trigo.
- **pH:** las fitasas vegetales son activas a pH cercano a 5 (Pointillart, 1994). Medios muy ácidos como el estómago del ave o muy alcalinos pueden inactivarla irreversiblemente.
- **Temperatura:** aunque algunos ingredientes poseen actividad endógena de fitasa, el procesamiento a que son sometidos para la fabricación de alimento como el peletizado resulta en pérdidas significativas de dicha actividad. El trigo, triticale y maíz poseen un óptimo de temperatura para la acción de la fitasa vegetal de 50°C. En el caso del trigo, a 70°C se inactiva el 50% de la fitasa vegetal y un 90% se inactiva al someterse a temperaturas de 72°C (Courtois, 1947 citado por Pointillart, 1994). El frío no afectaría a la fitasa, pero el congelamiento, al formar cristales de hielo, rompe las paredes celulares, lo que permitiría el contacto entre la fitasa con el ácido fítico (Fourdin, 1984 citado por Pointillart, 1994).
- **Calcio:** el calcio, junto a otros iones metálicos, forma fitatos estables, que son resistentes a la acción enzimática (Pointillart, 1994).
- **Contenido de proteínas:** la formación de complejos proteína-fitato en los granos hace que el fitato quede menos susceptible a la acción de la fitasa (Pointillart, 1994).
- **Integridad del grano:** el grano molido posee una mayor actividad fitásica que el grano entero (Pointillart, 1994).

- **Vitamina D₃**: la vitamina D al estimular la absorción de calcio a nivel duodenal, disminuye la cantidad disponible para la formación de fitatos de calcio insolubles a nivel intestinal (Pointillart *et al.*, 1989).

2. Fitasa Intestinal.

Los animales rumiantes son capaces de degradar la totalidad del fósforo fítico gracias a la acción enzimática de los microorganismos ruminales, lo que no ocurre en animales de estómago simple. Si bien las aves poseen actividad de fitasa intestinal, esta sería casi despreciable (Bühler *et al.*, 1998). Maenz y Classen (1998), utilizando un preparado de vesículas de membrana en cepillo de todas las secciones del intestino de gallinas ponedoras y pollos broilers, determinaron las condiciones de acción de la fitasa intestinal. Encontraron 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. Además, el duodeno presentó la mayor actividad específica de fitasa en ambos tipos de aves y mayor actividad fitásica intestinal promedio en gallinas ponedoras que en pollos broilers. Aunque el trabajo anterior, junto a otros, ha demostrado la existencia de actividad fitásica endógena en la mucosa intestinal, no ha sido posible determinar la contribución de esta actividad a la digestibilidad del fósforo fítico dietario.

Por su parte, la importancia de la fitasa producida por la microflora intestinal del ave no ha sido demostrada, pero es probable que sea marginal dado a que en intestino grueso no ocurre un proceso significativo de absorción de nutrientes (Kornegay, 2001).

3. Fitasas microbianas exógenas.

Diversos microorganismos son capaces de sintetizar la enzima fitasa, entre ellos bacterias, hongos y levaduras (Kornegay, 2001). Según la clasificación de las

enzimas, la fitasa microbiana corresponde a una hidrolasa 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8) que escinde primero el grupo fosfato de la posición C3 (Pallauf y Rimbach, 1995)

Las fitasas microbianas difieren de las vegetales y las intestinales en que 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). La fitasa de *Aspergillus niger* posee dos pH óptimos. El primero a pH 2,5 y el segundo a pH 5,5 (Kornegay, 2001) alcanzando su mayor actividad a pH 5 e inactivándose por completo a pH superiores a 7 (Khan, 1996). La fitasa del trigo posee un solo pH óptimo, 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 tiene, ajustándose mejor a las condiciones predominantes en el tracto digestivo del animal (Eeckhout y De Paepe, 1996).

En lo que corresponde al sitio de actividad de la fitasa microbiana, Liebert *et al.* (1993) menciona que en pollos el 69-86% de la actividad fitásica se detecta en el buche y el 31-39% se detecta en el proventrículo

En la alimentación de aves, el uso de procesamientos térmicos es una rutina común, por lo que debe ser considerado el aspecto de la termo estabilidad. Las fitasas microbianas también se inactivan a temperaturas elevadas, pero poseen la ventaja de que ofrecen una mayor flexibilidad en su uso, debido a que se puede incluir un margen de seguridad equivalente al nivel estimado de destrucción térmica por proceso, alrededor del 30% (Pointillart, 1994). Khan (1996) señala que la fitasa de *A. Niger* retiene el 40% de su actividad tras ser sometida a temperaturas del orden de 68°C por 10 minutos, ocurriendo su inactivación a temperaturas sobre los 80°C.

Comparando la efectividad de las fitasas vegetales y microbianas, Eeckhout y De Paepe (1992) utilizaron 500 U./Kg de alimento tanto de fitasa vegetal de trigo como proveniente de fitasa microbiana, y encontraron que la digestibilidad

del fósforo fítico en cerdo fue un 20% mayor al utilizar fitasa microbiana comparada con la vegetal. Estos autores atribuyen esta mayor eficiencia a la capacidad de la fitasa microbiana de actuar a pH inferior a 3, conservando su actividad en un 60-80%.

Zhang *et al.* (2000) demostró que el uso de una semilla de raps genéticamente modificada con el gen de fitasa de *A. ficuum* fue igualmente efectiva en dietas bajas en fósforo disponible que la fitasa proveniente de *A. niger*.

Valor de equivalencia de fitasa.

Describe el valor de reemplazo o sustitución de fitasa y se define como la cantidad de fósforo inorgánico que puede ser reemplazado por una cantidad de fitasa intrínseca o adicionada a las dietas (Kornegay, 2001). Se han realizado diversos estudios para determinar la equivalencia de la fitasa con el fosfato inorgánico. Cantor (1995; citado por Khan, 1996) estimó que 1200 U./kg de fitasa de *A. niger* equivaldría a 1 gramo de fósforo inorgánico. Van der Klis y Versteegh (1991, citado por BASF, 1995) estimaron que 250 U. de fitasa equivalen a 1,2 grs. de fósforo proveniente de fosfato monocálcico y 500 U. equivaldrían a 1,4 grs. de fósforo. Simon y Versteegh (1993, citado por BASF, 1995) estimaron que 300 U. de fitasa equivalen a 1 gr. proveniente del fosfato monocálcico. Bühler *et al.* (1998) menciona que 500 U./kg. puede sustituir a 1,15 grs. de fósforo proveniente de fosfato bicálcico o a 1 gr. de fósforo proveniente de fosfato monocálcico.

El uso de fitasas microbianas en alimentación avícola obedece a dos razones fundamentales: Permite disminuir la cantidad de fósforo inorgánico 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.

Fitasa utilizada en este estudio.

La fitasa utilizada en este estudio corresponde al producto Phyzyme® 5000G, elaborado por la empresa Danisco¹. La enzima es una 3-Fitasa (E.C. 3.1.3.8) producida por *Trichoderma longibrachiatum (reesei)* que aporta 5000 U./g.

Fitasa y productividad.

Se ha estudiado el efecto de fitasa sobre parámetros productivos en gallinas ponedoras en dietas a base de maíz y poroto de soya. La mayor parte de los estudios realizados evaluaron la incorporación de la enzima fitasa en dietas con distintos niveles de fósforo disponible (FD).

Gran parte de la literatura informa de los efectos beneficiosos de adicionar fitasa a dietas con bajos niveles de FD sobre el porcentaje de postura. Trabajos como los realizados por Gordon y Roland (1996, 1997), Punna y Roland (1999) y Boling *et al.* (2000a) señalan que a niveles de 0,1% de FD, 300 U/kg de fitasa logran corregir los efectos adversos en este indicador. Coon y Leske (1999) y Keshavarz (2003b) informan similar efecto con 300 U/kg, pero a niveles de FD de 0,18%. Kamińska *et al.* (1994) y Kamińska y Skraba (1997) al suplementar las dietas con 300 U./kg de fitasa al menor nivel de FD (0,25%), obtuvieron porcentajes de postura similares a los presentados por los tratamientos con 0,35% de FD. Boling *et al.* (2000b) encontraron que al adicionar 100 U./kg de fitasa a dietas con 0,1% FD se lograba mantener el porcentaje de postura similar a los tratamientos con mayor cantidad de FD.

En un segundo experimento, Kamińska y Skraba (1997) utilizaron dos niveles de fitasa (150 y 300 U./kg) y encontraron que al adicionar 150 U. aumenta el porcentaje de postura a un 90,8%, alcanzando el máximo (93,3%) al adicionar 300 U. de fitasa.

¹Danisco Animal Nutrition. P.O. box 470157, St. Louis, Missouri, 63147, E.E.U.U.

Um y Paik (1999) informan una mejora en el porcentaje de postura de 2,15% al adicionar fitasa en dosis de 500 U/kg a niveles de 0,37% de FD. Lim *et al.*, (2003) evaluó el uso de fitasa (300 U/Kg) en dietas con dos niveles de calcio (3 y 4%) y dos niveles de fósforo disponible (0,15 y 0,25%) en ponedoras desde las 21 a las 41 semanas de edad, y encontró que al mayor nivel de fósforo disponible, la fitasa aumentaba el porcentaje de postura en el período de 31-41 semanas de edad.

Otros trabajos informan sobre la ausencia de efectos de la suplementación de fitasa sobre el porcentaje de postura (Scott *et al.*, 1999; Scheideler y Jalal, 2000; Keshavarz, 2000a, Keshavarz, 2003a) e incluso la incapacidad de 300 U. para mantener el porcentaje de postura del grupo control sin suplementación (Terreros, 2001).

En cuanto al efecto de fitasa sobre el peso del huevo, los resultados de investigaciones realizadas tanto en pruebas de campo como en galpones experimentales han arrojado resultados controversiales. Algunos autores describen una mejora en el peso de huevo al menor nivel de FD (Coon y Leske, 1999; Gordon y Roland, 1996, 1997; Scott *et al.*, 1999; Keshavarz, 2003b), otros no describen efectos beneficiosos (Kamińska y Skraba, 1997; Roland y Punna, 1998; Keshavarz, 2000a; Jalal y Scheideler, 2001; Kim *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2003) e incluso algunos informan efectos adversos en su uso (Terreros, 2001).

Gordon y Roland (1997) describieron un aumento del peso del huevo al suplementar fitasa desde 1 gr. de incremento en los controles sin fitasa, a 2,2 grs. con fitasa, al menor nivel de fósforo disponible (0,1%). Por su parte, Scott *et al.* (1999) encontraron que al suplementar fitasa en los grupos con mayores niveles dietarios de calcio y FD, la enzima disminuía significativamente el peso del huevo.

En un experimento con gallinas ponedoras se demostró que la suplementación con fitasa mejoró la producción de huevo, conversión alimenticia, digestibilidad de nutrientes, calidad de cáscara (al mejorar grosor y resistencia al quiebre) y el contenido de cenizas, calcio y fósforo en tibia, pero no mejoró el consumo de alimento ni el peso de huevo (Kim *et al.*, 2001). Otro estudio realizado por Sheideler y Jalal (2000) con gallinas ponedoras de 40 a 60 semanas de edad utilizando distintos niveles de fósforo dietario, concluyó que suplementar fitasa posee efectos benéficos en el rendimiento de gallinas ponedoras mejorando el consumo de alimento, conversión alimentaria, masa de huevo, sin influenciar en el peso y producción de huevo.

Un estudio llevado a cabo por Roland y Punna (1998) con gallinas ponedoras de 19 a 50 semanas de edad, evaluó el efecto de la incorporación de fitasa (300 U./kg de dieta) en dietas con cuatro niveles de fósforo disponible (0,1%, 0,2%, 0,3% y 0,4%). Se dividió el período en dos fases, la primera desde las 19 a las 36 semanas de edad, y la segunda, desde las 37 a las 48 semanas de edad. En la primera fase, se evidenciaron efectos significativamente negativos con el menor nivel de fósforo disponible sobre producción de huevos, consumo de alimento, peso de huevo y mortalidad, esta última alcanzando valores de 55%. Todos estos efectos fueron contrarrestados al adicionar fitasa. No se evidenció un efecto significativo de la fitasa sobre los otros niveles de fósforo disponible. En la segunda fase del experimento, la fitasa mejoró en un 9,3% el porcentaje de postura promedio, consumo de alimento, calidad de hueso (medida como contenido de minerales y densidad ósea) y peso corporal en gallinas con el menor nivel de FD, sin influir sobre el peso del huevo.

Fitasa y calidad del huevo.

Debido a la gran influencia del fósforo dietario y de otros nutrientes sobre la calidad del huevo y la capacidad de la fitasa de liberar dichos nutrientes unidos

al fósforo fítico, como ha sido mencionado anteriormente, es que varios trabajos determinaron el efecto de la adición de dicha enzima en dietas de ponedoras sobre varios indicadores de calidad de huevo.

Los resultados obtenidos son variados. Terreros (2001) utilizó dos niveles de incorporación de fitasa a las dietas, 300 y 600 U/kg de dieta, obteniendo los mayores valores de gravedad específica a niveles de 300 U/kg, luego el control (sin suplementación) y el menor valor a niveles de 600 U/kg. Concuerdan con sus resultados Gordon y Roland (1996), que encontraron mejoras en la gravedad específica con todos los niveles de FD al adicionar fitasa, observando una mayor respuesta al menor nivel de PD (0,1%). Además, se observó un aumento a este nivel del peso de cáscara de 4,89 a 5,17 gramos por huevo, lo que no concuerda con lo observado por Terreros (2001), que presencié una disminución significativa del peso de la cáscara a mayor incorporación de fitasa.

Keshavarz (2003b) encontró que la incorporación de la enzima fitasa a dietas bajas en FD (0,08 y 0,07%) mejoraba notoriamente la gravedad específica. Keshavarz (2000b) hace notar que los mayores valores de gravedad específica fueron obtenidos por gallinas suplementadas con fitasa en todo el experimento.

Además, se encontraron efectos benéficos al agregar fitasa sobre otros indicadores de la calidad de huevo. Scheideler y Jalal (2000) mencionan un aumento del peso seco de yema y un mayor porcentaje de cáscara seca en todos los niveles de FD al suplementar fitasa. Jalal y Scheideler (2001) señalan que la adición de fitasa aumenta los porcentajes de albúmina y yema secos comparados con el menor nivel de FD (0,10%) sin suplementación enzimática. Kamińska y Skraba (1997) informan una disminución significativa en el porcentaje de huevos dañados (quebrados y trizados) de un 10,32% a un 8,12% al suplementar las dietas con 300 U/kg de alimento.

Boling *et al.* (2000a; 2000b) observaron la ausencia de efectos de la fitasa sobre la gravedad específica a niveles de 0,1% de FD. Concuerdan con esta aseveración Scheideler y Jalal (2000) y Jalal y Scheideler (2001) que tampoco evidenciaron efectos sobre la gravedad específica, resistencia a la fractura y unidades Haugh (Jalal y Scheideler, 2001). Van der Klis *et al.* (1997) tampoco encontraron diferencias al incorporar distintos niveles de fitasa (0, 100, 200 y 300 U/kg) a las dietas sobre el peso de cáscara.

Um y Paik (1999) no encontraron diferencias al incorporar 500 U/kg de fitasa en la resistencia a la fractura, razón huevos quebrados: huevos totales y unidades Haugh.

Kamińska y Skraba (1997) al evaluar el efecto de la fitasa a niveles de 300 U/ kg de alimento sobre indicadores de la calidad de cáscara, no encontraron efectos significativos sobre la resistencia a la fractura, peso de la cáscara y el porcentaje de cáscara en dietas con nivel de FD de 0,25%.

Se han descrito efectos adversos al utilizar fitasa sobre la calidad interna y externa del huevo. Keshavarz (2000a) señala que la gravedad específica fue mayor en aves alimentadas con los niveles de FD menores. Al adicionar 300 U de fitasa, la gravedad específica disminuye en todos los niveles de FD salvo el mayor (0,40%). Además, la presencia de fitasa disminuyó significativamente el porcentaje de cáscara en todos los niveles de FD en comparación con sus respectivos controles.

Lim *et al.* (2003) informan que a niveles de 0,25% de fósforo disponible y 3% de calcio, la fitasa disminuye la gravedad específica, pero disminuye los porcentajes de huevos quebrados y sin cáscara en ambos niveles de fósforo y calcio para todo el período.

Borrmann *et al.* (2001) señalan que la adición de fitasa a razón de 300 U/kg de dieta produce un menor grosor de cáscara (0,359 mm. con fitasa *versus* 0,368

mm. sin fitasa). Además, en este mismo estudio, en el período correspondiente a las semanas 72 a 76 de edad, la presencia de fitasa disminuyó significativamente las unidades Haugh.

Fitasa y digestibilidad de nutrientes.

Dado que el ácido fítico liga nutrientes, el uso de la enzima fitasa podría aumentar la disponibilidad de ellos y eventualmente su digestibilidad.

El uso de fitasa mejoró la digestibilidad de calcio y fósforo en dietas bajas en FD (0,10%), llegando a valores de digestibilidad en la semana 60 de edad de 60,39% y 47,31% respectivamente (Jalal y Scheideler, 2000). Además, aumentó la digestibilidad de metionina, cisteína, aminoácidos azufrados totales y valina en niveles de 0,15% y 0,1% de FD; isoleucina en todos los niveles de FD y la digestibilidad de ácido glutámico, alanina y glicina a niveles de 0,1% y 0,25% de FD.

Rutherford *et al.* (2004) evaluó el efecto de agregar 500 y 750 U./kg. de fitasa a dietas de maíz y soya en pollos broiler. La suplementación de fitasa aumentó significativamente la digestibilidad ileal verdadera de fósforo en un 10 a 12% respectivamente. Leske y Coon (1998) estimaron que la retención del fósforo fítico en ponedoras fue un 36,7%; 29,0% y 14,8% mayor al suplementar con 300 U. de fitasa para la harina de soya, maíz y afrecho de arroz respectivamente, lo que demostraría que la suplementación de fitasa es un método efectivo para liberar fósforo fítico, permitiendo disminuir los niveles de fósforo inorgánico y la excreción de fósforo en las deyecciones (Kornegay, 2001). Applegate *et al.* (2003) evaluó el efecto de una fitasa de *Escherichia coli* sobre la retención de fósforo en pollitas de pavo de 10 a 21 días de edad, y encontraron que 500 U./kg de dieta aumentaron la retención de fósforo en un 15,79% (68,2% de retención *versus* 58,9% en el grupo sin suplementación).

En la actualidad se están llevando a cabo estudios que demuestran que el empleo de fitasa mejora la digestibilidad de los aminoácidos, la cual parece mejorar entre el 1 y 3% para la mayoría de aminoácidos. Asimismo, se han conseguido mejoras del rendimiento en pollos broiler entre el 1,5 y 3%, por lo que se ha sugerido que las fitasas también tienen un efecto beneficioso sobre la utilización de la energía del insumo (Kies *et al.*, 2001). Ravidran *et al.* (2000) descubrieron que al adicionar salvado de arroz (rico en ácido fítico) a dietas de aves, la digestibilidad ileal de nitrógeno, lisina, treonina, isoleucina, leucina, valina fenilalanina e histidina, disminuyó. Estos efectos adversos fueron superados al incorporar a la dieta la enzima fitasa. Se ha visto que la adición de 1200 U. de fitasa mejora significativamente la digestibilidad ileal de proteínas y aminoácidos en granos como el maíz, sorgo y trigo y sus subproductos y en subproductos de oleaginosas como el afrecho de canola, soya, maravilla y algodón (Ravidran *et al.* 1999). Rutherford *et al.* (2004) encontraron que 500 y 750 U./kg. de fitasa aumentaron significativamente la digestibilidad ileal verdadera de los aminoácidos en un 3,4% como valor promedio total, sin influir en la digestibilidad de metionina, tirosina, histidina y triptofano.

Lim *et al.* (2003) describen un aumento en la disponibilidad de materia seca, fibra y fósforo al adicionar 300 U de fitasa/Kg de alimento.

La fitasa además de aumentar la disponibilidad de fósforo, aumenta la disponibilidad de otros minerales. El zinc es el mineral más susceptible a formar complejos con el ácido fítico (Kornegay, 2001). Um y Paik (1999) encontraron que la retención de cenizas, calcio, magnesio, fierro y zinc fue mayor en los grupos suplementados con 500 U/kg de fitasa. Lim *et al.* (2003) al evaluar el efecto de la incorporación de fitasa y dos niveles de calcio (3 y 4%) encontraron que al mayor nivel de calcio, la adición de fitasa (300 U/kg) aumenta la retención y disponibilidad de zinc. En un estudio realizado en pollos broilers, Sebastian *et*

al. (1996) evaluaron la respuesta de la suplementación de fitasa sobre la utilización del calcio, fósforo, cobre y zinc dietario. La incorporación de fitasa en dietas bajas en FD aumentó la retención total de fósforo (12,5%), calcio (12,2%), cobre (19,3%) y zinc (62,3%), aumentó las concentraciones plasmáticas de fósforo en 15,7% e incrementó la mineralización del hueso.

En un experimento con pavos, Yi *et al.* (1996) observaron que la adición de fitasa a una dieta baja en FD aumentaba significativamente la digestibilidad ileal de materia seca, aminoácidos no esenciales totales, aminoácidos totales y fósforo, además de mejorar la utilización aparente de materia seca y la retención de nitrógeno.

La fitasa también actuaría sobre la digestibilidad de energía. Ravidran *et al.* (2000) y Gómez *et al.* (2000 y 2003) señalan aumentos significativos en la digestibilidad de la energía, siendo estos mayores a niveles adecuados de FD (0,45%) que a niveles deficientes (0,23%) con niveles de 400 U/kg de dieta.

Aunque la mayor parte de la literatura describe un aumento en la digestibilidad de nutrientes al utilizar fitasa, existen trabajos en los cuales se ha demostrado la ausencia de efecto de la fitasa sobre la retención de nitrógeno (Um y Paik, 1999; Keshavarz, 2000a; Ledoux y Firman, 2001); de fósforo (Keshavarz 2000a); proteína cruda (Sebastian *et al.*, 1997; Scheideler y Jalal, 2000; Ledoux y Firman, 2001) y de aminoácidos (Sebastian *et al.*, 1997; Ledoux y Firman, 2001), incluso se describe una disminución al incorporar fitasa en dietas de broilers machos en la digestibilidad ileal de metionina y fenilalanina (Sebastian *et al.*, 1997).

Fitasa y medio ambiente.

Mediante diversos estudios se ha demostrado que con el uso de fitasas en la alimentación de aves, no sólo se mejora la digestibilidad del fósforo fítico, sino que además se reduce hasta en un 30% su eliminación al medio. En un estudio

realizado por Gordon y Roland (1997) se registró la excreción de fósforo. En el tratamiento con menor nivel de fósforo no fítico (0,1%) con la adición de la enzima fitasa, se excretó un 25% menos de fósforo que el mismo nivel sin suplementación (3,71 mg/gr y 4,48 mg/gr respectivamente). En este contexto, Simons *et al.* (1992) describe una reducción del 33% utilizando fitasa. Lim *et al.* (2003) señalan que la fitasa (300 U/kg) disminuye la excreción de fósforo en un 11, 76%. Keshavarz (2003a) encontró que la excreción de fósforo en dietas bajas en FD (0,25-0,2-15%) suplementadas con el mayor nivel de fitasa (300 U/kg.) fue un 55,6% menor que el control sin suplementación. Terreros (2001) encontró que la incorporación fitasa en orden de 300 y 600 U./kg de dieta permitió disminuir la excreción de fósforo en un 3,91% y 12,61% respectivamente. Kornegay (2001) indica que la excreción de fósforo se reduce en un 31,9% al utilizar 500 U de fitasa/kg de dieta.

Keshavarz y Austic (2004) realizaron un estudio de retención de fósforo y nitrógeno en gallinas ponedoras alimentadas con niveles bajos de fósforo disponible (0,2%) y encontraron que la incorporación de la enzima fitasa a niveles de 300 U/kg. de dieta disminuye significativamente la excreción de fósforo y nitrógeno en 48 y 45% respectivamente.

Todas estas evidencias contrastan con lo observado por Keshavarz (2000b) quien describe que la adición de fitasa no tuvo un efecto sobre la excreción total de fósforo y la ingesta diaria de dicho mineral.

α -AMILASAS, PROTEASAS Y XILANASAS.

El uso de enzimas en algunas partes del mundo es una práctica rutinaria en la alimentación de aves. Las enzimas mejoran la eficiencia de la producción, permiten el uso de insumos de baja calidad nutritiva y reduce la excreción de nutrientes al medio ambiente. Los ingredientes de las dietas rara vez son

absorbidos en su totalidad, por lo que su digestibilidad es susceptible a ser mejorada. Además, muchos nutrientes se encuentran formando complejos entre sí, por lo que es frecuente encontrar complejos multi enzimáticos utilizados con el objeto de obtener mejores resultados que utilizando las enzimas por separado (Classen, 1996).

Descripción del complejo multi enzimático en estudio.

El complejo multi enzimático utilizado en el presente estudio corresponde a Avizyme® 1502, fabricado por Danisco² el cual esta compuesto de 600 U/g de **xilanasa** proveniente de *Trichoderma longibraquiatum*, 8000 U/g de **proteasa** proveniente de *Bacillus subtilis* y 800 U/g de **α-amilasa** proveniente de *Bacillus amyloliquifaciens*.

Variabilidad de los insumos utilizados en la alimentación de aves.

Uno de los motivos por el cual se utilizan enzimas en nutrición avícola es la variabilidad presente en los alimentos. Aunque se considera que insumos vegetales como el maíz, la soya y el sorgo son homogéneos y la digestibilidad de sus nutrientes alta, es un hecho que existen variaciones importantes, incluso dentro de un mismo insumo. 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).

² Danisco Animal Nutrition. P.O. box 470157, St. Louis, Missouri, 63147, E.E.U.U.

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 Leeson y Summers (1976, citado por Hruby y Pierson, 2002) que señalan 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, los polisacáridos no amiláceos (PNA) son responsables del 70 a 80% de la variación en su valor nutritivo (Choct *et al.*, 1996). 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 (Elliot, 2004). Douglas *et al.* (2000, citado por Dudley-Cash, 2001) 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.

Áreas de acción del complejo multi enzimático.

El uso de enzimas exógenas a menudo influye en la digestibilidad de los nutrientes aportados por la dieta. Se describen 4 áreas en las cuales las enzimas estarían ayudando a incrementar la digestibilidad de la dieta y a reducir la variabilidad presente en los alimentos:

1. Mejoramiento de la digestibilidad de las dietas mediante la destrucción de las paredes celulares.

Las paredes celulares sirven como barrera física entre las enzimas digestivas del ave y los nutrientes como almidón, proteína y aceite contenidos en los insumos, impidiendo directamente el acceso de las enzimas a sus sustratos o atrasando la digestión de los nutrientes hacia el segmento posterior del intestino delgado, donde el animal deberá competir con la mayor población bacteriana presente en ese segmento por la utilización de estos nutrientes (Classen, 1996). Enzimas como xilanasas y β -glucanasas ayudarían en la digestibilidad al romper las paredes celulares que cubren el endosperma, permitiendo un acceso rápido de las enzimas como amilasas y proteasas endógenas del ave al contenido celular, lo que permite una digestión mas completa del alimento (Bedford, 1996; Bedford y Schulze, 1998).

2. Mejoramiento de la digestibilidad de las dietas mediante la destrucción de los factores antinutricionales (FAN) presentes en ellas.

Si bien los cereales utilizados en dietas de aves son fuentes concentradas de energía y otros nutrientes, contienen además un número importante de polisacáridos no amiláceos (PNA), los cuales son pobremente digeridos por el ave. A modo de ejemplo, pese a que el maíz es considerado un cereal con un alto porcentaje de digestibilidad (tan bueno como 95%) y no posee problemas importantes por PNA, se describe a nivel ileal una digestibilidad que no supera el 85% (Noy y Sklan, 1995 citado por Pack *et al.*, 1998). El almidón no digerido pasa al intestino grueso, donde es fermentado por la microflora y no es utilizado por el ave (Elliot, 2004).

Las enzimas actuarían al hidrolizar completamente los PNA a monosacáridos, para su posterior absorción. La glucosa liberada mediante la hidrólisis total de estructuras como los β -glucanos, no presentaría problemas en su absorción, pero la degradación total de los pentosanos a arabinosas y xilosas puede causar efectos antinutricionales al ser sustrato energético para varios microorganismos (Bedford y Schulze, 1998; Huyghebaert, 2003) por lo que en este caso la hidrólisis total no sería deseable (Classen, 1996). En orden de mejorar el valor nutritivo de los granos, las enzimas deben hidrolizar un número reducido de enlaces y con esto reducir el peso molecular, lo que es suficiente para reducir la viscosidad del quimo intestinal y facilitar el acceso a los nutrientes (Classen, 1996; Bedford y Schulze, 1998).

En dietas basadas en trigo, el contenido de arabinoxilanos es el responsable del aumento de la viscosidad intestinal. El aumento en la viscosidad altera la dinámica digestiva, en especial la difusión de nutrientes y su interacción con las enzimas digestivas, disminuyendo la eficiencia en el proceso de digestión (Classen, 1996; Tucker *et al.*, 2000; Huyghebaert, 2003). Además, como ha sido

mencionado anteriormente, enzimas como la xilanasas permiten disminuir la viscosidad y por ende, aumentar la digestibilidad de nutrientes al disminuir las alteraciones en la difusión de nutrientes y en el proceso de mezclado del quimo intestinal (Bedford, 1996; Bedford y Schulze, 1998; Hruby, 2003).

La magnitud de la respuesta a la suplementación enzimática depende de la calidad inicial del grano. En este sentido, granos poco viscosos como el maíz no responden marcadamente y en forma consistente a la adición de enzimas, mientras que en granos altamente viscosos como el centeno, el ave debe adaptarse a medida que la viscosidad aumenta, incrementando la secreción de enzimas pancreáticas y bilis, lo que aumenta la utilización de energía en el proceso digestivo, disminuyendo la productividad del animal. (Bedford, 1996). Granos muy viscosos sobrepasan la capacidad adaptativa del ave, por lo que los nutrientes pasan por el intestino sin ser digeridos (Bedford, 1996). Es precisamente en los granos altamente viscosos donde se espera una mayor respuesta a la suplementación enzimática.

En el caso de la soya, los FAN que requieren una mayor atención son los inhibidores de tripsina y las lectinas. Es un hecho conocido que dietas con cantidades importantes de estos FAN poseen un efecto negativo en la producción y digestibilidad de nutrientes (Classen, 1996). En este contexto, se ha visto en cerdos que al incorporar inhibidores de tripsina a razón de 0,21 g./kg. de alimento, disminuye la digestibilidad ileal de proteína en un 15% (Jansman *et al.*, 1994 citado por Bedford, 1996). El procesamiento térmico de la soya es ampliamente utilizado en la industria de alimentos con el objeto de disminuir, o en su defecto eliminar estos FAN, pero existe la posibilidad de encontrar partidas de insumos con niveles significativos de inhibidores de tripsina y lectinas o dañadas por un exceso de calor (Classen, 1996).

La incorporación de proteasas ha sido estudiada como una alternativa o complemento al procesamiento térmico de la soya. Se han observado mejoras en el rendimiento en pollos broilers debido a la adición de enzimas que degradan las lectinas e inhibidores de tripsinas en soya cruda al ser pre-incubada con proteasas, resultando en una mejora del 60% en la tasa de crecimiento y en 23% en la eficiencia de conversión alimenticia, al ser comparada con el control sin enzimas (Hessing *et al.*, 1995 citado por Bedford, 1996).

La acción de las proteasas en este sentido, no se limita a los FAN presentes en la soya, sino que puede hidrolizar otras proteínas, lo que ampliaría su uso a dietas de mala calidad proteica, FAN y proteínas antigénicas (Classen, 1996).

3. Mejoramiento de la digestibilidad de las dietas mediante la complementación de las enzimas del huésped.

El tracto digestivo no tiene una capacidad enzimática y digestiva suficiente para hacer frente a todos los tipos de dietas (Bedford, 1996). A medida que el ave crece, aumenta la producción de bilis y enzimas pancreáticas, pero existen ciertas ocasiones en las cuales la producción endógena de enzimas proteolíticas, aminolíticas y lipolíticas se ve superada por los requerimientos, por lo que la suplementación de complejos enzimáticos potenciaría de manera importante la acción de las enzimas endógenas (Bedford, 1996; Bühler *et al.*, 1998).

4. Mejoramiento de la digestibilidad de las dietas mediante la manipulación de la población de la microflora intestinal.

La dieta tiene una influencia significativa sobre la capacidad fermentativa de la población microbiana presente en íleon y ciegos y puede además alterar la proporción de la energía utilizada por la microflora en desmedro del ave. El uso de la enzima xilanasas ha alterado los patrones de fermentación, reduciendo este proceso en el íleon y estimulándolo en los ciegos (Bedford, 1996, Revington,

2002). La disminución de la fermentación en el íleon podría ser beneficiosa debido a que el material que es sometido a fermentación correspondería básicamente a almidón y proteínas sin digerir, los cuales se encontrarían disponibles para ser utilizados por el ave en condiciones normales (Bedford, 1996). La estimulación de la fermentación en los ciegos estaría dada por la presencia de oligosacáridos de pequeño peso molecular provenientes de la acción de la xilanasas, los cuales entrarían a los ciegos y se convertirían 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, 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*), favorece el proceso de exclusión competitiva de la flora patógena, y por su parte, el propionato ha sido identificado como un elemento tóxico para organismos patógenos como *Salmonella*, *Campylobacter* y *Clostridium* (Revington, 2002). 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 (Hruby, 2003), además de mejorar el estado inmunitario del animal y debido a todo esto, favorece una mayor productividad (Bedford, 1996).

Mecanismos de acción de α -amilasas, proteasas y xilanasas.

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). En aves alimentadas con

vegetales poco viscosos como el maíz y la soya, el objetivo del uso del complejo multi enzimático sería aumentar la digestibilidad de los nutrientes, principalmente el almidón contenido en los cereales y las proteínas vegetales (Wyatt y Newcombe, 1999). En el caso del almidón, se esperaría un aumento en su digestibilidad en intestino delgado. Amilasas y xilanasas actúan sobre la digestibilidad energética al exponer más rápidamente el almidón a la digestión intestinal y se especula que las proteasas actúan sobre la disolución de proteínas, exponiendo gránulos de almidón incrustados en proteínas estructurales del grano (Bedford y Pack, 1998). Existen evidencias que parte de la energía obtenida de las dietas de ponedoras provienen de la fermentación microbiana en los ciegos (Wyatt y Newcombe, 1999). Al suplementar las dietas con el complejo multi enzimático 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 presente en intestinos, la cantidad y perfil de AGV, afectando de esta manera la disponibilidad de energía y el consumo de alimento (Wyatt y Newcombe, 1999).

Sobre la digestibilidad de proteínas, el efecto del complejo multi enzimático estaría dado por una reducción de las pérdidas endógenas de aminoácidos más que 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 manera similar. Sakomura *et al.* (1998, citado por Wyatt y Newcombe, 1999) informan que el uso del complejo multi enzimático 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 secreciones endógenas del ave (enzimas pancreáticas, recambio de enterocitos y mucosa), el contenido de lisina

se asocia a la fuente dietaria y endógena, mientras que el contenido de metionina se relaciona en forma casi directa al aporte dietario (Wyatt y Newcombe, 1999). Los resultados antes mencionados avalan la hipótesis de que la acción del complejo multi enzimático estaría dado por una reducción de las pérdidas endógenas, mas que aumentar la digestibilidad de los aminoácidos dietarios (Bedford y Pack, 1998; Wyatt y Newcombe, 1999).

El uso de proteasas traería mayores beneficios sobre la digestibilidad energética que sobre la proteica. Las aves al dedicar menos energía al proceso de digestión, pueden derivar esta energía al proceso productivo, como la producción de huevos y la ganancia de peso (Wyatt y Newcombe, 1999). Además, las proteasas al degradar proteínas que encapsulan los gránulos del almidón, afectan además de manera indirecta la digestibilidad de la energía (Wyatt y Newcombe, 1999).

En el caso de la harina de soya, los factores antinutricionales inhibidores de tripsina y lectinas serían degradados por las proteasas del complejo multi enzimático, pero faltan mayores estudios in vivo que avalen esta aseveración (Bedford y Pack, 1998).

Aplicación del complejo multi enzimático en dietas de aves ponedoras.

El complejo multi enzimático puede ser incorporado a las raciones de aves de dos formas (Wyatt y Newcombe, 1999; Scheideler y Weber, 2003):

1. “Over the top”: en esta modalidad, el complejo multi 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”: aquí se considera al momento de formular las dietas el aporte que realiza el complejo multi 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.

Complejo multi enzimático y productividad.

Diversos han sido los resultados obtenidos en los indicadores productivos al incorporar el complejo multi enzimático en dietas de gallinas ponedoras.

En un experimento realizado por Scheideler y Abudabos (1998), en dietas basadas en maíz y harina de soya, la suplementación en dietas con baja energía metabolizable (2850 kcal./kg. de dieta) con amilasas, proteasas y xilanasas (Avizyme®1500) mejoró la producción de huevo en un 1,5% y la conversión alimenticia en gallinas ponedoras.

En un estudio llevado a cabo por Scheideler y Weber (2003) con gallinas ponedoras en las fases de pollitas (de 1 día a 16 semanas de edad) y postura (desde las 16 a las 40 semanas de edad) se evaluó el efecto de amilasas, proteasas y xilanasas y de dos planos energéticos (2900 y 2770 kcal./kg. de dieta el alto y el bajo, respectivamente) sobre algunos indicadores productivos. En este estudio, ni el nivel de energía de las dietas ni la incorporación del complejo multi enzimático afectaron significativamente el porcentaje de postura, pero encontraron que la adición de α -amilasas, proteasas y xilanasas a las dietas aumentó significativamente el peso de huevo en las dietas bajas en energía metabolizable.

Otro estudio realizado en Australia (Danisco, 1997d) con gallinas ponedoras de 74 semanas de edad, informa que la inclusión de α -amilasas, proteasas y xilanasas a una dieta formulada con 5% menos de energía metabolizable, proteína y metionina+cistina permitió llevar el porcentaje de postura y el peso de huevo a niveles de la dieta control sin restricción. Danisco (1999b) hace referencia a un estudio realizado por la Universidad de Nebraska en el cual se evaluó la incorporación de α -amilasas, proteasas y xilanasas a una dieta con 3% menos de energía sobre parámetros productivos en gallinas ponedoras de

25 a 40 semanas de edad. La inclusión del complejo multi enzimático permitió mantener el porcentaje de postura, peso de huevo, masa de huevo, ECA y consumo de alimento a niveles del control sin restricción energética, generando un ahorro en los costos de alimentación del orden de 2,5 dólares por tonelada de alimento.

Un experimento llevado a cabo por la empresa Wenger Feeds (Elliot, 2004) estudió el efecto de la incorporación de α -amilasas, xilanasas y proteasas a una dieta “down-spec” basada en maíz y soya en gallinas ponedoras de 24 a 44 semanas de edad. Esta dieta fue formulada con 5% menos de energía metabolizable, proteína y aminoácidos, y el rendimiento de las aves fue comparado con los obtenidos por aquellos animales alimentados con dos dietas controles (una con niveles adecuados de nutrientes y la otra “down-spec” sin suplementación enzimática). La disminución en el nivel de nutrientes deprimió significativamente el porcentaje de postura, la masa de huevo, el consumo de alimento y la ECA, sin tener un efecto sobre el peso de huevo. La adición del complejo multi enzimático a la dieta “down-spec” restauró todos los indicadores productivos a los niveles alcanzados por las aves alimentadas con la dieta control, significando además un ahorro importante en los costos de alimentación.

En un experimento de campo con gallinas ponedoras de 22 a 34 semanas de edad mencionado por Danisco (1999a), se disminuyó el nivel de energía metabolizable de las dietas en 100 kcal./kg. (un 3,6% menos) y se demostró que la adición del complejo multi enzimático mantuvo el porcentaje de postura y el peso de huevo en las dietas con restricción energética a niveles del control con mayor contenido de energía metabolizable.

Un experimento realizado en Filipinas (Danisco, 1998a) también con una dieta con 5% menos de energía metabolizable, proteína cruda, lisina y metionina

+ cistina, señala un aumento del porcentaje de postura a niveles del control sin restricción, no encontrando efecto alguno sobre el peso de huevo.

Sohail *et al.* (2002) evaluaron el efecto de incorporar el complejo multi enzimático en dietas con dos niveles de energía (alta y baja) y tres niveles de proteína (19,8, 18,7 y 17,4%) y encontraron un aumento significativo en el porcentaje de postura en dietas con 18,7% de proteína y ningún efecto sobre el peso de huevo, independiente del nivel energético o del porcentaje de proteína en la dieta.

Jiménez (2001) utilizando gallinas ponedoras de 23 semanas de edad, evaluó el efecto de un complejo multi enzimático compuesto por α -amilasas, proteasas y xilanasas a dos niveles distintos de energía, y concluyó que el uso de enzimas no afectó significativamente el porcentaje de postura, pero aumentó significativamente el peso del huevo en un 2,4% (de 60,58 grs. a 62,02 grs.), independiente del nivel de EMAn.

En un estudio realizado en la Universidad de Nebraska (Danisco, 1999d) en el cual se adicionó α -amilasas, proteasas y xilanasas “over the top” a dietas basadas en maíz y soya con 3 niveles de energía metabolizable distintos (2740, 2760 y 2780 kcal./kg.) y 17% de proteína en gallinas ponedoras de 40 a 50 semanas de edad, se encontró que la suplementación enzimática mejoró significativamente el porcentaje de postura, sin afectar el peso de huevo.

En otro ensayo conducido en España (Danisco, 1999c) con gallinas ponedoras de 24 a 36 semanas de edad, el cual se diseñó con dos tipos de dietas (la primera con 17% de proteína 2750 kcal./kg. de EMAn y la segunda con 16,4% de proteína y 2650 kcal./kg. de dieta de EMAn) y la adición o no del complejo multi enzimático compuesto por α -amilasas, proteasas y xilanasas a ambos tipos de dietas. Los resultados obtenidos indican que el uso de enzimas aumentó significativamente el porcentaje de postura en el período desde las 28 a

las 32 semanas de edad y el peso de huevo en el período desde las 32 a 36 semanas de edad.

Jaroni *et al.* (1999) evaluaron el efecto de un complejo enzimático compuesto por proteasas y xilanasas (Avizyme® 1300) sobre dietas basadas en afrechillo de trigo, no encontrando diferencias significativas en el porcentaje de postura, pero vieron que la suplementación enzimática aumentó significativamente el peso y masa de huevo.

Se han realizado diversos estudios de las enzimas pertenecientes al complejo, por separado o junto a otras enzimas con el objeto de evaluar su efecto sobre indicadores productivos. Halle (2001) evaluó, en gallinas ponedoras desde las 22 a las 42 semanas de edad, el efecto de xilanasas y β -glucanasas en dietas formuladas con un alto nivel de inclusión de granos de trigo (hasta un 60%) y adicionadas con distintos niveles de afrecho de trigo (hasta un 10%) sobre indicadores productivos. La adición de xilanasas y β -glucanasas mejoró significativamente la eficiencia de conversión alimenticia (ECA), sin afectar el porcentaje de postura y el peso de huevo. Lázaro *et al.* (2003) estudiaron el efecto de la incorporación de xilanasas y β -glucanasas en dietas basadas en trigo, cebada y centeno en gallinas ponedoras y encontraron que el uso de las enzimas aumentó el porcentaje de postura en 2,1%, sin presentar efecto sobre el peso de huevo. Mathlouthi *et al.* (2003) utilizando también xilanasas y β -glucanasas, pero en dietas basadas en maíz y soya no encontraron efectos de la suplementación enzimática sobre el porcentaje de postura, peso y masa de huevo.

Complejo multi enzimático y calidad de huevo.

Debido al gran impacto que poseen nutrientes como energía, proteína, ácidos grasos y aminoácidos sobre la calidad interna y externa del huevo, y la capacidad del complejo multi enzimático de liberar los nutrientes antes mencionados de los alimentos, se han realizado estudios con el fin de observar si

existe un efecto concreto al adicionar las enzimas en dietas de ponedoras sobre indicadores de calidad del huevo.

Los resultados obtenidos en los distintos estudios sobre el efecto del complejo sobre la calidad externa del huevo son variados. Un experimento realizado por Jiménez (2001) en gallinas ponedoras de 23 semanas de edad en las que se evaluó el efecto de un complejo multi enzimático compuesto por α -amilasas, proteasas y xilanasas sobre los indicadores de la calidad interna y externa del huevo, a dos niveles distintos de energía, concluyó que el uso de enzimas mejoró la gravedad específica y grosor de la cáscara en las dietas con bajo plano energético y no produjo un efecto sobre el porcentaje de huevos quebrados y sucios, la deformación y resistencia de la cáscara previa a la fractura independiente también del nivel energético.

Danisco (1999c) utilizando gallinas ponedoras de 24 a 36 semanas de edad, encontró que la adición del complejo multi enzimático compuesto por α -amilasas, proteasas y xilanasas a dietas con distintos niveles de EMAn (2750 y 2650 kcal./kg.) disminuían significativamente el porcentaje de huevos quebrados, lo que al final se tradujo en un mayor número de huevos vendibles a las 36 semanas de edad.

En un estudio realizado en la Universidad de Nebraska (Danisco, 1999d) en el cual se adicionó α -amilasas, proteasas y xilanasas “over the top” a dietas basadas en maíz y soya con 3 niveles de energía metabolizable distintos (2740, 2760 y 2780 kcal./kg.) se encontró que la suplementación enzimática mejoraba significativamente la gravedad específica. Gómez y Scheideler (1998) también informan un aumento significativo en la gravedad específica en dietas basadas en maíz y soya al ser suplementadas con el complejo multi enzimático.

Algo diferente es lo que informan Scheideler y Weber (2003) y Sohail *et al.* (2002), los cuales no encontraron diferencias significativas en la gravedad

específica atribuidas a la incorporación del complejo multi enzimático ni al nivel energético de las dietas en gallinas ponedoras.

Jaroni *et al.* (1999) al incorporar xilanasas y proteasas a dietas basadas en afrechillo de trigo evidenciaron aumentos significativos en los porcentajes de albúmina y yema, ausencia de efectos en el porcentaje de huevos sucios y en el porcentaje de cáscara y una disminución significativa en la gravedad específica. Lázaro *et al.* (2003) al incorporar β -glucanasas y xilanasas a dietas basadas en trigo, cebada y centeno encontró una disminución significativa en el porcentaje de huevos sucios.

Con respecto al efecto del complejo multi enzimático sobre los indicadores de calidad interna del huevo, existen resultados controversiales. Jiménez (2001) en dietas basadas en maíz y soya con dos niveles energéticos encontró un aumento significativo en la pigmentación de la yema del orden de 1,82%, independiente del nivel de energía y no observó efectos sobre las unidades Haugh y las razones peso/peso y volumen/volumen yema: albúmina, independiente del nivel energético. Concuerdan con el aumento en la pigmentación de la yema los resultados obtenidos en una prueba de campo en Italia (Danisco 1997a), estudio que informa un aumento en la pigmentación equivalente a 0,5 puntos en la escala de Roche[®].

Danisco (1999d) encontró un aumento numérico en el porcentaje de albúmina al agregar α -amilasas, proteasas y xilanasas a dietas de gallinas ponedoras. Algo distinto es lo informado por Gomez y Scheideler (1998), los cuales no encontraron diferencias al adicionar el complejo multi enzimático en las proporciones de yema, albúmina y cáscara.

Un estudio llevado a cabo por Roberts y Choct (1999) con dietas de trigo, cebada y avena a las cuales se adicionó xilanasas y β -glucanasas, evaluó el efecto de dichas enzimas sobre la calidad del huevo. La suplementación enzimática

mejoró la resistencia y peso de la cáscara y disminuyó el número de huevos trizados y quebrados, además de disminuir significativamente el color de la yema.

Complejo multi enzimático y digestibilidad de nutrientes.

En años recientes se han realizado diversos experimentos en pollos broilers y gallinas ponedoras con el fin de evaluar el efecto de la suplementación enzimática sobre la digestibilidad y retención de nutrientes.

En un ensayo realizado en pollos broilers utilizando distintas fuentes de harina de soya, la adición de amilasas, proteasas y xilanasas mejoró los valores de energía digestible, especialmente en fuentes de harina de soya con menor nivel de energía digestible, las que respondieron de mejor manera (Douglas *et al.*, 2000 citado por Dudley-Cash, 2001).

Se realizó un estudio de retención de nutrientes en gallinas ponedoras (Scheideler y Weber, 2003) en el cual se utilizaron dos niveles de energía metabolizable y la incorporación o no del complejo multi enzimático Avizyme® 1500 (amilasas, proteasas y xilanasas) en pollitas a la semana 12 de edad y en ponedoras a la semana 30 de edad de las aves. En la etapa de pollitas, la incorporación del complejo multi enzimático aumentó significativamente la retención de nitrógeno, independiente del nivel de energía de la dieta. En la etapa de postura, la incorporación de amilasas, proteasas y xilanasas aumentaron significativamente la retención de nitrógeno en las dietas con el menor plano energético, y la de energía metabolizable independiente del nivel de energía de las dietas.

Un estudio realizado en el Reino Unido (Danisco, 1998b) en broilers alimentados con dietas de maíz-soya encontró un aumento significativo del 3,2% en la digestibilidad ileal de energía y del 1% en la del almidón al utilizar el complejo multi enzimático. Danisco (1998c) también señala un aumento en la digestibilidad ileal de energía del 1,9% y del almidón del orden de 0,9% al

incorporar amilasas, proteasas y xilanasas a las dietas de pollos broilers. Otros estudios informan de la ausencia de efecto del uso de amilasas, proteasas y xilanasas sobre la digestibilidad de energía en gallinas ponedoras (Scheideler, 1998) patos (Burrows *et al.*, 2002) y pavos (Persia *et al.*, 2002).

Zanella *et al.* (1999) adicionaron α -amilasas, proteasas y xilanasas a dietas de pollos broilers basadas en soya y midieron el efecto de la suplementación enzimática sobre la digestibilidad ileal de nutrientes, encontrando una mejora significativa en la digestibilidad ileal de proteína, energía, almidón, grasa y algunos aminoácidos como tirosina, cistina, valina y treonina, sin ser significativo para lisina y metionina. Pack *et al.* (1998) también encontraron un aumento importante en la digestibilidad ileal de proteína total, cistina y treonina, un aumento leve en la digestibilidad de lisina y mínimo para la metionina. Distinto es lo informado por Danisco (1998b) en el cual no se manifestaron efectos significativos al incorporar las enzimas sobre la digestibilidad ileal de proteína y extracto etéreo.

Lázaro *et al.* (1999) evaluaron en pollos broiler alimentados con dietas basadas en trigo y maíz el uso de amilasas, β -glucanasas, proteasas y xilanasas sobre digestibilidad de nutrientes, encontrando un aumento significativo en la digestibilidad de energía metabolizable y proteína cruda en dietas basadas en trigo de 3,2 y 5,7% y de 2,4 y 7,4% para las dietas basadas en maíz, respectivamente..

Gracia *et al.* (2003b) evaluaron el efecto de la suplementación de 20.000 U de xilanasas, 19.000 U de proteasas y 90 U de α -amilasas sobre la retención de nutrientes. La incorporación de las enzimas aumentó significativamente la retención fecal aparente de materia seca, materia orgánica, fibra neutrodetergente, almidón, extracto etéreo y energía metabolizable en broilers de 21 días de edad alimentados con dietas basadas en cebada. Gracia *et al.* (2003a) al incorporar α -amilasas en dietas de pollos broilers basadas en trigo encontraron un aumento

significativo en la digestibilidad fecal de materia orgánica, almidón y energía, sin efecto sobre la digestibilidad de proteína y extracto etéreo.

Bedford (1997) evaluó el efecto de la suplementación en pollos broilers de 21 días de edad con 3.000 U de xilanas/kg. en dietas basadas en trigo sobre la digestibilidad ileal aparente de energía, proteína y aminoácidos. Al adicionar xilanas a la dieta aumentó significativamente la digestibilidad ileal de energía, proteína, cisteína, metionina, arginina, treonina y lisina. En un estudio realizado por Rostagno *et al.* (2000) en el cual se incorporó celulasas, amilasas y proteasas a dietas de maíz y soya para pollos broilers, se informó un aumento significativo en la digestibilidad ileal de proteína (3%) y energía metabolizable (1,3%).

La incorporación de enzimas a las dietas de aves mejora además la digestibilidad de minerales. En el experimento llevado a cabo por Scheideler (1998) en gallinas ponedoras de 25 semanas de edad, la suplementación de α -amilasas, proteasas y xilanasas mejoraron significativamente la digestibilidad ileal de calcio. Rostagno *et al.* (2000) señalan en pollos broilers un aumento en la digestibilidad ileal de fósforo y calcio en un 4,7 y 7,9% respectivamente. Scheideler y Weber (2003) encontraron en la etapa de pollitas que la adición del complejo multi enzimático compuesto por amilasas, proteasas y xilanasas mejoraba significativamente la retención de fósforo en el nivel energético alto.

Lázaro *et al.* (2003) al incorporar β -glucanasas y xilanasas a dietas de gallinas ponedoras basadas en trigo, cebada y centeno encontraron un aumento significativo en la digestibilidad aparente de energía, materia seca, extracto etéreo y polisacáridos no amiláceos. Saleh *et al.* (2003) evaluaron el uso de celulasas, xilanasas, pectinasas, hemicelulasas, glucanasas, fitasas y proteasas sobre la digestibilidad *in vitro* de proteína cruda y materia seca en afrecho de soya. Al adicionar todas las enzimas juntas, salvo las proteasas, se obtuvo el máximo de

digestibilidad de proteína cruda y al incorporar proteasas, estas ejercieron un efecto inhibitorio sobre el resto de las enzimas.

Complejo multi enzimático y medio ambiente.

Uno de los principales problemas derivados de la producción animal es la contaminación del medio ambiente. El nitrógeno, junto con el fósforo, es uno de los principales agentes contaminantes (Mühlhauser, 1983).

Existen diferentes mecanismos a través de los cuales se puede disminuir la cantidad de nitrógeno excretado. Una opción es disminuir el nivel de nitrógeno mediante la reducción del contenido de proteína en la dieta. Yamazaki *et al.* (1996 citado por Hruby y Barratt, 2000) encontraron que el nivel de nitrógeno excretado por aves de 7 a 14 días de edad durante cuatro días fue de 3,93; 3,26; 2,35 y 2,19 gramos por ave a niveles de proteína dietaria de 23, 21, 19 y 17% respectivamente, lo que implica una reducción del orden del 10 a 20% en la excreción de nitrógeno. El problema es que puede producirse una disminución en el rendimiento de las aves si no son ajustados los niveles de aminoácidos.

Otra alternativa es el uso de enzimas, las que permitirían, sin sacrificar el rendimiento del ave, aumentar la digestibilidad de la proteína dietaria. Muchos estudios han informado de un aumento de la digestibilidad de proteína al utilizar el complejo multi enzimático (Pack *et al.*, 1998; Scheideler, 2000; Burrows *et al.*, 2002). Zanella *et al.* (1999) mencionan un aumento en la digestibilidad ileal de proteína cruda del 2,9% al utilizar amilasas, proteasas y xilanasas en dietas de pollos broilers. Scheideler y Weber (2003) encontraron un aumento significativo en la retención de nitrógeno al incorporar el complejo multi enzimático. En un estudio realizado por el centro de investigación avícola NUTRECO (Danisco, 1999c, Hruby y Barratt, 2000) se obtuvo un incremento en la digestibilidad ileal de proteína del orden del 9%. Si consideramos que mil ponedoras producen 650 kg. de nitrógeno por año proveniente de su excreción fecal, el aumento en la

digestibilidad ileal de proteína de 9% se traduciría en una producción anual de 570 kg. de nitrógeno, un ahorro del 12,31% (Hruby y Barratt, 2000).

Aunque limitada, existe información del efecto benéfico del uso de enzimas carbohidrasas y proteasas sobre la digestibilidad del fósforo. Rostagno *et al.* (2000) al suplementar dietas basadas en soya y maíz de pollos broilers con celulasas, amilasas y proteasas encontraron un aumento en la digestibilidad ileal de proteína de 3% y un incremento de 4,7% en la digestibilidad ileal de fósforo. Scheideler y Weber (2003) también mencionan un aumento en la retención de fósforo en gallinas ponedoras en la etapa de pollitas al incorporar amilasas, proteasas y xilanasas a las dietas con alto contenido de energía metabolizable.

Las evidencias aquí presentadas indican que la inclusión de enzimas a las dietas, considerando su costo como insumos, no solo pueden mejorar la rentabilidad del rubro avícola al incrementar la productividad y disminuir los costos de formulación, sino que además se transforman en una herramienta útil para disminuir el impacto de la producción animal sobre el medio ambiente.

Complejo multi enzimático y microflora intestinal.

La microflora intestinal es una parte integral del sistema digestivo del ave. Los microorganismos obtienen la energía que utilizan para el crecimiento y la reproducción de los componentes de la dieta que no han sido digeridos apropiadamente por escapar a la acción de los fluidos digestivos o debido a que su digestión es tan lenta que permite a los microorganismos competir por los sustratos (Apajalahti, 2003). La mayoría de las bacterias pertenecientes a la comunidad intestinal dependen de factores de crecimiento otorgados por microorganismos o de secreciones del huésped (Apajalahti, 2003).

Durante los últimos años, se han introducido prohibiciones en Europa y Japón del uso de antibióticos como promotores de crecimiento. Problemas asociados a su utilización, como la resistencia bacteriana, ha obligado a la

industria avícola a buscar alternativas al uso de drogas anti microbianas. Se ha discutido previamente como la composición del alimento posee un efecto sobre la microflora intestinal, por lo que el uso de enzimas podría ser una alternativa viable para ser utilizada como promotor de crecimiento (Hruby y Pierson, 2002; Revington, 2002; Huyghebaert, 2003).

Debido a la creciente preocupación sobre la efectividad del uso de enzimas para reemplazar a los antibióticos promotores de crecimiento, se han realizado algunos estudios que comparan el uso de ambos suplementos. Revington (2002) informa que estudios llevados a cabo con pollos broilers alimentados con dietas basadas en maíz y soya, arrojaron que el uso de enzimas aumenta la eficiencia de conversión alimenticia en un 5,9%, mientras que los antibióticos sólo lo hacían en un 3,3%. Rosen (2001, citado por Hruby y Pierson, 2002) también describe una mayor respuesta de las enzimas sobre los antibióticos en este mismo indicador (5% contra 2,9% respectivamente).

Este efecto adicional del uso de enzimas tiene una vital importancia en la industria avícola. Mercados exigentes prohíben el uso de la mayoría de antibióticos como promotores de crecimiento, lo que se suma a una creciente demanda de parte del consumidor por productos inocuos y de gran calidad. En este último punto, la industria y los centros de investigación están llevando a cabo estudios sobre el efecto de las enzimas sobre la microflora intestinal, en especial las especies patógenas.

Se ha visto que enzimas utilizadas comúnmente para mejorar el rendimiento en aves disminuyen el número de bacterias patógenas como *Salmonella* y *Campylobacter* (Hruby, 2003). El efecto concreto es que estas enzimas, al aumentar la digestibilidad de la dieta, cambian la cantidad y calidad del sustrato disponible para la microflora (Hruby, 2003).

Se llevó a cabo un estudio por Fernández *et al.* (2002) utilizando pollos broilers inoculados con 10^4 unidades formadoras de colonias (u.f.c.) de *Campylobacter jejuni*. Estas aves fueron alimentadas con una dieta basada en trigo, a la cual se suplementó un complejo multi enzimático compuesto por proteasas y xilanasas (Avizyme[®] 1300) y se compararon los resultados obtenidos con un control alimentado con la misma dieta sin suplementación enzimática y otro tratamiento con una dieta basada en maíz. Los resultados obtenidos indican que la viscosidad intestinal y el número de *Camp. jejuni* fueron significativamente menores en la dieta con suplementación enzimática que los valores obtenidos por el control, y similares a los obtenidos por la dieta basada en maíz.

Hruby (2003) hace referencia a otro estudio llevado a cabo por la Universidad de Bristol, en el cual se evaluó el efecto de dos complejos multi enzimáticos (Avizyme[®] 1300 para dietas basadas en trigo y Avizyme[®] 1500 para dietas basadas en maíz) en pollos broilers inoculados con 10^4 ó 10^6 u.f.c. de *Camp. jejuni* a los días 4 y 5 de edad; se cuantificó la población bacteriana en ciegos a los días 12 y 33 de edad. Se encontró una reducción de un 66% en el número de *Camp. jejuni* en las aves que consumieron las dietas basadas en trigo suplementadas con el complejo multi enzimático, y una reducción de un 33% en las u.f.c. presentes en los pollos broilers alimentados con las dietas basadas en maíz al adicionar el complejo enzimático, ambos resultados comparados a sus respectivos controles sin suplementar. Paralelamente, se evaluó el efecto de ambos complejos enzimáticos en pollos broilers alimentados con dietas basadas en trigo y otras en maíz, inoculados con concentraciones de 10^4 a 10^6 u.f.c. de *Salmonella enteritidis* al día de edad, registrándose el número de bacterias presente en ciegos a los días 14 y 17 de edad de las aves. Los resultados fueron una disminución del orden del 60% en el número de *Salmonella* presente en aves alimentadas con dietas basadas en maíz y suplementadas con amilasas, proteasas

y xilanasas, además de observar una disminución significativa en el número de *Salmonella* al incorporar proteasas y xilanasas a las dietas basadas en trigo. Además, el número de animales positivos a *Salmonella* fue menor en los tratamientos suplementados con los complejos multi enzimáticos (Hruby, 2003).

Francis *et al.* (1999 citado por Hruby y Pierson, 2002) también mencionan una disminución de u.f.c. de *Salmonella* y *Clostridia* en dietas suplementadas con el complejo multi enzimático compuesto por α -amilasas, proteasas y xilanasas (Avizyme[®] 1500), además de un aumento en las concentraciones de AGV (medidas por el ácido acético) en dichas dietas.

Un estudio llevado a cabo por la Universidad de Auburn (Danisco, 2004) respalda el rol del complejo multi enzimático en el control de *Salmonella* en pollos broilers. Mil ciento veinte (1120) machos fueron expuestos a 4 serotipos de *Salmonella* y alimentados con dietas basadas en maíz y soya, con y sin suplementación enzimática de α -amilasas, proteasas y xilanasas (Avizyme[®] 1502). Se tomo una muestra de las deyecciones de las aves para detectar la presencia de *Salmonella* en ciegos 18 horas después de la exposición, resultando todas las aves positivas. A las ocho semanas de experimento, el 21% de las aves del grupo control sin suplementación enzimática resultaron positivas a *Salmonella*, y ningún ave del grupo suplementado con α -amilasas, proteasas y xilanasas resultó positiva a *Salmonella*.

Los estudios antes mencionados hacen referencia al efecto benéfico del complejo multi enzimático frente a desafíos de microorganismos patógenos, pero es de vital importancia determinar si existe un posible efecto del complejo sobre la microflora intestinal en condiciones productivas.

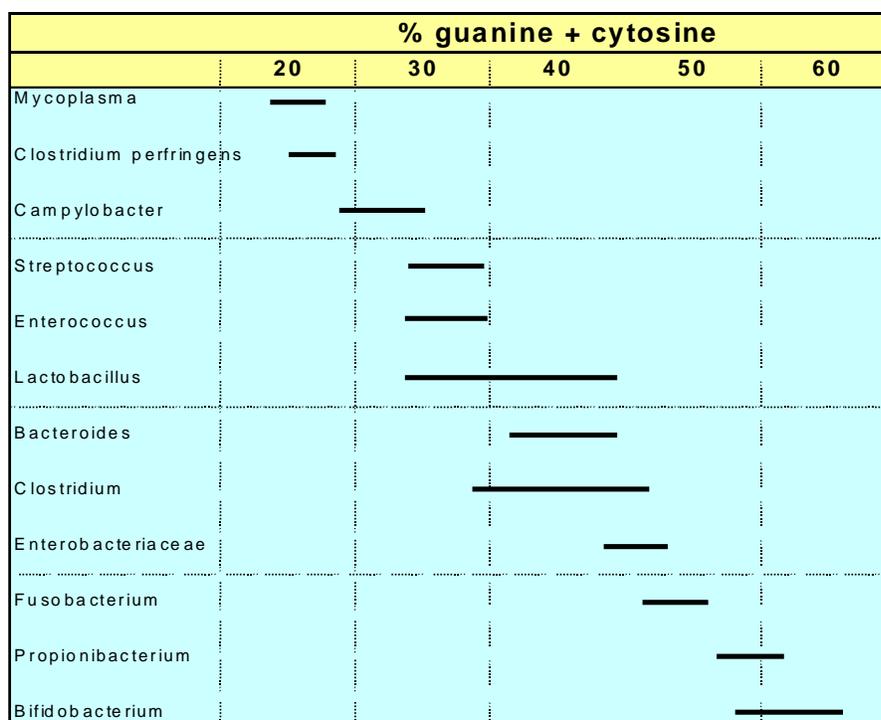
Existen pocos métodos específicos capaces de medir cambios en la dinámica poblacional del tracto intestinal. Todas las bacterias que alcanzan el tamaño suficiente pueden ser detectadas mediante microscopía de fluorescencia,

pero solo unas pocas pueden ser cultivadas en condiciones de laboratorio (Apajalahti, 2003).

En la actualidad para aumentar la especificidad se utilizan métodos basados en el reconocimiento del ADN, entre los cuales se encuentran el análisis del contenido de guanina+citosina presente en el ADN bacteriano, hibridización (arreglo de ADN), reacción en cadena de la polimerasa con primers específicos y la determinación de la secuencia del ADN ribosomal 16S (Apajalahti, 2003).

En la figura N°3 se puede observar los rangos de %G+C de algunos grupos de bacterias en el tracto gastro intestinal del ave informado por Danisco³.

Figura N° 3.- Rangos de %G+C de algunos grupos microbianos presentes en el tracto digestivo de gallinas (Danisco).



Una vez finalizado el estudio realizado por Jimenez (2001), se efectuó un análisis de la microflora intestinal y como el uso del complejo multi enzimático y los dos niveles energéticos distintos alteraban su composición (Pierson, 2003).

³ Danisco Innovation, Sokeritehtaantie 20, 02460, Kantvik, Finlandia.

Los resultados indicaron que el complejo multi enzimático no tuvo efectos significativos sobre la microflora total en dietas basadas en maíz con el nivel de energía metabolizable normal, pero aumentó la abundancia relativa de microflora en el rango de % guanina + citosina (%G+C) 45-69 al menor nivel de EMAn dietaria. Estos resultados demuestran el efecto benéfico del complejo multi enzimático al aumentar la población de bacterias consideradas como benéficas en desmedro de las patógenas.

No toda la literatura menciona una interacción positiva al adicionar el complejo multi enzimático con la microflora intestinal. Persia *et al.* (2002) evaluó en pavas el uso de α -amilasas, proteasas y xilanasas en dietas basadas en maíz o trigo como primer cereal, no encontrando efectos sobre la microflora total en ciegos, aunque observaron una disminución marcada de bacterias que degradan el almidón en aves alimentadas con la dieta basada en trigo.

En un estudio realizado por Nava *et al.* (2002) se evaluó el efecto de incorporar α -amilasas, proteasas y xilanasas en pollos broilers alimentados con dietas altas en trigo y un desafío de coccidias ($10^{4.7}$ *Eimeria acervulina*; $10^{3.3}$ *E. maxima* y $10^{4.3}$ *E. tenella* por ave). Se elaboraron tres tratamientos, el primero con dieta alta en trigo, sin enzimas y sin desafío de coccidias; el segundo con dieta alta en trigo, con enzimas y desafío de coccidias, y el tercero (control) dieta alta en trigo y con desafío de coccidias, sin suplementación enzimática. A los 20 y 26 días de edad de las aves, se analizó el contenido ileal para coliformes, levaduras, enterobacteriaceae y *Clostridium* sp. Los resultados arrojaron un mayor conteo de coliformes, levaduras, enterobacteriaceae y *Clostridium* sp. para el tratamiento con suplementación enzimática. Además, 3 aves murieron del tratamiento 2 y todas mostraron signos de enteritis necrótica. Los autores concluyeron que la suplementación enzimática con α -amilasas, proteasas y xilanasas y el desafío de coccidias pueden inducir la presentación de enteritis necrótica en pollos broilers.

Como se ha podido observar en esta revisión bibliográfica, la literatura informa resultados controversiales al incorporar a dietas de gallinas ponedoras comerciales las enzimas fitasa y el complejo multi enzimático compuesto por α -amilasas, proteasas y xilanasas sobre los parámetros productivos, calidad interna y externa del huevo y digestibilidad de nutrientes, pero no existen estudios publicados que utilicen ambos suplementos en forma simultanea.

El presente trabajo pretende demostrar la acción en conjunto de la enzima fitasa y un complejo multi enzimático compuesto por α -amilasas, proteasas y xilanasas sobre el porcentaje de postura, el peso del huevo, la calidad interna y externa del huevo y sobre la digestibilidad ileal aparente de energía y proteína dietaria.

HIPÓTESIS DE TRABAJO.

La suplementación de dietas de gallinas de postura comercial con una fitasa junto con un complejo enzimático a base de proteasas, α -amilasas y xilanasas, tiene efectos beneficiosos sinérgicos sobre la calidad del huevo, indicadores productivos y sobre la digestibilidad de fracciones nutritivas de sus dietas.

OBJETIVOS.

Objetivo general.

Evaluar los efectos sobre la calidad del huevo, algunos parámetros productivos y sobre la digestibilidad de algunas fracciones nutritivas, del uso de dos tipos de enzimas exógenas agregadas a las dietas de gallinas ponedoras comerciales.

Objetivos específicos.

1. Estudiar el efecto del uso independiente y combinado de las enzimas fitasa y complejo multi enzimático a base de proteasas, α -amilasas y xilanasas agregadas en dietas de gallinas ponedoras sobre el porcentaje de postura y sobre el peso de huevo.
2. Estudiar el efecto del uso independiente y combinado de las enzimas fitasa y complejo multi enzimático a base de α -amilasas, proteasas y xilanasas agregadas en dietas de gallinas ponedoras sobre indicadores de la calidad interna y externa del huevo.
3. Determinar la digestibilidad ileal aparente de proteína y energía en la dieta de gallinas ponedoras comerciales suplementadas con fitasa, α -amilasas, proteasas y xilanasas.

MATERIALES Y MÉTODOS.

El presente estudio se llevó a cabo en las instalaciones experimentales de gallinas de postura en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (anexo A.1). Ciento cuarenta y cuatro gallinas de postura de raza Leghorn Hy-Line W-36 (anexo A.2) de 18 semanas de edad, fueron distribuidas aleatoriamente en 36 jaulas con 4 gallinas en cada una. Las aves se asignaron a 4 tratamientos, cada uno de ellos contó 3 repeticiones, con 12 gallinas por repetición, disponiéndose así de 36 gallinas por tratamiento.

Tamaño de muestra.

El tamaño de muestra se determinó considerando la variabilidad de algunos indicadores. Se utilizó para este efecto dos características:

1. Peso de Huevo: con una desviación estándar de 5,72 para detectar diferencias con 99 % de potencia y un $\alpha = 1 \%$, se requiere de 36 aves por tratamiento.
2. Deformación de la cáscara: con una desviación estándar de 0,078 para detectar diferencias con 99 % de potencia y un $\alpha = 1 \%$, se requiere de 36 aves por tratamiento.

Este experimento presentó un diseño factorial de tratamientos de 2 x 2, siendo las variables en estudio la enzima fitasa (Phyzyme®¹ a 0,06 kg./ton. de alimento), el complejo multi enzimático compuesto por α -amilasas, proteasas y xilanasas (Avizyme 1502®¹ a 0,375 kg./ton. de alimento) y su inclusión (sí o no) en las dietas.

Tratamientos.

<i>Enzimas</i>	<i>Tratamiento 1</i>	<i>Tratamiento 2</i>	<i>Tratamiento 3</i>	<i>Tratamiento 4</i>
Fitasa	0	60 gr./ton.	0	60 gr./ton.
Complejo	0	0	375 gr./ton.	375 gr./ton.

¹ Producido y distribuido por Danisco. P.O. box 470157, St. Louis, Missouri, 63147, E.E.U.U.

Las fórmulas de las dietas experimentales utilizadas y su composición nutricional calculada, se muestran en la Tabla 1. El aporte de fósforo de las distintas fuentes provenientes de la dieta se detalla en el anexo D.18., donde se muestra la dieta formulada para 100 g de consumo de alimento y 0,38% de FD, como ejemplo.

Durante el período experimental se fabricó alimento una vez al mes (anexo A.8). Las dietas fueron formuladas para cumplir con los requerimientos nutritivos establecidos por el NRC (1994) de gallinas ponedoras y de la línea genética. Todas las dietas fueron formuladas de manera isoenergética e isonitrogenada. La fitasa entregó un equivalente de 0,11% del fósforo disponible y 0,1% de calcio en las dietas suplementadas con esta enzima. Los valores de energía metabolizable (EM) fueron ajustados según la edad y el consumo de alimento de la aves en orden de mantener un consumo de energía relativamente constante de 220 a 250 kcal/ave/día cifra que corresponde al 86% del requerimiento de EM. De manera similar, el contenido de proteína cruda (PC) de la dieta fue disminuido para mantener un consumo de 15,2 a 16,2 g /ave/día, valor correspondiente al 92% del requerimiento de PC. Los niveles de EM y PC fueron formulados por debajo de los requerimientos para exacerbar el efecto de las enzimas.

En este proceso, se tomó una muestra para análisis químico proximal, actividad de fitasa y la actividad de α -amilasa. El análisis químico proximal y actividad de fitasa fueron realizados de acuerdo a procedimientos analíticos estandarizados (AOAC, 1995) y la actividad de α -amilasa fue realizada por la empresa Danisco².

Los resultados fueron expresados como valores promedio para cada tratamiento. Los valores de actividad de α -amilasa, fitasa y los resultados del

² Danisco Animal Nutrition. P.O. box 470157, St. Louis, Missouri, 63147, E.E.U.U.

análisis químico proximal de las dietas se encontraron dentro de lo esperado (anexos D.16 y D.17).

El período experimental tuvo una duración de 35 semanas (18 a 52 semanas de edad de las gallinas). Durante el experimento, las aves fueron alimentadas a voluntad en forma controlada, siguiendo las directrices de la línea genética, para cumplir con los requerimientos nutritivos establecidos por el NRC (1994) de ponedoras, siendo el alimento entregado dos veces al día, a las 09:00 horas y a las 17:00 horas. El régimen de luz fue de un total de 16 horas por día, considerando las horas de luz natural y entregando las restantes, vía luz artificial tanto en la mañana como en la noche, procedimiento controlado mediante el uso de un reloj control.

La unidad experimental dispone de líneas de agua potable por nivel, con un niple de bebida por jaula, que entrega agua a libre consumo.

Digestibilidad Ileal Aparente de Proteína y Energía.

Al final del período experimental (52 semanas de edad) se efectuó un estudio de digestibilidad ileal aparente de proteína y energía en 9 gallinas por repetición, mediante el método del marcador. Se utilizó el marcador Celite®³ (dióxido de sílice) a una proporción del 1,5% de la dieta. La dieta utilizada en este estudio corresponde a la fórmula para un consumo de 100 g de alimento, con cambios mínimos en su composición al adicionar el marcador.

El día anterior al ensayo de digestibilidad, el alimento fue retirado en la tarde, con el objeto de ayunar a las aves por 17 horas, tiempo suficiente para limpiar el tubo digestivo y generar apetito en las aves que asegure el consumo del alimento.

En el día del estudio, al encenderse las luces (05:30 a.m.) las aves fueron alimentadas con la dieta que incluye el marcador. A 4 horas de iniciada la

³ Celite Corp., Lompar, CA 93436.

alimentación, se sacrificaron tres aves por jaula (9 aves por repetición) mediante dislocación cervical. Dos minutos después de realizada la dislocación se procedió al ingreso a cavidad abdominal, se localizó la unión ileocecal y el divertículo de Meckel (anexo C.1), se realizó una ligadura utilizando sutura de lino en el divertículo de meckel y otra a un centímetro antes de la unión ileocecal (anexo C.2) y se procedió a la extracción del íleon. Luego se retiraron las ligaduras del íleon y mediante presión mecánico-digital suave (anexo C.3), el contenido ileal fue depositado en envases “ad-hoc” rotulados para cada repetición que así reunió un pool de contenidos ileales de las 9 gallinas de cada repetición. Estos envases fueron congelados a -18°C hasta su posterior análisis en el laboratorio.

El contenido ileal congelado fue posteriormente liofilizado (anexo C.4) (secado en frío seco). La liofilización es un proceso que consiste en desecar un producto previamente congelado, lográndose la sublimación del hielo bajo vacío. Es por lo tanto el paso directo del hielo (sólido) a gas (vapor), sin que en ningún momento aparezca el agua en su estado líquido. Se obtiene una masa seca, esponjosa de más o menos el mismo tamaño que la masa congelada original (anexo C.4), mejorando su estabilidad. La temperatura a que es sometido el producto, está por debajo de aquella a la que muchas sustancias inestables sufren cambios químicos, la pérdida de constituyentes volátiles es mínima y se reduce el peligro de contaminación microbiana.

El contenido ileal liofilizado y las dietas consumidas por las aves fueron analizados para nitrógeno mediante el método de Kjeldahl (anexo C.5), energía bruta utilizando una bomba calorimétrica adiabática (anexo C.6) (A.O.A.C., 1995) y ceniza ácido insoluble (Celite®) (Vogtmann *et al.*, 1975), utilizando los procedimientos analíticos estandarizados.

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales formuladas para un consumo de 80 g, 95 g y 100 g a las siguientes edades: 18 a 26 sem., 27 a 32 sem. y 33 a 52 semanas respectivamente.

Consumo de alimento	80 g				95 g				100 g			
	Tto.1	Tto.2	Tto.3	Tto. 4	Tto.1	Tto.2	Tto.3	Tto. 4	Tto.1	Tto.2	Tto.3	Tto. 4
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 ¹ (FDF/FBC) ¹	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 Fosfato defluorinado (FDF) para la dieta de 80 g de consumo de alimento y Fosfato bicálcico (FBC) para las dietas de 95 y 100 g de consumo de alimento.

² Premezcla vitamínica (suplementada por kilo de dieta): Vitamina A: 8000 IU; Vitamina D: 2500 IU; Vitamina E: 10 mg; Vitamina K: 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 ug; Ácido fólico: 1 mg; Biotina: 50 ug; and Colina: 300 mg.

³ Premezcla mineral (suplementada por kilo 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: 0,3 mg.

⁴ Fitasa contribuye con 0.1% de fósforo disponible y 0.1% de calcio a la dieta.

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

VARIABLES A CONTROLAR.

Las variables controladas fueron:

PRODUCTIVAS GENERALES.

1. Porcentaje de postura.

Se llevó un registro diario de todos los huevos puestos y se dividió por el número de gallinas vivas de cada repetición. La recolección de los huevos fue realizada mediante el uso de bandejas rotuladas por repetición (anexo A.3). Este parámetro se expresó como promedio semanal por repetición.

2. Peso del huevo.

Se utilizó una pesa de 1 gramo de sensibilidad (anexo A.4) y fue expresado en gramos (g.). Fueron pesados todos los huevos producidos por cada repetición el día lunes de cada semana.

CALIDAD INTERNA Y EXTERNA DEL HUEVO.

1. Defectos visibles de la cáscara: se manifiestan mirando los huevos a simple vista y a través de un ovoscopio (anexo A.3). Se contabilizaron los huevos sin cáscara (Anexo A.5), los huevos trizados (anexo A.6) y los huevos quebrados (anexo A.7). Se llevó un registro diario de todos los huevos según repetición para luego expresar este indicador como porcentaje semanal.

A las semanas 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46 y 50 de edad, se obtuvo una muestra de 9 huevos por tratamiento, 3 de cada repetición (1 por jaula), los que fueron analizados en el laboratorio del Centro de Referencia para la Evaluación y Certificación de la calidad de Productos de Origen Animal (CERPRAN) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile para las características que se indican a continuación:

Calidad Externa.

La calidad de la cáscara se midió a través de los siguientes indicadores:

1. **Gravedad específica:** se utilizó el método descrito por Hempe *et al.* (1998). Los huevos fueron introducidos en un canasto, el cual se sumerge en baldes con soluciones de sal común (NaCl) y agua, de distinta densidad (1,082; 1,084; 1,086; 1,088; 1,090; 1,092; 1,094; 1,096; 1,098; 1,100), empezando por la menor y, a medida que los huevos fueron flotando, se retiraron (anexo B.1). Se conoce como gravedad específica de un huevo, la correspondiente a la de la primera solución en la que flote dicho huevo. La densidad de las soluciones fue medida con un densímetro antes de realizarse la prueba (anexo B.2).
2. **Grosor de la cáscara (mm.):** se registró mediante el uso de un micrómetro (anexo B.4) el grosor de la cáscara en tres puntos: punto de fractura y dos puntos en el ecuador.
3. **Resistencia de la cáscara a la fractura (kg./cm²):** esta variable mide la fuerza necesaria para quebrar la cáscara al comprimir el huevo en el ecuador, con un durómetro TSS (anexo B.5).
4. **Deformación de la cáscara (mm.):** esta medición indica cuanto se deforma la cáscara del huevo al comprimir éste con un durómetro TSS, antes de quebrarse. (anexo B.6)

Calidad Interna.

1. **Unidades Haugh:** mide la altura de la albúmina densa de los huevos quebrados sobre una superficie lisa, mediante el uso de un tornillo micrométrico conectado a un sistema computacional (anexo B.3).
2. **Color de la yema:** se utilizó un colorímetro con la escala de Roche® (anexo B.7) conectado a un sistema computacional.

3. **Peso de yema, peso de albúmina y razón peso yema/ albúmina:** se separó la yema de la albúmina en dos placas petri. El peso respectivo fue obtenido utilizando una pesa de 0,1 gramos de sensibilidad (anexo B.8).
4. **Volumen de yema, volumen de albúmina y razón volumen yema/albúmina:** luego del pesaje, se utilizó dos probetas graduadas (anexo B.9) para calcular el volumen de yema y albúmina.

DIGESTIBILIDAD ILEAL APARENTE DE PROTEÍNA Y ENERGÍA.

Para calcular la digestibilidad ileal aparente se utilizó la relación entre los diferentes nutrientes y el contenido de cenizas ácido insoluble, expresándose estos nutrientes tanto en alimentos y en contenido ileal, en base a “Materia Seca” (100% M.S.).

La digestibilidad ileal aparente de proteína se calculó mediante la siguiente fórmula, de acuerdo a lo señalado por Scott y Hall (1998):

$$D = 100\% - [100\% \times (Ma /Mf) \times (Nf / Na)]$$

Donde:

D = digestibilidad ileal aparente de proteína.

Ma = concentración del marcador en alimento.

Mf = concentración de marcador en contenido ileal.

Nf = concentración de proteína en contenido ileal.

Na = concentración de proteína en alimento.

La digestibilidad ileal aparente de energía se calculó mediante la siguiente fórmula, según lo informado por Scott y Hall (1998):

$$\text{E.M.A. (Kcal/kg. de dieta)} = \text{E.B.}_D - [\text{E.B.}_I \times (\text{Ma} / \text{Mf})]$$

Donde:

E.M.A. = Energía metabolizable aparente.

E.B._D = Energía bruta de la dieta.

E.B._I = Energía bruta del contenido ileal.

Ma = concentración del marcador en alimento.

Mf = concentración de marcador en contenido ileal.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados del experimento fueron analizados por Análisis de Varianza (ANDEVA), de acuerdo a un diseño factorial de tratamientos con repeticiones y según las condiciones del ensayo. Se utilizó un programa computacional de manejo estadístico, SAS (1989-1996).

El modelo matemático a utilizar fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + (TxP)_{ij} + S_k + \xi_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Respuesta observada.

μ = Media Poblacional

T_i = Efecto del *i*-ésimo tratamiento (*i* = presencia y ausencia de fitasa)

P_j = Efecto del *j*-ésimo tratamiento (*j* = presencia y ausencia de complejo multi enzimático)

$(TxP)_{ij}$ = Interacción entre el *i*-ésimo tratamiento y el *j*-ésimo tratamiento.

S_k = Efecto de la *k*-ésima semana.

ξ_{ijk} = Error experimental

Para el análisis del estudio de la digestibilidad ileal aparente de proteína y energía, se utilizó el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + (T \times P)_{ij} + \xi_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Respuesta observada.

μ = Media Poblacional

T_i = Efecto del i -ésimo tratamiento (i = presencia y ausencia de fitasa)

P_j = Efecto del j -ésimo tratamiento (j = presencia y ausencia de complejo multi enzimático)

$(T \times P)_{ij}$ = Interacción entre el i -ésimo tratamiento y el j -ésimo tratamiento.

ξ_{ijk} = Error experimental

Debido al normal comportamiento fisiológico-productivo de los indicadores “porcentaje de postura”, “peso del huevo” e indicadores de calidad externa del huevo, que inician su aparición con gran variabilidad durante las cuatro primeras semanas del estudio (semana 18 a 21 de edad), se realizó un análisis de covarianza utilizando los valores promedios de esas semanas para dichos indicadores con el objeto de corregir el efecto de esas semanas sobre los promedios finales.

Los indicadores de expresión porcentual fueron transformados según la función del arcoseno previo al ANDEVA, en los casos en que fue necesario. Las diferencias estadísticas entre promedios específicos, se establecieron mediante la prueba de Tukey (Sokal y Rohlf, 1981).

RESULTADOS

INDICADORES PRODUCTIVOS.

Los resultados promedios para la totalidad del período experimental obtenidos para los parámetros “porcentaje de postura” y “peso del huevo” se presentan en la Tabla N°2. En los anexos D.1 y D.2 se observa el comportamiento de las variables “porcentaje de postura” y “peso del huevo” durante las 35 semanas experimentales, respectivamente.

Tabla N° 2. Parámetros productivos: Porcentaje de postura (%) y peso del huevo (g) promedio durante el período correspondiente a las semanas 18 a 52 de edad.

Tratamiento	Fitasa	Complejo	Porcentaje de Postura	Peso del Huevo
1	Ausente	Ausente	83,87 ± 23,31	57,52 ± 6,59
2	Presente	Ausente	84,83 ± 23,01	57,17 ± 6,34
3	Ausente	Presente	83,00 ± 21,90	58,30 ± 6,90
4	Presente	Presente	84,38 ± 22,54	57,41 ± 6,24
	Fitasa Ausente		83,44 b ± 22,56	57,91 a ± 6,74
	Fitasa Presente		84,60 a ± 22,72	57,29 b ± 6,28
	Complejo Ausente		84,35 a ± 23,11	57,34 b ± 6,45
	Complejo Presente		83,69 b ± 22,18	57,86 a ± 6,58
	Probabilidad			
	Fitasa		0,0003	0,0001
	Complejo		0,0472	0,0001
	Fitasa x Complejo		0,7656	0,0001

a y b: Los subíndices diferentes dentro de la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

!: Valores indican el promedio ± desviación estándar

Para la variable “porcentaje de postura”, se puede observar que la presencia de la enzima fitasa aumenta significativamente ($p < 0,05$) el porcentaje de postura en un 1,39% (de 83,44% a 84,60%). Además se observa que la presencia del complejo disminuyó significativamente ($p < 0,05$) el porcentaje de

postura (83,69% contra 84,35%) en un 0,78%. No se registró interacción estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre la adición de fitasa y la incorporación del complejo enzimático para porcentaje de postura.

Con respecto al peso del huevo, se observó un efecto significativo al adicionar la enzima fitasa y el complejo enzimático para el promedio final del período. La incorporación de fitasa disminuyó en forma significativa ($p < 0,05$) el peso del huevo en un 1,08% (57,91 gramos sin la adición de la enzima a 57,29 gramos al agregar fitasa).

La adición a la dieta del complejo multi enzimático compuesto por α -amilasas, proteasas y xilanasas aumentó significativamente ($p < 0,05$) el peso del huevo de 57,34 gramos a 57,86 gramos, lo que corresponde a un incremento del 0,91%.

Además se observó la presencia de una interacción significativa ($p < 0,05$) entre el uso de la enzima fitasa y el uso del complejo enzimático para el peso de huevo. Al adicionar el C.M.E. 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 complejo sobre este parámetro.

CALIDAD EXTERNA DEL HUEVO.

Los resultados promedio obtenidos para las variables “porcentaje de huevos sin cáscara”, “porcentaje de huevos quebrados” y “porcentaje de huevos trizados” para todo el período experimental se presentan en la Tabla N°3.

Para el porcentaje de huevos sin cáscara no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) atribuibles a los efectos medios de la adición de fitasa y el complejo multi enzimático. El comportamiento de la variable durante las 35 semanas de estudio se observa en el anexo D.3. Se registró, sin embargo, una interacción significativa ($p < 0,05$) entre la enzima fitasa y el complejo multi enzimático sobre el porcentaje de huevos sin cáscara. Al

incorporar fitasa en presencia del complejo, éste aumentó el porcentaje de huevos sin cáscara, sin embargo en ausencia de complejo, la adición de fitasa disminuyó este parámetro.

El comportamiento del porcentaje de huevos quebrados durante las 35 semanas de estudio se presenta en el anexo D.4. 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). La incorporación del complejo disminuyó significativamente ($p < 0,05$) el porcentaje de huevos quebrados en un 3,11%.

En el anexo D.5 se detalla el comportamiento del porcentaje de huevos trizados durante el estudio. No se registraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) debido a los efectos medios de la adición de la enzima fitasa o del complejo multi enzimático para esta variable. Sin embargo, se observa la presencia de una interacción significativa ($p < 0,05$) entre fitasa y el complejo enzimático. Para los huevos trizados, en ausencia de complejo, al agregar la enzima fitasa el porcentaje de huevos trizados no varió mayormente, pero en presencia del complejo la fitasa disminuyó este indicador.

Tabla N° 3: Indicadores de calidad externa del huevo: Porcentaje de huevos sin cáscara, huevos quebrados y huevos trizados. Valores promedio para el período correspondiente a las semanas 18 a 52 de edad.¹

Tratamiento	Fitasa	Complejo	Huevos Sin Cáscara	Huevos Quebrados	Huevos Trizados
1	Ausente	Ausente	1,94 ± 4,08	1,93 ± 2,40	9,18 ± 4,73
2	Presente	Ausente	1,67 ± 4,06	1,92 ± 3,67	8,18 ± 4,62
3	Ausente	Presente	1,09 ± 2,61	1,64 ± 1,79	9,04 ± 5,17
4	Presente	Presente	2,55 ± 7,10	2,13 ± 2,79	9,01 ± 4,42
Fitasa Ausente			1,52 ± 3,44	1,79 ± 2,12	9,11 ± 4,94
Fitasa Presente			2,11 ± 5,78	2,02 ± 3,25	8,60 ± 4,53
Complejo Ausente			1,80 ± 4,06	1,93 a ± 3,10	8,68 ± 4,69
Complejo Presente			1,82 ± 5,38	1,87 b ± 2,35	9,03 ± 4,80
Probabilidad					
Fitasa			0,9719	0,2248	0,1135
Complejo			0,0585	0,0482	0,0620
Fitasa x Complejo			0,0464	0,3812	0,0001

a y b: Los subíndices diferentes dentro de la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

¹: valores indican el promedio ± desviación estándar

Los resultados obtenidos para las variables “gravedad específica”, “grosor de cáscara”, “deformación de la cáscara” y “resistencia a la fractura” se presentan en la Tabla N°4. El comportamiento durante el ensayo de estos parámetros se esquematiza en los anexos D.6, D.7, D.8 y D.9, respectivamente.

El indicador “gravedad específica”, no fue influenciado significativamente ($p > 0,05$) por la enzima fitasa no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$). Al incorporar el complejo multi enzimático, la gravedad específica del huevo disminuyó significativamente ($p < 0,05$) en un 0,18%. No se registró interacción significativa ($p > 0,05$) entre la adición de fitasa y del complejo para esta variable.

En cuanto al grosor de la cáscara, la adición de la enzima fitasa a la dieta significó una disminución significativa de este parámetro ($p < 0,05$). La incorporación del complejo multi enzimático no arrojó diferencias significativas ($p > 0,05$) en este indicador y tampoco se observó la presencia de una interacción estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

El parámetro “deformación de la cáscara” no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) debidas a la adición de la enzima fitasa o del complejo enzimático a las dietas. Tampoco se observó la presencia de interacción significativa ($p > 0,05$) entre ambas.

La presencia de la enzima fitasa disminuyó significativamente ($p < 0,05$) la resistencia a la fractura (de 2506,19 gramos sin fitasa a 2359,80 gramos con la enzima). Sin embargo, la adición del complejo enzimático a las dietas no influyó significativamente ($p > 0,05$) esta variable. Tampoco se registró una interacción significativa ($p > 0,05$) entre fitasa y el complejo multi enzimático.

Tabla N° 4: Indicadores de calidad externa del huevo: Gravedad Específica, Grosor de cáscara (mm.), Deformación de la cáscara (mm.) y Resistencia a la fractura (Kg/cm²). Valores promedio para las semanas 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46 y 50 de edad.¹

Tratamiento	Fitasa	Complejo	Gravedad Específica	Grosor de la Cáscara	Deformación de la Cáscara	Resistencia a la Fractura
1	Ausente	Ausente	1,0871 ± 0,004	0,331 ± 0,025	0,363 ± 0,061	2548,65 a ± 430,75
2	Presente	Ausente	1,0866 ± 0,004	0,328 ± 0,023	0,349 ± 0,075	2366,60 b ± 435,61
3	Ausente	Presente	1,0861 ± 0,004	0,332 ± 0,026	0,350 ± 0,040	2463,74 ab ± 467,08
4	Presente	Presente	1,0857 ± 0,004	0,322 ± 0,020	0,351 ± 0,066	2353,00 b ± 341,99
Fitasa Ausente			1,0866 ± 0,004	0,332 a ± 0,025	0,357 ± 0,051	2506,19 a ± 449,73
Fitasa Presente			1,0861 ± 0,004	0,325 b ± 0,022	0,350 ± 0,070	2359,80 b ± 390,29
Complejo Ausente			1,0869 a ± 0,004	0,330 ± 0,024	0,356 ± 0,068	2457,63 ± 441,23
Complejo Presente			1,0859 b ± 0,004	0,327 ± 0,023	0,351 ± 0,054	2408,37 ± 411,67
Probabilidad						
Fitasa			0,2583	0,0163	0,3322	0,0022
Complejo			0,0223	0,3094	0,3792	0,3003
Fitasa x Complejo			0,9742	0,2905	0,2247	0,4531

a y b: Los subíndices diferentes dentro de la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

¹: valores indican el promedio ± desviación estándar.

CALIDAD INTERNA DEL HUEVO.

Los resultados obtenidos para las variables “color de yema” y “unidades Haugh” se presentan en la tabla N°5.

Tabla N° 5: Indicadores de calidad interna del huevo: Color de Yema (Escala Roche®), y Unidades Haugh. Semanas 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46 y 50.¹

Tratamiento	Fitasa	Complejo	Color de Yema	Unidades Haugh
1	Ausente	Ausente	8,291 ± 0,740	95,539 ± 6,416
2	Presente	Ausente	8,236 ± 0,702	95,317 ± 5,605
3	Ausente	Presente	8,583 ± 0,727	95,007 ± 5,707
4	Presente	Presente	8,458 ± 0,768	95,628 ± 4,298
Fitasa Ausente			8,438 ± 0,745	95,27 ± 6,059
Fitasa Presente			8,347 ± 0,742	95,47 ± 4,979
Complejo Ausente			8,264 b ± 0,719	95,43 ± 6,004
Complejo Presente			8,521 a ± 0,748	95,32 ± 5,039
Probabilidad				
Fitasa			0,2012	0,7234
Complejo			0,0003	0,8395
Fitasa x Complejo			0,6226	0,4611

a y b: Los subíndices diferentes dentro de la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

¹: Valores indican el promedio ± desviación estándar

La inclusión de la enzima fitasa no tuvo un efecto significativo ($p > 0,05$) sobre la coloración de la yema. En cambio, la adición a las dietas del complejo enzimático compuesto por α -amilasas, proteasas y xilanasas, aumentó significativamente ($p < 0,05$) el color de la yema en un 3,11% (de 8,264 a 8,521). No se observó la presencia de interacción significativa entre la enzima fitasa y el complejo para este parámetro. El comportamiento del color de la yema durante las 35 semanas experimentales se muestra en el anexo D.10.

El parámetro “unidades Haugh” no fue significativamente influenciado por los distintos tratamientos ($p > 0,05$). Tampoco se observó la presencia de una

interacción significativa entre la incorporación de ambos tipos de enzimas. El comportamiento de los tratamientos para las “unidades Haugh” durante el período experimental se muestra en el anexo D.11.

Los resultados obtenidos para las variables “peso de yema”, “peso de albúmina” y “razón peso yema/peso albúmina” se presentan en la Tabla N° 6.

La incorporación de fitasa no influyó significativamente ($p > 0,05$) el peso de la yema, peso de albúmina y la razón peso yema/albúmina.

La presencia del complejo enzimático, sin embargo, aumentó significativamente ($p < 0,05$) el peso de yema y la razón peso yema/peso albúmina en un 4,27% y 3,29%, respectivamente. Los tratamientos no tuvieron efectos significativos ($p > 0,05$) sobre el peso de albúmina. Tampoco se observaron interacciones ($p > 0,05$) entre las enzimas para el peso de yema, peso de albúmina y la razón peso yema/peso albúmina. El comportamiento de la razón peso yema/peso albúmina durante el período experimental se observa en el anexo D.12.

En la Tabla N° 7 se presentan los resultados promedio obtenidos durante todo el período experimental para las variables “volumen de yema”, “volumen de albúmina” y “razón volumen yema/volumen albúmina”. El comportamiento de la razón volumen yema/volumen albúmina durante el período experimental se observa en el anexo D.13.

Tabla N° 6: Indicadores de calidad interna del huevo: Peso de yema (gr.), Peso de albúmina (gr.) y Razón peso yema/peso albúmina. Semanas 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46 y 50 de edad.¹

Tratamiento	Fitasa	Complejo	Peso Yema	Peso Albúmina	Razón Peso Yema/Peso Albúmina
1	Ausente	Ausente	14,76 ± 2,79	34,88 ± 3,82	0,424 ± 0,056
2	Presente	Ausente	14,75 ± 2,68	34,54 ± 3,68	0,426 ± 0,058
3	Ausente	Presente	15,56 ± 2,67	35,53 ± 4,11	0,436 ± 0,072
4	Presente	Presente	15,30 ± 2,70	34,59 ± 3,37	0,442 ± 0,061
Fitasa Ausente			15,10 ± 2,74	35,20 ± 3,97	0,430 ± 0,064
Fitasa Presente			15,03 ± 2,69	34,57 ± 3,52	0,434 ± 0,060
Complejo Ausente			14,75 b ± 2,72	34,71 ± 3,74	0,425 b ± 0,057
Complejo Presente			15,38 a ± 2,68	35,06 ± 3,77	0,439 a ± 0,066
Probabilidad					
Fitasa			0,6525	0,0793	0,5512
Complejo			0,0007	0,3291	0,0128
Fitasa x Complejo			0,6967	0,3999	0,7664

a y b: Los subíndices diferentes dentro de la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

¹: valores indican el promedio ± desviación estándar.

Tabla N° 7: Indicadores de calidad interna del huevo: Volumen yema (cc.), Volumen albúmina (cc.) y Razón volumen yema/volumen albúmina. Semanas 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46 y 50.¹

Tratamiento	Fitasa	Complejo	Volumen Yema	Volumen Albúmina	Razón volumen Yema/volumen Albúmina
1	Ausente	Ausente	14,71 ± 2,90	35,21 ± 3,94	0,416 ± 0,059
2	Presente	Ausente	15,04 ± 2,86	34,76 ± 3,68	0,431 ± 0,061
3	Ausente	Presente	15,71 ± 3,00	35,92 ± 4,14	0,438 ± 0,074
4	Presente	Presente	15,49 ± 2,73	34,99 ± 3,39	0,441 ± 0,059
Fitasa Ausente			15,21 ± 2,98	35,56 ± 4,04	0,427 ± 0,067
Fitasa Presente			15,26 ± 2,80	34,88 ± 3,53	0,436 ± 0,060
Complejo Ausente			14,88 b ± 2,88	34,99 ± 3,81	0,424 b ± 0,060
Complejo Presente			15,60 a ± 2,86	35,45 ± 3,80	0,440 a ± 0,066
Probabilidad					
Fitasa			0,7651	0,0546	0,0892
Complejo			0,0001	0,1925	0,0040
Fitasa x Complejo			0,1360	0,4955	0,2971

a y b: Los subíndices diferentes dentro de la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

¹: valores indican el promedio ± desviación estándar

La incorporación de la enzima fitasa no presentó efectos significativos ($p>0,05$) sobre el volumen de yema, volumen de albúmina y sobre la razón volumen yema/volumen albúmina.

Sin embargo, en presencia del complejo enzimático, el volumen de yema aumentó significativamente ($p<0,05$) en un 4,84% (de 14,88 cc. a 15,60 cc.). El volumen de albúmina no presentó diferencias significativas ($p>0,05$) debido a la presencia del complejo. Similar a lo ocurrido para el volumen de yema, la La razón volumen de yema/volumen de albúmina aumentó significativamente ($p<0,05$) en un 3,77% al agregar el complejo enzimático (de 0,424 a 0,440).

No se evidenció la presencia de interacción significativa ($p>0,05$) entre la enzima fitasa y el complejo enzimático para estas variables.

DIGESTIBILIDAD ILEAL APARENTE DE PROTEÍNA Y ENERGÍA.

Los valores de digestibilidad ileal obtenidos para proteína y energía se presentan en la Tabla N° 8.

La adición de la enzima fitasa no presentó efectos significativos ($p>0,05$) sobre la digestibilidad ileal aparente de proteína. Sin embargo, la presencia del complejo multi enzimático compuesto por α -amilasas, proteasas y xilanasas produjo un aumento significativo ($p<0,05$) en la digestibilidad ileal de proteína de un 6,01%. No se observó la presencia de interacción significativa ($p>0,05$) entre la incorporación de ambas enzimas. Los resultados obtenidos para la digestibilidad ileal aparente de proteína por tratamiento se esquematizan en el anexo D.14.

En la digestibilidad ileal de energía, no se registró un efecto significativo al incorporar fitasa a las dietas ($p>0,05$). Al contrario, el complejo enzimático aumentó significativamente ($p<0,05$) la digestibilidad ileal de energía en un 9,38%. Nuevamente no se observó la presencia de interacción entre fitasa y el

complejo enzimático. Los resultados obtenidos para la digestibilidad ileal aparente de energía por tratamiento se esquematizan en el anexo D.15.

Tabla N° 8: Valores de digestibilidad ileal de proteína (%) y de energía metabolizable aparente (Kcal.) obtenidos a la semana 52 de edad.¹

Tratamiento	Fitasa	Complejo	Proteína	Energía Metabolizable
1	Ausente	Ausente	69,59 ± 1,92	2045,21 ± 18,96
2	Presente	Ausente	72,90 ± 4,43	2082,23 ± 222,96
3	Ausente	Presente	76,24 ± 1,86	2272,87 ± 53,29
4	Presente	Presente	74,80 ± 0,48	2241,93 ± 38,96
	Fitasa Ausente		72,91 ± 4,02	2159,04 ± 129,72
	Fitasa Presente		73,85 ± 3,01	2162,08 ± 167,76
		Complejo Ausente	71,24 b ± 3,55	2063,72 b ± 142,97
		Complejo Presente	75,52 a ± 1,45	2257,40 a ± 45,06
	Probabilidad			
	Fitasa		0,5505	0,9651
	Complejo		0,0215	0,0206
	Fitasa x Complejo		0,1523	0,6275

a y b: Los subíndices diferentes dentro de la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

¹: Valores indican el promedio ± desviación estándar

DISCUSIÓN.

Porcentaje de Postura.

La mayor parte de los estudios enfocados a la utilización de la enzima fitasa mencionan que la enzima corrige los efectos adversos provocados por un bajo nivel de fósforo disponible (F.D.), menor a 0,25% en dietas vegetales. (Gordon y Roland, 1996; Gordon y Roland 1997; Kamińska y Skraba, 1997; Punna y Roland, 1999; Boling *et al.*, 2000; Ceylan *et al.*, 2003 y Keshavarz, 2003a).

Los niveles de F.D. utilizados en este estudio fueron de 0,37% (para consumo de 80 gramos), 0,30% (consumo de 95 grs.) y 0,28% (consumo de 100 grs.) sin considerar el aporte de fitasa, los cuales se consideran marginalmente deficitarios. La incorporación de fitasa a niveles de 300 U/kg. de dieta, incrementó el porcentaje de postura. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Um y Paik (1999), los cuales utilizaron niveles de F.D. 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/kg de dieta no fueron suficientes para igualar la producción del grupo control sin suplementación de fitasa, haciéndose necesaria la inclusión de 600 U/kg 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 ahora disponibles para ser utilizados en la producción de huevos. Un estudio realizado por Ravidran *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 (Díaz, 2004). Sin embargo, los valores de los tratamientos que contenían fitasa fueron numéricamente superiores a los valores que no poseían la enzima, aun cuando las dietas suplementadas con fitasa contenían un 0,1% menos de F.D.

La adición del complejo multi enzimático (C.M.E.) a las dietas produjo un efecto adverso sobre el porcentaje de postura ($p < 0,05$). No se ha encontrado literatura que coincida con estos resultados. La mayoría de los estudios muestran un aumento en el porcentaje de postura (Danisco, 1998a; Scheideler y Abudabos, 1998; Danisco, 1999c; Danisco, 1999d; Scheideler, 2000) en gallinas suplementadas por sobre los requerimientos de una “dieta base” sin deficiencias nutricionales. O bien, se ha descrito que el porcentaje de postura no presenta diferencias ($p > 0,05$) entre aves suplementadas con el CME y alimentadas con bajos niveles nutricionales y el control energético alto (Danisco, 1997a; Danisco, 1999a;) o simplemente no muestran diferencias significativas (Scheideler y Weber, 2003).

Por otra parte, al final del período experimental del presente estudio, se observa que los pesos corporales de las gallinas suplementadas con el C.M.E. presentan una diferencia mayor del orden del 1,65%, al compararlas con los tratamientos sin C.M.E (Díaz, 2004). Esto sugiere que las gallinas estarían destinando una mayor cantidad de nutrientes para cubrir los requerimientos dados por un mayor peso corporal y peso de huevo, en desmedro de una mayor producción de huevos.

Peso de huevo.

La disminución en el peso de huevo al incorporar la enzima fitasa concuerda con los resultados obtenidos por Terreros (2001), estudio que observó que tanto la inclusión de 300 U como la de 600 U 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.*, 2000; 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).

Adicionalmente, en otros estudios se ha observado que la fitasa corrige los efectos sobre el peso de huevo en dietas con bajos niveles de F.D. (Gordon y Roland, 1996; Gordon y Roland, 1997; Coon y Leske, 1999). En este sentido, en el estudio realizado por Gordon y Roland (1997) se evidenció que sin la adición de la enzima fitasa el peso de huevo aumentó en 1 gramo, pero a ese mismo nivel de F.D. al incorporar fitasa el peso aumentaba 2,2 gramos.

El menor peso de huevo debido a la adición de fitasa observado en el presente estudio se puede explicar debido a la presencia de cáscaras más delgadas y por el menor peso de yema y albúmina (resultados que no fueron estadísticamente significativos). El aumento en el peso de huevo al incorporar el C.M.E. concuerda con los resultados de Scheideler y Abudabos (1998) y Jiménez (2001). Este resultado se podría explicar por el efecto del complejo en la degradación de las paredes celulares de los ingredientes de la dieta, liberando nutrientes que influyen en el peso del huevo. Este aumento en el peso del huevo se manifestó a partir de la semana 26 de edad, que coincidió con el cambio de dieta a una con mayor contenido de afrechillo de trigo. Es precisamente sobre este insumo donde la xilanasas actuaría con mayor actividad, 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 pudiera ser liberada por la acción de la xilanasas y se encontraría disponible para ser utilizada, pudiendo contribuir al aumento del peso de huevo. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la hipótesis mencionada anteriormente no fue evaluada en el

presente trabajo. Bedford (1997) menciona un aumento significativo en la digestibilidad ileal de metionina al suplementar dietas basadas en trigo con 3.000 U. de xilanasa/kg. de dieta en pollos broilers de 21 días de edad. Un estudio realizado por Wolford *et al.* (2002) en cerdos también describe un aumento en la digestibilidad ileal de metionina en dietas suplementadas con xilanasa. Sin embargo, adicionalmente hay que considerar que en el presente estudio se observó que el C.M.E. originó aumentos en la digestibilidad de energía metabolizable (EM), de N y P (no mostrado), todos nutrientes que participan en el tamaño del huevo.

La interacción para peso de huevo entre fitasa y complejo se originaría posiblemente, por la presencia de cáscaras más delgadas y menores pesos de yema y albúmina, que aunque no fueron significativos, si pudieron haber contribuido, numéricamente, a la disminución de dicho efecto.

Huevos sin cáscara, trizados y quebrados.

La incorporación de la enzima fitasa no arrojó diferencias estadísticamente significativas en ninguno de estos parámetros. Estos resultados concuerdan con los de Terreros (2001) quién 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 encontró diferencias al utilizar 500 U. Por su parte, 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 dieta.

La adición del complejo 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 C.M.E.

Se observó además una interacción entre la enzima fitasa y el C.M.E. para los parámetros “huevos sin cáscara” y “huevos trizados”. La fitasa en presencia del complejo, aumentó el porcentaje de huevos sin cáscara, sin embargo en ausencia de complejo, la adición esta enzima disminuyó este parámetro. No existe una explicación clara para este fenómeno.

Por su parte, en ausencia de complejo, al agregar la enzima fitasa el porcentaje de huevos trizados no varió mayormente, sin embargo, en presencia del complejo la fitasa disminuyó este indicador.

Calidad de la cáscara.

Aunque numéricamente la adición de la enzima fitasa disminuyó la gravedad específica, estas diferencias no fueron significativas ($p>0,05$). Esto concuerda con lo observado por Boling *et al.* (2000a), que utilizó distintos niveles de F.D. hasta un máximo de 0,45% y 300 U/kg de dieta. Similares son los resultados obtenidos por Gordon y Roland (1997), los cuales utilizaron distintos niveles de F.D. hasta un máximo de 0,5% y 300 U/kg de dieta, sin encontrar diferencias entre el nivel más bajo de F.D. suplementado con fitasa y los niveles más altos.

Esto contrasta, sin embargo, con los resultados obtenidos por Terreros (2001), que observó que con 300 U/kg de alimento obtenía una mayor gravedad específica que niveles de 0 (control) y 600 U/kg de dieta. Asimismo, Gordon y Roland (1999) observaron que al agregar la enzima fitasa, esta mejoraba la gravedad específica en dietas con 0,1% de F.D. Keshavarz (2003b) encontró que al alimentar las aves con niveles deficitarios de F.D. (0,08% y 0,07%), la enzima fitasa aumentaba los valores de la gravedad específica sobre los niveles de 0,34% de F.D. sin fitasa.

Um y Paik (1999) encontraron que en dietas con una suplementación de 0,25% de P como fosfato tricálcico al adicionar fitasa disminuía la gravedad

específica significativamente. Por su parte, Scott *et al.* (1999) describen que a niveles de 0,4 % de F.D., la incorporación de fitasa disminuía significativamente la gravedad específica.

En el presente trabajo, la incorporación de fitasa disminuyó significativamente el grosor de la cáscara. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Borrmann *et al.* (2001) que indican que 300 U disminuyen el grosor de la cáscara (0,359 mm con fitasa y 0,368 mm sin fitasa). Por otro lado, Dagher *et al.* (1985) encontraron que el mayor grosor de cáscara se obtenía con dietas con niveles $\leq 0,35\%$ de F.D. Finalmente, Terreros (2001) encontró que a mayor incorporación de la enzima fitasa menor era el peso de la cáscara.

Los resultados del presente estudio se podrían explicar debido a una mayor disponibilidad de fósforo liberado por la enzima fitasa. Esta mayor disponibilidad de fósforo tendría un efecto adverso sobre el proceso de la mineralización de la cáscara, alterando la disposición espacial de los iones de calcita (Simkiss, 1964).

Por otra parte, es posible que la fitasa utilizada en el presente estudio haya tenido una mayor actividad a la asignada en la formulación de las raciones, liberando una cantidad de fósforo fítico mayor al 0,1% de la dieta, aumentando de esta forma los niveles de P en sangre. Es sabido que un aumento en los niveles de P plasmático produce un efecto inhibitorio de la $1,25 (\text{OH}) \text{D}_3$, disminuyendo de esta forma la absorción de Ca intestinal y la retención de Ca en riñón, procesos que pueden deteriorar la calidad de la cáscara (Roland, 1992). Consecuentemente, los resultados del presente estudio demuestran que es muy importante conocer exactamente la actividad fitásica de la enzima antes de su uso en las raciones de gallinas ponedoras.

La presencia de fitasa no tuvo efectos significativos ($p>0,05$) sobre la deformación de la cáscara.

La fitasa disminuyó significativamente la resistencia de la cáscara a la fractura, lo cual concuerda con los resultados de grosor de cáscara. Estos resultados no concuerdan, sin embargo, con los obtenidos por Terreros (2001), quién obtuvo la mayor resistencia a la fractura al incorporar 300 U/kg. de dieta al ser comparado con niveles de 600 U, los cuales obtuvieron los menores valores de resistencia a la fractura. Um y Paik (1999) no encontraron diferencias significativas para esta variable al incorporar la enzima fitasa. La explicación de estos resultados estaría dada por el menor grosor de cáscara obtenido en los tratamientos suplementados con la enzima fitasa.

Analizando los resultados para calidad de cáscara en su totalidad, se observa un deterioro de ella al incorporar la enzima fitasa, disminuyendo significativamente el grosor de la cáscara y la resistencia a la fractura, y numéricamente la gravedad específica. Se ha visto que el aumento de F.D. obtenido al adicionar esta enzima en dietas con niveles no extremadamente deficitarios de F.D. produce un deterioro en varios indicadores de calidad de cáscara, por lo que se hace necesario saber la cantidad exacta de F.D. que libera la fitasa para no subestimar este nivel en la dieta, y así prevenir dichos efectos.

La adición del complejo disminuyó significativamente la gravedad específica. Esta disminución comenzó a manifestarse a partir de la medición de la semana 30 en adelante, lo que coincide con el aumento del peso de huevo. La gravedad específica se ve principalmente influenciada por el grosor de la cáscara y por el tamaño de la cámara de aire. Huevos más grandes poseen mayor tamaño de cámara de aire y cáscaras más delgadas, lo que explicarían nuestros resultados. Además, en el estudio de digestibilidad ileal aparente, el C.M.E. aumentó la digestibilidad del fósforo más que la del calcio (Díaz, 2004), por lo que el exceso

de fósforo podría también perjudicar la gravedad específica. Estos resultados, sin embargo, contrastan con los obtenidos por Jiménez (2001) y Scheideler y Weber (2003) quienes no observaron un efecto significativo de la adición de C.M.E. sobre la gravedad específica.

La incorporación del C.M.E. no afectó significativamente el grosor de la cáscara, la resistencia a la fractura y la deformación de la cáscara previa a fractura. Resultados similares fueron obtenidos por Jiménez (2001), al usar un C.M.E. similar al utilizado en el presente trabajo.

Color de la yema.

La incorporación de fitasa no produjo diferencias significativas en el parámetro color de yema. Por otra parte, no se encontraron estudios que evaluaran el efecto de la fitasa sobre este parámetro.

Con respecto a la inclusión del C.M.E., éste aumentó significativamente el color de yema, lo que concuerda por lo observado por Jiménez (2001). Estos resultados indicarían que la adición del C.M.E. mejoraría la disponibilidad y absorción de los carotenoides contenidos en el maíz mediante dos posibles mecanismos. El primero estaría dado por el efecto que las enzimas carbohidrasas tienen sobre la microflora intestinal. Al aumentar la disponibilidad y absorción de carbohidratos por acción de las enzimas, disminuye este sustrato para el crecimiento en el tracto gastrointestinal de las bacterias perjudiciales que degradan los ácidos biliares, produciendo esto, una mejor emulsificación de las grasas y, por lo tanto, aumentando la absorción de los lípidos (Bedford y Pack, 1998) y de carotenoides que son lipofílicos. El segundo mecanismo, estaría dado por el hecho que se ha descrito que estos carotenoides están unidos, entre otros compuestos, a proteínas dentro del grano de maíz (Latscha, 1990). Así, al entregar una proteasa exógena podría aumentar la liberación y exposición de los

carotenoides a las células del lumen intestinal (enterocitos), aumentando así su disponibilidad y absorción.

Peso y volumen de yema y albúmina, y sus razones.

La adición de fitasa no afectó significativamente ninguno de estos parámetros. Un estudio realizado por Jalal y Scheideler (2001) encontró diferencias significativas entre las dietas suplementadas con dos fitasas distintas y sus respectivos controles a nivel de 0,1% de F.D. en el porcentaje de albúmina siendo éstos mayores al incorporar cualquier fitasa.

La adición del C.M.E. mejoró significativamente el peso y volumen de yema y por lo tanto las razones peso yema /peso albúmina y volumen yema/ volumen albúmina. Esto se puede explicar por la acción de la amilasa sobre el almidón aportado principalmente por el maíz, y la acción de la xilanasas y proteasas sobre los FAN aportados por el afrechillo de trigo y la soya. Al mejorar la digestibilidad de estos nutrientes en intestino delgado ellos no se encuentran disponibles para ser utilizados como sustratos por la microflora perjudicial presente en intestino grueso, disminuyendo así su población. Este fenómeno se traduce en una menor degradación de los ácidos biliares por parte de esta microflora y, consecuentemente, en un aumento de la emulsión de las grasas y posterior absorción. Dos tercios de la materia seca de la yema está compuesta de lípido-proteínas ricas en triglicéridos (Thapon y Bourgeaus, 1994) por lo que es esperable que una mayor disponibilidad de lípidos sea utilizada para la formación de yema, manifestándose en un mayor tamaño y peso de ésta. La xilanasas contribuiría también en este aspecto al degradar las paredes celulares, principalmente en el afrechillo de trigo, liberando nutrientes como lípidos, carbohidratos, aminoácidos y proteínas, que se encontrarían disponibles para ser utilizados en la formación de la yema.

En la actualidad no existe ningún estudio que haga referencia al efecto del C.M.E. sobre el peso y volumen de yema, salvo Jiménez (2001), el cual no evidenció efectos significativos.

Estos resultados podrían ser útiles en la industria avícola, especialmente para aves reproductoras, debido a que una yema más grande representa una reserva nutricional mayor para el embrión en desarrollo y el pollo recién nacido. También sería beneficioso para la industria alimenticia debido a que la yema es utilizada en la fabricación de productos como mayonesa y pastelería.

Unidades Haugh.

La enzima fitasa no tuvo efectos significativos sobre este parámetro, lo que concuerda con Um y Paik (1999), Terreros (2001) y Jalal y Scheideler (2001).

Sin embargo, estos resultados contrastan con lo realizado por Borrman *et al.* (2001) quienes encontraron la enzima fitasa disminuyó las unidades Haugh significativamente.

La adición del C.M.E. tampoco tuvo un efecto significativo sobre estos parámetros, lo que concuerda con lo observado por Jiménez (2001).

Es evidente que ni la incorporación de la enzima fitasa ni la del C.M.E. ejercieron efectos medibles sobre la frescura del huevo.

Digestibilidad ileal de energía.

En el presente estudio, a pesar de que la fitasa produjo aumentos en la digestibilidad ileal aparente de la energía, estos no fueron significativos ($p > 0,05$). No obstante, otros autores (Ravidran *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2002 y 2003) señalan aumentos significativos en la digestibilidad de la energía, siendo estos mayores a niveles adecuados de F.D. (0,45%) que a niveles deficientes (0,23%) con niveles de 400 U/kg de dieta (Ravidran *et al.*, 1999). Se debe destacar que la enzima fitasa utilizada en este último trabajo es distinta a la utilizada en el

presente estudio, por lo que es esperable encontrar distintos efectos sobre la energía metabolizable.

La adición del C.M.E. mejoró significativamente la digestibilidad de la energía. Numerosos estudios han evaluado la digestibilidad ileal de la energía en pollos broilers, indicando mejoras significativas al usar el complejo multi enzimático (Danisco, 1997b; Danisco, 1997c; Danisco, 1998b; Danisco, 1998c; Wyatt *et al.*, 1999). Estas mejoras significativas también se ven reflejadas en ponedoras como lo describen los estudios realizados por Zanella *et al.* (1999), Douglas *et al.* (2000) y Scheideler y Weber (2003).

El efecto del C.M.E. estaría dado por la adición de las enzimas α -amilasa, xilanasas y proteasa. Las α -amilasas aumentan la digestibilidad del almidón, las xilanasas, al degradar los arabinosilanos, liberan moléculas de glucosa, las cuales se encontrarían disponibles para ser absorbidas por el ave, y por último las proteasas, al degradar las proteínas presentes en las paredes de los granos liberarían nitrógeno el cual aporta EM, aumentando además la digestibilidad de la proteína.

Digestibilidad ileal de proteína.

La fitasa no afectó significativamente la digestibilidad de la proteína. Esto concuerda con lo observado por Um y Paik (1999); Keshavarz (2000a); Keshavarz (2000b); Scheideler y Jalal (2000b); Ledaux y Firman (2001) y Peter y Backer (2001).

A pesar de que la incorporación de la fitasa aumentó la digestibilidad de la proteína numéricamente, este incremento no fue significativo. La explicación de estos resultados puede especularse, estaría dada por la tal vez insuficiente cantidad de proteína eventualmente liberada por la fitasa, la que pudiese no ser suficientemente importante para determinar una significancia estadística.

En el presente estudio, el C.M.E. mejoró significativamente la digestibilidad de la proteína. Resultados similares fueron los encontrados por Zanella *et al.* (1999), quienes observaron un aumento en la digestibilidad ileal de la proteína de un 2,9% al utilizar el C.M.E. Otros estudios indicaron mejoras entre un 0,3% (Danisco, 1997b), 1,8% (Danisco, 1998c) y un 2,2% (Danisco, 1997c). Además, en un estudio reciente realizado por Scheideler y Weber (2003), en el cual se utilizaron dos niveles de energía (2900 y 2770 Kcal/Kg de dieta) la adición del C.M.E. mejoró significativamente la retención de nitrógeno en ambos niveles energéticos. Sin embargo, según lo informado por Danisco (1998b) no encontraron diferencias significativas al adicionar el complejo.

El efecto del C.M.E. sobre la digestibilidad ileal de proteína estaría dado por la adición de las enzimas xilanasas y proteasas. Las xilanasas al degradar las paredes celulares, liberarían proteínas asociadas a estas estructuras, las cuales se encontrarían disponibles para ser absorbidas. Además, las proteasas también actuarían degradando las proteínas presentes en las paredes de los granos y liberarían nitrógeno, aumentando de esta manera la digestibilidad de la proteína.

CONCLUSIONES.

1. El uso de la enzima fitasa mejoró el porcentaje de postura y tuvo un efecto negativo sobre el peso y la calidad externa del huevo. Se hace necesario mayores estudios para determinar el real aporte de P disponible por parte de esta enzima.
2. El C.M.E. aumentó la digestibilidad ileal aparente de energía y proteína cruda, lo que se manifestó en un mayor peso de huevo, mayor peso, volumen y pigmentación de la yema.
3. Los indicadores evaluados en el presente estudio, no se mejoraron ($p>0,05$) por sobre las ventajas logradas separadamente por cada tipo de enzima, al ser ambas enzimas consideradas en conjunto.

BIBLIOGRAFÍA DE TEXTO.

- **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.

- **ANTILLON, A.** 1976. Pathology of caged laying hens fed different levels of calcium, phosphorus and vitamin D. PhD Thesis. New York, U.S.A. Cornell University. 163 p. (citado por 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.)

- **APAJALAHTI, J.H.A.** 2003. Microbial community analysis and its application in gastrointestinal health. **In:** Proceedings of the British Society of Animal Science Annual Meeting. March 24-26, 2003. University of York. York, U.K. p. 228-229.

- **APPLGATE, T.J.; WEBEL, D.M.; LEI, X.G.** 2003. Efficacy of a phytase derived from *Escherichia coli* and expressed in yeast on phosphorus utilization and bone mineralization in turkey poults. Poultry Science 82: 1726-1732.

- **ARIAS, J.L.** 1998. Calidad del huevo: un enfoque científico-práctico. Inform. Avic. & Porc. 218: 8-15.

- **ARIAS, J.L.; FINK, D.J.; XIAO, S.; HEUER, A.H. ; CAPLAN, A.I.** 1993. Biomineralization and eggshells: cell-mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix. Int. Rev. of Citol. 145: 217-250.

- **ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE PRODUCTORES DE HUEVO.** 2002. La calidad del huevo vista por el consumidor español. **In:** Jornada temática

Industria agroalimentaria. Seguridad y calidad alimentaria. Madrid, 11 de julio 2002.

- **ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.).** 1995. Methods of Analysis. Washington D.C.
- **BAILEY, R.W.** 1973. Structural carbohydrates. In: Butler, G.W. & R.W. Bailey, eds., Chemistry and Biochemistry of Herbage. New York: Academic Press, Vol. 1, p. 157-211 (Citado por Choct, M. 1997 Feed Non-Starch Polysaccharides: Chemical Structures and Nutritional Significance. Feed Milling International, June Issue, pp. 13-26.).
- **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).
- **BASF.** 1995. La eficacia de la fitasa microbiana en gallinas ponedoras. BASF (ed.), Química fina. 15p. (Investigación y práctica, 34).
- **BAKER, J.R.; BALCH, D.A.** 1962. A study of the organic material of the hen's egg shell. Biochem. J. 82: 352-361 (Citado por Arias, J.L.; Fink, D.J.; Xiao, S.; Heuer, A.H. ; Caplan, A.I. 1993. Biomineralization and eggshells: cell-mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix. Int. Rev. of Citol. 145: 217-250).
- **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.** 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.** 2000. Enzymes for cereals which do not pose viscosity problems. **In:** Proceedings from the third European Symposium on Feed Enzymes. May 8-10, 2000.
- **BEDFORD, M.R.; SCHULZE, H.** 1998. Exogenous enzymes for pigs and poultry. Nutrition Research Reviews 11: 91-114.
- **BEDFORD, M.R.; PACK, M.** 1998. Mechanism of action and nutritional benefits from feed enzymes in low-viscous poultry diets. **In:** Proceedings of the AFMA Forum 98. May 6-8, 1998. Sun City, South Africa. 14 pp.
- **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.; ZIMMERMAN, R.A.** 2000a. The effects of dietary available phosphorus levels and phytase on performance of young and older laying hens. Poultry Science 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.
- **BORRMANN, M.S.L.; BERTECHINI, A.G.; FIALHO E.T.; DE OLIVEIRA, B.L.** 2001. Efeitos da adição de fitase com diferentes níveis de fósforo disponível em rações de poedeiras de segundo ciclo. Ciênc. agrotec., Lavras, 25(1):181-187.

- **BROWN, I.** 1996. Complex carbohydrates and resistant starch. *Nutrition Reviews* 54: S115-S119.

- **BURROWS, H.; HRUBY, M.; HONG, D.; ADEOLA, O.** 2002. Addition of enzymes to corn-soy diets for ducks: A. Performance and digestibility study. (Abstract). Abstracts from current meetings of The Southern Poultry Science Society. *Poultry Science* 80 (Suppl.1):S127.

- **BÜHLER M.; LIMPER J.; MÜLLER A.; SCHWARTZ G.; SIMON O.; SOMMER M.; SPRING W.** 1998. Las enzimas en la nutrición animal. *Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernährung* (ed.). Bonn, Alemania. pp. 1-46.

- **CANTOR, A.H.** 1995. Using enzymes to increase phosphorus availability in poultry diets. *Biotechnology in the Feed Industry. Proceeding of Alltechs Eleventh Annual Symposium.* Alltech Inc. (Ed.) T.p. Lyons and K.A. Jacques. Nottingham University Press. pp 349-354. (Citado por Khan, N. 1996. Tackling the Phosphate Burden. *Feed Mix* 4 (3): 22-26).

- **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. August 21-24, 2000. Montreal, Canada. 12 pp.

- **CHEYRAN, M.** 1980. Phytic acid interactions in food systems. *CRC Critical Review of Food Science and Nutrition* 13: 297-335.

- **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.** 1997. Feed non-starch polysaccharides: chemical structures and nutritional significance. Feed Milling International, June Issue, pp. 13-26.
- **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.** 1996. Enzymes in action. Feed Mix 4 (2): 22-28.
- **COELHO, M.B.** 2000. Positive, negative traits of phosphorus examined. Feedstuffs 7 Feb. 2000: 12-15, 23.
- **COON, C.; LESKE, K.** 1999. The effect of soluble calcium levels, nonphytate phosphorus levels, and natuphos phytase on laying hen performance. . **In:** Proceedings of the 1999 BASF Technical Symposium, Atlanta, Georgia, January 19, 1999.p 62-77.
- **COURTOIS, J.** 1947. Recherches sur la phytase III. Essais de séparations de l'activé glycerolphosphatasique et de l'activité du son de blé. Bioch. Biophys. Acta 1: 270-277. (Citado por Pointillart, A. 1994. Fitatos, fitasas: su importancia en la alimentación de monogástricos. INRA Prod. Anim. 7(1): 29-39.)
- **COWAN, D.; KAHN, N.** 1999. Phytase cuts phosphorous losses. Feed Mix 7 (3): 14-16.
- **CROMWELL, G.L.** 1992. The biological availability of phosphorus in feedstuffs for pigs. Pig News and Information 13 (2): 75N (Citado por Kornegay, E.T. 2001. Digestion of Phosphorus and other nutrients: the rol 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.)

- **CUART, J. J.** 2003. El calcio y las cáscaras de huevo. [en línea] <
<http://www.wfoib.com/calificacion.htm>> [consulta: 16-10- 2003].

- **DAGHIR, N.J.; FARRAN, M.T.; KAYSI, S.A.** 1985. Phosphorus requirements of laying hens in a semiarid continental climate. Poultry Science 64: 1382-1384.

- **D'ALFONSO, T.** 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]

- **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 allows nutrient reduction in corn-based layer diets without affecting production. 1500.27. Trial report-Australia. 3 p.

- **DANISCO.** 1998a. Avizyme[®] 1500 allows reduction in nutrient specification of a corn-based layer diets 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 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.** 2004. Auburn research backs *Salmonella* control. Press release. [en línea] Danisco Animal Nutrition. <http://animalnutrition.danisco.com/web/an/common/files/news_attachments/2004/Auburn_University_research.pdf> [consulta: 08-02-2004]
- **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.
- **DE RHAM, O.; JOST, T.** 1979. Phytate protein interactions in soybean extracts and low-phytate soy protein products. J. Food Sci. 44: 596-600.
- **DESHPANDE, S. S.; CHEYRAN, M.** 1984. Effects of phytate, divalent cations and their implications on alpha-amylase activity J. Food Sci. 49:

516 (Citado por Coelho, M.B. 2000. Positive, negative traits of phosphorus examined. Feedstuffs 7 Feb. 2000: pp. 12-15, 23.)

- **DÍAZ, B.G.R.** 2004. Consumo de alimento y digestibilidad ileal de fósforo y calcio en gallinas Leghorn: datos de memoria de título “Uso de fitasa y un complejo enzimático a base de xilanas, α -amilasa y proteasa sobre variables productivas y digestibilidad de fósforo y calcio en gallinas comerciales”. Santiago, Chile (Correspondencia Personal).

- **DIECKERT, J.W.; DIECKERT, M.C.; CREGER, C.R.** 1989. Calcium reverse assembly: a basic structural unit of calcium reserve system of the hen eggshell. Poultry Science 68: 1569-1584.

- **DOUGLAS, M.W.; 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. (citado por Dudley-Cash. 2001 Soybean meal source, added enzyme affect nutritional value for chicks. Feedstuffs Vol. 73, No. 41).

- **DOZIER, W.A.** 2000. How to manage dietary phosphorous in enviromentally sensitive areas. Feed Management 51(10): pp. 27-29.

- **EECKOUT, W.; DE PAEPE, M.** 1992. Phytase microbienne: comparaison de l’effet de 500 unités de phytase de blé et d’une phytase microbienne sur la digestibilité apparente du phosphore d’un aliment pour porcs à l’engrais. Landbouwjidschrift, Rev. Agricult. 45:209-215.

- **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]

- **FERNÁNDEZ, M.S.; ARAYA, M.; ARIAS, J.L.** 1997. Eggshells are shaped by a precise spatio-temporal arrangement of sequentially deposited macromolecules. *Matrix Biology* 16: 13-20.

- **FERNANDEZ, F.; HINTON, M.H.; BEDFORD, M.R.** 2002. The influence of endo-xylanase and protease mixture on *Campylobacter jejuni* colonization in broiler chicks. (Abstract). *Poultry Science* 91st Annual Meeting Abstracts (Suppl. 1) 80: 96 (410).

- **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (F.A.O.).** 1995. Sorghum and millets in human nutrition. [en línea] <<http://www.fao.org/DOCREP/T0818e/T0818E02.htm#Grains%20and%20their%20structure>> [consulta: 11-02-2004].

- **FOURDIN, A.** 1984. Valorisation par la phytase du phosphore phytique des grains. I. Introduction bibliographique sur la phytase. DEA Sciences Alimentaires 1984, Paris XI-ENSA Massy, 18 pp (LNSA). (Citado por Pointillart, A. 1994. Fitatos, fitasas: su importancia en la alimentación de los monogástricos. *INRA Prod. Anim.* 7(1): 29-39.)

- **FRANCIS, P.A.; ROBBINS, K.R.; MATHEW, F.A.; DRAUGHON, F.A.; GOLDEN, D.A.** 1999. The effects of Avizyme in rye or corn based diets on broiler on performance, microbiological and fermentation changes in the gastrointestinal tract. *Poultry Science* 78 (Suppl. 1): S30 (citado por Hruby, M.; Pierson, E.M. 2002. Implications of enzyme use in corn/sorghum/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].)

- **FRETZDORFF, B.; BRUMMER, J.M.; ROCKEN, W.; GREINER, R.; KONIETZNY, U; JANY, K.D.** 1995. Reduktion des Phytinsäure-Gehaltes bei der Herstellung von Backwaren und Getreidenahrmittein. *AID-Verbraucherdienst* 40:12 p.

- **FROST T.J.; ROLAND SR, D.A.** 1991. The influence of various calcium and phosphorus levels on tibia strength and eggshell quality of pullets during peak production. *Poultry Science* 70: 963-969.

- **FUNDACIÓN ESPAÑOLA PARA EL DESARROLLO DE LA NUTRICIÓN ANIMAL (FEDNA).** 1999. Normas FEDNA para la formulación de piensos compuestos. C. de Blas, G.G. Mateos y P.G. Rebollar (eds.).Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España. 496 pp.

- **GARCÍA, M.; GRACIA, M.I.; ROBLEDO, D.; SORENSEN, P.; MATEOS, G.G.** 1999. Effects of enzyme supplementation on nutrient digestibility and performance of broilers fed low viscosity cereals. (Abstract). *Poultry Science Annual Meeting Abstract* 78 (Suppl. 1): 55.

- **GARLICH, J.D.** 1979. The Phosphorus requirement in laying hens. **In:** Proceedings of the Georgia Nutrition Conference, Athens, GA. 1979. University Of Georgia. Pp. 104-113.(citado por Frost T.J.; Roland Sr, D.A. 1991. The influence of various calcium and phosphorus levels on tibia strength and eggshell quality of pullets during peak production. *Poultry Science* 70: 963-969.

- **GÓMEZ, S.; SCHEIDELER, S.E.** 1998. Effects of enzyme addition to corn-soybean rations with different energy densities on laying hen performance. (Abstract). *Poultry Science Annual Meeting Abstract* (Suppl.1) 78:103 (S36).

- **GÓMEZ, S.; MOJICA, C.; FERNANDEZ, S.R.** 2002. Effect of *Pheniophora lycii* phytase on nutrient utilization in Laying Hens. (Abstract). *Poultry Science Association 91st Annual Meeting Abstracts* (Suppl. 1) 80: 10 (39).

- **GÓMEZ, S.; MOJICA, C.; FERNANDEZ, S.R.** 2003. Effect of several levels of *Pheniophora lycii* phytase on nutrient utilization in Laying Hens.

(Abstract). Poultry Science Association 92st Annual Meeting Abstracts (Suppl. 1) 81: 50 (211).

- **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.; ARANÍBAR, M.J.; LÁZARO, R.; MEDEL, P.; MATEOS, G.G.** 2003a. α -Amilase supplementation of broiler diets base on corn. Poultry Science 82: 436-442.
- **GRACIA, M.I.; LATORRE, M.A.; GARCÍA, M.; LÁZARO, R.; MATEOS, G.G.** 2003b. Heat processing of barley and enzyme supplementation of diets for broilers. Poultry Science 82: 1281-1291.
- **GRIMES, J.; CROUCH, A.N.** 1997. Enzyme supplementation may improve bird performance. Feedstuffs 69(22): 31-34.
- **HALLE, I.** 2001. Effect off dietary enzymes in wheat-based diets on laying performance of hens. **In:** Proceedings of the 13th European Symposium on Poultry Nutrition. 30 September -04 October, 2001. Blankenberge, Belgium.
- **HARMS, R.H.; MILES, R.D.** 1977. Phosphorus and laying hen nutrition. Feedstuffs 49(26): 18-19.

- **HEMPE, J.M.; LAUXEN, R.C.; SAVAGE, J.E.** 1998. Rapid determination of egg weight and specific gravity using a computerized data collection system. *Poultry Science* 67: 902 – 907.

- **HESSING, M.; MOCKING-BODE, H.; BLEEKER-MARCELIS, H.; VAN LAARHOVEN, H.; ROOKE, J.; MORGAN, A.** 1995. Quality of soybean meals and effect of microbial enzymes in degrading soya antinutritional compounds (ANC's) using immunochemical, microscopic techniques and *in vivo* studies. *In*: Proceedings of the 2th European Symposium on feed enzymes. October 25-27, 1995. Noordwijkerhout, The Netherlands. p. 176-177. (Citado por Bedford, M.R. 1996. The effect of enzymes on digestion. *J. Appl. Poultry Res.* 5: 370-378.)

- **HRUBY, M.** 2003. Enzyme reduce food poisoning bacteria. [en línea]. Danisco Animal Nutrition. <http://animalnutrition.danisco.com/web/an/common/files/attachmets_tech_publications/Enzymes_reduce_food_poisoning_bacteria.pdf> [consulta: 05-11-2003]

- **HRUBY, M.; BARRATT, A.** 2000. The positive effects of carbohydrases on the enviroment. [en línea]. Danisco Animal Nutrition. <http://animalnutrition.danisco.com/web/an/common/files/news_attachmets/53_attach.pdf> [Consulta: 13-01-2004].

- **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].

- **HUISMAN, J.; TOLDMAN, G.H.** 1992. Anti-nutritional factors in the plant proteins of diets for non-rumiants. *In*: Haresign, W.; Cole, D.J.A. (Eds.). Recent advances in animal nutrition 1992. Butterworth Heinemann. Oxford, U.K. pp. 3-31.

- **HUYGHEBAERT, G.** 2003. Replacement of antibiotics in poultry. **In:** Proceedings of the Eastern Nutrition Conference. May 8-9, 2003. Quebec, Canada. p. 55-78.
- **IJI, P.A.** 1999. The impact of cereal non-starch polysaccharides on intestinal development and function in broiler chickens. *World's Poultry Science Journal* 55 (4): 375-385.
- **IKEGAMI, S.; TSUCHIHASHI, F.; HARADA, H.; TSUCHIHASHI, N.; NISHIDE, E.; INNAMI, S.** 1990. Effect of viscous indigestible polysaccharides on pancreatic-biliary secretion and digestive organs in rats. *J. Nutr.* 120(4):353-360.
- **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.
- **JANSMAN, A.J.M.; SCHULZE, H.; VAN LEEUWEN, P.; VERSTGEN, M.W.A.** 1994. Effects of protease inhibitors and lectins from soya on the true digestibility and endogenous excretion of crude protein in piglets. **In:** Proc. of the 6th Int. Symposium on digestive physiology in pigs, October, 4-6, 1994, Bad Doberman, Germany. Pp. 322-325 (Citado por Bedford, M.R. 1996. The effect of enzymes on digestion. *J. Appl. Poultry Res.* 5: 370-378.)
- **JARONI, D.; SCHEIDELER, S.E.; BECK, M.; WYATT, C.** 1999. The effect of dietary wheat middlings and enzyme supplementation. 1. Late egg production efficiency, egg yields, and egg composition in two strains of leghorn hens. *Poultry Science* 78: 841-847.
- **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.

- **JOHNSON, I.T.; GEE, J.M.** 1981. Effect of gel-forming gums on the intestinal unstirred layer and sugar transport in vitro. *Gut* 22:398-403 (Citado por Choct, M. 1997. Feed non-starch polysaccharides: chemical structures and nutritional significance. *Feed Milling International*, June Issue, pp. 13-26.).

- **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.

- **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 de growing and laying on performance of two strains of leghorns. *Poultry Science* 82: 1444-1456.

- **KESHAVARZ, K.; AUSTIC, R.E.** 1990. Effect of dietary minerals on acid-base balance and eggshell quality in chickens. *J. Nutr.* 120:1360-1369.

- **KEHAVARZ, K.; AUSTIC, R.E.** 2004. The use of low-protein, low-phosphorus, amino acid-and phytase-supplemented diets on laying hen performance and nitrogen and phosphorus excretion. *Poultry Science* 83: 75-83.
- **KESHAVARZ, K.; NAKAJIMA, S.** 1993. Re-evaluation of calcium and phosphorus requirements of laying hens for optimum performance and eggshell quality. *Poultry Science* 72:144-153.
- **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.
- **KIM S.H.; LEE W.J.; LEE S.J.; YU D. J.; PARK S.Y.; KANG B. S.; NA J. C.; RYU K. S.** 2001. Effects of dietary supplemental microbial phytase and nonphytate phosphorus on performance, nutrient digestibility and egg quality of laying hens. (Abstract). *Poultry Science* 80, (Suppl. 1): 478.
- **KIRK, O.; VEDEL BORCHERT, T.; CRONE FUGLSANG, C.** 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 345-351.
- **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.
- **KLINGENSMITH, P.M.; HESTER, P.Y.** 1985. Phosphorus phase feeding and uterine and ithmus mucosal enzymes and mineral in relation to soft-shelled and shell-less eggs production. *Poultry Science* 64: 2180-2188.

- **KORNEGAY, E.T.; DENBOW, D.M.; ZHANG, Z.** 1997. Phytase supplementation of corn-soybean meal broiler diets from three to seven weeks of age. (Abstract). Poultry Science Annual meeting abstracts. Athens, Georgia, U.S.A. August 3-6. p.6
- **KORNEGAY, E.T.** 2001. Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytase and factors influencing their activity. **In:** Bedford, M.R.; Patridge, G.G. (Eds.). Enzymes in animal nutrition. CABI Publishing. Wallingford Oxon, U.K. pp. 237-272.
- **KNUCCKLES, B.E.; BETSCHAT, A.A.** 1987. Effect of phytate and other myo-inositol phosphate esters on alpha-amylase digestion of starch. J. Food Sci. 52(3): 719-721.
- **LATSCHA, T.** 1990. Carotenoids, their nature and significance in animal feeds. Department of Animal Nutrition and Health. F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland.
- **LÁZARO, R.; GARCÍA, M.; ARANIBAR, M.J.; MATEOS, G.G.** 2003. Effect of enzyme addition to wheat-, barley-and rye-based diets on nutrient digestibility and performance of laying hens. Br. Poult. Sci. 44(2): 256-265.
- **LEDOUX, D. R.; FIRMAN J. D.** 2001. Effects of Natuphos on amino acid and energy release by turkeys and broilers fed diets formulated on an ideal protein basis. **In:** Proceedings of the 2001 Multi-State Poultry Feeding and Nutrition Conference. Indianapolis, IN. May 13-15, 2001. pp. 1-22.
- **LESKE K.; COON, C.** 1999. A bioassay to determinate the effect of phytase on phytate phosphorous hydrolysis and total phosphorous retention of feed ingredients as determined with broilers and laying hens. Poultry Sci. 78:1151-1157.

- **LEESON, S.; SUMMERS, J.D.** 1976. Effect of adverse growing conditions on corn maturity and feeding value for poultry. *Poultry Science* 55: 588-593. (citado por 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].)

- **LEESON, S.; SUMMERS, J.D.** 1997. Use of enzymes in poultry nutrition. **In:** Commercial poultry nutrition. 2^a ed. University Books. Guelph, Ontario, Canada. pp. 51-72.

- **LEESON, S.; YERSIN, A; VOLKER, L.** 1993. Nutritive value of the 1992 corn crop. *J. Appl. Poultry Res.* 2: 208-313

- **LIEBERT, F.C.; WECKE, C.; SCHONER, F.J.** 1993. Phytase activity in different gut contents of chickens as dependent on levels of phosphorus and phytase supplementation. **In:** Proceedings of the 1993 Symposium of enzymes in animal nutrition. Karthause Ittingen, Switzerland. October 13-16, 1993. pp. 202-205.

- **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.

- **LISTER, S.** 2002. Campylobacter-the lurking menace. *International Poultry Production* 10: 15-19.

- **MAENZ, D.D.; CLASSEN, H.L.** 1998. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poultry Science* 77:557-563.

- **MATHLOUTHI, N.; MOHAMED, M.A.; LARBIER, M.** 2003. Effect of enzyme preparation containing xylanase and beta-glucanase on performance of laying hens fed wheat/barley or maize/soybean meal – based diets. *British Poultry Science* 44(1): 60-66.

- **McDONALD, P.; EDWARDS, R.A.; GREENHALGH, J.F.D; MORGAN, C.A.** 2002. *Animal Nutrition*. 6th Ed. Pearson Education Ltd., Gosport, U.K. pp. 561-582.

- **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.

- **McNAMARA, D.J.** 1999. Corrigiendo los mitos sobre la nutrición: la importancia del huevo en una dieta saludable. [en línea] Asociación de productores de huevos de Chile. < <http://www.asohuevo.cl/Salud.html>> [consulta: 15-10-2003].

- **MEISTER, K.** 2002. The role of eggs in the diet: Update. [en línea] American Council on Science and Health. <http://www.acsh.org/publications/reports/eggs_2002.pdf> [consulta: 15-10-2003]

- **MILES, R.D.; COSTA, P.T.; HARMS, R.H.** 1983. The influence of dietary phosphorus level on laying hen performance, egg shell quality and various blood parameters. *Poultry Science* 62: 1033-1037.

- **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.

- **NAVA, G.; JUAREZ, M. A.; LEDESMA, N; CHARLES, L. M.; MERINO, R.; MORALES, E.; SUTTON, L.; SILVA, M.; TELLES,**

- G.** 2002. The addition of an enzymatic complex induces the occurrence of necrotic enteritis in broiler chicks fed with a high-wheat-based diet and coccidia challenge. (Abstract). Abstracts from current meetings of The Southern Poultry Science Society. Poultry Science 80 (Suppl.1):S109.
- **NOY, Y.; SKLAN, D.** 1995. Digestion and absorption in the young chick. Poultry Science 74: 366-373 (citado por 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 of the AFMA Forum. May 6-8, 1998. Sun City, South Africa).
 - **NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL.** 1994. Nutrient requirements of domestic animals. Nutrient requirements of poultry. 9th ed. National Academy of Sciences Press. Washington, D.C., USA. 155p.
 - **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.
 - **NYS, Y.; FRAPIN, D.; POINTILLART, P.** 1996. Occurrence of phytase in plants, animals and microorganism. **In:** Coelho, M.B.; Kornegay, E.T. (ed.) Phytase in Animal Nutrition and Waste Management. BASF Corporation. Mount Olive, New Jersey, pp. 213-240.
 - **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.
 - **OGASAWARA, T.; KOGA, O.; NISHIYAMA, H.** 1975. Premature oviposition induced by intrauterine injection of phosphate solution in the laying hen. Jpn. J. Zootech. Sci. 46: 185-191.
 - **OVERFIELD, N.D.** 1995. Egg quality assessment techniques at laboratory and field level. **In:** Proceedings of the VI European symposium of the

quality of eggs and egg products. Zaragoza, Spain. September 25 - 29, 1995.

- **PACK, M; BEDFORD, M.R.; HARKER, A.; LE NY, P.** 1998. Alleviation of corn variability with poultry feed enzymes: recent progress in development and practical application. **In:** Proceedings of the AFMA Forum. May 6-8, 1998. Sun City, South Africa. 16 p.
- **PALLAUF, J.; RIMBACH, G.** 1995. Recent results on phytic acid and phytase. **In:** Proceedings of the 5TH Forum Animal Nutrition, BASF Fine Chemicals, May 4-5, 1995, Ludwigshafen, Germany.
- **PERSIA, M.E.; DEHORITY, B.A.; LILBURN, M.S.** 2002. The effects of enzyme supplementation of corn-and wheat- based diets on nutrient digestion and cecal microbial populations in turkeys. *J. Appl. Poult. Res.* 11 (2): 134-145.
- **PIERSON, E.M.** 2003. Update of the use of Avizyme 1502® in layer diets. **In:** Seminario Uso de enzimas en la producción avícola. 26 de junio, 2003. Santiago, Chile.
- **POINTILLART, A.** 1993. Importance of phytates and cereal phytases in the feeding of pigs. **In:** Wenk, C.; Boessinger, C.M. (Eds.). *Enzymes in animal nutrition. Proceedings of the 1st Symposium Kartause Ittinger, Switzerland. 13-16 october, 1993.* pp. 192-199. (citado por Kornegay, E.T. 2001. Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytase and factors influencing their activity. **In:** Bedford, M.R.; Patridge, G.G. (Eds.). *Enzymes in animal nutrition.* CABI Publishing. Wallingford Oxon, U.K. pp. 237-272.
- **POINTILLART, A.** 1994. Fitatos, fitasas: su importancia en la alimentación de los monogástricos. *INRA Prod. Anim.* 7(1): 29-39.

- **POINTILLART, A.; COLIN, C.; CAYRON, B.; CAMUS, P.; FOURDIN, A.** 1989. Apport vitaminique D et absorption du phosphore phytique chez le porc. Jour. Rech. Porc. 21: 39-44.

- **PUNNA, S.; ROLAND, Sr. 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.

- **RAKOWSKA, M.; REK-CIEPLY, B.; SOT, A.; LIPISKA, E.; KUBINSKI, T.; BARCZ, I.; VE AFAHASJEV, B.** 1993. The effects of rye, probiotics and niasin on faecal flora and histology of the small intestine of chicks. J. Animal and Feed Sci., 2 (1/2) 73-81.

- **RAVIDRAN, V.** 1999. Protein and energy effects of microbial phytase in poultry diets. Use of Natuphos[®] phytase in layer nutrition and manegemet. BASF Technical symposium. pp. 1-21. (1999 series).

- **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.

- **RAVIDRAN, V.; CABAUG, S.; RAVIDRAN, G.; BRYDEN, W.L.; SELLE, W.L.** 2000. Response of broilers to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus levels. II. Effects on apparent metabolizable energy digestibility and nutrient retention. British Poultry Science 41 (2): 193-200.

- **REAL ACADEMIA DE LA LENGUA ESPAÑOLA.** 2001. Diccionario de la lengua española. 22ª edición. Espasa Calpe. Madrid, España. 1656 p.

- **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]

- **ROBERTS, J.R.; CHOCT, M.** 1999. The use of commercial enzymes and egg shell quality in four strains of laying hens. **In:** Proceedings of the 8th European Symposium on the Quality of Egg and Egg Products. Bologna, Italy, 1999. Università Degli Studi Di Bologna, World Poultry Science Association, European Federation.

- **ROLAND SR., D.A.** 1992. The interrelationship of phosphorus, calcium and vitamin D3 on bone metabolism. **In:** Proceedings of the National Feed Ingredient Association Meeting. Chicago, Illinois, U.S.A. June 1-3, 1992.

- **ROLAND SR. D.A.; PUNNA S.** 1998. Effect of dietary supplementation of phytase on Hy-line® W-36 hens fed varying levels of dietary phosphorus 2. Week 19 to 50. **In:** Proceedings of the 1999 BASF Technical Symposium. Atlanta, Georgia, U.S.A. January 19, 1999. Pp.49-59.

- **ROSEN, G.** 2001. Multi-factorial efficacy evaluation of alternatives to antimicrobials in pronutrition. **In:** Proceedings of the BSAS annual meeting. April 10-11, 2001. York, U.K. (Citado por 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].)

- **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.
- **RUTHERFURD, S.M.; CHUNG, T.K.; MOREL, P.C.H.; MOUGHAN, P.J.** 2004. Effect of microbial phytase on ileal digestibility of phytate phosphorus, total phosphorus and amino acids in low-phosphorus diet for broilers. *Poultry Science* 83: 61-68.
- **SALANITRO, J.P.; BLAKE, I.G.; MUIRHEAD, P.A.; MALIO, M.; GOODMAN, J.R.** 1978. Bacteria isolated from the duodenum, ileum and cecum of young chicks. *Appl. Environ. Micro.* 35(4) 782-790.
- **SALEH, F.; OHTSUKA, A.; TANAKA, T.; HAYASHI, K.** 2003. Effect of enzymes of microbial origin on *in vitro* digestibilities of dry matter and crude protein in soybean meal. *Animal Science Journal* 74 (1): 23-29.
- **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. (Citado por 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.)
- **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. [en línea]. University of Nebraska. <<http://www.ianr.unl.edu/pubs/poultry/mp70/mp70-04.htm>> [consulta: 23-05- 2002].
- **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.
- **SCOTT, M.L.; NESHEIM, M.C.; YOUNG, R.J.** 1982. Essential inorganic elements. **In:** Nutrition of the chicken. Scott, M.L.; Nesheim, M.C.; Young, R.J. (Eds.). 3^a edición. W.R. Humphrey Press. New York (E.E.U.U.). pp. 277-382.
- **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.
- **SEBASTIAN, S.; TOUCHBURN, S.P.; CHAVEZ, E.R.; LAGUE, P.C.** 1996. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and utilization of dietary calcium, phosphorus, copper and zinc in broiler chickens fed corn-soybean diets. Poultry Science 75 (6): 729-736.
- **SEBASTIAN, S.; TOUCHBURN, S.P.; CHAVEZ, E.R.; LAGUE, P.C.** 1997. Apparent digestibility of protein and amino acids in broiler chickens fed a corn-soybean diet supplemented with microbial phytase. Poultry Science 76: 1760-1769.

- **SIMKISS, K.** 1964. Phosphates as crystal poisons of calcification. *Biol. Rev.* 39: 487-505.

- **SIMONS, P.C.M.; JONGBLOED, A.W.; VERSTEEGH, H.A.J; KEMME, P.A.** 1992. Improvement of phosphorous availability by microbial phytase in poultry and pigs. **In:** Proceedings Georgia Nutrition Conference, Atlanta, Georgia, U.S.A. November 19, pp. 100-109.

- **SIMONS, P.C.M.; VERSTEEGH, H.A.J.** 1993. The effect of the addition in low doses of microbial phytase to layer feed on the technical results and skeleton and eggshell quality. Spelderholt publication 589. (Citado por BASF. 1995. La eficacia de la fitasa microbiana en gallinas ponedoras. BASF (ed.), Química fina. 15p. (Investigación y práctica, 34)).

- **SINGH, M.; KRIKORIAN, A.D.** 1982. Inhibition of trypsin activity by phytate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30: 799-800. (Citado por Kornegay, E.T. 2001. Digestion of Phosphorus and other nutrients: the rol of Phytase and factors influencing their activity. **In:** Enzymes in Farm Animal Nutrition. Bedford, M.R. and Patridge, G.G. (ed).CAB. International, 2001 p. 237-271.)

- **SOH, T.; YAMAMOTO, K.; FUJIHARA, N.; KOGA, O.** 2002. The effects of intrauterine injection with prostaglandin F2, arachidonic acid and phosphate solution on the eggshell formation of Japanese quail hen. *J. Poult. Sci.* 39(1): 56-60.

- **SOHAIL, S.S.; ROLAND SR, D.A.** 2002. Influence of dietary phosphorus on performance of Hy-Line W36 hens. *Poultry Science* 81: 75-83.

- **SOHAIL, S.S.; BRYANT, M.M.; ROLAND SR, D.A.** 2002. Effect of Avizyme on energy utilization in commercial leghorns. (Abstract). Abstracts from current meetings of The Southern Poultry Science Society. *Poultry Science* 80 (Suppl.1):S171.p.149.

- **SOKAL, R.; ROHLF, F.J.** 1981. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2° ed. New York. Freeman and Company. p. 859.

- **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.

- **THAPON, J.L.; BOURGEOIS, M.C.** 1994. L' oeuf et les ovoproduits. Technique et documentation. Lavosier, France. 344 p.

- **THOMPSON, L.U.** 1986. Phytic acid: a factor influencing starch digestibility and blood glucose response. **In:** Graf, E. (ed) Phytic acid: Chemistry and Applications. Pilatus Press, Minneapolis, p. 173.

- **THOMPSON, L.** 1988. Antinutrients and blood glucose. Food Technology 42(4): 123-132.

- **THORPE, J.; BEAL, J.D.** 2001. Vegetable protein meals and the effects of enzymes. **In:** Bedford, M.R.; Patridge, G.G. (Eds.). Enzymes in animal nutrition. CABI Publishing. Wallingford Oxon, U.K. pp. 125-144.

- **TUCKER, L.; WYATT, C.; BEDFORD, M.R.** 2000. Feed enzymes and betaine in antibiotic free poultry diets. [en línea]. AFMA Matrix, March 2000. <http://www.afma.co.za/AFMA_Template/1,2491,768_423,00.html> [consulta: 01-03-2004].

- **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.

- **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 DE MIEROP, L.; GHESQUIERE, H.** 1998. Enzymes have a long life ahead. *World Poultry* 14 (11): 16-18.

- **VAN DER KLIS, J.D.; VERSTEEGH, H.A.J.** 1991. The ileal absorption of phosphorus in light, white laying hens when using microbial phytase and various calcium contents in layer feed. Spelderholt publication 563. (Citado por BASF. 1995. La eficacia de la fitasa microbiana en gallinas ponedoras. BASF (ed.), Química fina. 15p. (Investigación y práctica, 34).)

- **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.

- **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

- **WALDROUP, P.W.** 1999. Nutritional approaches to reducing phosphorus excretion by poultry. *Poultry Science* 78: 683-691.

- **WICKER, D.L.** 1999. Phosphorus reduction techniques examined. *Feedstuffs* 71(2): 12-14.

- **WOLFORD, S.C.; SIMMINS, P.H.; VAN KEMPEN, T.** 2002. Xylanase improves the ileal energy and nitrogen digestibility of high weat finisher diets in swine. [en línea]. NC State University. <<http://mark.asci.ncsu.edu/SwineReports/2002/wolford.htm>>. [Consulta: 05-01-2004].

- **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.

- **YAMAZAKI, M.; MURAKAMI, H.; YAMAZAKI, M.; TAKEMASA, M.** 1996. Reduction of nitrogen excreted from broiler chicks by feeding low-protein, aminoacid-supplemented diets. *Jp. Poult. Sci.* 33(4): 249-255. (Citado por Hruby, M.; Barratt, A. 2000. The positive effects of carbohydrases on the environment. [en línea]. Danisco Animal Nutrition. <http://animalnutrition.danisco.com/web/an/common/files/news_attachmets/53_attach.pdf> [Consulta: 13-01-2004].)

- **YI, Z.; KORNEGAY, E.T.; DENBOW, D.M.** 1996. Effect of microbial phytase on nitrogen and amino acid digestibility and nitrogen retention of turkey poults fed corn-soybean meal diets. *Poultry Science* 75: 979-990.

- **ZANELLA, I.; SAKOMURA, N.K.; SILVERSIDES, F.G.; FIQUEIRO, A.; PACK, M.** 1999. Effect of enzyme supplementation on broiler diets based on corn and soybeans. *Poultry Science* 78: 561-568.

- **ZHANG, Z.B.; KORNEGAY, E.T.; RADCLIFFE, J.S.; DENBOW, D.M.; VEIT, H.P.; LARSEN, C.T.** 2000. Comparison of genetically engineered microbial and plant phytase for young broilers. *Poultry Science* 79: 709-717.

- **ZUMBADO, M.** 1983. La gravedad específica para determinar la calidad del cascarón. *Avicultura Profesional*, Marzo 1983. p. 8-10.

ANEXO A.

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

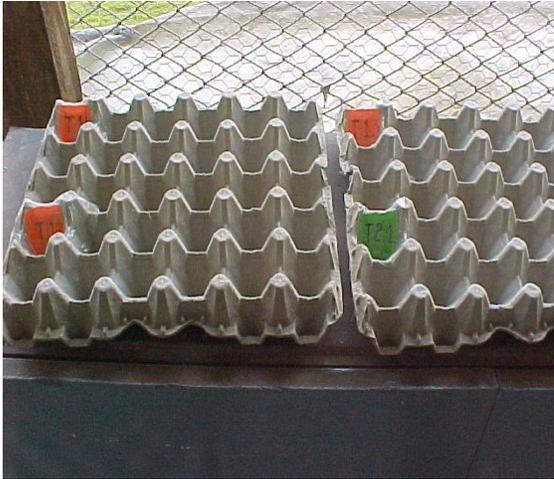
A.1.- Unidad experimental de gallinas ponedoras en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.



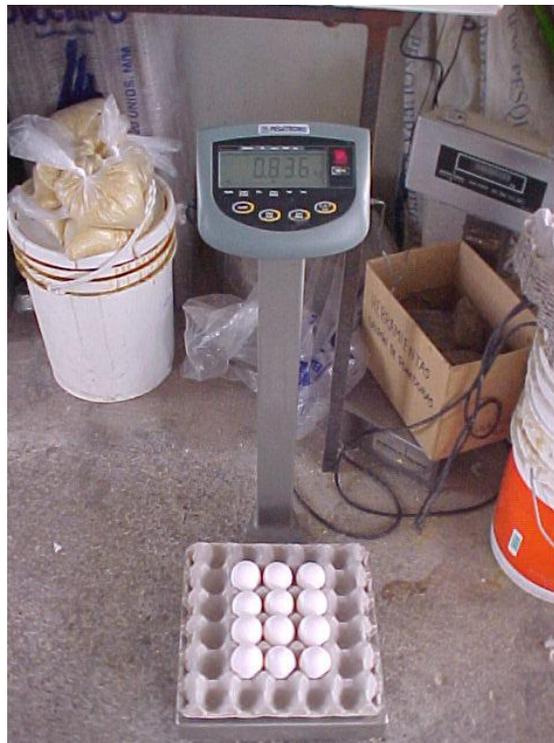
A.2.- Gallinas Hy-Line W-36 utilizadas en el estudio.



A.3.- Recolección de huevos en bandejas rotuladas según tratamientos y clasificación mediante el uso de un ovoscopio.



A.4.- Pesa con sensibilidad de 1g. utilizada para medir el peso de huevo.



A.5.- Clasificación de huevos sin cáscara.



A.6.- Clasificación de huevos trizados en bandeja y mediante transiluminación.



A.7.- Clasificación de huevos quebrados en bandeja y mediante transiluminación.



A.8.- Fabricación de alimento utilizando una maquina mezcladora en la unidad experimental de gallinas de postura.



ANEXO B.

FOTOGRAFÍAS DE PROCEDIMIENTOS REALIZADOS EN EL
CENTRO DE REFERENCIA PARA LA EVALUACIÓN Y
CERTIFICACIÓN DE LA CALIDAD DE PRODUCTOS DE ORIGEN
ANIMAL (CERPRAN) DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
VETERINARIAS Y PECUARIAS DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE

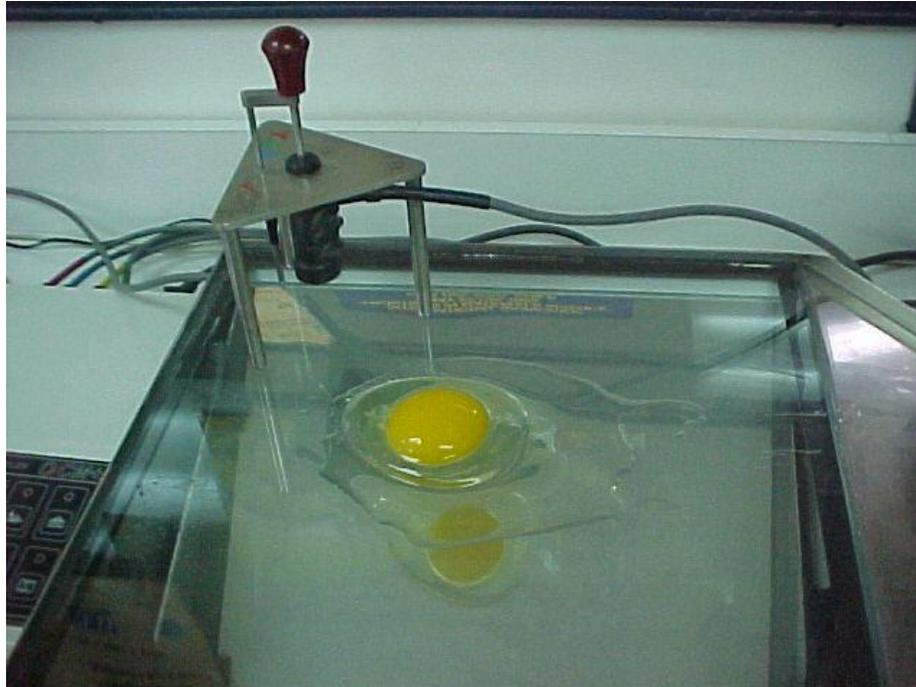
B.1.- Baldes empleados para preparar las distintas soluciones para medir la gravedad específica y huevos flotando en la solución respectiva.



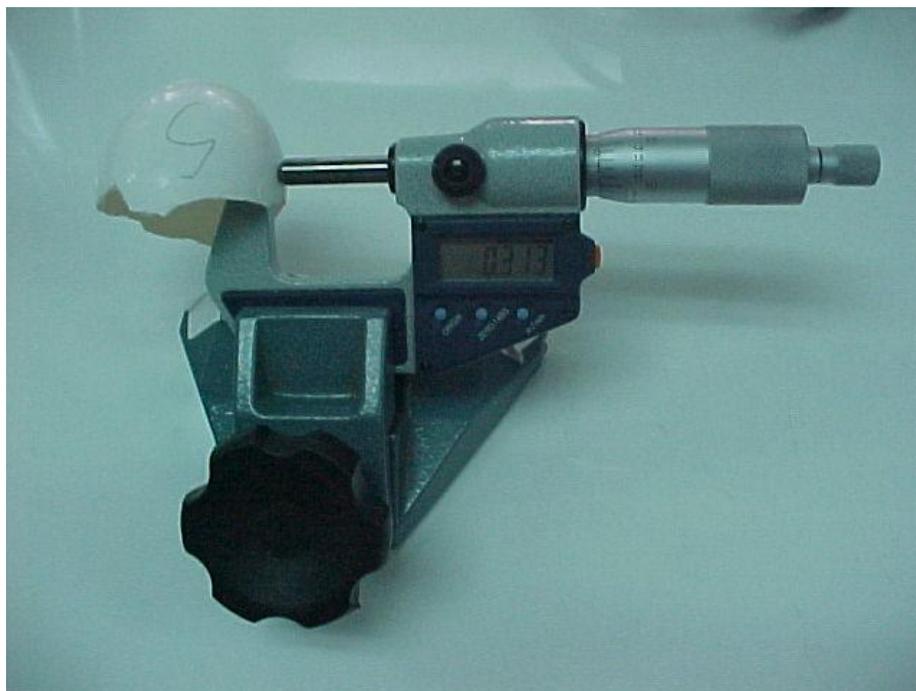
B.2.-Densímetro utilizado para medir la gravedad específica.



B.3.- Tornillo micrométrico conectado a un sistema computacional para medir las Unidades Haugh.



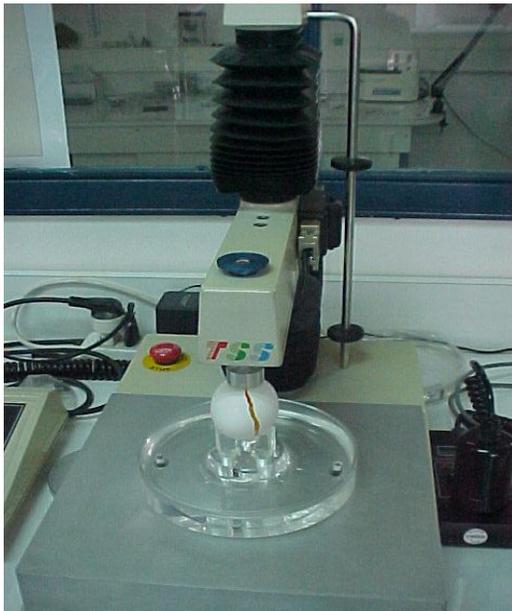
B.4.- Micrómetro utilizado para medir el grosor de la cáscara.



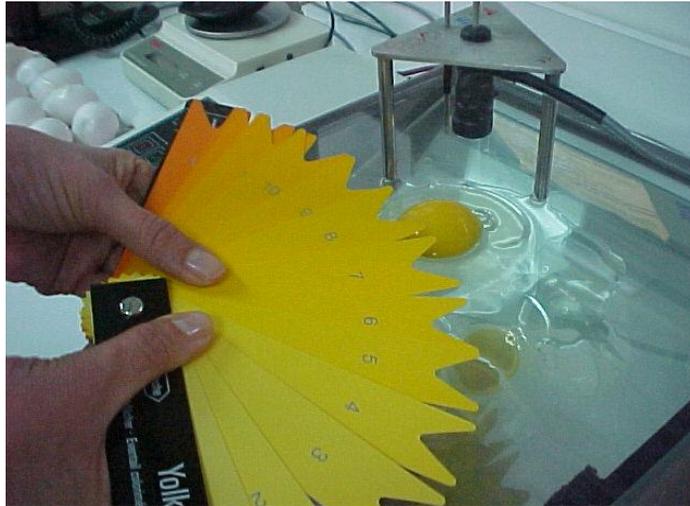
B.5.- Durómetro TSS para medir la deformación y resistencia de la cáscara a la fractura.



B.6.- Medición de la deformación y resistencia de la cáscara a la fractura con un Durómetro TSS.



B.7. Medición del color de la yema mediante el uso de un colorímetro ajustado a la escala de Roche®.



B.8.- Pesaje de yema y albúmina para establecer la razón peso yema/peso albúmina.



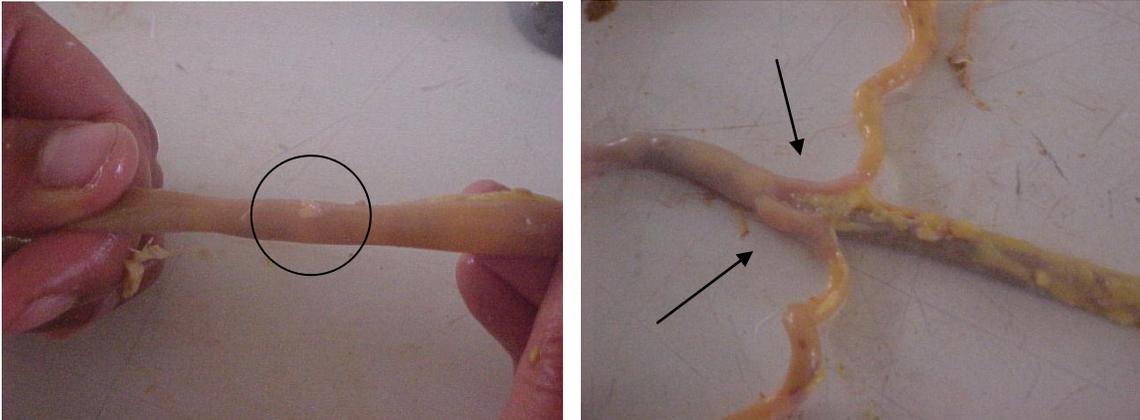
B.8.- Medición del volumen de yema y albúmina para establecer la razón volumen yema/volumen albúmina.



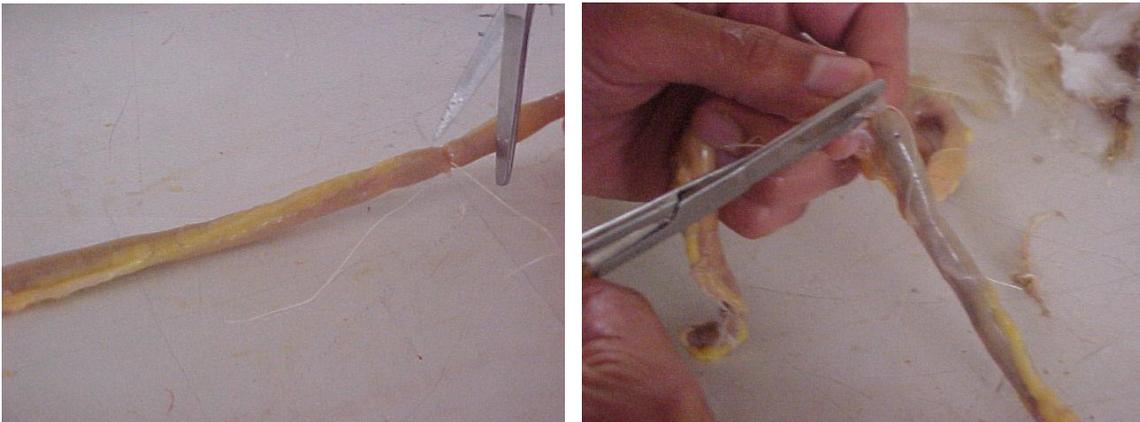
ANEXO C.

FOTOGRAFÍAS DE PROCEDIMIENTOS REALIZADOS Y EQUIPOS
UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DE DIGESTIBILIDAD ILEAL
APARENTE.

C.1.- Localización del divertículo de Meckel y la unión ileocecal.



C.2.- Ligadura y corte del ileon.



C.3.- Extracción del contenido ileal mediante presión mecánica digital y almacenamiento en envases para posterior análisis.



C.4.- Máquina liofilizadora, proceso de liofilización y contenido ileal liofilizado.



C.5.- Máquina de análisis de Kjeldahl utilizada para determinar el contenido de nitrógeno en las muestras liofilizadas.



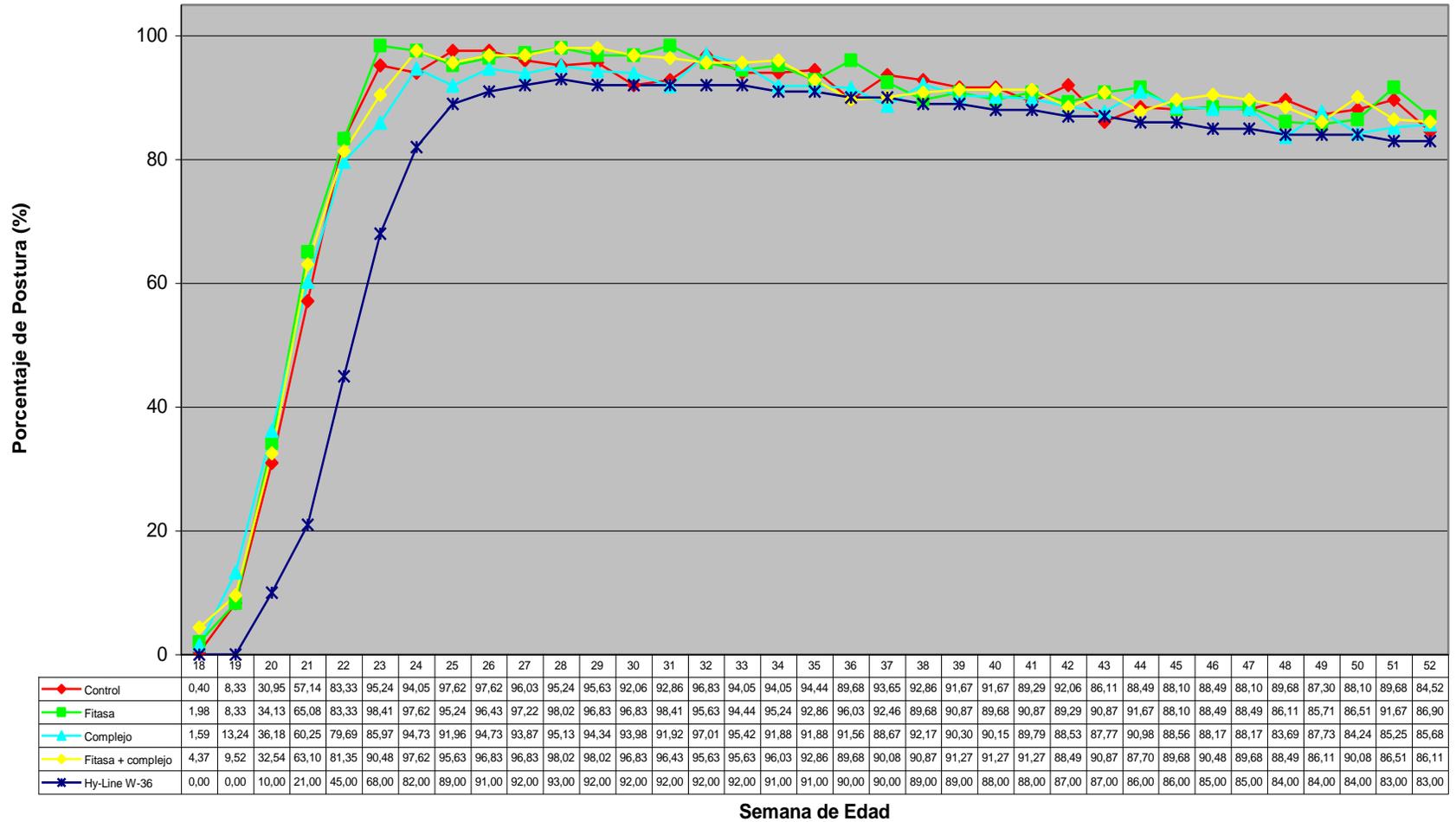
C.6.- Bomba calorimétrica adiabática utilizada en la determinación del contenido de energía de las muestras liofilizadas.



ANEXO D.

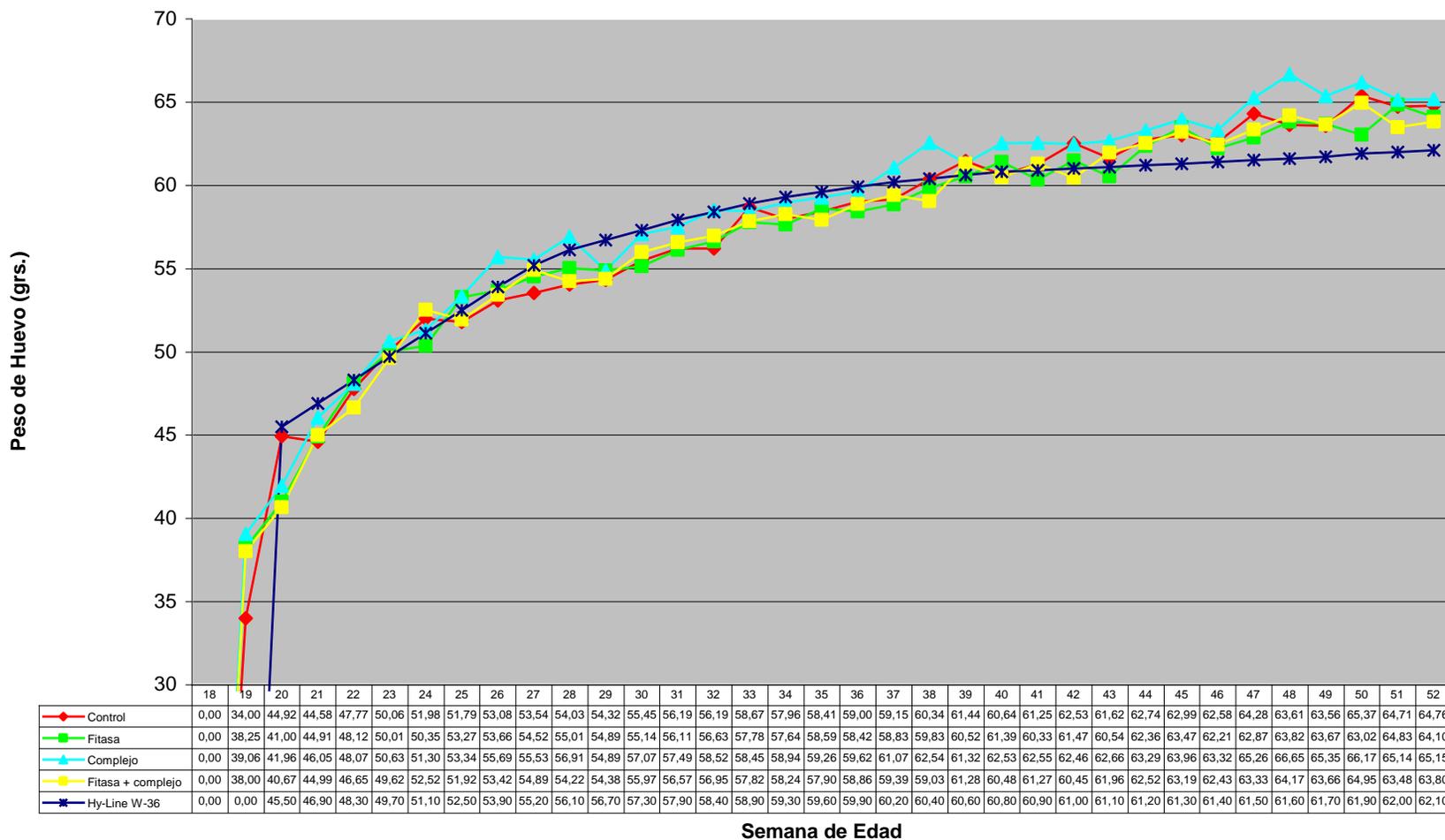
GRÁFICOS DEL COMPORTAMIENTO DE LOS INDICADORES
EVALUADOS DURANTE EL ESTUDIO Y TABLAS ANEXAS.

D.1. Producción de huevo en el período comprendido entre las 18 a las 52 semanas de edad, expresado como promedio semanal, comparado con el estándar de la línea genética ¹



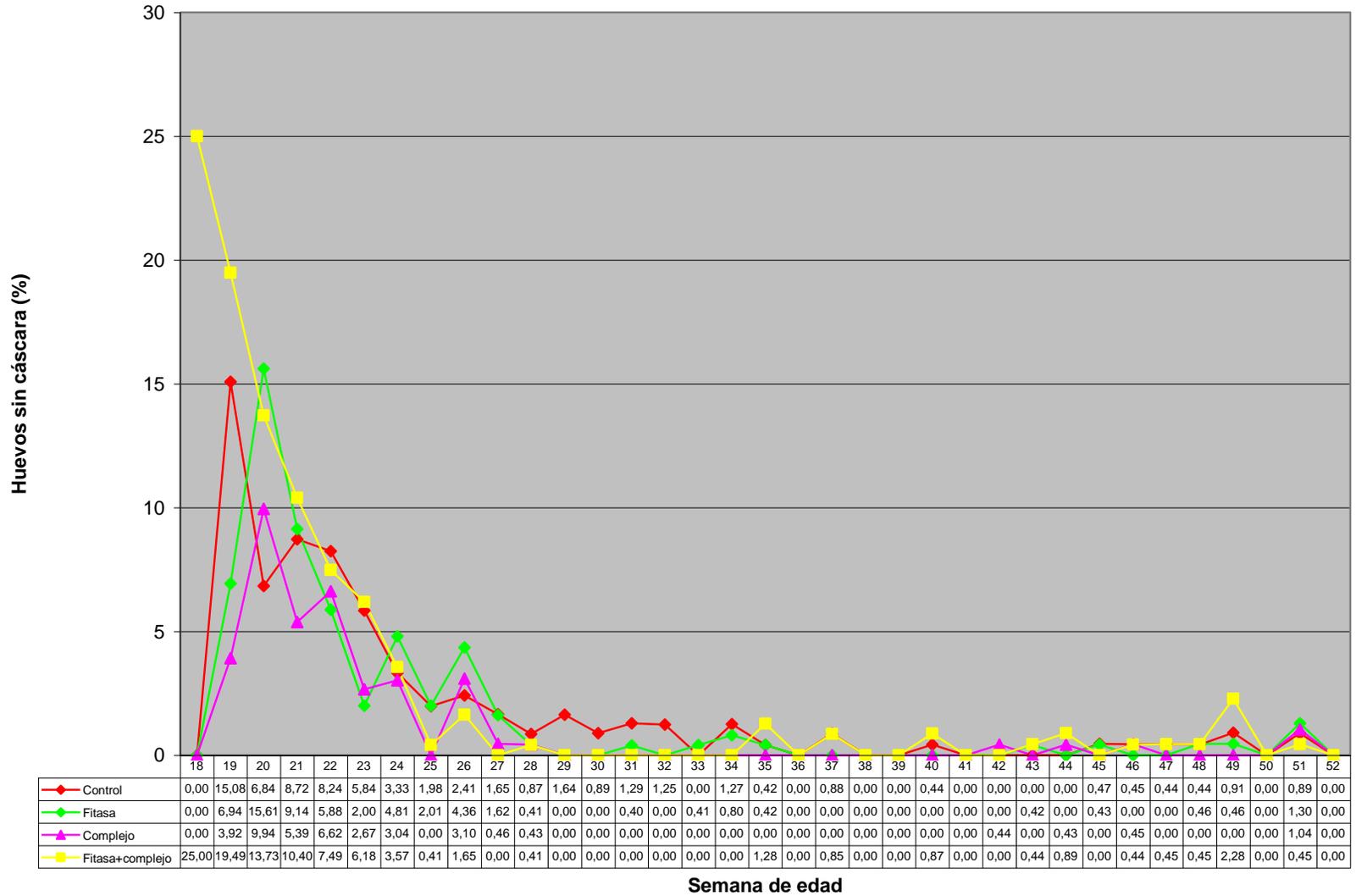
¹ Guía de manejo Hy-Line W-36 2000-2001.

D.2. Peso de huevo en el período comprendido entre las 18 a las 52 semanas de edad expresado como promedio semanal, comparado con el estándar de la línea genética ¹

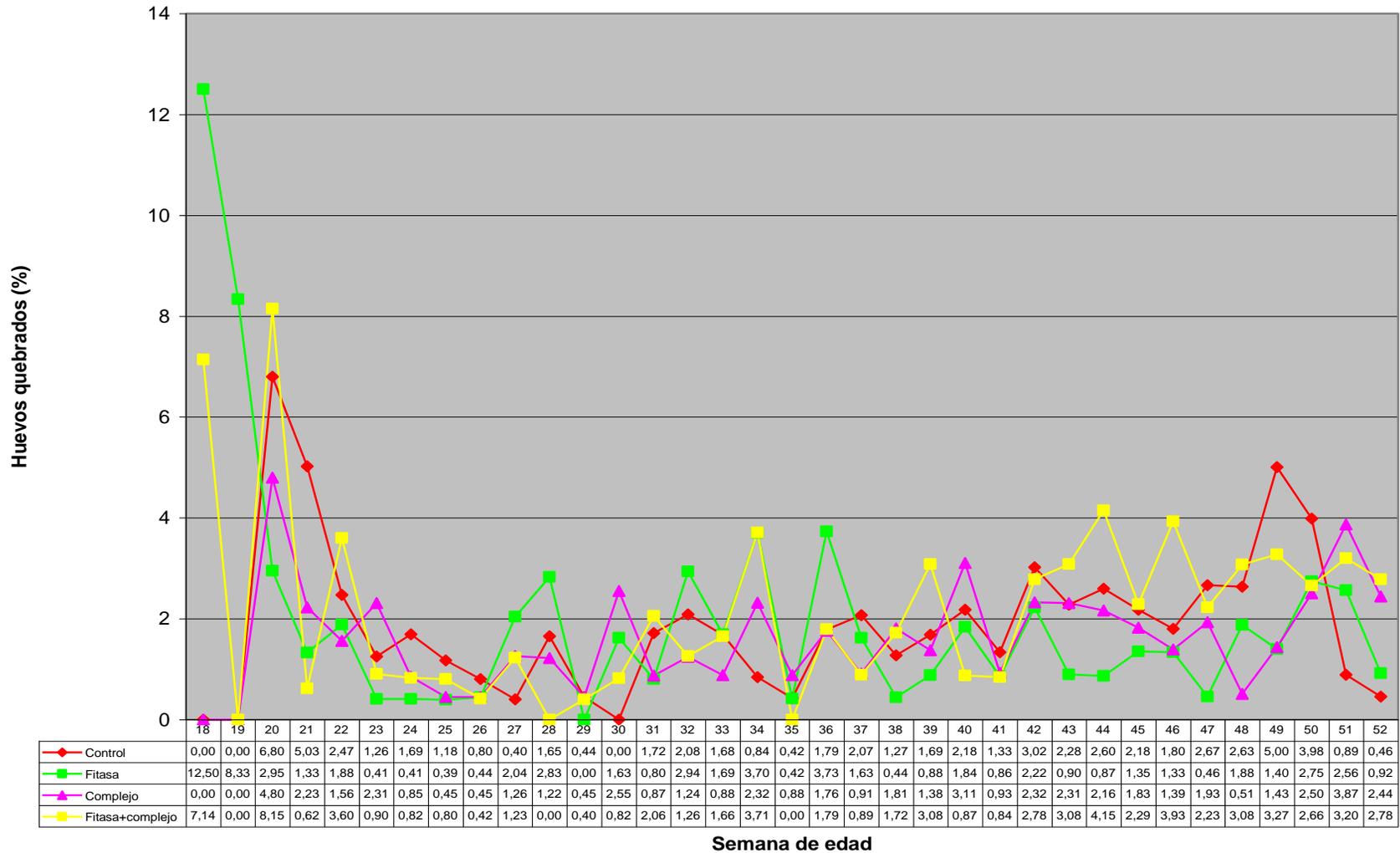


¹ Guía de manejo Hy-Line W-36 2000-2001.

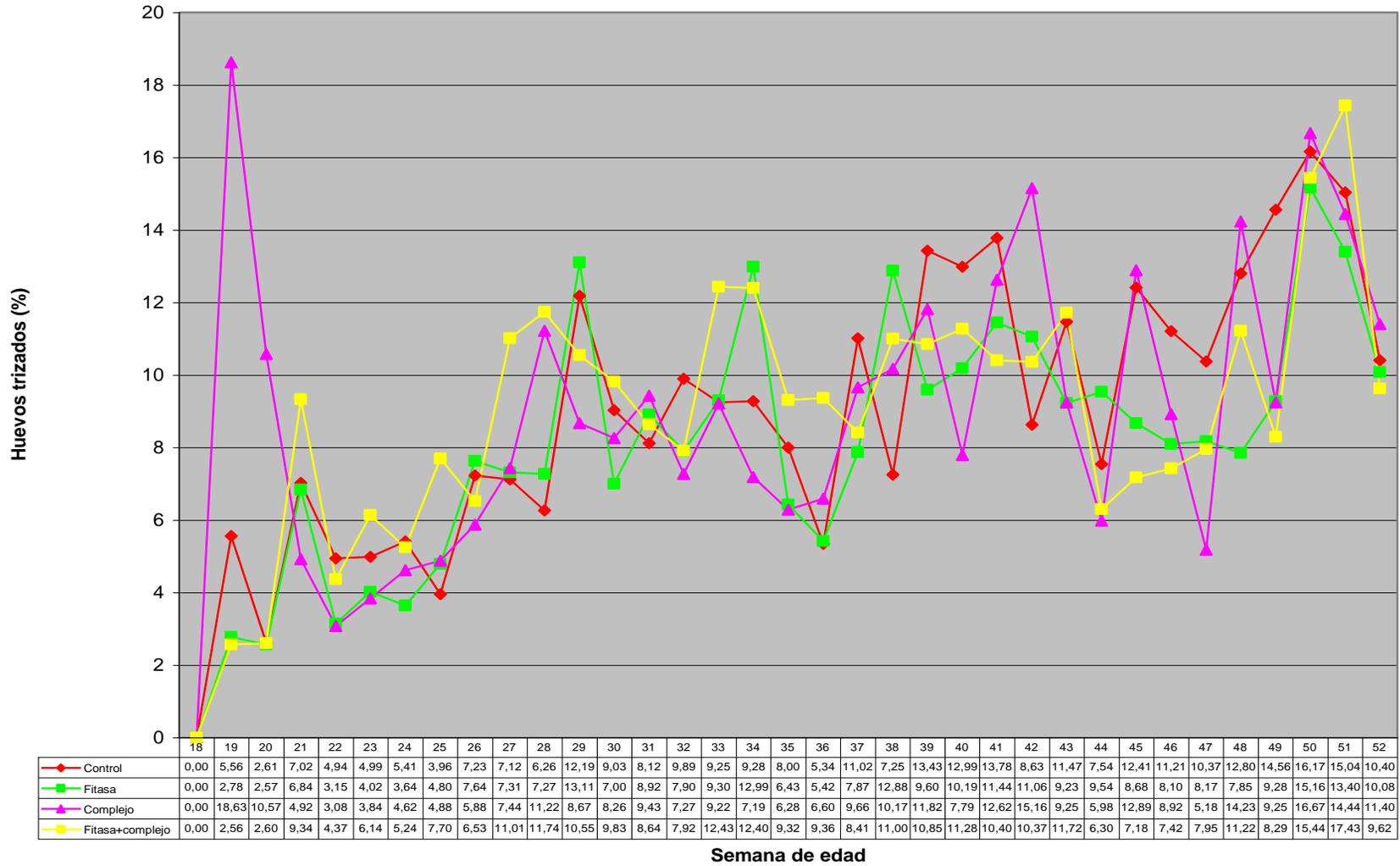
D.3. Porcentaje de huevos sin cáscara en el período comprendido entre las 18 a las 52 semanas de edad.



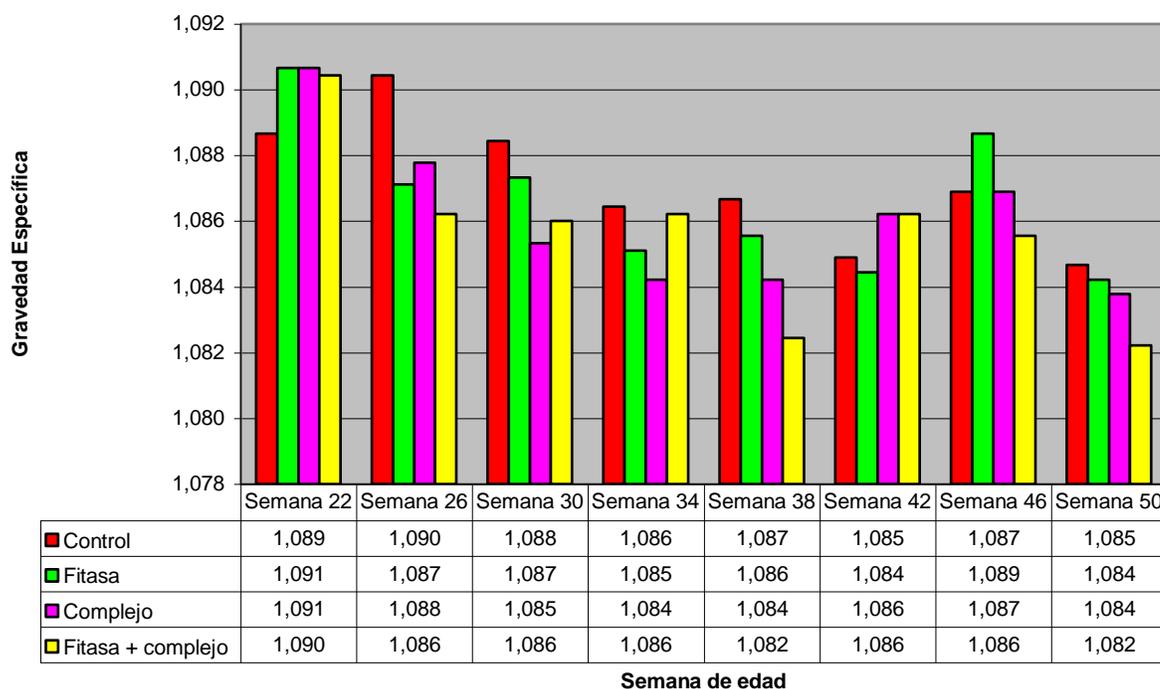
D.4. Porcentaje de huevos quebrados en el período comprendido entre las 18 a las 52 semanas de edad.



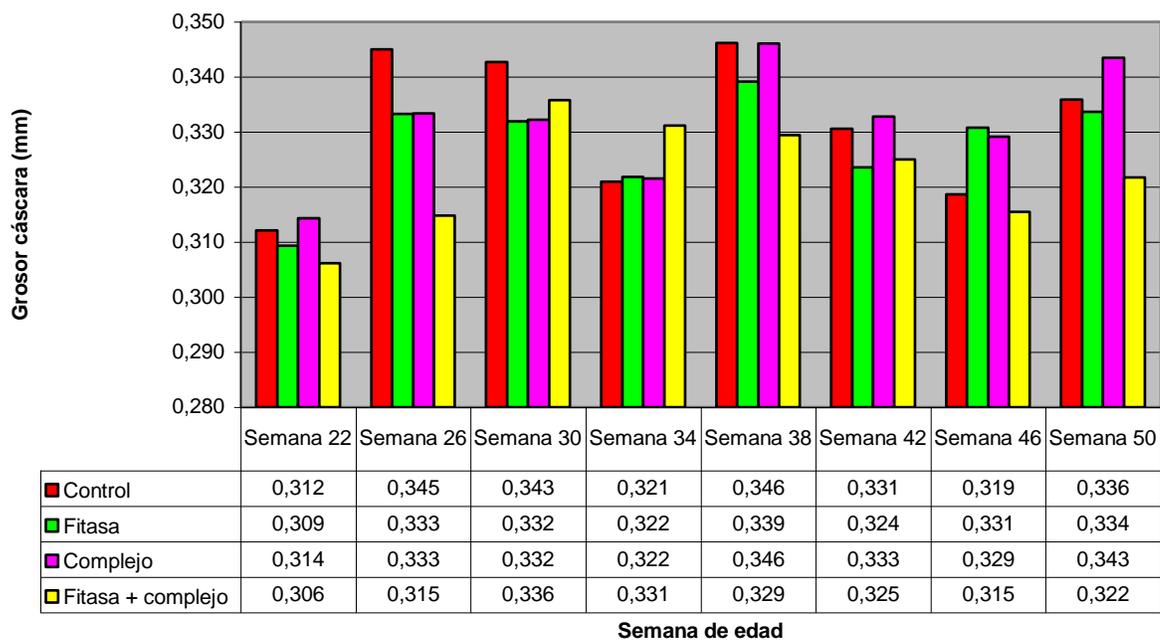
D.5. Porcentaje de huevos trizados en el período comprendido entre las 18 a las 52 semanas de edad.



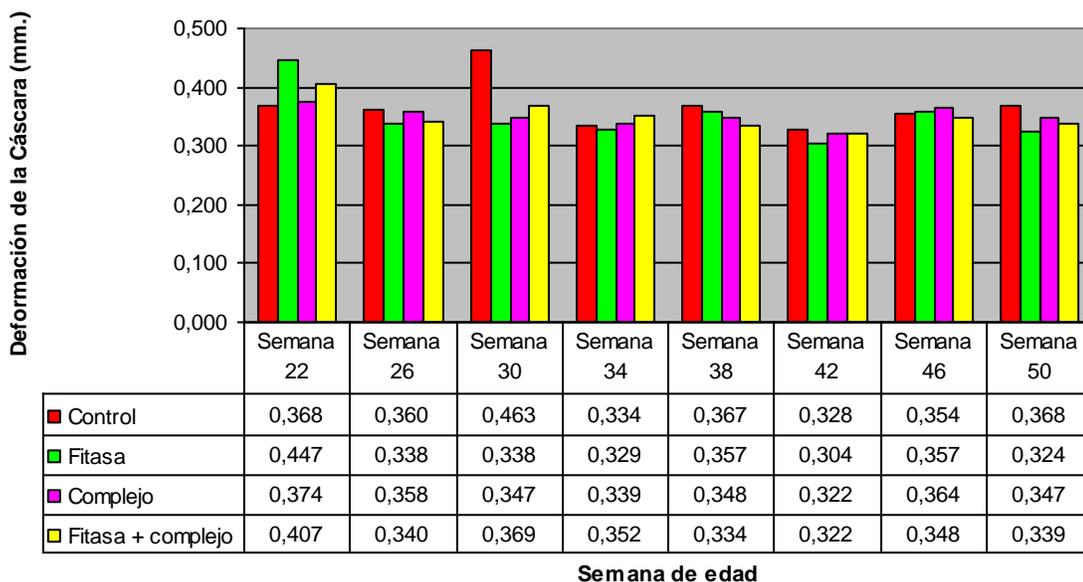
D.6. Efecto del uso de fitasa y del complejo multi enzimático sobre la gravedad específica, expresados como promedio. Semanas 22, 26, 30, 34, 38, 42 ,46 y 50 de edad.



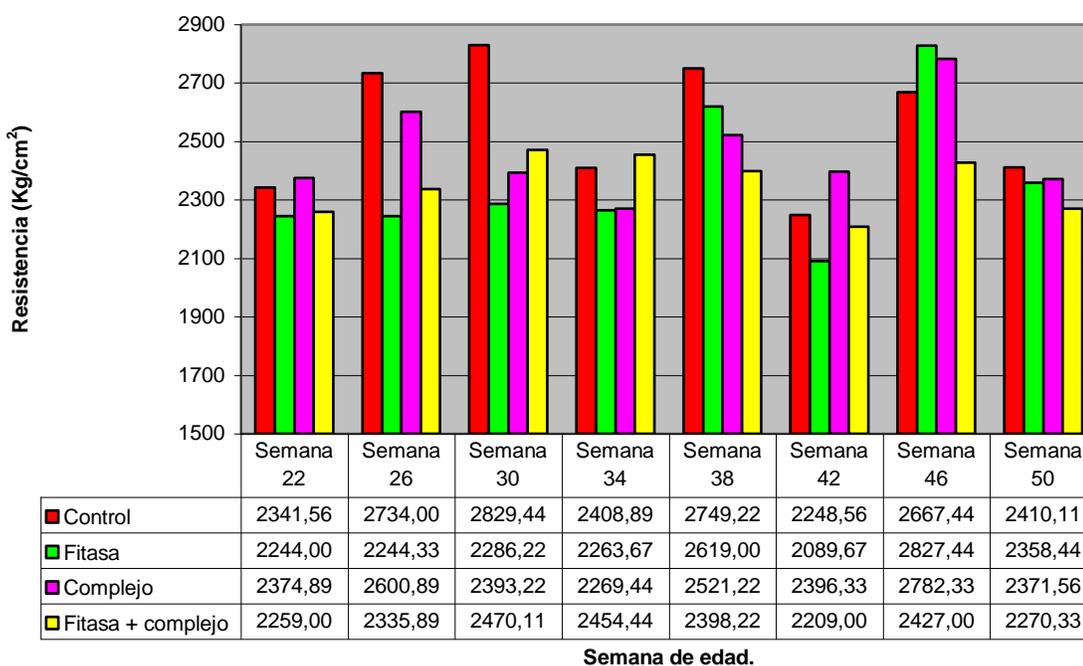
D.7. Efecto del uso de fitasa y del complejo multi enzimático sobre el grosor de la cáscara, expresados como promedio. Semanas 22, 26, 30, 34, 38, 42 ,46 y 50 de edad.



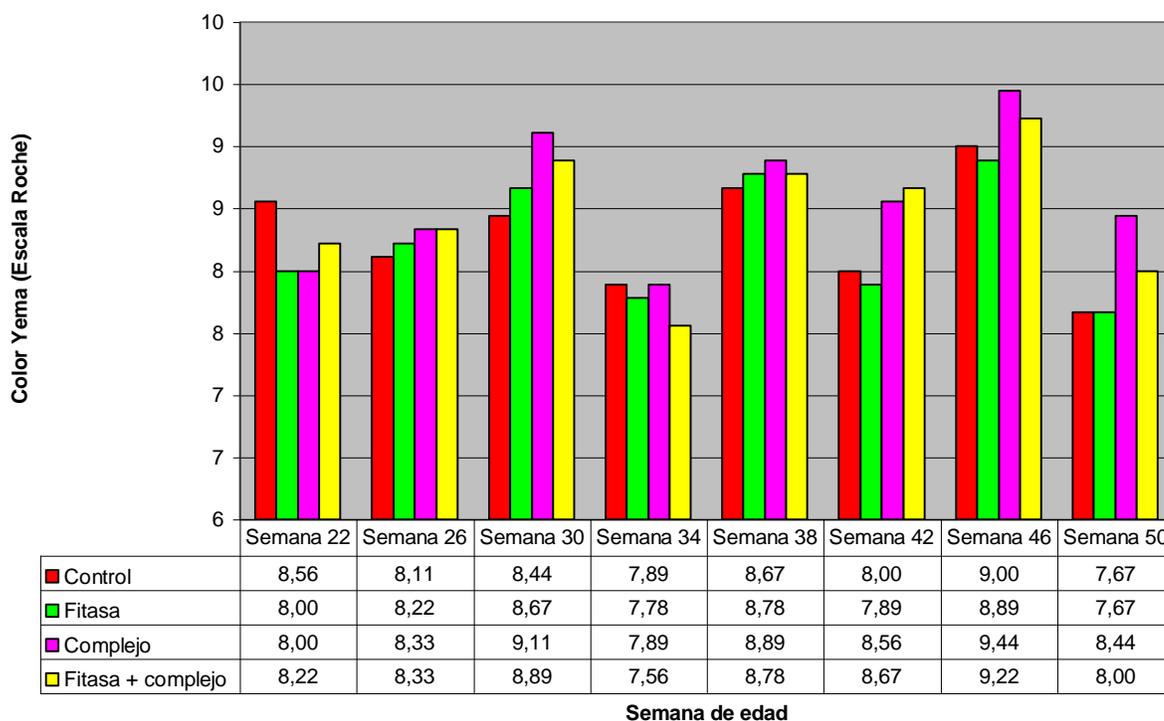
D.8. Efecto del uso de fitasa y del complejo multi enzimático sobre la deformación de la cáscara previa a la fractura, expresados como promedio. Semanas 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46 y 50 de edad.



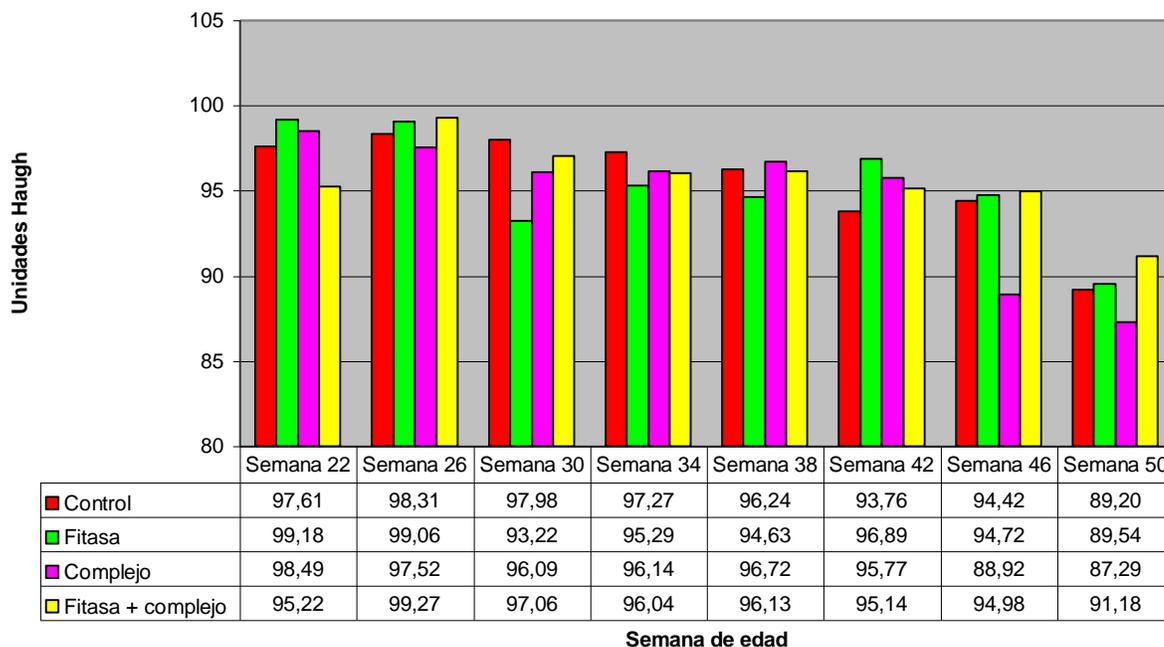
D.9. Efecto del uso de fitasa y del complejo multi enzimático sobre la resistencia de la cáscara a la fractura, expresados como promedio. Semanas 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46 y 50 de edad.



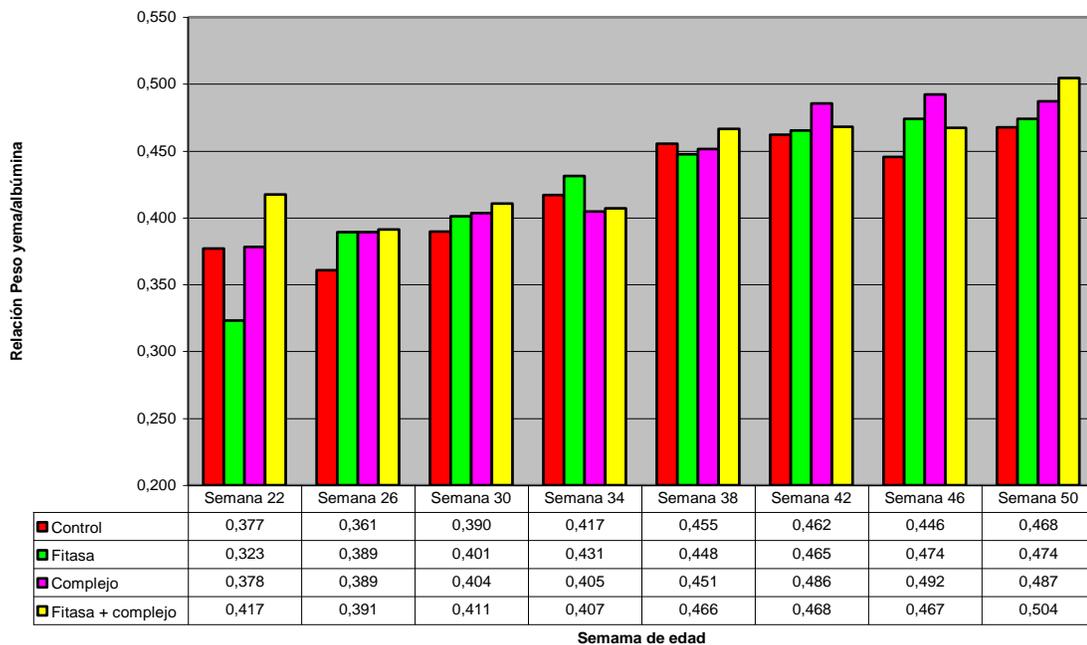
D.10. Efecto del uso de fitasa y del complejo multi enzimático sobre el color de la yema, expresados como promedio. Semanas 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46 y 50 de edad.



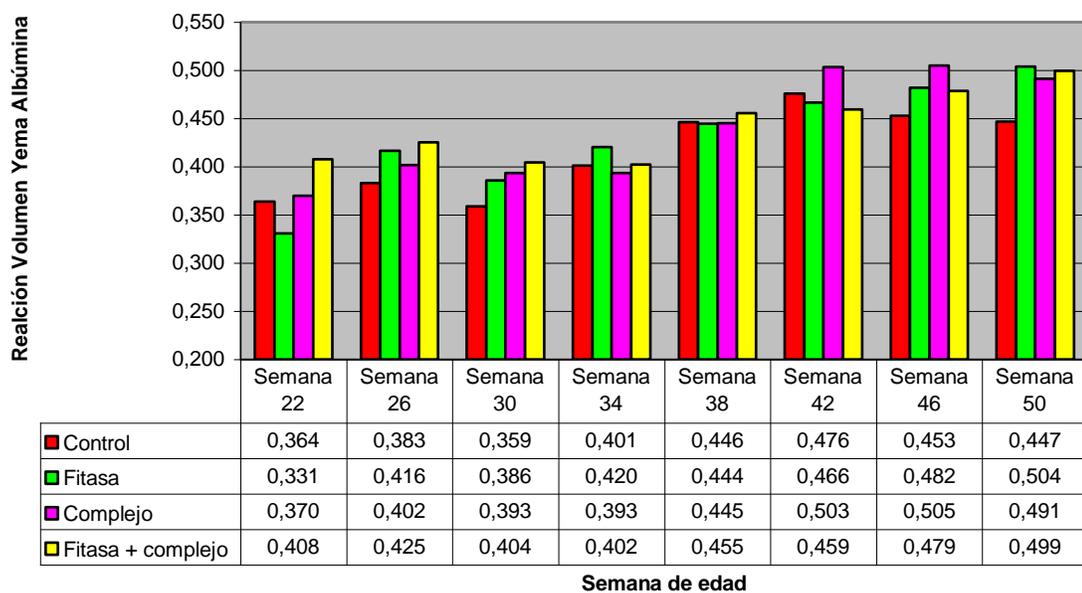
D.11. Efecto de la incorporación de fitasa y del complejo enzimático sobre las unidades Haugh, expresados como promedio. Semanas 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46 y 50 de edad.



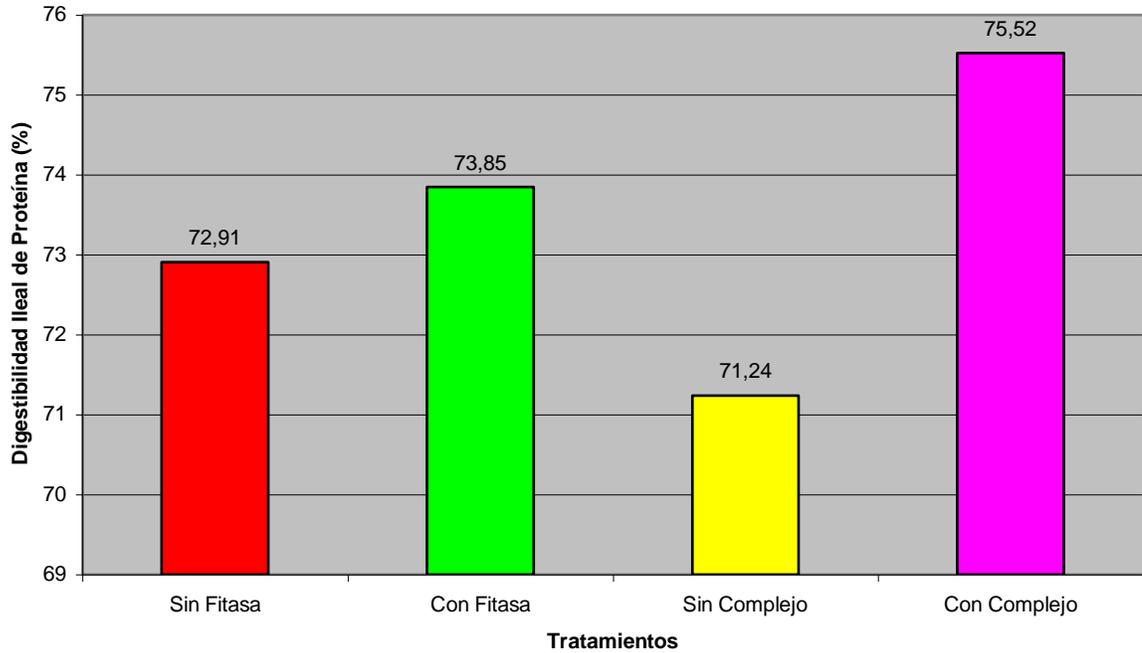
D.12. Efecto de la suplementación con fitasa y complejo enzimático sobre la relación peso de yema/peso albúmina, expresados como promedio. Semanas 22, 26, 30, 34, 38 42, 46 y 50 de edad.



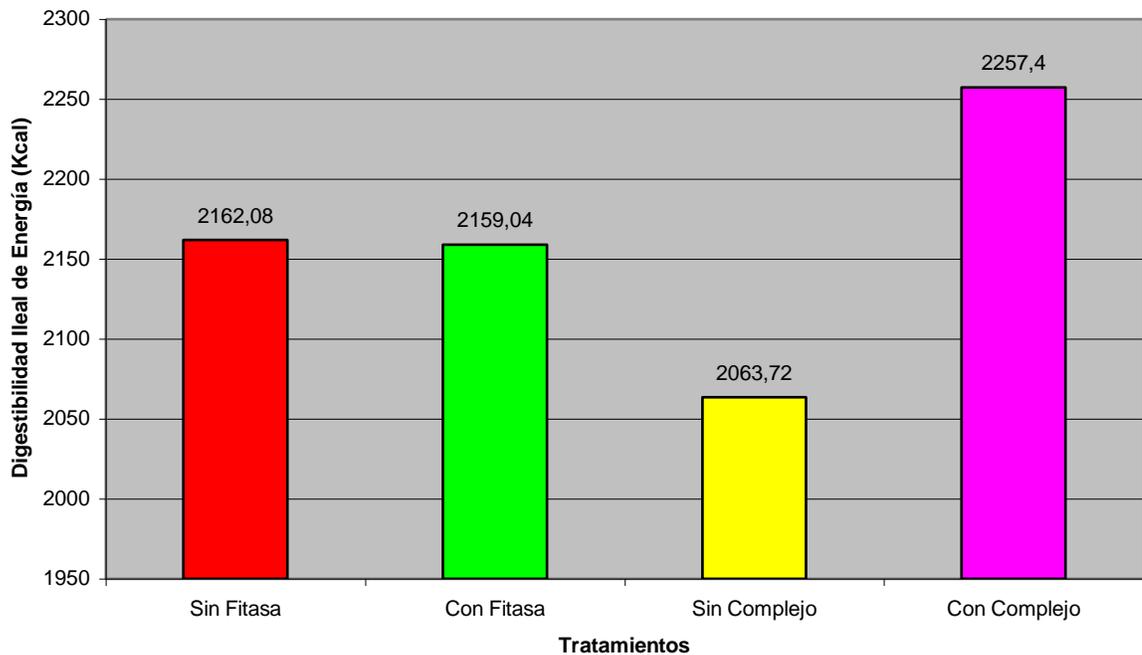
D.13. Efecto de la suplementación con fitasa y complejo enzimático sobre la relación volumen de yema/volumen de albúmina, expresados como promedio. Semanas 22, 26, 30, 34, 38 42, 46 y 50 de edad.



D.14. Efecto de la suplementación con fitasa y complejo enzimático sobre la digestibilidad ileal aparente de proteína (%) expresados como promedio. Semana 52 de edad.



D.15. Efecto de la suplementación con fitasa y complejo enzimático sobre la digestibilidad ileal aparente de energía (Kcal./Kg de dieta), expresados como promedio. Semana 52 de edad.



D.16.- Resultados obtenidos en el análisis químico proximal realizado a las dietas.

Consumo de Alimento	80 g				95 g				100 g			
	Tto. 1	Tto. 2	Tto. 3	Tto.4	Tto. 1	Tto. 2	Tto. 3	Tto.4	Tto. 1	Tto. 2	Tto. 3	Tto.4
ANÁLISIS												
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

D.17.- Resultados obtenidos en el análisis de actividad de fitasa y α -amilasa en las dietas.

TRATAMIENTOS				
Análisis	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
Fitasa (U/Kg.)	187	257	165	265
Amilasa (U/Kg.)	94	55	2270	2100

D.18. - Aporte de fósforo desde las distintas fuentes en las dietas.

Tratamiento	Fosfato (%)	Fitasa (%)	Dieta Basal (%)	Fósforo disponible (%)	Fósforo no disponible (%)	Fósforo 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