

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

**EVALUACIÓN PRODUCTIVA DE UNA FITASA DE ORIGEN
MICROBIANO (Ronozyme ® Phytase) EN DIETAS DE POLLOS
BROILER**

EDITH ANDREA CONTRERAS TOBAR

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

PROFESOR GUÍA: DR. JAVIER GONZÁLEZ FORETIC

Santiago – Chile

2001

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

**EVALUACIÓN PRODUCTIVA DE UNA FITASA DE ORIGEN
MICROBIANO (Ronozyme ® Phytase) EN DIETAS DE POLLOS
BROILER**

EDITH ANDREA CONTRERAS TOBAR

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

	Calificación	Firma
Profesor Guía: Dr. Javier González F.	_____	_____
Profesor Consejero: Dr. Sergio Cornejo V.	_____	_____
Profesor Consejero: Dr. Haroldo Toro G.	_____	_____

INDICE

	Página
1. Resumen.....	3
2. Introducción.....	5
3. Revisión Bibliográfica.....	7
4. Objetivos.....	20
5. Materiales y Métodos.....	21
6. Resultados.....	29
7. Discusión.....	34
8. Conclusiones.....	38
9. Bibliografía.....	39

1. RESUMEN

Se investigó el efecto de la incorporación de una fitasa comercial de origen microbiano (Ronozyme® Phytase) en dietas de pollos broiler. Se evaluó el comportamiento productivo de las aves mediante un experimento de 43 días de duración en que se utilizaron seis mil pollos broiler Ross 308 de 1 día de edad, 50% machos y 50% hembras. El experimento consistió en 4 tratamientos: 1) Dieta control sin adición de fitasa; 2) Dieta control mas fitasa (750 FTU[†] de fitasa/kg de dieta) en reemplazo de un 0,1% del fósforo total proveniente del fosfato de calcio; 3) Dieta formulada con los mismos ingredientes de la dieta control con la adición de 750 FTU de fitasa/kg de dieta, considerando un aporte nutritivo de la fitasa de 13 kcal/kg de EMAn, 0,35% de proteína, 0,013% de lisina, 0,009% de metionina+cistina, 0,1% de Ca y 0,1% de P total, valores que se descontaron del aporte nutritivo total de la dieta; 4) Dieta idéntica al tratamiento 3, descontados los valores nutricionales recién señalados, pero sin adición de fitasa. A lo largo del experimento se utilizaron 3 dietas para cada tratamiento según los siguientes períodos: inicial (1 a 21 días); intermedia (22 a 38 días) y final (39 a 43 días). Todas las dietas fueron formuladas a base de maíz, afrecho de soya, gluten de maíz, harina de pescado y aceite vegetal.

Los indicadores productivos controlados fueron peso vivo los días 1, 21 y 43, consumo de alimento, eficiencia de conversión alimenticia (ECA) y mortalidad a los 21 y 43 días de edad. Además, se calculó el porcentaje de cenizas en falanges de una muestra de 120 pollos por cada tratamiento al finalizar el período experimental. Adicionalmente, se registró el número de pollos que presentaron anomalías esqueléticas que se manifestaron con un desplazamiento anormal de las aves a los 21 y 43 días de edad.

La adición de fitasa en dietas de pollos broiler reemplazó el aporte parcial de fósforo (P) inorgánico, aminoácidos, proteína, Ca y energía metabolizable aparente corregida para nitrógeno (EMAn),

[†]Unidad Fitásica (FTU): se define como la actividad enzimática que libera 1 μmol de fosfato inorgánico por minuto a partir de una solución de fitato de sodio en condiciones óptimas de pH y temperatura (pH 5,5; 37°C)

sin afectar los indicadores productivos e integridad ósea de las aves. La reducción de EMAn, proteína, lisina, metionina+cistina, Ca y P de la dieta en ausencia de fitasa influyó negativamente sobre el rendimiento productivo de las aves de 1 a 43 días de edad.

El cálculo económico realizado indica que la adición de 750 FTU de fitasa mejora la utilidad por pollo cuando la enzima sólo reemplaza 0,1% de P disponible de la dieta.

2. INTRODUCCION

Los ingredientes de origen vegetal constituyen la mayor proporción de las dietas de las aves. Teóricamente, el contenido de fósforo (P) total de estos ingredientes sería suficiente para cubrir los requerimientos de P de las aves (Simons y Versteegh, 1993). Sin embargo, se conoce que alrededor de dos tercios del P total contenido en las materias primas de origen vegetal se encuentra en forma de ácido fítico como fosfato de inositol (Coelho, 2000). El P fítico es pobremente utilizado por animales monogástricos, por lo cual rutinariamente sus dietas son suplementadas con fosfato inorgánico para elevar el contenido de P disponible de la dieta.

El P es un mineral esencial para el crecimiento de las aves y las consecuencias de una deficiencia dietaria de este nutriente son fisiológica y económicamente desastrosas. Por esto, los nutricionistas se aseguran de dar un amplio margen de seguridad para este mineral en las dietas. Este hecho conlleva el problema de la excreción de grandes cantidades de fósforo a través de las fecas (Coelho, 2000). El uso de enzima fitasa en dietas de aves contribuye a solucionar en alguna medida este problema. La fitasa mejora el aprovechamiento del fósforo de los ingredientes de origen vegetal, por lo cual es posible reducir la cantidad de fósforo inorgánico de la dieta, y por la misma razón, la fitasa reduce la excreción de fósforo a través de las fecas (Vetési *et al.*, 1998). Además, el P es un nutriente costoso y actualmente en muchos países existe preocupación con respecto al contenido de P del estiércol y su impacto ambiental, por lo que la fitasa tiene numerosas ventajas al respecto.

Hasta hace poco tiempo se consideraba el ácido fítico como un factor limitante del P disponible de las dietas de animales monogástricos. Hoy en día, sin embargo, existen evidencias de que sus efectos anti-nutritivos van mucho más allá de limitar la disponibilidad de P. Esto debido a que en su estado natural el fitato también es capaz de unirse con diversos cationes, proteínas, lípidos (Cosgrove, 1980) y almidón

(Thompson y Yoon, 1984). En virtud de esta característica se puede afirmar que el suplementar dietas para aves con fitasa microbiana tendría efectos sobre la proteína y energía presentes en la dieta, debido a que contribuiría a liberar a los nutrientes ligados a fitato, aumentando su disponibilidad y, por ende, mejorando la utilización de éstos.

Existen numerosos estudios que indican que la fitasa de origen microbiano aumenta la disponibilidad del fósforo en dietas para pollos broiler (Denbow *et al.*, 1995; Denbow, *et al.*, 1998; Huff *et al.*, 1998; Zanini y Sazzad, 1999) y se ha demostrado que la fitasa también aumenta la disponibilidad de minerales traza como cobre y zinc (Sebastian *et al.*, 1996; Mohanna y Nys, 1999) en dietas de broiler, sin embargo el efecto de la fitasa sobre la disponibilidad de aminoácidos y proteína es aún algo controversial.

Con estos antecedentes, el propósito de este estudio fue determinar si la adición de fitasa en dietas de pollos broiler permite disminuir el aporte de proteína, aminoácidos esenciales, EMAn, Ca y P, sin afectar el rendimiento productivo de las aves.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El fósforo (P) es un nutriente esencial para el crecimiento de las aves. En el organismo animal cerca del 80% de este mineral se encuentra formando parte del esqueleto (Soares, 1995). El 20% restante está formando parte de diversos compuestos vitales para el metabolismo (ATP, ácidos nucleicos, fosfolípidos, etc.). El P inorgánico también se encuentra en la célula y es necesario en el balance ácido-base (Soares, 1995). Debido a su rápido crecimiento, las aves tienen una importante demanda de P para el adecuado desarrollo de su esqueleto. Por esto, es necesario adicionar este mineral a las dietas de broiler con un amplio margen de seguridad (Waldroup, 1999). El no suplementar la cantidad adecuada de P puede llevar a consecuencias severas, como reducción del rendimiento productivo, excesiva mortalidad y disminución en la calidad de la carcasa de las aves (Waldroup, 1999). En la práctica, las dietas de animales monogástricos requieren de la suplementación de P para obtener una óptima tasa de crecimiento. Esto es de real importancia en las aves debido a que sus dietas se componen principalmente de granos de cereales, los cuales contienen una gran proporción de P en forma de fitato.

Se conoce que en los ingredientes de origen vegetal cerca de dos tercios del P total forma parte del complejo P-fitato y, por lo tanto, no está disponible para ser utilizado por animales monogástricos (Coelho, 2000). El ácido fítico es sintetizado por las plantas y en su estructura química corresponde a una molécula de inositol con seis grupos hidroxilo que pueden estar en su totalidad o parcialmente fosforilados (Soares, 1995). Su estructura química da al ácido fítico la capacidad de unirse iónicamente a diversos elementos como minerales y proteínas, disminuyendo la solubilidad de éstos en el medio y reduciendo, eventualmente, la utilización de estos nutrientes por parte del ave (Cheryan, 1980). Esta interacción entre ácido fítico, minerales y proteína al parecer es la principal responsable de los efectos anti-nutritivos de una dieta con alto contenido de fitato. Es por esto que se hace necesario liberar de alguna forma a los

nutrientes ligados a ácido fítico, de modo de dar al organismo animal la posibilidad de utilizar estos nutrientes.

Las aves poseen una limitada habilidad para utilizar el P fítico, sin embargo existen algunas controversias al respecto. Por muchos años se ha asumido que el pollo broiler es incapaz de utilizar el P unido a fitato, mientras que el P vegetal restante, junto con el P proveniente de la proteína animal y el P inorgánico de los suplementos, tienen una elevada disponibilidad para el ave (Waldroup, 1999). Recientes estudios han demostrado que ninguno de estos supuestos es totalmente correcto. Por una parte, la disponibilidad del P inorgánico de los suplementos es inferior al 100% (Van der Klis y Versteegh, 1996) y además, puede variar considerablemente (55 a 92%). De Groote y Huyghebaert (1997) informaron que la retención aparente de P de un fosfato de calcio monobásico fue 78,1% en un estudio y 85,5% en un segundo estudio. Debido a que los suplementos de P generalmente aportan aproximadamente el 60% de los requerimientos de P no fítico de los pollos, pequeñas diferencias en la biodisponibilidad pueden tener un impacto significativo sobre la excreción de P (Waldroup, 1999).

Por otra parte, los pollos broiler probablemente tienen la capacidad de usar al menos una porción del P fítico. En un reciente estudio, Maenz y Classen (1998) observaron que existe cierta actividad de fitasa en la mucosa del intestino delgado de pollos broiler, siendo de mayor magnitud en la mucosa duodenal y disminuye progresivamente hacia las porciones posteriores del intestino delgado. Algunos investigadores han indicado que la expresión de la actividad fitásica intestinal está sujeta a mecanismos de regulación y es importante en la mantención del nivel de fosfato del animal (Mitchell y Edwards, 1996). Es probable que la actividad enzimática natural contribuya a la digestibilidad del P fítico de la dieta de las aves.

La fitasa (E.C. 3.1.3.8)* es una enzima hidrolítica sintetizada por diversas bacterias, hongos y levaduras. La enzima que se utiliza como aditivo en nutrición animal tiene su origen en cultivos *in vitro* de cepas de *Aspergillus*, microorganismo que puede provenir de la población natural o bien, de cepas de otro microorganismo al que se le ha transferido la información genética específica para la producción de fitasa. Esta enzima es capaz de romper el enlace fitato-nutriente, incrementando la disponibilidad de nutrientes como el P, que se encuentra ligado como fosfato al ácido fítico, proteínas y otros minerales (Sebastian *et al.*, 1997). Sólo algunos vegetales tienen actividad fitásica en forma natural, la que generalmente es muy baja y se inactiva con los procesos hidrotérmicos de elaboración de alimento. Los investigadores belgas Eeckhout y De Paepe (1994) analizaron para actividad fitásica, P fítico y P total una serie de ingredientes comúnmente utilizados en dietas de monogástricos en su país. De los 51 cereales analizados, sólo el centeno, triticale, trigo y cebada fueron ricos en fitasa, así como los subproductos del trigo. Todos los otros ingredientes analizados, entre ellos maíz y soya, mostraron cero o una extremadamente baja actividad fitásica. Leeson, (1999) indicó una actividad fitásica de 15 y 8 FTU/ kg para maíz y afrecho de soya, respectivamente. Por esto es necesario incorporar la enzima fitasa en forma exógena a las dietas de las aves.

La dosis de fitasa se cuantifica en unidades fitásicas. Una unidad fitásica (FTU) se define como la actividad enzimática que libera 1 μmol de fosfato inorgánico por minuto a partir de una solución de fitato de sodio en condiciones óptimas de pH y temperatura (pH 5,5; 37°C). Algunos investigadores (Kornegay *et al.*, 1996; Yi *et al.*, 1996b) han informado una equivalencia de P para la fitasa microbiana de 1 gramo de P no fítico por cada 650 a 750 FTU de enzima en pollos broiler. Esta equivalencia fue obtenida con una relación Ca:P total de 2:1 en la dieta.

* Nomenclatura correspondiente a la fitasa según la clasificación hecha por la comisión internacional de enzimas (Enzyme Commission) en 1961.

El efecto de la fitasa sobre la disponibilidad del P en ingredientes alimenticios de origen vegetal ha sido bastante estudiado. Existen numerosos estudios que indican que la fitasa de origen microbiano aumenta la disponibilidad del fósforo en dietas para pollos broiler (Denbow *et al.*, 1995; Denbow, *et al.*, 1998; Huff *et al.*, 1998; Zanini y Sazzad, 1999), mejorando su utilización y disminuyendo la excreción de este mineral a través de las fecas. La incorporación de fitasa en la dieta generalmente mejora la disponibilidad del P en un 20 a un 45%, dependiendo del nivel de fitasa adicionada, contenido de fitato de la dieta, fuente de fitato, niveles dietarios de P no fítico, calcio y vitamina D y de la razón calcio: P total (Ibrahim *et al.*, 1999). Estos investigadores observaron que al incorporar la mitad de la dosis recomendada de enzima fitasa (600 FTU/kg de dieta para el producto utilizado en este estudio) fue posible reducir el nivel de fosfato dicálcico de la dieta a un 50% del nivel del grupo control, sin afectar la ganancia de peso y la conversión alimenticia de las aves, lo que representó una reducción en P total de 0,56%. Además, demostraron que al disminuir el nivel de fosfato dicálcico en la dieta el nivel de P en las fecas también se redujo. Huff *et al.* (1998) también demostraron que al suplementar dietas para broiler con fitasa microbiana se puede reducir el contenido de P total de la dieta en al menos un 11%, sin afectar el rendimiento productivo ni el estado de salud de las aves. Zanini y Sazzad (1999), por su parte, observaron que la fitasa redujo significativamente la cantidad de P en las fecas de pollos broiler. Denbow *et al.* (1998) suplementaron con fitasa dietas para broiler que contenían un bajo nivel de P no fítico y observaron que la enzima mejoró la disponibilidad de P de la dieta, así como el crecimiento, el porcentaje de cenizas en falange y los parámetros óseos en pollos broiler, mientras que la excreción de P disminuyó.

Varios autores han observado un mejor efecto de incorporar fitasa a dietas de pollos broiler cuando éstas contienen un nivel de P menor al comúnmente utilizado (Sohail y Roland, 1999; Denbow *et al.*, 1995). Cuando la dieta presenta un nivel de P relativamente bajo, la suplementación de fitasa puede aumentar significativamente la disponibilidad tanto de P como de Ca, al mismo tiempo que reduce la excreción de estos minerales en las fecas. En un estudio realizado por Ibrahim *et al.* (1999) se comprobó

que la actividad de la enzima es afectada por el nivel de P inorgánico presente en la dieta, siendo mejores los resultados obtenidos con bajos niveles dietarios de este mineral. Asimismo, Denbow *et al.* (1998) concluyó que la digestibilidad del P disminuye y la excreción de P aumenta al incrementar el nivel de P no fítico de la dieta. En un estudio anterior, Denbow *et al.* (1995) evaluaron la efectividad de suplementar fitasa para mejorar la disponibilidad del P fítico del afrecho de soya con diferentes niveles de P en pollos broiler. Los distintos niveles de P se obtuvieron mediante la adición de diferentes cantidades de fosfato defluorinado. La ganancia de peso y el consumo de alimento fueron mejorados con la adición de fitasa en todos los niveles de P no fítico, siendo mayor la magnitud de la respuesta con bajos niveles de P no fítico (0,20; 0,27 y 0,34% de P no fítico resultó en incrementos en peso vivo de 48,9; 27,6 y 6,9%, respectivamente). Lo mismo se observó en el porcentaje de cenizas de falange y tibia y en la resistencia a la fractura de la tibia, las cuales aumentaron con la adición de fitasa (aumento de 17,2; 13,2 y 4,5% en porcentaje de cenizas de falange para 0,20; 0,27 y 0,34% de P no fítico en la dieta, respectivamente). En cuanto a la eficiencia de conversión alimenticia (ECA), ésta no fue afectada por la adición de fitasa. Los resultados anteriores muestran claramente que el P ligado a fitato en el afrecho de soya se hizo más biodisponible para los pollos mediante la adición de fitasa a la dieta. Así mismo, la respuesta total se relacionó a la fitasa y a los niveles de P no fítico y P total. Los resultados demostraron que la enzima es efectiva en mejorar la disponibilidad del P unido a fitato presente en el afrecho de soya para crecimiento y mineralización ósea en pollos broiler.

Sohail y Roland (1999) estudiaron la influencia de suplementar fitasa sobre el rendimiento de pollos broiler de cuatro a seis semanas de edad. Utilizaron dos niveles de P no fítico (0,225 y 0,325%) y tres niveles de fitasa (0, 300 y 600 FTU/kg) con 0,75% de Ca. Una dieta adicional con 0,425% de P no fítico y 0,85% de Ca fue el control positivo. Cuando el P no fítico y el Ca se redujeron en un 0,1% los resultados en rendimiento fueron comparables a los del grupo control positivo, sin embargo, cuando la reducción fue de un 0,2% en el contenido de P no fítico, manteniendo la reducción del Ca, hubo un

significativo impacto negativo sobre el peso vivo, consumo de alimento, eficiencia de conversión alimenticia y resistencia ósea. La fitasa aumentó significativamente el peso vivo con bajos niveles de P no fítico, pero no con niveles elevados. Este estudio indicó que el suplementar fitasa en dietas de crecimiento con niveles reducidos de P no fítico y Ca, mejoró significativamente el rendimiento y resistencia ósea en pollos broiler.

Otro factor a considerar al momento de incorporar fitasa a dietas de pollos broiler es el nivel de Ca dietario. Existen estudios que indican que el efecto de la adición de fitasa a dietas de monogástricos es mejor cuando se utiliza un bajo contenido dietario de Ca (Mohammed *et al.*, 1991; Lei *et al.*, 1994). Es probable que esto ocurra debido a que el Ca, el principal catión bivalente dietario para muchas especies, puede precipitar progresivamente al fitato mediante la formación de complejos Ca-fitato extremadamente insolubles en el intestino, y en consecuencia, el P fítico, así como el Ca, quedan menos disponibles para ser absorbidos (Nelson y Kirby, 1987).

Qian *et al.* (1997) evaluaron el potencial de la fitasa microbiana y del colecalciferol (D3) para mejorar la utilización del P y Ca unidos a fitato y la influencia de la relación Ca:P total (Pt) en dietas a base de maíz y soya en pollos broiler de 1 a 21 días de edad. Utilizaron cuatro relaciones Ca: Pt (1,1; 1,4; 1,7 y 2,0: 1), cuatro niveles de incorporación de fitasa (0, 300, 600 y 900 FTU/kg de dieta) y dos niveles de incorporación de D3 (66 y 660 µg de D3/kg de dieta). Además incluyeron otros cuatro tratamientos: las cuatro relaciones Ca:Pt mas 6600 µg de D3/kg de dieta, pero sin la incorporación de fitasa. La adición de fitasa incrementó linealmente la ganancia de peso, consumo de alimento, contenido de cenizas en falange y retención de Ca y P. Todos estos parámetros fueron negativamente influenciados por la ampliación de la razón Ca:Pt, con y sin la presencia de fitasa en la dieta. Esto indica que la relación Ca:Pt es un importante factor a considerar si se quiere mejorar el aprovechamiento del P fítico mediante el uso de fitasa.

El ácido fítico tiene la capacidad de formar una amplia variedad de sales insolubles con cationes como Ca, Mg, Zn y Cu (Oberleas, 1973). Se espera que al igual como ocurre con el P exista una mayor disponibilidad y mejor utilización de los minerales unidos a ácido fítico como resultado de la incorporación de fitasa en la dieta de pollos broiler. Es así como en un estudio realizado por Sebastian *et al.* (1996) se observó que la adición de fitasa microbiana a dietas para broiler a base de maíz y soya, mejoró la retención relativa de Ca en pollos machos. Este mejoramiento se explica porque la fitasa libera Ca desde el complejo Ca-fitato, aumentando la disponibilidad tanto de Ca como de P, dado que ambos minerales forman parte del mismo complejo. En este mismo estudio se observó que la fitasa mejoró significativamente la retención relativa de Zn y Cu, al contrario de lo observado por Aoyagi y Baker (1995), quienes informaron que la suplementación con fitasa microbiana a dietas de pollos broiler que incluían afrecho de soya redujo la utilización del Cu en un 50%. Los autores especularon que la fitasa pudo haber aumentado la biodisponibilidad de Zn de la soya, siendo este elemento antagónico a la absorción de Cu.

En un reciente estudio, Zanini y Sazzad (1999) observaron que la suplementación de fitasa mejoró la tasa de utilización de Ca y Zn en dietas de pollos broiler. Los investigadores observaron que el contenido de EMA de la dieta influyó sobre la excreción de Zn, de modo que la utilización de este mineral fue mayor cuando el nivel de EMA de la dieta fue alto. En este mismo estudio, se observó que la suplementación de fitasa dietaria aumentó significativamente el contenido de Ca y Zn en el hueso. El contenido de EMA afectó a la concentración tanto de P como de Ca en el hueso, de manera que la dieta con baja energía obtuvo un mayor contenido óseo de ambos minerales.

Yi *et al.* (1996a) investigaron la influencia de la adición de fitasa microbiana sobre la utilización del Zn en pollos broiler alimentados con dietas formuladas a base de maíz y soya pero deficientes en Zn. Observaron que la adición de dosis crecientes de fitasa (150 a 600 FTU/kg de dieta) aumentó la ganancia

de peso y el consumo de alimento de los pollos y disminuyó la conversión alimenticia. Por otra parte, la adición de fitasa aumentó linealmente el contenido de cenizas y de Zn en falange y tibia.

Mohanna y Nys (1999) encontraron que al suplementar con fitasa (800 FTU/ kg equivalentes a 14 mg/ kg de Zn en dietas a base de maíz y soya) dietas para pollos broiler, aumentó la biodisponibilidad de Zn y Mn cuando ambos elementos fueron incorporados al mínimo o por debajo del nivel recomendado por el NRC para el adecuado crecimiento de las aves. En ausencia de suplementación de Zn y Mn la concentración de ambos minerales en la tibia aumentaron al incorporar fitasa en la dieta. Este estudio confirmó que la adición de fitasa microbiana reduce los efectos antagónicos del ácido fítico sobre la biodisponibilidad de Zn.

El fitato presente en los ingredientes vegetales se puede unir a proteínas y afectar negativamente la digestibilidad de éstas (Cosgrove, 1980). Los grupos fosfato aniónicos del fitato tienen la capacidad de unirse con grupos catiónicos de las proteínas, en particular los grupos amino de los aminoácidos básicos (Reddy *et al.*, 1982). Además, el ácido fítico puede ligar proteasas endógenas, como tripsina y quimiotripsina en el tracto gastrointestinal, disminuyendo por lo tanto la efectividad de estas enzimas sobre la digestión de proteínas dietarias (Singh y Krikorian, 1982). La importancia de los complejos fitato–proteína en aves y otros animales monogástricos no recibía mayor atención hasta hace algún tiempo. Sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que estos complejos son insolubles y que las enzimas que forman parte de ellos sufren una menor degradación por parte de enzimas proteolíticas, comparado con la degradación que las mismas enzimas sufren sin estar ligadas a fitato (Dudley-Cash, 1999)

Existen algunas evidencias de que la fitasa microbiana puede mejorar la utilización de aminoácidos y EMAN de la dieta de aves. Así, por ejemplo, en un estudio realizado por Biehl y Baker

(1997) la fitasa tuvo un pequeño pero significativo y positivo efecto sobre la utilización de aminoácidos esenciales en pollos broiler alimentados con dietas a base de maíz y soya. Sin embargo, la suplementación de fitasa (600 FTU/ kg) no tuvo efectos significativos sobre la digestibilidad ileal aparente (DIA) de proteína cruda y de todos los aminoácidos, excepto Met y Fen, en pollos broiler machos de 19 días de edad (Sebastian *et al.*, 1997). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Zhang *et al.* (1999), donde la suplementación de fitasa no tuvo efectos significativos sobre la ganancia de peso, y sobre la DIA de proteína cruda y aminoácidos en pollos broiler de 1 a 49 días de edad. En este estudio la enzima tampoco tuvo efecto sobre la conversión alimenticia de las aves. Por su parte, Ravindran *et al.* (1999) obtuvieron resultados positivos al evaluar la influencia de una fitasa microbiana sobre la DIA de tres cereales (maíz, sorgo y trigo), cuatro afrechos de oleaginosas (soya, raps variedad canola, semilla de algodón y maravilla) y dos subproductos de cereales (afrechillo de trigo y refinado de arroz) en pollos broiler de 5 semanas de edad. La incorporación de fitasa (1200 FTU/ kg de dieta) mejoró la DIA de proteína y aminoácidos en todos los ingredientes evaluados, pero la magnitud de la respuesta varió dependiendo del ingrediente y del aminoácido considerado. La digestibilidad promedio de los aminoácidos aumentó en un 2,6 y 3,3% en maíz y afrecho de soya, respectivamente, por efecto de la enzima.

Namkung y Leeson (1999) estudiaron el efecto de la fitasa microbiana (1149 FTU/kg de dieta) sobre el rendimiento productivo, energía metabolizable aparente corregida para nitrógeno (EMAn) y digestibilidad ileal de N y aminoácidos en pollos broiler machos de 1 a 15 días de edad utilizando dietas deficientes en Ca (0,9 y 0,79% para el grupo control y para el grupo con fitasa, respectivamente) y en P disponible (Pd) (0,45 y 0,35% para el control y el tratamiento con fitasa, respectivamente). El peso vivo, consumo de alimento y conversión alimenticia de los pollos alimentados con fitasa, y cuyas dietas fueron deficientes en Ca y Pd, fueron comparables a los observados en los pollos alimentados con niveles normales de Ca y Pd. La dieta con fitasa tuvo una EMAn superior a la observada en la dieta control. Los

pollos alimentados con fitasa tuvieron mayores digestibilidades para Val, Ile, aminoácidos no esenciales y aminoácidos totales. Esto indicó que la adición de fitasa a dietas iniciales de pollos broiler mejora la EMAn y la digestibilidad de aminoácidos cuando reemplaza sólo a un porcentaje de Ca y Pd de la dieta (0,11 y 0,1%, respectivamente).

Se han encontrado diferencias entre sexos al evaluar la digestibilidad de aminoácidos. Sebastian *et al.* (1997) observaron que la suplementación de dietas a base de maíz y soya con fitasa de origen microbiano (600 FTU/ kg) mejoró la DIA de todos los aminoácidos, con excepción de lisina, metionina, fenilalanina y prolina, en hembras broiler. En este mismo estudio, sin embargo, la fitasa no tuvo efecto significativo en la DIA de los aminoácidos, a excepción de metionina y fenilalanina, en machos broiler. Los autores no tuvieron una explicación a la diferencia observada entre sexos.

Se ha visto que el nivel de P de la dieta afecta en alguna medida a la utilización de la proteína y aminoácidos en pollos broiler. Ibrahim *et al.*(1999) observaron que una reducción en el nivel de fosfato dicálcico en dietas de broiler mejoró la utilización del N dietario, resultando en una reducción en el contenido de N en las fecas. Sin embargo, al contrario de lo observado por otros autores, la utilización de N no fue mejorada con la suplementación de fitasa.

El primer informe respecto al efecto sobre la energía de la fitasa fue realizado por Rojas y Scott (1969), quienes encontraron que el contenido de EMA de afrecho de algodón y afrecho de soya para pollos fueron significativamente mejoradas después de ser tratadas con una preparación de fitasa cruda de *Aspergillus ficuum*. Utilizando un producto enzimático crudo similar al anterior, Miles y Nelson (1974) también observaron marcados mejoramientos en el contenido de EMA de afrecho de algodón (1690 v/s 2030 kcal/kg) y paja de trigo (1110 v/s 1660 kcal/kg) tratadas con fitasa, pero no en el de afrecho de soya

(2740 v/s 2550 kcal/kg) para pollos. Es probable que las respuestas observadas en estos estudios se deban en parte a la presencia de enzimas contaminantes.

Recientemente, Ravindran *et al.* (1998) estudiaron el impacto de la fitasa microbiana sobre la digestibilidad de la proteína, aminoácidos y EMAn en pollos broiler de 1 a 25 días de edad, utilizando dietas a base de trigo, sorgo, y harina de soya, con niveles de Ca de 1,15%, P total de 0,82% y P disponible de 0,45%. Esta dieta fue suplementada con 0, 400 y 800 FTU de fitasa/ Kg de alimento. La adición de esta enzima aumentó la EMAn de la dieta en un 5,6% y la DIA de N fue de 81, 82,2 y 82,5% para los tres niveles de inclusión de fitasa, respectivamente. En este mismo estudio se observó que la adición de fitasa aumentó la DIA de aminoácidos (arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina y valina) en 2,1%, como promedio. Por otra parte, se observó un pequeño efecto sobre la EMAn al incorporar fitasa a dietas con bajo contenido de P disponible (Pd), sin embargo, en dietas con adecuada cantidad de Pd se observó una mejoría de un 6%. Se podría decir, entonces, que esta respuesta se relacionaría con los efectos positivos de la fitasa sobre la mejor disponibilidad y utilización del N. También se observó que la DIA de N fue más alta en dietas con un contenido bajo de Pd en comparación a dietas con adecuado nivel de Pd. Esto sugiere que los efectos observados sobre la energía no se explican por la mejoría en la digestibilidad del N solamente. Cabe destacar que al incrementar el contenido de Pd dietario mediante la adición de fosfato dicálcico, los valores de EMAn en las dietas basales disminuyen notablemente. Este fenómeno generalmente se atribuye a un “efecto de dilución” que ocurre al agregar fuentes inorgánicas de fósforo. Sin embargo, se observó que estos efectos negativos pueden ser contrarrestados mediante la adición de fitasa sugiriendo que el fitato es responsable, al menos en parte, de la menor EMAn observada en el estudio anterior. Por otra parte, se sugiere que al formarse complejos fitato-calcio y al unirse estos con ácidos grasos en el lumen intestinal, formarían jabones metálicos insolubles, disminuyendo así la digestibilidad de la grasa (Ravindran *et al.*, 1998). Los autores concluyeron que la fitasa tiene efectos positivos sobre la utilización de la proteína, como resultado

de la hidrólisis del ácido fítico por la enzima y la consecuente liberación de las proteínas y aminoácidos ligados al fitato.

Ravindran y Bryden, (1997) también observaron el efecto del nivel de P inorgánico sobre la EMAn de la dieta. Estos investigadores determinaron el efecto de la fitasa y fósforo inorgánico sobre la EMAn en pollos broiler. La fitasa incrementó la EMAn en un 3,5% (3109 a 3217 kcal/ kg de materia seca), sin embargo, el nivel de P no fítico tuvo un efecto negativo sobre la EMAn. Al aumentar el Pd en la dieta mediante la incorporación de fosfato inorgánico la EMAn dietaria se redujo en 5,24% (3193 a 3026 kcal/ kg de materia seca).

Según algunos autores (Cosgrove, 1980; Ravindran y Bryden, 1997), el efecto de la fitasa sobre la digestibilidad de la proteína y energía probablemente puede explicarse por:

1. La presencia de complejos nativos de ácido fítico y proteína en los vegetales.
2. Formación *de novo* de complejos de ácido fítico con proteínas en el tracto gastrointestinal.
3. Formación de complejos de ácido fítico con enzimas proteolíticas en el tracto gastrointestinal.
4. La elevada relación Ca:fitato en dietas con P disponible adecuado ayuda a la formación de complejos insolubles Ca-fitato.
5. Complejos Ca-fitato con ácidos grasos forman jabones insolubles en el lumen intestinal, disminuyendo con esto la digestibilidad de la grasa.
6. Complejos Ca-fitato directamente ligados a almidones.
7. Complejos Ca-fitato inhiben la acción de la α -amilasa disminuyendo con esto la solubilidad y digestibilidad del almidón.

En base a los estudios anteriores, se puede decir que la suplementación de fitasa en dietas de pollos broiler puede considerarse una interesante alternativa si se necesita mejorar la utilización de nutrientes de la dieta, especialmente si se considera el valor económico que pueden tener los nutrientes liberados por la enzima. Al tomar como ejemplo al P liberado por la fitasa, el valor económico de este mineral se puede calcular mediante su comparación con el valor del P inorgánico. La liberación de 1,0 g de P por 500-600 FTU de fitasa/kg significa un ahorro de US\$1,35/ ton de alimento (Coelho, 2000).

Si bien es cierto que históricamente el estiércol se ha considerado como un valioso fertilizante, hoy en día en algunos países se ha establecido la inquietud de que las excretas provenientes de la producción intensiva de animales son un potencial contaminante del medio ambiente, debido principalmente al desarrollo de grandes unidades de producción (Coelho, 2000). Existen muchas fuentes de agua que han progresado de condiciones oligotróficas (bajo contenido de minerales y alto oxígeno disuelto) a condiciones mesotróficas y finalmente eutróficas (alto contenido de minerales y bajo oxígeno disuelto). La eutricación es el sobre-enriquecimiento de superficies de agua con nutrientes minerales. Esto resulta en la excesiva producción de algas y otros organismos vegetales, los que con su elevada tasa respiratoria disminuyen el nivel de oxígeno disuelto en el agua, y por ende, se crea un ambiente desfavorable para la vida de animales acuáticos (Correll, 1999). El P es el elemento limitante para algas y plantas acuáticas, por lo tanto, el P es el nutriente limitante para el proceso de eutricación (Schindler, 1977). Más aún, debido al importante efecto de la contaminación del P a través del proceso de eutricación, este elemento ha comenzado a ser un símbolo para las causas medioambientales. Derivado de lo anterior es que la fitasa es una importante herramienta para disminuir la cantidad de P contenido en las fecas, y por lo tanto, reducir la potencial contaminación de las superficies de agua.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la conveniencia de la adición de una enzima fitasa comercial en las dietas de pollos broiler en base a sus indicadores productivos y de integridad ósea.

Objetivos Específicos

1.- Evaluar si la adición de fitasa en la dieta de pollos broiler permite disminuir el aporte dietario de fósforo inorgánico sin afectar los indicadores productivos y de integridad ósea de las aves.

2.- Estudiar si la adición de fitasa permite disminuir el aporte de nutrientes como proteína, aminoácidos, energía metabolizable y calcio en la dieta de pollos broiler sin afectar el rendimiento productivo e integridad ósea de las aves.

3.- Determinar la conveniencia económica de la adición de fitasa en las dietas de pollos broiler.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Seis mil pollos broiler Ross 308 de 1 día de edad, sexos mezclados y provenientes del mismo origen de reproductoras fueron distribuidos en forma aleatoria en 4 tratamientos de 1500 pollos cada uno, utilizando 6 repeticiones por tratamiento de 250 pollos cada una. Los tratamientos utilizados fueron los siguientes:

- a) **Tratamiento 1:** Dieta control sin la adición de fitasa.
- b) **Tratamiento 2:** Dieta control mas la incorporación de 750 FTU de la enzima fitasa (Ronozyme® Phytase)* por kg de dieta. Esta dieta se formuló de modo que la enzima fitasa reemplazara sólo el aporte de fósforo de la dieta control a razón de 1 g de fósforo, proveniente del fosfato de calcio, por cada 750 FTU de fitasa/ kg de dieta. En consecuencia, esta dieta se formuló con una disminución de 0,1% en el contenido de fósforo total y disponible.
- c) **Tratamiento 3:** Dieta formulada con los mismos ingredientes que la dieta control mas la incorporación de 750 FTU de fitasa (Ronozyme®)/ kg de dieta, a la cual se le asignó un valor nutricional con un aporte a la dieta final equivalente a los siguientes valores:
- 13 kcal/ kg de EMAn
 - 0,35% de proteína
 - 0,013% de Lisina
 - 0,009% de Metionina + Cistina
 - 0,1% de Ca
 - 0,1% de P
- d) **Tratamiento 4:** Igual que la dieta del tratamiento 3 pero sin la incorporación de la enzima fitasa.

* Ronozyme® Phytase: fitasa de origen microbiano cuya actividad enzimática es de 2500 FTU/ g de producto. Marca registrada por Productos Roche Ltda.

La descripción de las dietas para los distintos tratamientos se muestra en la **Tabla 1**. Previo a la formulación de las dietas las materias primas fueron sometidas a análisis químico proximal (AOAC, 1995) y determinación del contenido de calcio y fósforo (AOAC, 1995). Todas las dietas experimentales fueron formuladas en base a maíz, afrecho de soya, harina de pescado, gluten de maíz y aceite vegetal. La fuente de fósforo inorgánico utilizada fue un fosfato tricálcico defluorinado con 18% de fósforo y 34% de calcio y la fuente de calcio fue conchuela con un contenido de 36% de calcio.

5.1. Manejo nutricional.

El período experimental tuvo una duración de 43 días, en el cual las aves fueron alimentadas con 3 dietas distintas correspondientes a cada período de la crianza:

- Inicial: de 0 a 21 días,
- Intermedia: de 22 a 38 días; y
- Final: de 39 a 43 días.

La composición de las distintas dietas para cada uno de los períodos se muestra en la **Tabla 1**. El sistema de alimentación fue *ad libitum* durante toda la crianza y con acceso permanente a agua de bebida. Las dietas se peletizaron a una temperatura de 75°C, a excepción de las dietas iniciales.

Se midió la actividad enzimática en las dietas intermedia y final ya elaboradas de los tratamientos 2 y 3 con el fin de conocer la actividad de la enzima fitasa en el alimento posterior al peletizado (F. Hoffmann-La Roche Ltd, 1998).

Tabla 1: Ingredientes y composición calculada de nutrientes de las dietas experimentales por tratamiento y para cada período productivo:

INGREDIENTE (%)	INICIAL (1-21 días)				INTERMEDIA (22-38 días)				FINAL (39-45 días)			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Maíz	63,25	63,26	63,70	63,71	65,29	65,27	65,73	65,78	69,61	69,60	70,05	70,07
Soya, afrecho (46%)	21,91	22,04	23,65	23,75	22,81	22,95	24,51	24,53	18,71	18,81	20,39	20,50
Maíz, gluten (60%)	3,89	3,80	2,05	1,96	3,11	3,01	1,30	1,26	4,95	4,88	3,15	3,06
Pescado Harina	7,00	7,00	7,00	7,00	4,00	4,00	4,00	4,00				
Aceite vegetal	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Conchuela	1,04	1,54	1,26	1,26	0,86	1,36	1,10	1,10	0,78	1,28	1,02	1,01
HSMA ¹									2,00	2,00	2,00	2,00
Metionina DL	0,14	0,14	0,15	0,15	0,15	0,15	0,16	0,16	0,08	0,08	0,09	0,09
Lisina HCl	0,14	0,14	0,09	0,08	0,06	0,06	0,01	0,01	0,14	0,14	0,09	0,09
Vitaminas	0,20	0,20	0,20	0,2	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Minerales	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Sal	0,09	0,09	0,09	0,09	0,16	0,16	0,16	0,16	0,21	0,23	0,23	0,23
Premix ²	0,04	0,04	0,04	0,04	0,07	0,07	0,07	0,07				
Fosfato Tricálcico³	1,20	0,65	0,64	0,64	1,19	0,64	0,63	0,63	1,21	0,66	0,65	0,65
Ronozyme® Phytase⁴		0,03	0,03			0,03	0,03			0,03	0,03	
Total, %	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Costo/kg Alimento (\$)	99,146	99,890	98,240	96,653	94,248	94,990	93,411	91,824	91,626	92,448	91,254	89,667
COMPOSICIÓN CALCULADA⁵												
Proteína, %	22	22 (22,35)	21,65 (22)	21,65	20	20 (20,35)	19,65 (20)	19,65	18	18 (18,35)	17,65 (18)	17,65
EMAn, kcal/kg	3000	3000 (3013)	2987 (3000)	2987	3050	3050 (3063)	3038 (3050)	3038	3150	3150 (3163)	3137 (3150)	3137
Lisina, %	1,30	1,30 (1,313)	1,287 (1,30)	1,287	1,10	1,10 (1,113)	1,087 (1,10)	1,087	0,90	0,90 (0,913)	0,887 (0,90)	0,887
Metionina, %	0,57	0,57 (0,57)	0,56 (0,57)	0,56	0,51	0,51 (0,51)	0,51 (0,51)	0,51	0,40	0,40 (0,40)	0,398 (0,40)	0,398
Met + Cis, %	0,93	0,93 (0,939)	0,921 (0,93)	0,921	0,86	0,86 (0,869)	0,851 (0,86)	0,851	0,74	0,74 (0,749)	0,731 (0,74)	0,731
Calcio, %	1,00	1,00 (1,1)	0,90 (1,00)	0,90	0,90	0,90 (1,00)	0,80 (0,90)	0,80	0,80	0,80 (0,9)	0,70 (0,80)	0,70
Fósforo total, %	0,70	0,60 (0,70)	0,57 (0,70)	0,60	0,65	0,54 (0,64)	0,55 (0,65)	0,55	0,56	0,46 (0,56)	0,47 (0,57)	0,47
Fósforo disp., %	0,45	0,35 (0,45)	0,35 (0,45)	0,35	0,40	0,30 (0,40)	0,30 (0,40)	0,30	0,35	0,25 (0,35)	0,25 (0,35)	0,25

¹ Harina de subproductos de matadero de aves.

² Contiene antibiótico promotor de crecimiento y anticoccidial.

³ Fosfato tricálcico defluorinado con 18% de P, 34% de Ca y 5% de Na.

⁴ Suplementación de 750 FTU de fitasa/kg de alimento, correspondiente a 300 gramos de Ronozyme® por ton. de alimento.

⁵ Valores nutricionales entre paréntesis incluyen aportes teóricos entregados por la enzima.

5.2. Alojamiento.

La crianza de las aves se realizó en el pabellón experimental de un criadero comercial de broilers ubicado en la comuna de Padre Hurtado, Región Metropolitana, de propiedad del Sr. Mario Conca C.

El pabellón es de construcción convencional y en una superficie de 1.500 m² posee 24 corrales de malla de alambre y marcos de madera, de 24 m² cada uno y con acceso individual a un pasillo de circulación, de manera de facilitar la entrega de alimento y del agua de bebida de los pollos. La separación entre corrales con malla de alambre permitió mantener separadas a las aves asignadas a los distintos tratamientos y que compartieran el mismo ambiente.

El ambiente y manejo a que fueron sometidos los pollitos durante el período de crecimiento correspondió al estándar para crianza en piso de pollos broiler:

- **Material de cama:** Se utilizó para cada corral viruta de madera con un espesor de 10 cm aproximadamente.
- **Densidad:** En cada corral se utilizó una densidad de 10,4 aves/ m².
- **Calefacción:** Se utilizó 1 calefactor a gas licuado con capacidad para 600 pollos por cada 2 corrales. Para ubicarlo, el cerco que separaba a un corral de otro fue dividido en dos bloques, de manera que al terminar el período de calefacción, sólo fue necesario sobreponer la otra mitad del cerco para que alcanzara su altura definitiva.

- **Cercos:** Se habilitaron cercos con planchas de cholguán de 2,40 x 0,5 mt, a fin de evitar que los pollitos se alejaran de la fuente de calor en los primeros días de vida. El cerco de cada corral fue retirado a los 12 días del inicio de la crianza.
- **Comederos:** Durante los primeros días de crianza, se usaron 3 comederos de madera tipo bandeja por corral, de 10 cm de alto, 60 cm de largo y 40 cm de ancho cada uno, distribuyéndose dentro del cerco de cholguán. Estos comederos fueron reemplazados gradualmente por comederos tubulares colgantes, desde los 12 y hasta los 18 días. A partir de entonces, cada corral quedó dotado de 9 comederos de tarro colgantes, considerando 3 por cada 100 pollos, manteniéndose hasta el término de la crianza.
- **Bebederos:** Durante los primeros 12 días de la crianza, por cada corral se utilizaron 3 bebederos de cono de 4 litros de capacidad cada uno, considerando 1 por cada 100 pollitos. Estos bebederos fueron reemplazados paulatinamente por bebederos automáticos colgantes cónicos con una capacidad de 150 pollos/ unidad en igual número por corral.
- **Manejo de luz:** Los pollos se criaron con un régimen de luz de 23 horas luz durante los primeros 4 días de edad, y posteriormente continuaron con luz natural hasta el término de la crianza.

5.3. Manejo sanitario.

Todas las aves fueron vacunadas contra Bronquitis Infecciosa Aviar (virus vivo) aplicada por aspersión al día de edad en la planta de incubación. Además, una vez instalados en el pabellón todos los pollitos recibieron un tratamiento preventivo con antibiótico (Coliprim®[‡] en dosis de 1 ml/ lt. de agua de bebida) durante los 5 primeros días de edad.

[‡]Coliprim®: Asociación antimicrobiana de Sulfacoloropiridazina 10% y Trimetoprim 2%. Laboratorio Centrovét.

5.4. Registros.

- **Peso vivo (PV):** Para cada corral se midió el PV promedio del 100% de las aves al día de edad, para determinar el peso promedio de inicio, y posteriormente a los 21 y 43 días de edad. Los pesajes de las aves de cada corral se realizaron en jabs colectivas con capacidad de 10 aves cada una.
- **Consumo de alimento (CA):** Se determinó el consumo promedio de alimento de cada corral a los 21 y 43 días de edad.
- **Eficiencia de conversión alimenticia (ECA):** Este indicador se evaluó a los 21 y 43 días de edad, en base al consumo de alimento y el cálculo de la ganancia de peso de los pollos.
- **Mortalidad:** Se determinó durante todo el período experimental, realizando la necropsia respectiva de la totalidad de los pollos muertos a fin de determinar las causas de muerte.
- **Porcentaje de cenizas de falanges (%):** A los 43 días de edad se seleccionaron aleatoriamente 20 pollos de cada corral (10 machos y 10 hembras), cada uno identificado con una banda metálica numerada en el pliegue alar, a los que durante el faenamamiento se les extrajo el dedo central de la extremidad derecha. Los dedos agrupados por tratamiento fueron congelados para su posterior procesamiento. Para este efecto, los dedos, una vez desarticulada la uña, fueron agrupados en pools de 5 dedos y puestos en crisoles de cerámica debidamente identificados y pesados. Luego los dedos fueron secados a peso constante en estufa a 100°C por 12 horas. Posteriormente, las muestras fueron pesadas y puestas en una mufla a 600°C por 12 horas para finalmente obtener las cenizas*. Las muestras se procesaron en 6 etapas, considerando una repetición de cada tratamiento por cada etapa.

* Miles, R.D. 1999. Procedimiento de análisis de cenizas en falanges. USA, Gainesville, Departments of Dairy and Poultry Sciences and Animal Science, University of Florida (Correspondencia personal)

Como medición adicional, a los 21 y 43 días de edad se registró el número de pollos que presentaban un desplazamiento anormal.

5.5. Análisis Económico

Para evaluar la conveniencia económica de utilizar fitasa microbiana en dietas de pollos broiler se calculó el Margen Bruto (MB)[§] para cada tratamiento de la siguiente forma:

$$MB_i = (Y_i - CV_i)$$

Donde:

Y_i = ingreso

CV_i = costo variable

i = 1-4 tratamientos

[§] El cálculo del Margen Bruto se realizó en base a lo citado por Stanton *et al.*(1992) quienes afirman que el MB corresponde a la diferencia entre el ingreso y los costos variables.

5.6. Análisis Estadístico

El modelo matemático utilizado en este estudio fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = respuesta observada

μ = media poblacional

T_i = efecto del i-ésimo tratamiento (1...4)

E_{ij} = error experimental

Para cada respuesta, el efecto de los tratamientos se estudió a través de un análisis de varianza (ANDEVA) (SAS, 1982) y cuando el ANDEVA arrojó significación estadística ($p < 0,05$) la comparación entre promedios se realizó utilizando la Prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1980).

6. RESULTADOS

Los resultados de peso vivo, consumo de alimento, eficiencia de conversión alimenticia y mortalidad se muestran en la **Tabla 2**. Los pesos de los pollitos al día de edad fueron similares para los distintos tratamientos sin presentar diferencias significativas, lo que asegura la homogeneidad de las aves al inicio del experimento.

El peso vivo y la conversión alimenticia no fueron diferentes ($p>0,05$) para los distintos tratamientos a los 21 días de edad. El consumo de alimento de los pollos alimentados con una dieta deficitaria en nutrientes y sin la adición de fitasa fue significativamente inferior ($p<0,05$) a los observados en los tratamientos control y deficitario en nutrientes mas fitasa, no presentándose diferencias significativas ($p>0,05$) entre el control y los tratamientos con fitasa. La mortalidad de las aves del grupo control, del tratamiento deficiente en 0,1% de P mas fitasa y el tratamiento con menor contenido de algunos nutrientes a los 21 días de edad no difirió significativamente ($p>0,05$), siendo la mortalidad del tratamiento con menos nutrientes mas fitasa significativamente ($p<0,05$) menor a la de los tratamientos control y deficiente en nutrientes sin fitasa.

A los 43 días de edad el peso vivo y el consumo de alimento de los pollos de los grupo control y ambos grupos con fitasa no fueron significativamente distintos ($p>0,05$), siendo el peso vivo y el consumo de alimento del tratamiento nutritivamente deficiente y sin fitasa significativamente menores ($p<0,05$) que en los otros tres tratamientos.

La ECA a los 43 días de edad no fue significativamente distinta ($p>0,05$) entre los pollos de los tratamientos control y deficitarios en nutrientes, con y sin fitasa, siendo la conversión de las aves del tratamiento con 0,1% menos de P total mas fitasa significativamente ($p<0,05$) más eficiente que aquella

obtenida por las aves de los tratamientos deficitarios en nutrientes con y sin fitasa. La mortalidad a los 43 días de edad no arrojó diferencias significativas ($p>0,05$) entre los distintos tratamientos.

De las causas de muerte, la ascitis representó un 49,17% del total de aves muertas durante todo el estudio, seguida de Enfermedad Crónica Respiratoria (CRD), aerosaculitis y muerte súbita, con un 10,33, 7,02 y 5,37%, respectivamente, mientras que otras causas, que tuvieron una mínima casuística, representaron el 28,09% restante.

En relación a los resultados de porcentaje de cenizas en falange, no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre los distintos tratamientos (**Gráfico 1**), y en lo que se refiere a la incidencia de anomalías esqueléticas, éstas estuvieron dentro de lo normalmente observado para este tipo de aves y no se observaron diferencias de importancia entre los distintos tratamientos a los 21 ó 43 días de edad (**Tabla 3**).

Los resultados de análisis de actividad enzimática en las dietas se muestran en el **Gráfico 2**. Se observó una disminución en la actividad enzimática respecto del valor teórico de actividad (750 FTU/ kg) en ambas dietas (intermedia y final) del tratamiento 2 (738 y 725 FTU/ kg, respectivamente) y sólo en la dieta final del tratamiento 3 (720 FTU/ kg), puesto que en la dieta intermedia de este último tratamiento se observó una mayor actividad enzimática respecto al valor teórico (816 FTU/ kg).

El cálculo económico del uso de fitasa en dietas para pollos broiler se muestra en la **Tabla 4**. La mayor utilidad por pollo, así como por kilo de pollo vivo, fue obtenida por las aves alimentadas con dietas con una reducción de 0,1% de P y suplementadas con fitasa (\$199,243 y \$82,81, respectivamente), seguidas por los pollos del tratamiento control positivo, tratamiento con reducción de nutrientes mas fitasa y tratamiento control negativo (\$194,204 y \$81,22; \$193,813 y \$81,03; \$180,534 y \$79,92, respectivamente).

Tabla 2. Peso vivo (PV), consumo de alimento (CA), eficiencia de conversión alimenticia (ECA) y mortalidad, al 1, 21 y 43 días de edad para cada tratamiento¹.

Tratamiento	Peso Inicial (kg)*	21 días ²				43 días ²			
		PV (kg)	CA (kg)	ECA	Mort. (%)	PV (kg)	CA (kg)	ECA	Mort. (%)
1	0,041	0,587	0,837 ^a	1,542	1,9 ^a	2,391 ^a	4,331 ^a	1,843 ^{ab}	5,0
2	0,042	0,603	0,822 ^{ab}	1,468	0,9 ^{ab}	2,406 ^a	4,293 ^a	1,816 ^b	3,9
3	0,041	0,615	0,844 ^a	1,472	0,5 ^b	2,392 ^a	4,378 ^a	1,862 ^a	3,7
4	0,041	0,576	0,800 ^b	1,496	1,3 ^a	2,259 ^b	4,132 ^b	1,864 ^a	4,3

¹ Tratamiento 1: Control; Tratamiento 2: Dieta con reducción de 0,1% de P total mas 750 UFT de fitasa/ kg de dieta; Tratamiento 3: Dieta con reducción de 13 kcal/ kg de EMAn, 0,35% de proteína, 0,013% de Lis, 0,009% de Met + Cis, 0,1% de Ca y 0,1% de P total, mas 750 UFT de fitasa/ kg de dieta; Tratamiento 4: Dieta con reducción de nutrientes en igual cuantía que Tratamiento 3 y sin fitasa.

² a-b, etc.: promedios con diferentes letras en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

Tabla 3. Número de aves con dificultad en su desplazamiento a los 21 y 43 días de edad para los distintos tratamientos.

Tratamiento	Dificultad al Desplazarse	Edad (días)	
		21 (N°)	43 (N°)
1	Leve ¹	1	8
	Severa ²	0	8
	Total	1	16
2	Leve	1	8
	Severa	0	1
	Total	1	9
3	Leve	1	12
	Severa	0	2
	Total	1	14
4	Leve	1	8
	Severa	0	3
	Total	1	11

¹ Tratamiento 1: Control; Tratamiento 2: Dieta con reducción de 0,1% de P total mas 750 UFT de fitasa/ kg de dieta; Tratamiento 3: Dieta con reducción de 13 kcal/ kg de EMAn, 0,35% de proteína, 0,013% de Lis, 0,009% de Met + Cis, 0,1% de Ca y 0,1% de P total, mas 750 UFT de fitasa/ kg de dieta; Tratamiento 4: Dieta con reducción de nutrientes en igual cuantía que Tratamiento 3 y sin fitasa.

² Ave con cojera que aún es capaz de desplazarse.

³ Ave postrada.

Tabla 4. Utilidad por pollo (\$), utilidad por cada 1000 pollos (\$) y utilidad por kg de pollo vivo (\$) para los distintos tratamientos¹.

Tratamiento	Utilidad/ pollo² (\$)	Utilidad/ 1000 pollos³ (\$)	Utilidad/ kg de pollo vivo⁴ (\$)
1	194,204	194.204	81,22
2	199,243	199.243	82,81
3	193,813	193.813	81,03
4	180,534	180.534	79,92

¹ Tratamiento 1: Control; Tratamiento 2: Dieta con reducción de 0,1% de P total mas 750 UFT de fitasa/ kg de dieta; Tratamiento 3: Dieta con reducción de 13 kcal/ kg de EMAn, 0,35% de proteína, 0,013% de Lis, 0,009% de Met + Cis, 0,1% de Ca y 0,1% de P total, mas 750 UFT de fitasa/ kg de dieta; Tratamiento 4: Dieta con reducción de nutrientes en igual cuantía que Tratamiento 3 y sin fitasa.

² Considera el ingreso (peso vivo x \$386/ kg) menos el costo alimentario por pollo exclusivamente, incluyendo el costo de Ronozyme® Phytase (\$1,587/ kg de alimento).

³ Utilidad por pollo multiplicado por 1000.

⁴ Utilidad por pollo dividido por el peso vivo promedio de los pollos de cada tratamiento.

Gráfico 1. Porcentaje de cenizas en falanges a los 43 días de edad.

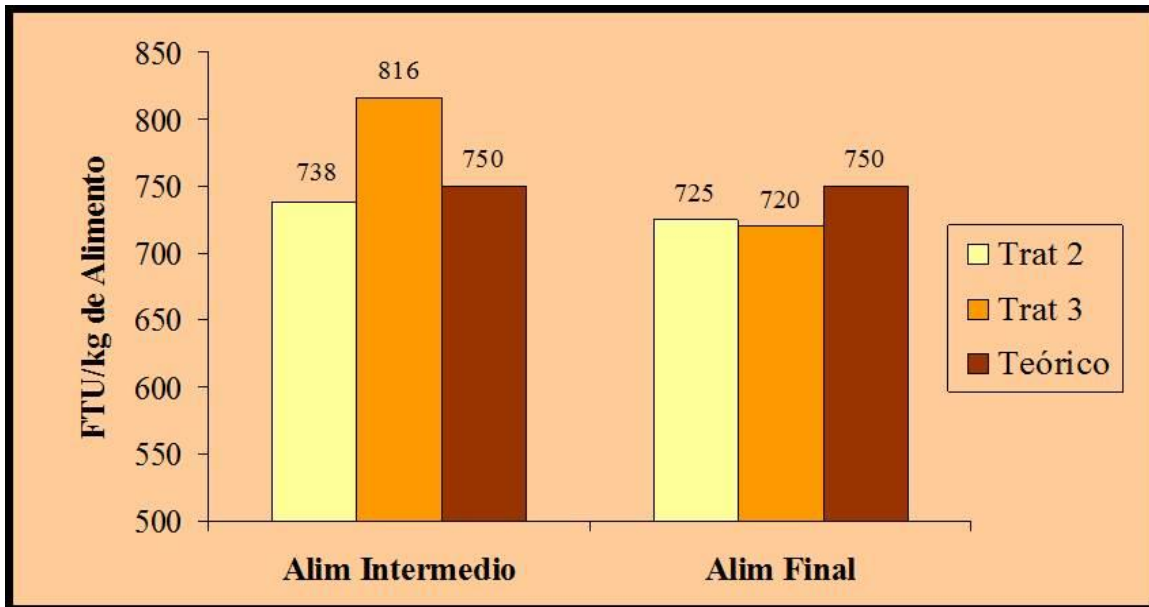
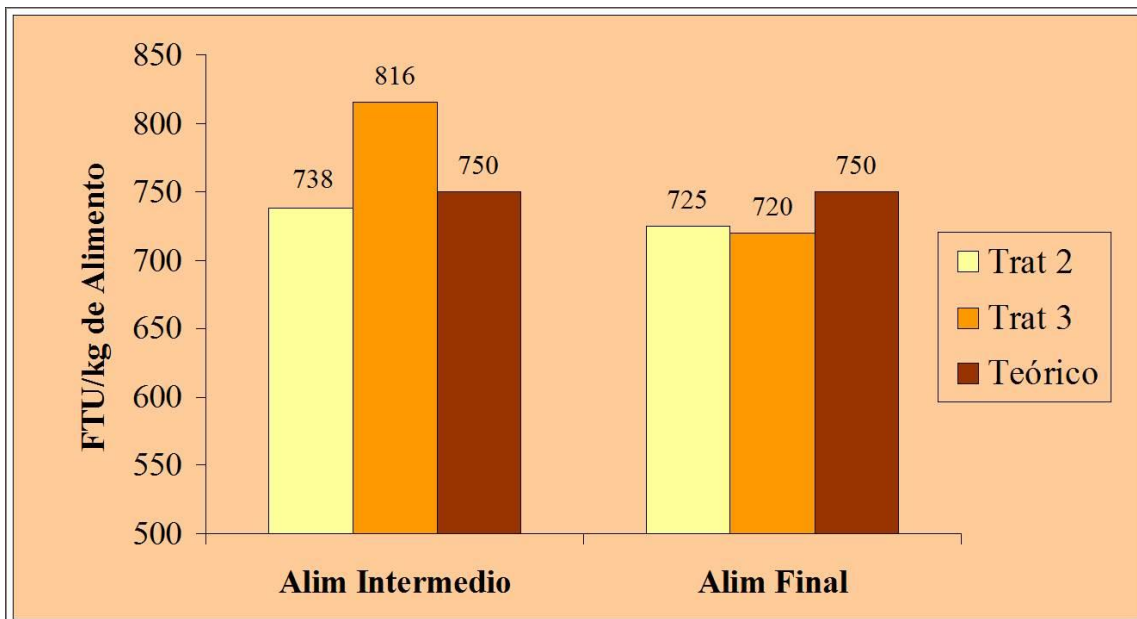


Gráfico 2. Actividad de enzima fitasa en el alimento peletizado (FTU/kg).



7. DISCUSIÓN

Los pesos de los pollitos al día de edad fueron semejantes para los distintos grupos de aves que posteriormente constituyeron cada tratamiento, lo que era esperable dado que provenían del mismo lote de reproductoras, las que al momento de la postura tenían 38 semanas de edad. Lo anterior indica que los pollitos utilizados eran homogéneos desde el origen y que las diferencias obtenidas para las variables medidas en los distintos tratamientos no son atribuibles a diferencias en el peso de los pollitos al día de edad.

A los 21 días de edad, la reducción de 0,1% de P y de Ca, así como de EMAn (13 kcal/ kg), proteína, lisina y metionina + cistina (0,35, 0,13 y 0,009%, respectivamente), con y sin la adición de fitasa, no afectó el peso vivo (PV) ni la eficiencia de conversión alimenticia (ECA) de las aves. Sin embargo, al término del experimento se observó un efecto negativo sobre el PV como consecuencia de la reducción de nutrientes en la dieta, dado que el grupo alimentado con esta ración, y sin la adición de fitasa, tuvo un PV significativamente ($p < 0,05$) inferior al obtenido por las aves alimentadas con una dieta deficiente en nutrientes pero con la adición de fitasa (2,259 y 2,392 kg, respectivamente). Queda en evidencia, con este hecho, el efecto positivo de la fitasa sobre la mejor utilización de nutrientes. Por su parte, los pollos alimentados con niveles deficitarios en nutrientes, mas la adición de fitasa, alcanzaron un PV comparable al obtenido por las aves del tratamiento control (2,392 y 2,391, respectivamente). Este efecto también fue observado por Namkung y Leeson (1999), en cuyo estudio el PV, ECA y consumo de alimento (CA) de los pollos alimentados con fitasa y cuyas dietas fueron deficientes en Ca y Pd (0,11 y 0,1%, respectivamente), fueron comparables a los obtenidos por pollos alimentados con niveles normales de Ca y Pd (0,9 y 0,45%, respectivamente).

La reducción de nutrientes en la dieta también tuvo un impacto sobre el CA. Tanto a los 21 como a los 43 días de edad, las aves del control negativo (dieta con reducción de nutrientes sin fitasa) mostraron un

CA significativamente inferior ($p < 0,05$) al control positivo (dieta normal sin fitasa). Por otro lado, los consumos alcanzados por los pollos de los tratamientos con fitasa fueron comparables al CA del control positivo en ambas edades. Es probable que el menor consumo observado en los pollos alimentados con la dieta nutritivamente deficiente se deba a una reducción del apetito como resultado del bajo nivel de P, pues este mineral está involucrado en el control del apetito y en la eficiencia de conversión alimenticia (McDowell, 1992).

La ECA no fue afectada por la adición de fitasa ni por la reducción de nutrientes a los 21 días de edad, siendo la ECA del grupo control positivo numéricamente superior a la de los otros tres tratamientos, pero sin alcanzar significancia ($p > 0,05$). Sin embargo, a los 43 días de edad la conversión de los pollos del tratamiento con una reducción de 0,1% de P mas fitasa fue significativamente ($p < 0,05$) más eficiente que la de las aves de los tratamientos con reducción de nutrientes, con y sin incorporación de fitasa (1,81, 1,86 y 1,86, respectivamente). Este hecho significó un mejoramiento en la ECA de un 1,46%. Un mejoramiento en la conversión de pollos broiler también fue encontrado por Denbow *et al.* (1998), sin embargo, otros autores (Zhang *et al.*, 1999; Vétesi *et al.*, 1998) observaron que la conversión alimenticia no fue afectada por la inclusión de fitasa en la dieta de pollos broiler. En el presente estudio, es probable que a los 43 días de edad las aves alimentadas con dietas con reducción de 0,1% de P mas fitasa, hayan obtenido una mejor conversión alimenticia debido a que presentaron el menor consumo de alimento y el más alto peso vivo entre los cuatro tratamientos.

Aún cuando las falanges de los pollos del tratamiento deficitario sin fitasa presentaron un menor porcentaje de cenizas, las diferencias observadas entre los distintos tratamientos no fueron significativas ($p > 0,05$), indicando que quizás se necesite de una mayor reducción de nutrientes para obtener algún impacto negativo en este parámetro. La tendencia observada en los valores de porcentaje de cenizas obtenidos indican que la adición de fitasa, sumada a una reducción en niveles de 0,1% de Ca y 0,1% de P en la dieta, no afecta negativamente la integridad ósea. Algunos autores han observado un significativo

aumento en el porcentaje de cenizas de falange, así como una mayor resistencia a la fractura, por efecto de la adición de fitasa a dietas para pollos broiler con un bajo contenido de P (Denbow *et al.*, 1995; Denbow *et al.*, 1998; Yi *et al.*, 1996b).

Respecto al registro del número de aves con un desplazamiento anormal, éste fue mínimo y se encuentra dentro de lo normalmente observado en el plantel en que se realizó el experimento.

La mortalidad total varió entre 3,7 a 5,0%, rango que está dentro de lo frecuentemente observado en el plantel comercial en que se realizó el estudio (5,0-6,0%). Las causas de muerte también se enmarcan dentro del estado sanitario normal del criadero.

Los resultados del análisis de actividad de la enzima fitasa en el alimento peletizado muestran que existió una menor actividad del orden de 1,6 y 3,3% en las dietas intermedia y final del tratamiento 2, respectivamente, y disminuyó en un 4% para la dieta final del tratamiento 3. Sin embargo, la dieta intermedia del tratamiento 3 tuvo una actividad enzimática 8,8% superior al valor teórico. Este resultado está dentro de la variación esperada para la técnica de análisis de actividad enzimática en el alimento, por lo tanto estos valores indican que la enzima utilizada resistió las temperaturas de peletizado a las que fue sometido el alimento en este experimento. Estos datos concuerdan con la literatura entregada por el proveedor de la enzima, la cual indica que la retención es sobre el 80% a temperaturas de peletizado hasta 85°C (Roche, 1999).

Los resultados de este estudio avalan la hipótesis que la suplementación de dietas de pollos broiler a base de maíz, soya y harina de pescado con la enzima fitasa mejora la disponibilidad o utilización de P, Ca, EMAn, proteína, lisina y metionina+cistina. Consecuentemente, el nivel de incorporación de P inorgánico, así como de los otros nutrientes en dietas para pollos broiler, pueden ser reducidos en presencia de la enzima fitasa sin afectar el resultado productivo de estas aves.

El cálculo económico realizado indica que la adición de fitasa microbiana (750 FTU/ kg) mejora la utilidad por pollo cuando la enzima reemplaza 0,1% de fósforo disponible de la dieta. En este estudio, al incluir a la enzima como un ingrediente más en la matriz de formulación, con aportes en EMAn, proteína, aminoácidos, Ca y P, se redujo el costo del kilo de alimento respecto a la dieta control (\$98,240 y \$99,146, respectivamente), siendo las utilidades obtenidas, por pollo y por kilo de pollo vivo, similares a las del grupo control, aunque levemente inferiores.

8. CONCLUSIONES

- 1.- La adición de fitasa (750 FTU/ kg de dieta) en dietas de pollos broiler reemplazó 0,1% de fósforo inorgánico disponible en la dieta sin afectar los indicadores productivos y de integridad ósea de las aves.
- 2.- La adición de fitasa en las dietas mejoró la utilización de aminoácidos, proteína, calcio y fósforo, lo cual se reflejó en los resultados de los indicadores productivos obtenidos en los tratamientos con y sin fitasa.
- 3.- La disminución de 13 kcal EMAn/Kg de dieta, 0,1% de fósforo disponible, 0,1% de calcio, 0,013% de lisina y 0,009% de metionina+cistina de 1 a 43 días de edad afectó negativamente el rendimiento productivo de los pollos.
- 4.- La temperatura de peletizado (75°C) no afectó la actividad enzimática presente en el alimento posterior a la elaboración de la dieta.
- 5.- El cálculo económico realizado indica que la adición de 750 FTU de fitasa mejora la utilidad por pollo cuando la enzima sólo reemplaza 0,1% de fósforo disponible de la dieta. Se debe reevaluar el valor económico de la enzima al considerar otros nutrientes como EM, Ca, aminoácidos y proteína.
- 6.- La adición de fitasa microbiana en dietas de pollos broiler a base de maíz y soya es conveniente si se considera que la enzima es efectiva en mejorar la utilización de nutrientes como EMA, proteína, aminoácidos, Ca y P, lo cual se reflejó al comparar el rendimiento productivo alcanzado por las aves alimentadas con dietas nutritivamente deficientes, con y sin la adición de fitasa. Sin embargo, su inclusión en la formulación de dietas a mínimo costo depende mas bien del valor económico que del valor nutricional asignado a la enzima.

9. BIBLIOGRAFIA

1. **Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995.** Chapter 45, pág: 57-58 in Official methods of analysis of the association of analytical chemists. 16ª Ed. Vol II. Association of official analytical chemists, Washington, DC.
2. **Aoyagi, S. y Baker, D. 1995.** Effect of microbial phytase and 1,25-dihydroxycholecalciferol on dietary copper utilization in chicks. *Poultry Science* 74:121-126.
3. **Biehl, R.R. y Baker, D.H. 1997.** Microbial phytase improves amino acid utilization in young chicks fed diets based on soybean meal but not diets based on peanut meal. *Poultry Science* 76:335-360.
4. **Cheryan, M. 1980.** Phytic acid interactions in food systems. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 13:297-335.
5. **Coelho, M.B. 2000.** Positive, negative traits of phosphorus examined. *Feedstuffs*, February 7. p. 12-15, 23.
6. **Correll, D.L. 1999.** Phosphorus: a rate limiting nutrient in surface waters. *Poultry Science* 78:674-682.
7. **Cosgrove, D.J. 1980.** Inositol phosphates: their chemistry, biochemistry and physiology. Elsevier Science Publishing Co., New York, NY.
8. **De Groote, G. y Huyghebaert, G. 1997.** The bio-availability of phosphorus from feed phosphates for broilers as influenced by bio-assay method, dietary Ca-level, and feed form. *Animal Feed Science and Technology* 69:329-340.
9. **Denbow, D.; Ravindran, V.; Kornegay, E.; Yi, Z.; Hulet, R. 1995.** Improving phosphorus availability in soybean meal for broilers by supplemental phytase. *Poultry Science* 74:1831-1842.
10. **Denbow, D.; Grabau, E.; Lacy, G.; Kornegay, E.; Russell, D.; Umbeck, P. 1998.** Soybeans transformed with a fungal phytase gene improve phosphorus availability for broilers. *Poultry Science* 77:878-881.

11. **Dudley-Cash, W.A. 1999.** Phytase improves amino acid digestibility of feed ingredients. *Feedstuffs*, June 7. p.15,42.
12. **Eeckhout, W. y De Paepe, M. 1994.** Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology* 47 (1-2):19-29.
13. **F.Hoffman/ La Roche Ltd. 1998.** “Roche” specifications and tests: Ronozyme P (CT). Basle, Switzerland. [8] p.
14. **Huff, W.; Moore, P.; Waldroup, P.; Waldroup, A.; Balog, J.; Huff, G.; Rath, N.; Daniel, T.; Raboy, V. 1998.** Effect of dietary phytase and high available phosphorus corn on broiler chicken performance. *Poultry Science* 77:1899-1904.
15. **Ibrahim, S.; Jacob, J; Blair, R. 1999.** Phytase supplementation to reduce phosphorus excretion of broilers. *Journal Applied Poultry Research* 8:414-425.
16. **Kornegay, E.T.; Denbow, D.M.; Yi, Z.; Ravindran, V. 1996.** Response of broilers to graded levels of microbial phytase added to maize-soybean meal diets containing three levels of nonphytate phosphorus. *British Journal Nutrition* 66:251-259.
17. **Leeson, S. 1999.** Enzimas para aves. Págs. 179-185 *en: Anais Simpósio Internacional sobre Nutrição de Aves*, Campinas, SP, Brazil.
18. **Lei, X.G.; Ku, K.P.; Millar, E.R.; Yokoyama, M.T.; Ullrey, D.E. 1994.** Calcium levels affects the efficecy of supplemental microbial phytase in corn-soybean diets of weanling pigs. *Journal of Animal Science* 72:139-143.
19. **Maenz, D. y Classen, H. 1998.** Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poultry Science* 77:557-563.
20. **McDowell, L.R. 1992.** Minerals in animal and human nutrition. Academic Press, Inc. U.S.A.
21. **Miles, R. y Nelson, T. 1974.** The effect of enzymatic hydrolysis of phytate on the available energy content of feed ingredients for chicks and rats. *Poultry Science* 53:1714-1717.
22. **Mitchell, R.D. y Edwards, H.M.Jr. 1996.** Additive effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol on phytate phosphorus utilization and related parameters in broiler chickens. *Poultry Science* 75:95-110.

23. **Mohammed, A.; Gibney, M.J.; Taylor, T.G. 1991.** The effect of dietary levels of inorganic phosphorus, calcium and cholecalciferol on the digestibility of phytate-P by the chicks. *British Journal Nutrition* 9:63-79.
24. **Mohanna, C y Nys, Y. 1999.** Changes in zinc and manganese availability in broiler chicks induced by vegetal and microbial phytases. *Animal Feed Science and Technology* 77:241-253.
25. **Namkung, H, y Leeson, S. 1999.** Effect of phytase enzyme on dietary nitrogen-corrected apparent metabolizable energy and the ileal digestibility of nitrogen and amino acids in broiler chicks. *Poultry Science* 78:1317-1319.
26. **Nelson, T.S. y Kirby, L.K. 1987.** The calcium binding properties of natural phytate in chick diets. *Nutr. Rep. Int.* 35:949-956.
27. **Oberleas, D. 1973.** Phytates. Pages 363-371 *in: Toxicants Occurring Naturally in Foods.* National Academy of Sciences, Washington, D.C.
28. **Qian, H.; Kornegay, E.T.; Denbow, D.M. 1997.** Utilization of phytate phosphorus and calcium as influenced by microbial phytase, cholecalciferol, and calcium: total phosphorus ratio in broiler diets. *Poultry Science* 76:37-46.
29. **Ravindran, V. y Bryden, W.L. 1997.** Influence of dietary phytic acid and available phosphorus levels on the response of broilers to supplemental Natuphos phytase. *Poultry Research Foundation Report,* University of Sidney, Australia.
30. **Ravindran, V.; Bryden, W.L.; Cabahug, S.; Selle, P.H. 1998.** Impact of microbial phytase on the digestibility of protein, amino acids and energy in broilers. Pages 156-165 *in: Proc. Maryland Nutrition Conference for Feed Manufacturers,* Maryland, U.S.A.
31. **Ravindran, V.; Cabahug, S.; Ravindran, G.; Bryden, W.L. 1999.** Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. *Poultry Science* 78:699-706.
32. **Reddy, N.R.; Sathe, S.K.; Salunkhe, D.K. 1982.** Phytates in legumes and cereals. *Advances in Food Research* 28:1-92.

33. **Roche. 1999.** Boletín técnico: Ronozyme® Phytase A new phytase for animal feed. Btl, Denmark. p. 2.
34. **Rojas, S. y Scott, J. 1969.** Factors affecting the nutritive value of cottonseed meal as a protein source for chick diets. *Poultry Science* 48:819-835.
35. **Schindler, D.W. 1977.** The evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science* 195:260-262.
36. **Sebastian, S.; Touchburn, S.; Chavez, E.; Laguë, P. 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* 75:729-736.
37. **Sebastian, S.; Touchburn, S.P.; Chavez, E.R.; Laguë, 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.
38. **Simons, P.C. y Versteegh, H.A. 1993.** Role of phytases in poultry nutrition. Pages 181-186 *in:* Enzymes in Animal Nutrition. Proc. Of the 1st Symposium, Kartaue, Ittingen, Switzerland.
39. **Singh, M. y Krikorian, A.D. 1982.** Inhibition of trypsin activity in vitro by phytate. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 30:799-800.
40. **Soares, J. 1995.** Phosphorus bioavailability. Pages 257-294 *in:* Bioavailability of nutrients for animals: amino acids, minerals, and vitamins. Academic Press, Inc. U.S.A.
41. **Sohail, S.S. y Roland, D.A. 1999.** Influence of supplemental phytase on performance of broilers four to six weeks of age. *Poultry Science* 78:550-555.
42. **Stanton, W.J.; Etzel, C.W.; Henry, P.R. 1992.** Fundamentos del Marketing. 9 ed. México. Ed. McGraw-Hill. P. 291-303.
43. **Statistical Analysis System (S.A.S.).** User's guide: Statistics, 1982 edition. S.A.S. Institute Inc. Cary, N.C. U.S.A.
44. **Steel, R.G.D. y Torrie, J.H. 1980.** Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 2 ed. U.S.A. Ed. McGraw-Hill. 633 p.

- 45. Thompson, L.U. y Yoon, J.H. 1984.** Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. *Journal of Food Science* 49:1228-1229.
- 46. Van der Klis, J.D. y Versteegh, H.A.J. 1996.** Phosphorus nutrition in poultry. Pages 71-83 *in:* *Recent Advances in Animal Nutrition*. Ed. Nottingham University Press, Nottingham, U.K.
- 47. Vetési, M.; Mézes, M.; Baskay, G.; Gelencsér, E. 1998.** Effects of phytase supplementation on calcium and phosphorus output, production traits and mechanical stability of the tibia in broiler chickens. *Acta Veterinaria Hungarica* 46 (2):231-242.
- 48. Waldroup, P. 1999.** Nutritional approaches to reducing phosphorus excretion by poultry. *Poultry Science* 78:683-691.
- 49. Yi, Z.; Kornegay, E.; Denbow, D. 1996a.** Supplemental microbial phytase improves zinc utilization in broilers. *Poultry Science* 75:540-546.
- 50. Yi, Z.; Kornegay, E.T.; Ravindran, V.; Denbow, D.M. 1996b.** Improving phytate phosphorus availability in corn and soybean meal for broilers using microbial phytase and calculation of phosphorus equivalency values of inorganic P by phytase. *Poultry Science* 76:240-249.
- 51. Zanini, S. y Sazzad, M. 1999.** Effects of microbial phytase on growth and mineral utilisation in broilers fed on maize soyabean-based diets. *British Poultry Science* 40:348-352.
- 52. Zhang, X.; Roland, D.A.; McDaniel, G.R.; Rao, S.K. 1999.** Effect of Natuphos® phytase supplementation to feed on performance and ileal digestibility of protein and amino acids of broilers. *Poultry Science* 78:1567-1572.