

UTILIZACIÓN DEL FÓSFORO EN AVES Y GANADO PORCINO

Olayiwola Adeola, Ryan N. Dilger, Edward M. Onyango y Joshua A. Jendza
Department of Animal Sciences. Purdue University, USA

1.- INTRODUCCIÓN

La obtención de crecimientos y tasas reproductivas satisfactorios, así como el bienestar de cerdos y aves, dependen del suministro adecuado con la dieta de energía y nutrientes. Uno de estos nutrientes, que juega un papel destacado en las transformaciones metabólicas de la energía en las células, es el fósforo (P). Puesto que la eficacia de uso del P de la dieta (incluyendo digestión, absorción y metabolismo) es incompleta, la determinación de la proporción realmente utilizada es muy importante. El uso ineficiente del P de los alimentos vegetales ha sido relacionado con problemas de contaminación ambiental a través del estiércol, especialmente en las zonas de producción más intensiva. Las fuentes de P vegetal utilizadas en piensos de aves y porcino contienen generalmente bajas concentraciones de P y, además, la mayor parte del P en los granos de cereales y semillas de oleaginosas se encuentra en forma de fitina, un compuesto que resulta poco digestible. Por tanto, un objetivo para mejorar la nutrición de estas especies y reducir la contaminación ambiental es incrementar la digestión de la fitina.

En la actualidad se están examinando varias aproximaciones para alcanzar estos objetivos. En primer lugar, conseguir ajustes precisos de los aportes de P para cubrir las distintas necesidades de los animales (es decir, crecimiento, mineralización de los huesos, mantenimiento). Para ello es necesario obtener información sobre: 1) las necesidades específicas de P para cada función y 2) medir la utilización verdadera del P por animales no rumiantes para cada ingrediente. La estimación de la digestibilidad verdadera puede hacerse sumando el flujo endógeno de P a valores conocidos de digestibilidad aparente. En segundo lugar, preparaciones de enzimas exógenas (fitasas) pueden añadirse a piensos de

animales monogástricos para mejorar la utilización digestiva del P dietético no disponible. Esta vía se ha experimentado con éxito para liberar P asociado a fitina de origen vegetal (Jongbloed et al., 1992; Cromwell et al., 1993). Una tercera estrategia busca reducir el contenido en P fítico de los alimentos vegetales. Para ello se han desarrollado híbridos mutantes o cultivares de granos de cereales y semillas de oleaginosas que contienen una mayor proporción de P en formas asimilables (Wilcox et al., 2000; Raboy et al., 2001; Raboy, 2002). Otra aproximación, usada por científicos de la Universidad de Ghelph, es la obtención de cerdos transgénicos para la expresión salivar de fitasa (Forsberg et al., 2003). El presente trabajo recoge estudios recientes sobre las dos primeras aproximaciones.

2.- PAPEL E IMPORTANCIA DEL FOSFORO EN LOS SISTEMAS CORPORALES

El P es un elemento esencial, para el que la mayor parte de los animales vertebrados tienen unas necesidades sólo inferiores a las de calcio. Hays (1976) reportó que aproximadamente un 75% del P de los cerdos se almacena en el esqueleto como principal componente de la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$), que es a su vez el mayor constituyente del esqueleto. El P del esqueleto sirve también como reserva movilizable para las funciones que cumple en casi todos los procesos metabólicos. El 25% del P corporal que no se encuentra en el esqueleto está contenido en moléculas de alto valor biológico, tales como ADN, ARN, ATP, fosfolípidos (fosfoglicéridos, esfingomiélin), compuestos ricos en energía (fosfoenolpiruvato, 1,3-bisfosfoglicerato y creatina fosfato) y proteínas fosforiladas. En las células pueden también encontrarse pequeñas cantidades de P inorgánico que juegan un papel importante en el mantenimiento del equilibrio ácido-base.

El calcio es un catión divalente que ejerce una gran diversidad de funciones en el animal. Una de las principales del calcio extra-esquelético, en su mayor parte en forma ionizada o ligado a albúmina, es la regulación de los procesos metabólicos y fisiológicos (Underwood y Suttle, 1999). Esta regulación puede ocurrir como una simple unión con una proteína, lo que da lugar a cambios conformacionales y/o funcionales, o por una relación clásica estímulo/respuesta a través de señales celulares en las que el calcio actúa como un segundo mensajero (Weaver, 2001). El calcio es también necesario para una contracción muscular adecuada (Lobaugh, 1995) que ocurre como consecuencia de la exocitosis de neurotransmisores (como la acetilcolina) en la sinapsis neuromuscular. Este proceso se inicia mediante un potencial de acción que requiere calcio para su propagación y produce la fusión de las vesículas donde se encuentran los neurotransmisores con la membrana muscular. De manera muy similar, el calcio también interviene en la liberación de hormonas como la insulina, mediante la fusión de las vesículas secretoras con las membranas lipídicas y la expulsión de su contenido en el tejido diana. Finalmente, el calcio es necesario para una apropiada coagulación sanguínea y como cofactor de muchas reacciones enzimáticas (Underwood y Suttle, 1999).

La regulación del calcio y el fósforo es bastante similar. Las tres hormonas implicadas en la misma son la paratiroidea, el 1,25-dihidroxicolecalciferol (la forma activa de la vitamina D) y la calcitonina (Bronner, 1997). En general, la hormona paratiroidea y el 1,25-dihidroxicolecalciferol modulan el calcio y P plasmático por el siguiente procedimiento: la hipocalcemia conduce a un aumento en la liberación de hormona paratiroidea que estimula la producción de 1,25-dihidroxicolecalciferol por el riñón. Finalmente, la absorción de calcio de la dieta en el aparato digestivo, el aumento de la reabsorción de calcio en los túbulos renales distales y la liberación de calcio desde los huesos sirve para incrementar el nivel de calcio en plasma. Simultáneamente, la hormona paratiroidea induce fosfaturia al reducir la reabsorción de P en los túbulos renales para mantener una relación adecuada calcio a fósforo en sangre. Como contraste, concentraciones elevadas de calcio sirven para reducir la liberación de hormona paratiroidea y la producción de 1,25-dihidroxicolecalciferol, lo que atenúa la hipercalcemia por vías opuestas a las anteriormente descritas. La calcitonina actúa de forma similar para reducir el nivel de calcio en plasma, aunque en respuesta a condiciones de hipercalcemia más extremas.

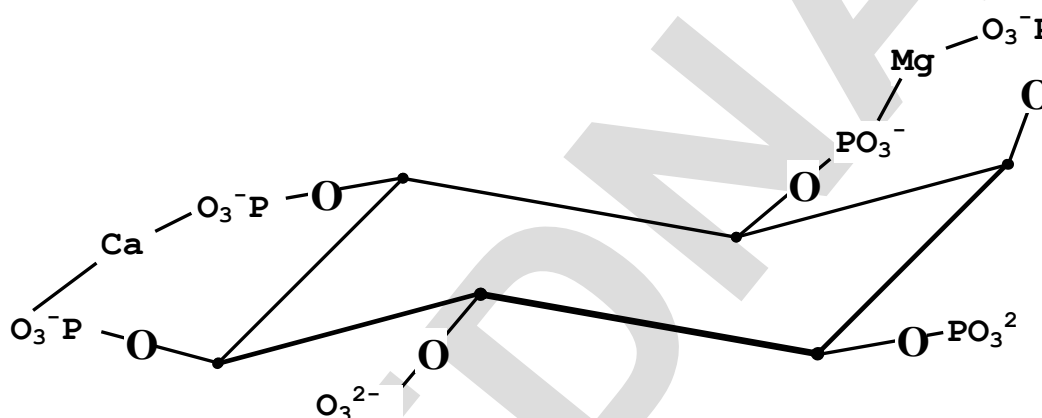
La absorción de calcio y P de la dieta ocurre a lo largo de la mayor parte del intestino delgado, aunque la capacidad absorbente es mayor en el yeyuno y el duodeno, respectivamente (Berner, 1997; Bronner, 1997). El transporte paracelular de calcio y fósforo que tiene lugar a lo largo de todo el intestino delgado, generalmente se realiza mediante transporte activo cuya regulación es poco precisa. El calcio atraviesa el epitelio intestinal en contra de su gradiente de concentración mediante un sistema regulado por la vitamina D (Bronner, 1997). El transporte transcelular del P de la dieta frente a su propio gradiente electroquímico tiene lugar principalmente por vías Na-dependientes, pero posiblemente también Na-independientes (Danisi y Murer, 1989). La absorción de P de la dieta por este sistema precisa de un aporte energético para el mecanismo de co-transporte Na-P.

3.- FUENTES VEGETALES DE FÓSFORO

El ácido fítico (mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexaquis dihidrógeno fosfato) es un éster de un alcohol cíclico, el inositol, con seis grupos fosfato. Anderson (1914) propuso la configuración molecular del ácido fítico que se presenta en la figura 1. Cuando forma complejos con mezclas de cationes como calcio, cinc, magnesio y cobre, la molécula se denomina fitina y cuando presenta la forma mono- a dodeca-aniónica se conoce como fitato. Este estereoisómero del inositol hexaquis dihidrógeno fosfato ha sido aislado de vegetales (Maga, 1982; Reddy et al., 1982). También está presente en tejidos animales (Grases et al., 2001). Se encuentra principalmente en semillas como mezcla de sales de magnesio, calcio y potasio (Selle et al., 2000). La fitina, término colectivo para esta mezcla

de sales (Temperton y Cassidy, 1964, Odani et al., 1997), constituye hasta un 3% de muchas semillas oleaginosas y cereales usados en alimentación animal (Erdman, 1979, Cheryan, 1980, Reddy et al., 1982, Anderson, 1985). El P fítico supone entre un 50 y un 80% del P total en la mayor parte de los ingredientes vegetales de los piensos para avicultura y ganado porcino (Common, 1940). Las funciones de los fitatos en las plantas incluyen (Cosgrove, 1966; Cosgrove e Irving, 1980): la reserva de P e inositol, la regulación del nivel de P inorgánico, la inmovilización de cationes necesarios para el control de los procesos celulares y para su liberación posterior durante la germinación, y la reserva de energía (un competidor del ATP durante su rápida biosíntesis cuando la semilla se acerca a la madurez, cuando el metabolismo está inhibido y se induce la dormancia)

Figura 1.- Fitatos y su estructura quelada (fitina). Adaptado de Graf (1986).



La conformación de los fitatos depende del pH (Barrientos y Murthy, 1996). Sin embargo, la conformación preferencial a diferentes pH no parece ser paralela al comportamiento espectroscópico del ácido fítico (Barrientos y Murthy, 1996). El ácido fítico tiene una estructura simétrica hexa-ortofosfato (Erdman, 1979; Maga, 1982). Es un ácido moderadamente fuerte con 12 protones ionizables (Martin y Evans, 1986a,b). Seis de los 12 protones (uno de cada fosfato) tienen valores pK_a de 1,1-2,1, otros tres son débilmente ácidos con valores pK_a de 5,7-7,6 y para los tres restantes valores pK_a de 10,0-12,0 (Costello et al., 1976). La carga neta para el ácido fítico es de alrededor de -3 a pH 1,5 y -8 a pH 7,6. Por tanto, a pH neutro el ion fitato puede quelar fuertemente varios cationes entre dos grupos fosfato o débilmente dentro de un grupo fosfato (Erdman, 1979). En esencia, a lo largo del rango de pH que se encuentra en el tracto digestivo, el ion fitato puede unirse a diferentes tipos de cationes.

Los fitatos interactúan con nutrientes alimenticios, tanto en el pienso como en el tracto digestivo, formando complejos con iones polivalentes (tales como el calcio, el cobre, el hierro, el magnesio o el cinc), proteínas, vitaminas, y posiblemente también con almidón (Erdman, 1979; Thompson, 1986; Torre et al., 1991; Pallauf et al., 1992; Zhou y Erdman,

1995; Kies et al., 1997, Liu et al., 1998; Ravindran et al., 1995, 1999). La formación de estos complejos es pH-dependiente (Erdman, 1979; Grynspan y Cheryan, 1989). Los grupos fosfato aniónicos situados sobre la molécula de fitato pueden unirse a grupos catiónicos de moléculas de proteína o aminoácidos (Cosgrove, 1966; Reddy et al., 1982).

La naturaleza de los complejos puede ser binaria (complejos fitato-proteína) a pH bajos, o ternaria (tales como los complejos fitato-mineral divalente-proteína) cuando el pH se aproxima a la neutralidad (Cosgrove, 1966; Anderson, 1985; Selle et al., 2000). A valores bajos de pH las proteínas tienen una carga positiva máxima y el fitato está cargado negativamente, lo que resulta en una fuerte atracción electrostática (Anderson, 1985). Cuando el pH aumenta, la proteína se aproxima a su punto isoelectrico, su carga se neutraliza y su solubilidad es mínima. Cuando el pH supera su punto isoelectrico la unión entre la proteína y el fitato se realiza a través de puentes catiónicos divalentes entre el grupo carboxilo de la proteína y el fitato (Okubo et al., 1976; Anderson, 1985). El fitato forma por tanto complejos con péptidos y proteínas a través tanto de los elementos básicos como ácidos de los residuos de aminoácidos (Sharma et al., 1978; Singh y Krikorian, 1982).

Con dos o más cationes presentes, puede haber un aumento sinérgico en la precipitación de sales de fitatos (Erdman, 1979). Sin embargo, la precipitación de complejos depende de la naturaleza de los cationes involucrados (Nolan et al., 1987). Las interacciones entre minerales pueden complicarse por interacciones proteína-mineral-fitato (Erdman, 1979).

La composición de los fitatos también afecta a la formación de complejos proteína-fitato (O'Dell y deBoland, 1976). El ácido fítico es también estructuralmente capaz de unirse a almidón a través de enlaces fosfato (Thompson, 1986; Kies et al., 1997; Jenab y Thompson, 2002). Los complejos fitato-nutriente pueden formarse en los alimentos o en el aparato digestivo y reducir su digestibilidad.

La interacción de las proteínas con los iones fitato reduce la solubilidad y la actividad de las proteínas (Maga, 1982; Grynspan y Cheryan, 1989; Ravindran et al., 1995). La menor solubilidad puede afectar negativamente algunas propiedades funcionales de las proteínas que dependen de su hidratación (Reddy et al., 1982), tales como sus propiedades hidrodinámicas (viscosidad y gelificación), capacidad emulsionante, espumante y dispersibilidad en medios acuosos (Reddy et al., 1982). Por todo ello, la formación de complejos fitato-proteína puede afectar su funcionalidad en el caso de enzimas o proteínas de transporte.

4.- DIGESTIBILIDAD VERDADERA DEL FÓSFORO DE HARINAS DE SOJA EN CERDOS Y AVES

La digestibilidad verdadera del P en ingredientes alimenticios, que permite el cálculo más preciso de los balances aportes/necesidades del animal, requiere estimaciones de las pérdidas endógenas intestinales. Para ello se usaron niveles gradualmente crecientes de P de fuentes de harina de soja convencional o pobre en fitatos en piensos suministrados a cerdos canulados en el íleon y a broilers (Dilger, 2004). La composición de los piensos experimentales se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1.- Composición química de los piensos experimentales (en fresco).

Fuente harina soja: Nº pienso:	Convencional				Bajo-fitato			
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Item, g/kg</i>								
Materia seca	902	905	905	908	909	912	922	926
Proteína bruta (N x 6,25)	65,5	141	206	269	71,9	150	215	279
Energía bruta, kcal/kg	3832	4026	4131	4293	3889	4068	4273	4459
Calcio	0,71	1,10	1,52	2,01	0,84	1,41	1,99	2,38
Fósforo total	0,88	1,75	2,71	3,58	0,83	1,64	2,29	3,01

Se observó una respuesta lineal ($P < 0,01$) en la ganancia de peso tanto en los cerdos que consumían variedades convencionales de soja: 1,64, 3,09, 4,00 y 4,22 kg/periodo en los piensos 1 a 4, respectivamente, como en las de bajo contenido en fitato: 1,44, 3,06, 4,22 y 4,16 kg/periodo en los piensos 5 a 8, respectivamente. Un aumento de la ingestión de P, a través de un incremento del nivel de harina de soja, aumentó linealmente ($P < 0,01$) la digestibilidad aparente prececal del P, la total en el conjunto del aparato digestivo y el output total de P (cuadro 2). Calculando la regresión entre la ingestión diaria de nutriente y el flujo prececal o total y por extrapolación a ingestión de nutriente cero, pudieron estimarse las pérdidas endógenas y la digestibilidad verdadera del P en las dos variedades de harina de soja en cerdos en crecimiento. Los valores de pérdidas endógenas de P obtenidos en la digesta prececal o a partir del output total de P en heces fueron muy diferentes: 0,10 y 0,03 g/kg materia seca ingerida (MSI) en la digesta prececal y 0,02 y 0,09 g/kg MSI en las muestras de heces para variedades de soja convencionales y de bajo contenido en fitatos, respectivamente, con un ESM de 0,05 (figura 2). La digestibilidad verdadera prececal del P, calculada a partir de las estimaciones de estas pérdidas endógenas de P fue más baja ($P < 0,05$) para variedades convencionales (43,7%) que para las de bajo contenido en fitatos (63,3%; ver figura 3). La digestibilidad verdadera del P en el conjunto del tracto digestivo fue también inferior para las variedades convencionales (44,7 vs 62.2%; $P < 0,05$).

UTILIZACIÓN DEL FÓSFORO EN AVES Y GANADO PORCINO

Cuadro 2. Contenido de P en el pienso, digestibilidad prececal y total del P en el aparato digestivo, y flujo total y endógeno de P en las heces procedentes de cerdos en crecimiento alimentados con dos variedades de harina de soja

Variedad soja: Pienso número:	Convencional				Baja en fitatos				ESM
	1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>Prececal</i>									
Input total de P, g/kg MS	0,97	1,93	2,99	3,94	0,92	1,80	2,48	3,25	-
Digestibilidad aparente, % ³	30,9	42,2	38,4	41,5	58,3	64,1	61,0	62,4	1,7
Flujo total, g/kg MOD ^{3,4}	8,87	10,55	12,00	12,06	4,26	4,91	5,12	4,79	0,21
Flujo total, g/kg MSI ^{3,4}	0,68	1,12	1,84	2,30	0,38	0,65	0,97	1,22	0,03
Flujo endógeno, g/kg MOD ³	1,54	0,11	0,94	0,50	0,22	-0,31	0,21	0,13	0,28
Flujo endógeno, g/kg MSI ³	0,12	0,03	0,16	0,09	0,05	-0,02	0,06	0,03	0,03
<i>Tracto digestivo total</i>									
Input total de P, g/kg DM	0,97	1,93	2,99	3,94	0,92	1,80	2,48	3,25	-
Digestibilidad aparente, % ^{3,4}	42,1	46,5	41,1	45,1	43,2	65,3	58,1	58,2	2,5
Flujo total, g/kg MOD ^{3,4}	21,78	30,48	34,85	36,64	17,61	15,78	18,17	17,74	0,82
Flujo total, g/kg MSI ^{3,4}	0,57	1,03	1,76	2,16	0,52	0,62	1,04	1,36	0,04
Flujo endógeno, g/kg MOD	-0,09	-2,59	2,21	0,11	5,23	-2,36	1,60	1,99	1,53
Flujo endógeno, g/kg MSI	0,02	-0,03	0,11	-0,02	0,17	-0,06	0,10	0,13	0,05

¹ Variedades de soja convencionales o seleccionadas por bajo contenido de fitatos (Dilger, 2004).

² 16 cerdos por tratamiento.

³ Efecto variedad de soja ($P < 0,01$).

⁴ Interacción variedad de soja x nivel de inclusión ($P < 0,01$).

⁵ L = contraste lineal, C = contraste cuadrático.

Figura 2.- Flujo endógeno prececal y total de P (g/kg MSI) en cerdos alimentados con variedades de soja convencionales (barras blancas) y con bajo contenido en fitatos (barras negras). Los datos presentados son medias de 16 cerdos por tratamiento.

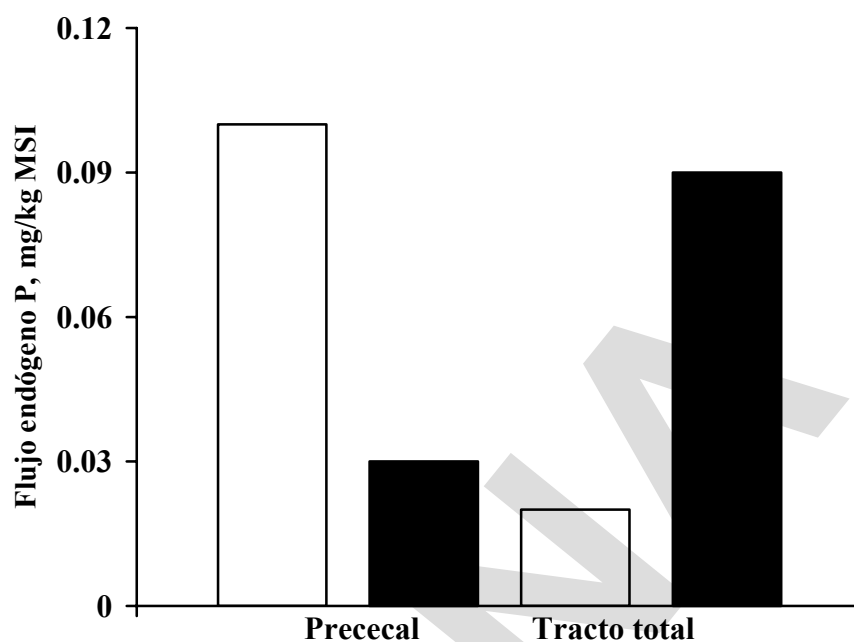
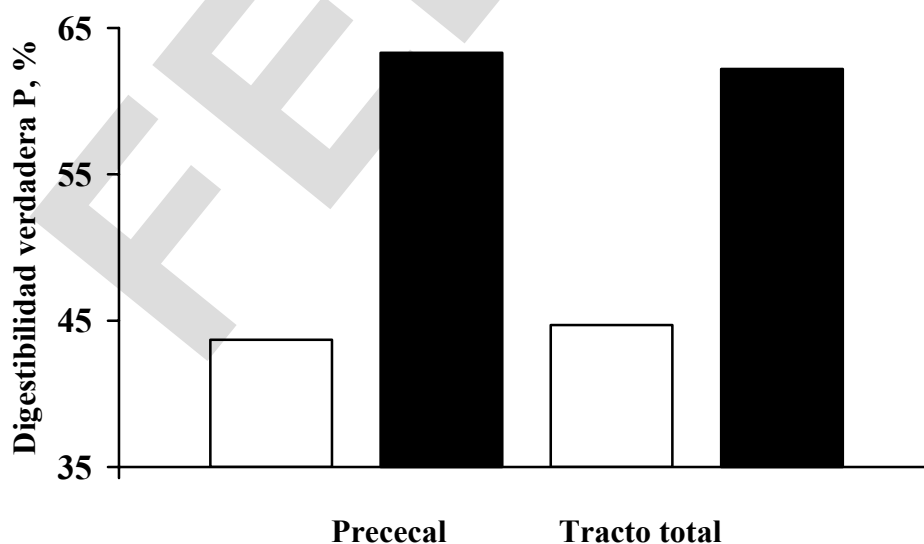


Figura 3.- Digestibilidad verdadera del P (%) de cerdos alimentados con variedades de soja convencionales (barras en blanco) y con bajo contenido en fitatos (barras negras). Los datos presentados son medias de 16 cerdos por tratamiento



Al suministrar nutrientes claramente por debajo de las necesidades de los animales, la metodología de regresión estima teóricamente el flujo endógeno de nutrientes por extrapolación a ingestión cero independientemente de la dieta. En el trabajo de Dilger (2004), el flujo total de P expresado sobre la base de MSI estuvo relacionado positivamente con el nivel de inclusión de cada fuente de soja. El flujo total de P supuso

entre un 58 y un 70% de la cantidad de P ingerida en variedades convencionales y entre un 36 y 42% en las de bajo contenido en fitatos a nivel prececal. Sin embargo, estas estimaciones del flujo endógeno son muy diferentes de las obtenidas por Fan et al. (2001). Los valores medios de flujo endógeno de P a nivel prececal y total para la variedad convencional de 0,10 y 0,02 g/kg MSI, respectivamente, difieren de los valores 0,86 (prececal) y 0,31 (tracto total) g/kg MSI estimados por Fan et al. (2001).

Por otra parte, suministrando un pienso con un bajo contenido de proteína, a base de caseína, Traylor et al. (2001) obtuvieron una estimación del flujo prececal de P de 0,18 g/kg MSI. De los datos de Dilger (2004) puede concluirse que la digestibilidad verdadera del P es superior en las variedades de soja con bajo contenido en fitatos (63%) que en las convencionales (44%). Este último valor fue próximo a las estimaciones de Fan et al. (2001) y ligeramente más bajo que estimaciones realizadas con cerdos de 40 y 58 kg (Ajakaiye et al., 2003).

Diferencias en la capacidad digestiva (en relación con la velocidad de crecimiento) pueden ayudar a explicar esta variación (Jongbloed, 1987). Por tanto, la mayor utilización digestiva verdadera del P de la variedad de soja de bajo contenido en fitatos en cerdos en crecimiento fue un resultado directo de la reducción de un 57% en el contenido en P analizado en la soja de bajo contenido en fitatos con respecto a la variedad convencional.

En el estudio realizado con pollos, la ganancia de peso también aumentó linealmente ($P < 0,01$) con el consumo de P, de forma que el peso a los 7 días se incrementó de 57 a 308 g en las aves que consumían la variedad convencional de soja y de 36 a 281 g en los que recibían la variedad con bajo contenido en fitatos. Al igual que en el ensayo con ganado porcino, un aumento gradual de la ingestión de P supuso un aumento lineal ($P < 0,01$) de la digestibilidad prececal aparente y del flujo total de P (cuadro 3). La digestibilidad aparente en el total del tracto digestivo aumentó linealmente ($P < 0,01$) desde un 33,1 hasta un 54,1% para la soja convencional y de un 31,2 a un 65,5% para la soja con bajo contenido en fitatos.

Las pérdidas endógenas de P, calculadas a partir de la regresión lineal entre la ingestión de P y el flujo prececal de P extrapolada a consumo cero de P, fueron de 0,21 y 0,14 g P/kg MSI para las variedades convencional y baja en fitatos, respectivamente (figura 4). Los valores correspondientes en heces fueron 0,19 y 0,40 g P/kg MSI. Las digestibilidades verdaderas prececales del P, calculadas a partir de estas estimaciones del flujo endógeno fueron similares entre ambas variedades (93,8%; figura 5). La digestibilidad verdadera del P en el total del tracto digestivo fue más baja ($P < 0,05$) para la soja convencional (59,8%) que para la baja en fitatos (76,9%).

Cuadro 3. Contenido de P en el pienso, digestibilidad prececal y total del P en el aparato digestivo, y flujo total prececal y en las heces procedentes de pollos alimentados con dos variedades de harina de

Variedad soja: Pienso número:	Convencional				Baja en fitatos				ESM
	1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>Prececal</i>									
Input total de P, g/kg MS	0,97	1,93	2,99	3,94	0,92	1,80	2,48	3,25	-
Digestibilidad aparente, % ³	71,2	82,7	88,8	87,7	75,4	87,2	88,9	88,5	1,3
Flujo total, g/kg MOD ^{3,4}	1,34	1,55	1,76	2,11	0,86	1,07	1,35	1,54	0,12
Flujo total, g/kg MSI ^{3,4}	0,28	0,33	0,33	0,48	0,23	0,23	0,28	0,37	0,02
Flujo endógeno, g/kg MOD ³	1,07	0,99	0,78	1,09	0,65	0,55	0,59	0,70	0,17
Flujo endógeno, g/kg MSI ³	0,22	0,22	0,15	0,24	0,17	0,12	0,12	0,17	0,03
<i>Tracto digestivo total</i>									
Input total de P, g/kg DM	0,97	1,93	2,99	3,94	0,92	1,80	2,48	3,25	-
Digestibilidad aparente, % ^{3,4}	33,1	55,2	53,6	54,1	31,2	59,4	57,8	65,5	3,4
Flujo total, g/kg MOD ^{3,4}	3,41	4,78	6,67	7,07	3,22	4,15	4,98	4,17	0,26
Flujo total, g/kg MSI ^{3,4}	0,65	0,87	1,39	1,81	0,63	0,73	1,05	1,12	0,06
Flujo endógeno, g/kg MOD	1,36	0,44	0,94	0,92	2,20	1,83	2,29	1,41	0,29
Flujo endógeno, g/kg MSI	0,26	0,09	0,19	0,23	0,42	0,32	0,48	0,37	0,05

¹ Variedades de soja convencionales o seleccionadas por bajo contenido de fitatos (Dilger, 2004).

² 6 réplicas (6 pollos por réplica) por tratamiento.

³ Efecto variedad de soja ($P < 0,01$).

⁴ Interacción variedad de soja x nivel de inclusión ($P < 0,01$).

⁵ L = contraste lineal, C = contraste cuadrático.

Figura 4.- Flujo endógeno de P (g/kg MSI) en pollos alimentados con variedades de soja convencionales (barras blancas) o con bajo contenido en fitatos (barras negras). Los datos presentados son medias de 6 réplicas de 4 jaulas por tratamiento (6 pollos por jaula).

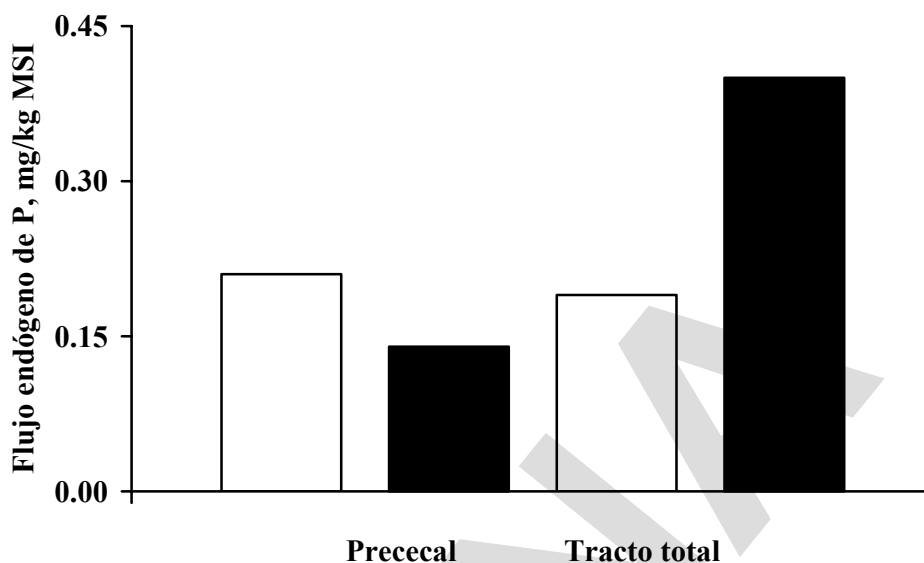
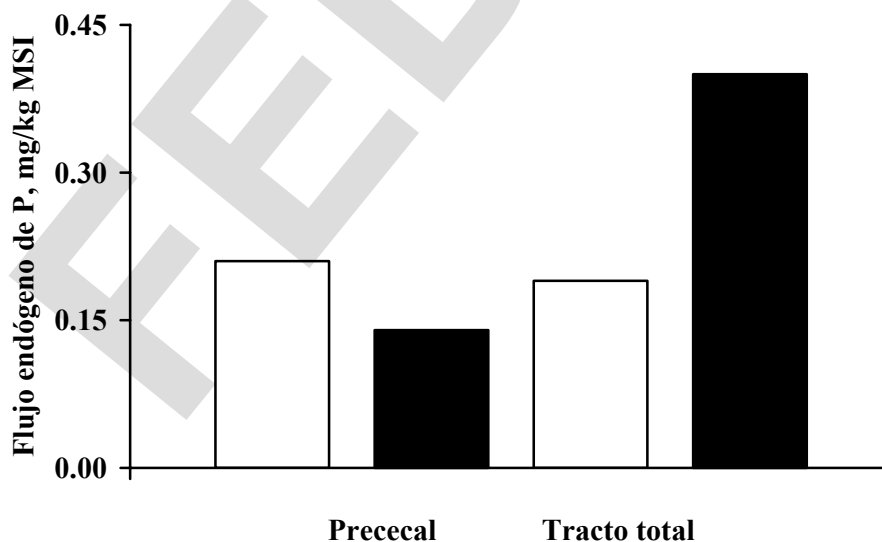


Figura 5.- Digestibilidad verdadera del P (%) en pollos alimentados con variedades de soja convencionales (barras blancas) o con bajo contenido en fitatos (barras negras). Los datos presentados son medias de 6 réplicas de 4 jaulas por tratamiento (6 pollos por jaula).



Al igual que en el caso del ganado porcino, un aumento gradual de la ingestión de P incrementó las pérdidas endógenas proporcionalmente menos que el consumo total. La mayor disminución de esta contribución relativa se observó entre el primer y el segundo pienso en cada una de las variedades de soja. Este resultado es esperable desde el momento en que las pérdidas basales endógenas de nutrientes son independientes del tipo de dieta y teóricamente permanecen constantes. Las estimaciones de P endógeno en la digesta prececal, expresadas sobre materia seca, promediaron 0,21 y 0,15 g/kg para la variedad de

soja convencional y la de bajo contenido en fitatos, respectivamente. Una estimación del contenido en P endógeno en el ileon de 0,27 g/kg MSI fue realizada por Rutherford et al. (2002). Sin embargo, otros resultados del mismo laboratorio (Rutherford et al., 2004) indican un valor de P endógeno de 0,45 g/kg MSI. Aunque limitada, la recopilación de datos recientes sugiere una elevada variabilidad entre y dentro de los diferentes laboratorios. Ello puede ser debido a diferencias en la edad o en la genética de los animales utilizados, o, más probablemente a las distintas metodologías empleadas para estimar las pérdidas endógenas. Así, en el trabajo de Diger (2004), la relación Ca:P se mantuvo relativamente constante, de forma que no contribuyó a diferencias en las pérdidas endógenas o en el metabolismo del P (Al-Masri, 1995). El similar flujo endógeno de P entre ambas variedades de soja sugiere que su estimación fue independiente de la dieta recibida por los animales.

La digestibilidad aparente prececal para la soja convencional varió entre un 71 y un 89% en comparación con estimaciones previas que oscilaban entre 49 y 53% (Rutherford et al., 2002; Dilger et al., 2004; Rutherford et al., 2004). Estos altos valores de digestibilidad prececal pueden estar relacionados con las bajas concentraciones de P en los piensos utilizados en este trabajo. Las aves recibieron entre un 5 y un 20% y entre un 9 y un 36% de las necesidades de P (NRC, 1994) en las dietas basadas en soja convencional o baja en fitatos, respectivamente. Incluso en el corto periodo de tiempo experimental puede haberse producido una adaptación de la capacidad digestiva hacia una mayor digestibilidad (Nwokolo et al., 1976), aunque este razonamiento no puede explicar completamente los resultados obtenidos. En contraste con las estimaciones de la utilización prececal del P, los valores de retención corporal del P son muy similares a los obtenidos previamente (Perney et al., 1993; Sebastian et al., 1996) oscilando desde un 33 hasta un 54% y desde un 31 hasta un 66% para la soja convencional y la baja en fitatos, respectivamente.

5.- INVESTIGACIONES RECIENTES SOBRE USO DE FITASAS EN PORCINO Y AVES

Numerosos trabajos han mostrado que la suplementación de piensos basados en alimentos vegetales con fitasas microbianas mejora la utilización del P unido a fitina. Después del éxito de las fitasas Natuphos y Ronozyme, otros trabajos han medido la eficacia de otras enzimas experimentales, especialmente aquéllas derivadas de *E. coli* expresadas en *Schizosaccharomyces pombe*.

Este es el caso de los experimentos realizados con lechones y cerdos en crecimiento y cebo (Jendza et al., 2005) y pollitos en iniciación y crecimiento (Dilger et al., 2004). Para ello utilizaron piensos maíz-soja consistentes en un control con alto contenido en P (HPC), que contenía un suplemento de fosfato bicálcico, un pienso basal

sin fosfato bicálcico, y este mismo pienso basal suplementado con 500 ó 1000 unidades de fitasa por kg para evaluar parámetros de crecimiento en lechones (11 kg de peso inicial), cerdos en crecimiento (23 kg) y cebo (53 kg). La ganancia de peso, la eficacia alimenticia, la concentración de P en plasma y en las cenizas del hueso metacarpo aumentaron linealmente ($P < 0,05$) con la adición de P al pienso (cuadro 4). La absorción diaria de P también aumentó linealmente ($P < 0,05$) con la suplementación con fitasas, indicando que fitasas procedente de *E. coli* son efectivas en liberar P fítico en piensos de cerdos de distintas edades. Las fitasas procedentes de *Aspergillus niger* han demostrado también su valor para mejorar la disponibilidad del P de la dieta (Adeola et al., 1995; Kemme et al., 1999; Traylor et al., 2001). Recientemente se han publicado resultados obtenidos con fitasas alternativas (Rutherford et al., 2002; Gentile et al., 2003; Augspurger y Baker, 2004) de diferentes orígenes biológicos, vectores de expresión y eficacia. En los resultados presentados en el cuadro 4 se observa que los rendimientos de crecimiento y la digestibilidad de nutrientes mejora con la suplementación con fitasas de piensos deficientes en P. Estas mejoras son atribuibles a la digestión del P fítico por la acción de las enzimas añadidas y ha sido observada también con otros preparados enzimáticos de fitasas (Lei et al., 1993; Kemme et al., 1999). La digestión del P fítico resultó presumiblemente en el incremento de las concentraciones de P en plasma observadas. Igualmente Gentile et al. (2003) con 750 FTU/kg, Adeola et al. (1995) y Lei et al. (1993) con 1500 FTU/kg de fitasa de *A. niger*, demostraron una respuesta similar del P plasmático a la suplementación con fitasa en lechones alimentados con piensos deficientes en P. Este aumento de la concentración de P en plasma se interpreta como el resultado de la mayor biodisponibilidad del P, que es necesaria para cubrir los gastos de mantenimiento, así como los de crecimiento y desarrollo.

En un estudio de 6 semanas realizado con pollos, el pienso control positivo fue formulado para contener 10 g de Ca y 5 g de P digestible/kg para los días 1 a 22 (iniciación) y 9 g de Ca y 3,8 g de P digestible/kg para los días 22 a 43 (crecimiento). El pienso control negativo contenía 6,6 g de Ca y 2,4 g de P digestible/kg para los días 1 a 22 y 6,2 g de Ca y 1,8 g de P digestible /kg en los días 22 a 43. El pienso control negativo fue suplementado con 500, 750, ó 1000 unidades/kg de fitasa derivada de *E. coli* y expresada en *Schizosaccharomyces pombe* o con 500 unidades/kg de Natuphos como comparación de referencia. La adición de fitasa microbiana al pienso control negativo mejoró linealmente ($P < 0,05$) todos los parámetros de crecimiento estudiados tanto durante en el período de iniciación como en el de crecimiento, como en el periodo global del experimento (cuadro 5). No se observaron diferencias ($P > 0,10$) en los rendimientos de crecimiento entre los dos tipos de enzimas. Tanto el contenido en cenizas de la tibia como el del metacarpo aumentó linealmente ($P < 0,01$) con la adición de fitasas al pienso control negativo, oscilando entre un 44 y un 49% para la tibia y entre un 10 y un 12% para las muestras de metacarpo (cuadro 5).

Cuadro 4.- Parámetros de crecimiento, concentración de P en plasma y contenido en cenizas del hueso de cerdos alimentados con un pienso control rico en P (HPC), un pienso basal (B), o un pienso basal suplementado con 500 ó 1,000 unidades de fitasa/kg (Jendza et al., 2005).

Item	Pienso ¹				DE
	HPC	B	B + 500	B + 1000	
Lechones²					
Peso inicial, kg	10,7	10,6	10,6	10,6	0,21
P inicial plasma, mmol/L	4,31	4,12	4,16	4,05	0,294
G. peso, kg/d ^{3,4}	0,54	0,43	0,48	0,48	0,044
Consumo, kg/d	1,08	1,09	1,06	1,02	0,164
G:C, g/kg ^{3,4}	510	407	465	488	74,9
Peso final, kg ^{3,4}	21,9	19,7	20,8	20,8	1,00
P final plasma, mmol/L ^{3,4}	3,61	1,59	2,20	2,50	0,420
Digestibilidad P, % ^{3,4,5}	37,45	24,03	32,10	49,47	4,071
Cerdos crecimiento ⁶					
Peso inicial, kg	22,9	23,0	22,6	22,7	0,46
G. peso, kg/d ^{3,4,5}	0,87	0,60	0,73	0,77	0,035
Consumo, kg/d ^{3,4}	2,29	1,96	2,06	2,14	0,152
G:C, g/kg ^{3,4}	385	306	357	364	27,4
Peso final, kg ^{3,4}	59,4	48,4	53,3	55,2	1,64
P plasma, mmol/L	2,24	2,19	2,22	2,23	0,057
Cenizas hueso, % ^{3,4}	56,42	51,97	53,60	55,16	1,38
Cerdos acabado ⁶					
Peso inicial, kg	52,6	53,0	52,3	52,7	0,47
G. peso, kg/d ^{3,4,5}	0,92	0,76	0,80	0,86	0,047
Consumo, kg/d ^{3,4}	2,97	2,94	2,98	2,95	0,173
G:C, g/kg ^{3,4}	310	254	269	293	22,8
Peso final, kg ^{3,4}	91,1	84,9	86,1	89,0	1,92
P plasma, mmol/L	2,32	2,27	2,26	2,27	0,051
Cenizas hueso, % ^{3,4}	59,02	56,68	58,44	57,51	1,56
Fósforo					
Ingestión, g/d ³	3,16	2,32	2,31	2,37	0,31
Absorción, g/d ^{3,4}	1,18	0,56	0,74	1,18	0,17
Digestibilidad, % ^{3,4}	37,45	24,03	32,10	49,47	4,071

¹ Los piensos experimentales eran un control rico en P (HPC) formulado para contener 1,7 g/kg más P inorgánico que el pienso basal (B) que no contenía P inorgánico suplementario, un pienso basal + 500 FTU/kg y un pienso basal + 1000 FTU/kg en los que el premix de fitasa se preparó con 1 g fitasa Phyzyme™ XP (3200 FTU/g) añadido a 31 g de almidón de maíz, resultando en 100 FTU/g premix, en sustitución de almidón de maíz. ² Parámetros de crecimiento medidos durante 21 días con 12 cerdos alojados individualmente por pienso. ³ HPC y pienso basal difieren, $P < 0,05$. ⁴ Respuesta lineal a la suplementación con fitasa, $P < 0,05$. ⁵ Respuesta cuadrática a la suplementación con fitasa, $P < 0,05$. ⁶ Parámetros de crecimiento medidos durante 42 días con 8 boxes por pienso y 4 ó 5 cerdos/box. ⁷ Respuesta lineal a la suplementación con fitasa, $P < 0,01$.

UTILIZACIÓN DEL FÓSFORO EN AVES Y GANADO PORCINO

Cuadro 5. Parámetros de crecimiento, concentración de P en plasma y de cenizas en huesos de pollos alimentados con (NC), y pienso basal suplementado con 500, 750 ó 1000 unidades de fitasa/kg (Dilger et

	Dieta ²				
	PC	NC	NC + 500 d/kg Phyzyme XP	NC + 750 Ud/kg Phyzyme XP	NC + 1000 Ud Phyzyme XP
Peso vivo, g					
Día 1	48	48	48	48	48
Día 22 ^{3,4}	726	660	715	746	746
Día 43 ^{3,4}	2247	2053	2183	2294	2257
Ganancia peso, g					
Días 1-22 ^{3,4}	678	612	667	697	698
Días 22-43 ^{3,4}	1521	1393	1468	1548	1511
Total ^{3,4}	2198	2005	2134	2246	2209
Consumo pienso, g					
Días 1-22 ^{3,4}	932	855	923	934	937
Días 22-43 ^{3,4,5}	2791	2575	2751	2862	2803
Total ^{3,4,5}	3723	3430	3674	3796	3740
Ganancia:Consumo, g:kg					
Días 1-22 ⁴	727	715	721	746	744
Días 22-43	545	541	534	541	540
Total	591	585	581	591	591
Cenizas tibia					
Día 22 ^{3,4,5}	52,0	44,5	49,0	49,4	49,3
Día 43 ^{3,4,5}	54,3	48,5	51,9	52,7	52,0
Cenizas metacarpo					
Día 22 ^{3,4,5}	13,3	10,4	10,7	11,9	11,8
Día 43 ^{3,4,5}	12,8	10,8	12,2	12,5	11,7

¹ El ensayo se desarrolló entre los días 1-43 de edad. La unidad experimental fue el box con 12 pollos por box y 8 réplicas por tratamiento. ² Dieta con 10 g Ca y 5 g P digestible/kg de 1 a 22 días y 9 g Ca y 3,8 g P digestible/kg para los días 22-43; NC = pienso control negativo. ³ Contraste entre control positivo vs control negativo ($P < 0,05$). ⁴ Contraste entre control positivo vs control negativo ($P < 0,05$). ⁵ Respuesta cuadrática al incremento gradual de fitasa Phyzyme XP ($P < 0,05$).

Ambas concentraciones variaron, además, lineal y cuadráticamente con la suplementación de fitasas en el periodo experimental global de 42 días ($P < 0,05$). La mineralización del hueso fue mayor en ambos casos en el caso de las aves que recibían el pienso control positivo con respecto al control negativo en todos los periodos estudiados ($P < 0,01$). Adicionalmente, el contenido en cenizas de las aves alimentadas con piensos suplementados con fitasas derivadas de *E. coli* fue superior al de las que recibían Natuphos en los días 1 a 22 ($P < 0,01$). Sin embargo, las diferencias entre estos dos tipos de enzimas no fueron evidentes en el metacarpo durante este periodo ni tampoco en ambos huesos en el conjunto del periodo experimental de 42 días ($P > 0,10$).

La suplementación de piensos deficientes en P con fitasas microbianas mejoró significativamente los rendimientos de crecimiento, la mineralización ósea y la utilización de nutrientes. Estos resultados fueron relacionados con una liberación paralela de P fítico. La capacidad de las fitasas para incrementar la disponibilidad del P en piensos para aves está bien documentada (Broz et al., 1994; Coelho y Kornegay, 1996; Kornegay et al., 1996; Qian et al., 1996; 1997). La mejor utilización del P fítico puede entonces reducir la necesidad de suplementar los piensos con P inorgánico, manteniendo la productividad de los animales. Los incrementos del contenido en cenizas en la tibia y el metacarpo son similares a los observados en otros trabajos (Broz et al., 1994; Denbow et al., 1995). Ravindran et al. (1995) observaron que los criterios de mineralización de huesos son indicadores más sensibles del status del P de las aves que los parámetros de crecimiento. Puesto que el P es un componente principal del esqueleto, esta observación reitera que las necesidades de P para la mineralización deben estar cubiertas cuando los estudios se enfocan a la nutrición del P. Los resultados del presente estudio sugieren que la hidrólisis de los enlaces del P con el ácido fítico es la responsable de estas mejoras.

El producto del contenido de P analizado (3,70 g/kg) por su digestibilidad (53%) en el pienso control negativo da un resultado de 1,96 g de P digestible/kg. La diferencia (1.74 g/kg) corresponde a la cantidad de P indigestible disponible para la actuación de la fitasa microbiana añadida. Dado que la incorporación de 500 (digestibilidad 69%) o 1000 (digestibilidad 66%) unidades de fitasa microbiana al pienso control negativo redujo la cantidad de P no digerido desde 1,74 hasta entre 1,15 y 1,27 g/kg, se deduce que la fitasa microbiana añadida hidrolizó aproximadamente un 30% del P indigestible. La eficacia del proceso de hidrólisis depende de varios factores tales como la actividad fitásica, la forma y localización de los fitatos en el alimento, y las condiciones del tracto digestivo (Adeola y Sands, 2003). Esto abre perspectivas de trabajo para mejorar la eficacia de actuación de estas enzimas sobre las moléculas de fitatos.

6.- REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA FITASA INTESTINAL

El uso de fitasas exógenas en piensos de aves para incrementar la utilización del ácido fítico y reducir el flujo de fitatos hacia el ambiente es actualmente muy común. La presencia de fitasa endógena en la mucosa intestinal ha sido demostrada en aves (Bitar y Reinhold, 1972; Onyango et al., 2001). Se supone generalmente que su actividad es muy baja cuando se formulan los piensos. Sin embargo, el papel y regulación de la fitasa intestinal en la hidrólisis de los fitatos en aves no han sido estudiados. Un mejor conocimiento de los factores involucrados en la regulación sería un paso importante para un uso más eficiente de esta fuente de fitasa. Estudios previos (Steenbock et al., 1953; Davies *et al.*, 1970) han indicado que los niveles de vitamina D o de P en el pienso podrían tener un efecto importante. Sin embargo, estos trabajos usaron preparaciones brutas y determinaciones de la actividad fitásica a pH alcalino. Estudios recientes realizados con vesículas del borde de la mucosa han mostrado que el pH óptimo para la actividad de la fitasa de la mucosa intestinal es de alrededor de 6 (Maenz y Classen, 1998), por lo que las determinaciones realizadas a pH alcalino pueden resultar erróneas.

Onyango (2004) presentó los resultados de un estudio diseñado para determinar el efecto del contenido del pienso en colecalciferol y en P sobre la regulación de la fitasa de la mucosa duodenal medida a pH 6 en pollos. Para ello se elaboraron cuatro piensos en harina basados en maíz-soja, con una estructura factorial 2 x 2 combinando dos niveles de colecalciferol (0 ó 75 µg/kg) y de P total (3,6 ó 7,0 g/kg). Los piensos se suministraron a las aves durante doce días bajo condiciones que excluían el uso de luz ultravioleta. Tanto el nivel de colecalciferol como el de P en el pienso mejoraron ($P < 0,01$) la ganancia de peso, el consumo, la eficacia alimenticia y la concentración de cenizas en la tibia (cuadro 6). Hubo un efecto principal del contenido en colecalciferol del pienso sobre la retención aparente de P (cuadro 6).

La cinética de la actividad de la fitasa de la mucosa intestinal que se muestra en la figura 6 indica también que la actividad máxima de la fitasa de la mucosa aumentó ($P < 0,01$) con el contenido en colecalciferol del pienso, mientras que su afinidad disminuyó ($P < 0,01$). El efecto de la concentración de P del pienso sobre la fitasa duodenal fue opuesto al del colecalciferol, ya que redujo ($P < 0,01$) la actividad máxima de la fitasa y aumentó ($P < 0,01$) su afinidad por el sustrato (cuadro 6).

El incremento en la digestibilidad del P asociado al colecalciferol puede explicarse por el efecto positivo de la vitamina D sobre la entrada de P en las células de la mucosa y su subsiguiente absorción desde el lumen intestinal, ya que ha sido demostrado que la vitamina D estimula el mecanismo de transporte de P en el intestino (Harrison y Harrison, 1961; Fuchs y Peterlik, 1980) y que este mecanismo es independiente del de transporte de calcio (Wasserman y Taylor, 1973).

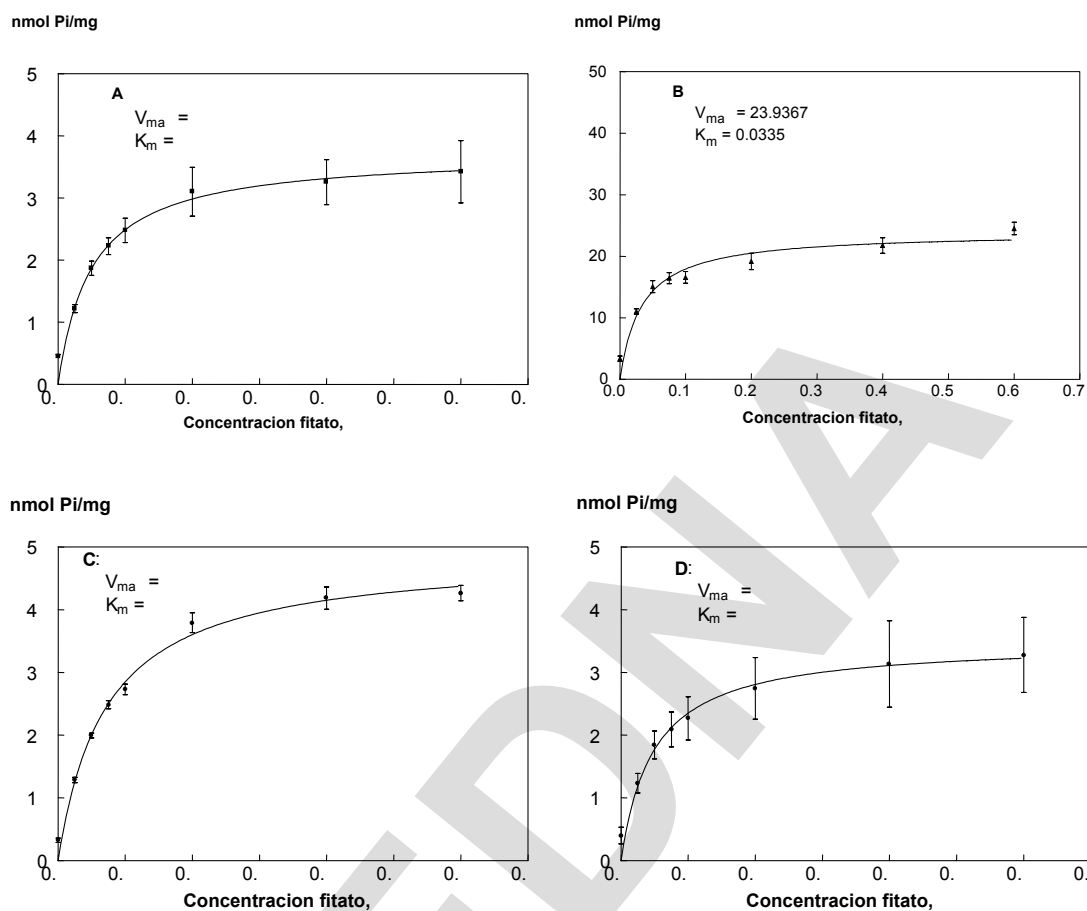
Cuadro 6.- Parámetros de crecimiento, contenido en cenizas de la tibia, utilización del P y actividad de la fitasa de la m con diferentes concentraciones de colecalciferol y P desde los 8 hasta los 20 días de edad (O

Colecalciferol µg/kg dieta	Total P dieta g/kg	Ganancia peso, g	Consumo pienso g	Eficacia alimento g/g	Cenizas tibia %	Digestibilidad prececal P %	Reteno P %
0	3,6	275	468	588	29,8	16	19
	7	453	617	733	41	53	28
75	3,6	445	597	748	38,6	75	58
	7	510	664	765	49,3	66	49
Medias efectos principales							
0		364	543	661	35,4	35	23
75		478	631	757	44	70	54
	3,6	360	533	668	34,2	45	38
	7	482	641	749	45,2	60	39
DE ²		33	29	30	1,5	4	3
Fuente de variación		Probabilidad					
Colecalciferol (C)		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Fósforo (P)		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,634
C x P		0,0008	0,0033	0,0001	0,7048	0,0001	0,0001

¹ Peso medio inicial de los pollos = 153 g; los valores para cada tratamiento representan la media de 6 jaulas con 4 pollos por jaula.

² Desviación estándar promediada.

Figura 6.- Cinética de la actividad de la fitasa de la mucosa duodenal en pollos alimentados desde los 8 hasta los 20 días de edad con piensos con niveles variables de colecalciferol y fósforo¹.



¹La actividad de la fitasa en vesículas de la superficie de la mucosa fue determinada por incubación con fitato de Na durante 10 min a 37 °C y pH 6. Panel A: Sin adición de vitamina D₃ con 3,6 g/kg total P; Panel B: Sin adición de vitamina D₃ con 3,6 g/kg total P; Panel C: 75 ug/kg vitamina D₃ con 3,6 g/kg total P; Panel D: 75 ug/kg vitamina D₃ con 7.0 g/kg total P. Las barras de error indican la desviación estándar. Los valores son medias de 6 aves.

La vitamina D media la entrada activa de P a través de la mucosa luminal de los enterocitos (Drezner, 2002). Los efectos de la vitamina D se modulan por la transcripción de mRNA inducida por calcitriol. Una vez en la célula, el P es translocado a la membrana vasolateral, desde donde abandona la célula a través de un mecanismo pasivo que es independiente del gradiente electroquímico. Wasserman y Taylor (1973) han mostrado que la vitamina D aumenta la entrada de P en todos los segmentos del intestino delgado del pollo. Este aumento es debido probablemente al papel regulador de la vitamina D sobre el aumento del número de proteínas de transporte para la entrada sodio-dependiente de P en el intestino (Combs, 1998).

En resumen, los pollos alimentados con piensos enriquecidos en colecalciferol muestran un incremento de los valores V_{\max} y K_m de la fitasa de la mucosa, mejoran su ganancia de peso, consumo de pienso, eficacia alimenticia, contenido en cenizas de la tibia y digestibilidad del P. Cuando los pollos recibieron piensos enriquecidos en P, se produjo una disminución de los valores V_{\max} y K_m de la fitasa intestinal. Como consecuencia, tanto el contenido en P como en colecalciferol del pienso parecen estar involucrados en la regulación de actividad de la fitasa de la mucosa intestinal.

7.- REFERENCIAS

- ADEOLA, O., LAWRENCE, B.V., SUTTON, A.L. y CLINE, T.R. (1995) *J. Anim. Sci.* 73: 3384-3391.
- ADEOLA, O. y SANDS, J.S. (2003) *J. Anim. Sci.* 81: E78-E85.
- ADEOLA, O., SANDS, J.S., SIMMINS, P.H. y SCHULZE, H. (2004) *J. Anim. Sci.* 82: 2657-2666.
- AJAKAIYE, A., FAN, M.Z., ARCHBOLD, T., HACKER, R.R., FORSBERG, C.W. y PHILLIPS, J.P. (2003) *J. Anim. Sci.* 81: 2766-75.
- AL-MASRI, M.R. (1995) *Br. J. Nutr.* 74: 407-15.
- ANDERSON, P.A. (1985) En: *Digestibility and amino acid availability in cereals and oilseeds* (eds Finley, J.W. and D.T. Hopkins). American Association of Cereal Chemists Inc, St Paul, MN. pp 31-45.
- ANDERSON, R.J. (1914) *J. Biol. Chem.* 17: 171-190.
- AUGSPURGER, N.R. y BAKER, D.H. (2004) *J. Anim. Sci.* 82: 1100-1107.
- BARRIENTOS, L.G. y MURTHY, P.P.N. (1996) *Carbohydrate Res.* 296: 39-54.
- BERNER, Y.N. (1997) En: *Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements* (edited by B. L. O'Dell y R. A. Sunde). New York, NY: Marcel Dekker, Inc.
- BITAR, K. y REINHOLD, J.G. (1972) *Biochim. et Biophys. Acta* 268: 442-52.
- BRONNER, F. (1997) En: *Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements* (edited by B. L. O'Dell y R. A. Sunde). New York, NY: Marcel Dekker, Inc.
- BROZ, J., OLDALE, P., PERRIN-VOLTZ, A.H., RYCHEN, G., SCHULZE, J. y SIMOES NUNES, C. (1994) *Br. Poultry Sci.* 35: 273-280.
- CHERYAN, M. (1980) *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 13: 297-335
- COELHO, M.B. y KORNEGAY, E.T. (1996) *Phytase in Animal Nutrition and Waste Management*. BASF Corp., Mt. Olive, NJ.
- COMBS, C.F.Jr. (1998) *The vitamins – fundamental aspects in nutrition and health* (2nd edn.) Academic press, San Diego.
- COMMON, R.H. (1940) *Analyst* 65: 79-83.
- COSGROVE, D.J. (1966) *Reviews of Pure and Applied Chemistry* 16: 209-224.
- COSGROVE, D.J. y IRVING, G.C.J. (1980) *Inositol phosphates. Their chemistry, biochemistry and physiology*. Elsevier Scientific Publishing, Amsterdam, The Netherlands.

- COSTELLO, A.J.R., GLONEK, J. y MYERS, T.C. (1976) *Carbohydrate Res.* 46: 159-171.
- CROMWELL, G.L., STAHLY, T.S., COFFEY, R.D., MONEGUE, H.J. y RANDOLPH, J.H. (1993) *J. Anim. Sci.* 71: 1831-1840.
- DANISI, G. y MURER, H. (1989) En: *Handbook of Physiology. The Gastrointestinal System. IV.*, edited by S. Schultz.
- DAVIES, M.I, RITCHEY, G.M. y MOTZOK, I. (1970) *Poultry Sci.* 49: 1280-1286.
- DILGER, R.N. (2004) *Utilization of phosphorus in low-phytate soybean meal by swine and poultry*. M.S. Thesis. Purdue University, West Lafayette, IN.
- DILGER, R.N., ONYANGO, E.M., SANDS, J.S. y ADEOLA, O. (2004) *Poultry Sci.* 83: 962-70.
- DENBOW, D.M., RAVINDRAN, V., KORNEGAY, E.T., YI, Z. y HULET, R.M. (1995) *Poultry Sci.* 74: 1831-1842.
- DREZNER, M.K. (2002) En: *Principles of Bone Biology*, vol 1. J. P. Bilezikian, L.G. Raisz and G. A. Rodan, eds. Academic Press, San Diego. pp 321-338
- ERDMAN, J.W.Jr. (1979) *J. Am. Oil Chemists Soc.* 56: 736-741.
- FAN, M.Z., ARCHBOLD, T., SAUER, W.C., LACKEYRAM, D., RIDEOUT, T., GAO, Y., DE LANGE, C.F. y HACKER, R.R. (2001) *Journal of Nutrition* 131: 2388-96.
- FORSBERG, C.W., PHILLIPS, J.P., GOLOVAN, S.P., FAN, M.Z., MEIDINGER, R.G., AJAKAIYE, A., HILBORN, D. y HACKER, R.R. (2003) *J. Anim. Sci.* 81: E68-E77.
- FUCHS, R. y PETERLIK, M. (1980) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 93: 87-92.
- GENTILE, J.M., RONEKER, K. R., CROWE, S.E., POND, W.G. y LEI, X.G. (2003) *J. Anim. Sci.* 81: 2751-2757.
- GRAF, E. (1986) *Chemistry and applications of phytic acid: an overview*. Edited by E. Graf, Phytic Acid: Chemistry and Applications. Pilatus Press, Minneapolis, MN.
- GRASES, F., SIMONET, B.M., PRIETO, R.M. y MARCH, J.G. (2001) *Journal of Nutritional Biochemistry* 12: 595-601.
- GRYNSPAN, F. y CHERYAN, M. (1989) *Journal of the American Oil Chemist's Society* 66: 93-97.
- HARRISON, H.E. y HARRISON, H.C. (1961) *American Journal of Physiology* 201: 1007-1012.
- HAYES, S.H., CROMWELL, G.L., STAHLY, T.S. y JOHNSON, T.H. (1979) *J. Anim. Sci.* 49: 992-999.
- JENAB, M. y THOMPSON, L.U. (2002) En: *Food phytates* (Reddy, N.R. and S.K. Sathe, eds), CRC Press, LLC, Boca Raton, Florida, U.S.A. pp 225-248.
- JENDZA, J.A. (2005) *Exogenous phytase supplementation of swine and poultry diets*. M.S. Thesis. Purdue University, West Lafayette, IN.
- JONGBLOED, A.W., MROZ, Z. y KEMME, P.A. (1992) *J. Anim. Sci.* 70: 1159-1168.

- KEMME, P.A., JONGBLOED, A.W., MROZ, Z., KOGUT, J. y BEYNEN, A.C. (1999) *Livest. Prod. Sci.* 58: 119-127.
- KIES, A., VAN HEMERT, K., SELLE, P. y KEMME, P. (1997) *Feed Compounder* 17: 15-21.
- KORNEGAY, E.T., YI, Z., RAVINDRAN, V. y DENBOW, D.M. (1996) *Poultry Sci.* 75: 240-249.
- LEI, X.G., KU, P.K., MILLER, E.R. y YOKOYAMA, M.T. (1993) *J. Anim. Sci.* 71: 3359-3367.
- LOBAUGH, B. (1995) En: *Calcium and Phosphorus in Health and Disease*, edited by J. J. B. Anderson and S. C. Garner. Boca Ranton, FL: CRC Press, Inc.
- LIU, B., RAFIQ, A., TZENG, Y. y ROB, A. (1998) *Enzyme and Microbial Technology* 22: 415-424.
- MAGA, J. A., 1982. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance and methods of analysis. *J. Agric. Food Chem.* 30:1-9
- MARTIN, C.J. y EVANS, W.J. (1986a) *Biochem.* 26: 169-183.
- MARTIN, C.J. y EVANS, W.J. (1986b) *J. Inorganic Biochem.* 27: 17-30.
- MARTIN, C.J. y EVANS, W.J. (1989) *J. Inorganic Biochem.* 35: 267-288.
- McDOWELL, L.R. (2003) *Minerals in animal and human nutrition*. 2nd ed. Elsevier, Amsterdam.
- NOLAN, K.B., DUFFIN, P.A. y McWEENY, D.J. (1987) *J. Sci. Food Agric.* 40: 79-85.
- NRC (1994) *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.
- NWOKOLO, E.N., BRAGG, D.B. y KITTS, W.D. (1976) *Poultry Sci.* 55: 2217-2221.
- O'DELL, B.L. y DEBOLAND, A. (1976) *J. Agric. Food Chem.* 24: 804-808.
- ODANI, A., TAKAMIDO, R. y YAMAGUCHI, O. (1997) *J. Inorg. Biochem.* 67: 378.
- OKUBO, K., MYERS, D.V. y IACOBUCCI, G.A. (1976) *Cereal Chem.* 53: 513-524.
- ONYANGO, E.M. (2004) *Influence of phytate and phytase on the digestion and uptake of nutrients in the chicken (Gallus domesticus) and the White Pekin duck (Anas platyrinchos domesticus)*. Ph.D. Diss. Purdue University, West Lafayette, IN.
- ONYANGO, E.M., ASEM, E.K. y ADEOLA, O. (2001) *Poultry Sci.* 80 (Supplement 1): 132.
- PALLAUF, J., HOHLER, D. y RIMBACH, G. (1992) *J. Anim. Phys. Anim. Nutr.* 68: 1-9.
- PERNEY, K.M., CANTOR, A.H., STRAW, M.L. y HERKELMAN, K.L. (1993) *Poultry Sci.* 72: 216-2114.
- QIAN, H., KORNEGAY, E.T. y DENBOW, D.M. (1997) *Poultry Sci.* 76: 37-46.
- RABOY, B.V., YOUNG, K.A., DORSCH, J.A. y COOK, A. (2001) *J. Plant Phys.* 158: 489-497.
- RABOY, V. (1997) En: *Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development*. edited by B. A. Larkins and I. K. Vasil. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- RABOY, V. (2002) *J. Nutr.* 132: 503S-505S.

- RAVINDRAN, V., BRYDEN, W.L. y KORNEGAY, E.T. (1995) *Poultry and Avian Biology Reviews* 6: 125-143.
- RAVINDRAN, V., CABAUGH, S., RAVINDRAN, G. y BRYDEN, W.L. (1999) *Poultry Sci.* 78: 699-706.
- REDDY, N.R., SATHE, S.K. y SALUNKHE, D.K. (1982) *Adv. in Food Res.* 28: 1-92.
- RUTHERFURD, S.M., CHUNG, T.K., MOREL, P.C. y MOUGHAN, P.J. (2004) *Poultry Sci.* 83: 61-8.
- RUTHERFURD, S.M., CHUNG, T.K. y Moughan, P.J. (2002) *Br. Poultry Sci.* 43: 598-606.
- SEBASTIAN, S., TOUCHBURN, S.P., CHAVEZ, E.R. y LAGUË, P.C. (1996) *Poultry Sci.* 75: 729-736.
- SELLE, P.H., RAVINDRAN, V., CALDWELL, R.A. y BRYDEN, W.L. (2000) *Nutr. Res. Rev.* 13: 255-278.
- SHARMA, C.B., GOEL, M. y IRSHAD, M. (1978) *Phytochemistry* 17: 201-204.
- SINGH, M. y KRIKORIAN, A.D. (1982) *J. Agric. Food Chem.* 30: 799-800.
- STEENBOCK, H., KRIEGER, C.H., WIEST, W.G. y PILEGGI, V.J. (1953) *J. Biol. Chem.* 205: 993-999.
- TEMPERTON, H. y CASSIDY, J. (1964) *Br. Poultry Sci.* 5: 75-80.
- THOMPSON, L.U. y SERRAINO, M.R. (1986) *J. Agr. Food Chem.* 34: 468-469.
- TORRE, M., RODRÍGUEZ, A.R. y SAURA-CALIXTO, F. (1991) *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1: 1-22.
- TRAYLOR, S.L., CROMWELL, G.L., LINDEMANN, M.D. y KNABE, D.A. (2001) *J. Anim. Sci.* 79: 2634-42.
- UNDERWOOD, E.J. y SUTTLE, N.F. (1999) *The Mineral Nutrition of Livestock*. 3rd ed. CABI Publishing, New York, NY.
- WASSERMAN, R.H. y TAYLOR, A.N. (1973) *J. Nutr.* 103: 586-599.
- WEAVER, C.M. (2001) *Calcium. In: Present Knowledge in Nutrition*, edited by B. A. Bowman and R. M. Russell. Washington, DC: ILSI Press.
- WILCOX, J.R., PREMACHANDRA, G.S., YOUNG, K.A. y RABOY, V. (2000) *Crop Sci.* 40: 1601-1605.
- ZHOU, J.R. y ERDMAN, J.W. (1995) *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35: 495-508.