

DIGESTIBILIDAD DE PROTEÍNA, AMINOÁCIDOS, FÓSFORO, CALCIO Y ENERGÍA EN DIETAS SORGO-PASTA DE SOYA ADICIONADAS CON FITASA EN CERDOS JÓVENES

DIGESTIBILITY OF PROTEIN, AMINO ACIDS, PHOSPHORUS, CALCIUM AND ENERGY IN SORGHUM-SOYBEAN MEAL DIETS ADDED WITH PHYTASE IN PIGS

Edrei Sánchez-Torres¹, Miguel Barrera-Silva², Miguel Cervantes-Ramírez^{1*},
Adriana Morales-Trejo¹, José L. Landero-Viera¹, Benedicto Araiza-Piña¹, Jorge Yáñez-Hernández³

¹Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California. Avenida Bernabeu # 3276, Puerta de Alcalá Res. Mexicali, Baja California, México. (miguel_cervantes@uabc.mx). ²Departamento de Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. ³Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tlaxcala, México.

RESUMEN

Los fitatos en cereales y pasta de soya (PS) interactúan con fósforo (P) y calcio (Ca) impidiendo su utilización. Estas moléculas también pueden interactuar con aminoácidos (AA), proteínas, y almidón, afectando su digestibilidad. En el presente estudio se realizó un experimento para determinar si, además de elevar la digestibilidad ileal aparente (DIA) del P y Ca, la fitasa también mejora la DIA de proteína cruda (PC) y AA, así como, la digestibilidad fecal (DF) de la energía bruta (EB). Diez cerdos castrados (18.6 ± 1.3 kg peso inicial), canulados en íleon terminal, se asignaron a cinco dietas (tratamientos) en un Cuadro Latino repetido 5×5 . Los tratamientos (T) fueron: T1) dieta testigo con sorgo-PS más P inorgánico (+PI); T2) dieta base, sorgo-PS sin P inorgánico (-PI-FTU); T3, T4 y T5, dieta base más 250, 500 y 1000 unidades fitasa (FTU) kg^{-1} de alimento (-PI+FTU). La absorción y DIA de P y Ca aumentaron, y la excreción disminuyó ($p \leq 0.05$) por la adición de fitasa a la dieta base. La excreción de P y Ca fue mayor en la dieta +PI que en la -PI-FTU o las -PI+FTU ($p \leq 0.01$). La DF de la EB aumentó ($p = 0.043$) con fitasa, pero en menos de 1 %. La DIA de PC fue superior en las dietas -PI-FTU que en la +PI ($p = 0.009$), pero no se afectó por la adición de fitasa ($p = 0.192$). Estos resultados sugieren que la adición de fitasa a dietas sorgo-PS mejora la DIA de P y Ca, pero no cambia la de PC y AA en cerdos en crecimiento; niveles superiores a 500 FTU kg^{-1} de fitasa en el alimento aumentan adicionalmente la absorción de P y Ca.

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: Febrero, 2010. Aprobado: Marzo, 2011.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 45: 315-324. 2011.

ABSTRACT

Phytates in grains and soybean meal (SBM) interact with phosphorus (P) and calcium (Ca), preventing their use. These molecules can also interact with amino acids (AA), proteins, and starch, affecting digestibility. In this study an experiment was conducted to determine whether in addition to raising the apparent ileal digestibility (AID) of P and Ca, phytase also improves AID of crude protein (CP) and AA, as well as fecal digestibility (FD) of gross energy (GE). Ten barrows (initial BW 18.6 ± 1.3 kg), fitted with cannulas at the distal ileum, were assigned to five diets (treatments) in a 5×5 replicated Latin square design. Treatments (T) were: T1) control diet with sorghum-SBM plus inorganic P (+IP); T2) basal diet, sorghum-SBM without inorganic P (-IP-FTU); T3, T4 and T5 were the basal diet plus 250, 500 and 1000 phytase units (FTU) kg^{-1} of feed (-IP+FTU). Absorption and AID of P and Ca increased, and excretion decreased ($p \leq 0.05$) by phytase addition to basal diet. P and Ca excretion were higher in diet +IP than in -IP-FTU or the -IP+FTU ($p \leq 0.01$). FD of GE increased ($p = 0.043$) with phytase, but the increase was less than 1 %. AID of CP was higher in diets -IP-FTU than in +IP ($p = 0.009$), but was not affected by addition of phytase ($p = 0.192$). These results suggest that phytase addition to sorghum-SBM diets improves AID of P and Ca, but did not change that of CP and AA of growing pigs; phytase levels higher than 500 FTU kg^{-1} of feed additionally increased the absorption of P and Ca.

Key words: pigs, phytate, phytase, digestion, protein

Palabras clave: cerdos, fitato, fitasa, digestión, proteína.

INTRODUCCIÓN

Los cereales, especialmente maíz y sorgo, y la pasta de soya (PS), contienen fitatos, compuestos presentes naturalmente en ingredientes de origen vegetal (Maga, 1982). El ácido mio-inositol-hexafosfórico es un éster de ácido fosfórico e inositol y es la forma más común de fitatos (Reddy *et al.*, 1982). Además del P, los fitatos interactúan con Ca, Zn, Fe y Mg formando complejos fitato-minerales, los cuales reducen la disponibilidad del P y Ca en cerdos (Cromwell, 1992). Según Reddy *et al.* (1982), los complejos fitato-minerales interactúan con proteínas y almidón formando complejos fitato-mineral-proteína-almidón.

La adición de fitasa microbiana a dietas para cerdos libera el P de los fitatos, aumentando su digestibilidad (Woyengo *et al.*, 2008; Akinmusire y Adeola, 2009). La estrecha relación de fitatos con proteínas, por tanto, sugiere que la adición de fitasa aumentaría la digestibilidad ileal aparente (DIA) de las proteínas en cerdos. Sin embargo, el efecto de esta enzima sobre la DIA de PC y AA ha sido inconsistente. La adición de fitasa a dietas con trigo (Nortey *et al.*, 2007) o maíz (Radcliffe *et al.*, 2006), aumentó la DIA de AA, pero otros autores (Liao *et al.*, 2005; Woyengo *et al.*, 2008; Pomar *et al.*, 2008), no encontraron efecto. Esta inconsistencia puede atribuirse en parte al tipo de ingrediente usado en las dietas experimentales.

En esos estudios las dietas experimentales se formularon principalmente con base en trigo, maíz o cebada, pero en ninguna se usó sorgo. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de una fitasa exógena en dietas donde el sorgo es el principal cereal, y su función sobre la DIA de la PC, AA, P y Ca, y en la absorción y excreción de Ca, P y N, así como en la digestibilidad fecal (DF) de nutrientes energéticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diez cerdos castrados (Yorkshire-Hampshire-Landrace; 18.6 ± 1.3 kg peso inicial), fueron canulados quirúrgicamente, con una cánula simple T en íleon terminal; aproximadamente 15 cm antes de la válvula ileocecal. Los cerdos se recuperaron de la cirugía en 7 d, lo cual se evidenció por la falta de

INTRODUCTION

Cereals, especially corn and sorghum, and soybean meal (SBM) contain phytate, a naturally occurring compound found in plant ingredients (Maga, 1982). The myo-inositol hexaphosphoric acid is an ester of phosphoric acid and inositol and is the most common form of phytate (Reddy *et al.*, 1982). In addition to P, phytate bind to cations Ca, Zn, Fe and Mg forming phytate-mineral complexes which reduce P and Ca availability in pigs (Cromwell, 1992). According to Reddy *et al.* (1982) phytate-mineral complexes interact with proteins and starch forming phytate-mineral-protein-starch complexes.

The addition of microbial phytase to swine diets releases P from phytates, increasing their digestibility (Woyengo *et al.*, 2008; Akinmurise and Adeola, 2009). The close relationship of phytate with proteins, therefore, suggests that the addition of phytase would increase the apparent ileal digestibility (AID) of protein in pigs. However, the effect of this enzyme on AID of CP and AA has been inconsistent. The addition of phytase to wheat (Nortey *et al.*, 2007) or corn (Radcliffe *et al.*, 2006) diets, increased the AID of AA, but others (Liao *et al.*, 2005; Woyengo *et al.*, 2008, Pomar *et al.*, 2008) found no effect. This inconsistency can be attributed in part to the type of ingredient used in experimental diets.

In those studies, the experimental diets were formulated based mainly on wheat, corn or barley but in any sorghum was used. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of phytase on diets where sorghum was the major cereal, and its role on AID of CP, AA, P and Ca, and on absorption and excretion of Ca, P and N, as well as on fecal digestibility (FD) of energetic nutrients.

MATERIALS AND METHODS

Ten barrows (Yorkshire-Hampshire-Landrace; with an initial BW of 18 ± 1.3 kg) were surgically fitted with a simple T-cannula at the distal ileum; approximately 15 cm before the ileo-cecal junction. The pigs recovered from surgery in 7 d, which was evidenced by the lack of inflammation around the incision and standardization in feed consumption. They were housed in individual metabolism cages of 1.2×0.6 m. Before the experiment, the pigs consumed a wheat-SBM with 16.5 % CP diet. The phytase used was from *Apergillus niger*,

inflamación alrededor de la incisión y un consumo estandarizado de alimento. El alojamiento fue en jaulas metabólicas individuales (1.2×0.6 m). Antes del experimento, los cerdos consumían una dieta trigo-PS, con 16.5 % PC. La fitasa usada fue de *Aspergillus niger*, con 5000 FTU g⁻¹; una FTU es la cantidad de enzima que libera 1 μMol P inorgánico min⁻¹ de una solución 5.1 mMol L⁻¹ Fitato-Na, a pH 5.5 y 37 °C (Engelen *et al.*, 1994).

Los tratamientos (T) fueron dietas sorgo-PS adicionadas con vitaminas, minerales, lisina, treonina y metionina cristalinas (Cuadro 1). El T1 fue una dieta testigo más P inorgánico (+PI) que cubrió todas las necesidades de nutrientes de cerdos en crecimiento (NRC, 1998). El T2 fue una dieta similar a la del T1, pero se excluyó el P inorgánico, por tanto era deficiente en P disponible y fue la dieta base (-PI-FTU). Los T3, T4 y T5 fueron la dieta base más 250, 500 y 1000 FTU kg⁻¹ (-PI+FTU). Las dietas se formularon a 19 % PC y contenían 0.4 % de óxido crómico para determinar la DIA de AA. La composición de AA en las dietas se muestra en el Cuadro 2.

El diseño experimental fue un Cuadro Latino 5×5 repetido (Steel *et al.*, 1997). Cada periodo fue de 9 d: 7 para adaptación a la dieta y 2 para recolección de contenido ileal y heces. El alimento se ofreció a las 07:00 y 19:00 h, mezclado con agua en una relación 1:1. El consumo de alimento se limitó a 3.0 veces el requerimiento de ED para mantenimiento (NRC, 1998), con base en el peso vivo promedio al inicio de cada periodo. Los cerdos consumieron su ración en 15 min o menos.

with 5000 FTU g⁻¹; an FTU is defined as the amount of enzyme that releases 1 μMol inorganic P min⁻¹ of a solution 5.1 mMol L⁻¹ Phytate-Na, at pH 5.5 and 37 °C (Engelen *et al.*, 1994).

The treatments (T) were sorghum-SBM diets supplemented with vitamins, minerals, crystalline lysine, threonine and methionine (Table 1). T1 was a control diet added with inorganic P (+IP); and this completely covered nutrient requirements of growing pigs (NRC, 1998). T2 was a diet similar to that of T1, except that the inorganic P was removed, and this diet therefore was deficient in available P and was named basal diet (-IP-FTU). T3, T4 and T5 were the basal diet plus 250, 500, and 1000 FTU kg⁻¹ (-IP+FTU). Diets were formulated to 19 % CP and contained 0.4 % chromic oxide to determine AID of AA. The AA composition of diets is shown in Table 2.

The experimental study was a 5×5 replicated Latin square design (Steel *et al.*, 1997). Each experimental period was of 9 d: 7 d for diet adaptation and 2 d for collection of ileal digesta and faeces. Pigs were fed at 07:00 and 19:00 h; feed was mixed with water at a 1:1 ratio. Feed consumption was limited to 3.0 times the ED maintenance requirement (NRC, 1998), based on the average live weight at the beginning of each period. Pigs consumed their ration in 15 min or less. Ileal digesta were collected for 12 continuous hours on each day of collection in plastic bags tied to the cannula. Collection began at 07:00 h on days 8 and 9. Bags were removed from the cannula when filled with ileal digesta, but did not remain tied to the cannula over

Cuadro 1. Dietas experimentales (%).

Table 1. Experimental diets (%).

Ingrediente	Testigo	Base	Base+Fitasa (FTU kg ⁻¹)		
			250	500	1000
Sorgo	72.33	74.00	74.00	74.00	74.00
Pasta de soya	22.60	22.16	22.16	22.16	22.16
Aceite de soya	2.21	1.75	1.75	1.75	1.75
Ortofosfato	1.07	0.00	0.00	0.00	0.00
Piedra caliza	0.30	0.58	0.58	0.58	0.58
Sal iodada	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
L-Lisina-HCL	0.33	0.34	0.34	0.34	0.34
DL-Metionina	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
L-Treonina	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Vitaminas y minerales [†]	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
Fitasa	0.00	0.00	0.05	0.10	0.20
Óxido crómico	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40

[†] Cada kg de dieta proporcionó: Vit. A, 4800 UI; D₃, 800 UI; E, 4.8 UI; K₃, 1.6 mg; B₂, 4 mg; ácido pantoténico, 9.2 mg; niacina, 16 mg; B₁₂, 14.8 μg; Zn, 80 mg; Fe, 80 mg; Cu, 4 mg; Mn, 4 mg; I, 0.14 mg; Se, 0.30 mg. [‡] Each kg of diet provided: Vit. A, 4800 UI; D₃, 800 UI; E, 4.8 UI; K₃, 1.6 mg; B₂, 4 mg; pantothenic acid 9.2 mg; niacin, 16 mg; B₁₂, 14.8 μg; Zn, 80 mg; Fe, 80 mg; Cu, 4 mg; Mn, 4 mg; I, 0.14 mg; Se, 0.30 mg.

El contenido ileal se recolectó durante 12 h continuas en cada día de recolección, en bolsas de plástico atadas a la cánula. La recolección se inició a las 07:00 h en los días 8 y 9. Las bolsas se retiraron de la cánula cuando se llenaron de contenido intestinal, pero no permanecieron atadas a la cánula más de 15 min. Las muestras de heces se recolectaron 3 veces en el d 8 de cada periodo. Las muestras se almacenaron a -20°C inmediatamente después de su recolección.

Las muestras ileales y fecales se descongelaron, homogenizaron, sub-muestraron y liofilizaron, previo al análisis en laboratorio. Éstas y las muestras de alimento se molieron a través de una malla de 1 mm y se analizaron para materia seca, P, Ca y N (AOAC, 2006). El alimento y las heces se analizaron para energía bruta en una bomba calorimétrica adiabática (IKA-Werke GMBH & Co. KG, Staufen, Germany). La composición de AA en alimento y contenido ileal se analizó en los Laboratorios de Química de la Estación Experimental de la Universidad de Missouri (método 982.30; AOAC, 2006). El óxido crómico se analizó utilizando la técnica de Hill y Anderson (1958).

Los datos se analizaron de acuerdo con el diseño indicado, usando el procedimiento GLM de SAS (1996). Las medias de tratamientos se compararon usando cuatro contrastes que evaluaron los efectos siguientes: C1, adición de P inorgánico, +PI *vs.* -PI-FTU; C2, P inorgánico contra fitasa, +PI *vs.* -PI+FTU (T3, T4 y T5); C3, adición de fitasa, -PI-FTU *vs.* -PI+FTU (T3, T4 y T5); y C4, efecto lineal de fitasa (T2, T3, T4 y T5). Los niveles de significancia y tendencia fueron $p \leq 0.05$ y $p \leq 0.10$, para cada contraste.

RESULTADOS

En el Cuadro 3 se presentan los datos de absorción (ABS) y excreción (EXC) de P, Ca y N; así como la DIA de P y Ca. Con respecto al P, la ABS ($p=0.001$) y DIA ($p=0.024$) fueron mayores en la dieta +PI que en la -PI-FTU. La ABS promedio en las dietas -PI+FTU (T3 al T5) fue menor ($p=0.001$), pero la DIA no fue diferente a la +PI ($p=0.220$). La fitasa aumentó linealmente la ABS ($p=0.003$) y la DIA ($p=0.002$) en respuesta al aumento en sus niveles. En contraste, la EXC en -PI-FTU ($p=0.010$) o el promedio en las -PI+FTU ($p=0.001$) fue menor que en la +PI; la fitasa redujo en forma lineal la EXC ($p=0.004$).

En el caso del Ca, la ABS en la dieta +PI fue mayor que en -PI-FTU y en el promedio de las dietas -PI+FTU ($p=0.001$); en estas últimas la ABS fue mayor que en la -PI-FTU ($p=0.043$). La EXC fue mayor en +PI que en -PI-FTU

Cuadro 2. Composición analizada de aminoácidos (%) y calculada de energía digestible (ED), calcio, y fósforo total y disponible en las dietas testigo y base utilizadas en el experimento.

Table 2. Analyzed composition of amino acids (%) and calculated composition of digestible energy (DE), calcium, and total and available phosphorus in the control and basal diets used in the experiment.

Nutriente	Dietas	
	Testigo (+PI)	Base (-PI-FTU)
Aminoácidos esenciales, %		
Arg	1.11	1.09
Fen	0.92	0.88
His	0.45	0.43
Ile	0.79	0.75
Leu	1.73	1.64
Lis	1.20	1.16
Met	0.30	0.30
Tre	1.76	1.70
Val	0.90	0.85
Proteína cruda, %	19.0	19.0
ED, Kcal kg^{-1}	3.41	3.41
Calcio, %	0.60	0.45
Fósforo total, %	0.57	0.38
Fósforo disponible, %	0.30	0.15

15 min. Fecal samples were collected 3 times on d 8 of each period. Samples were stored at -20°C immediately after their collection.

Ileal and fecal samples were thawed, homogenized, sub-sampled and lyophilized prior to laboratory analysis. These and feed samples were ground through a 1 mm mesh screen and were analyzed for dry matter, P, Ca and N (AOAC, 2006). Feed and feces were analyzed for gross energy with an adiabatic bomb calorimeter (IKA-Werke GMBH & Co. KG, Staufen, Germany). Composition of AA in diets and ileal digesta were analyzed at the University of Missouri Agricultural Experiment Station Chemical Laboratories (method 982.30; AOAC, 2006). Chromic oxide was analyzed using the technique of Hill and Anderson (1958).

Data were analyzed according to the indicated design, using the GLM procedure of SAS (1996). Means of treatments were compared using four contrasts that evaluated the following effects: C1, addition of inorganic P, +IP *vs.* -IP-FTU; C2, inorganic P against phytase, +IP *vs.* -IP+FTU (T3, T4 and T5); C3, phytase addition, -IP-FTU *vs.* -IP+FTU (T3, T4, and T5); and C4, linear effect of phytase (T2, T3, T4, and T5). Levels of significance and tendency were $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.10$, for each contrast.

Cuadro 3. Efecto de fitasa (F, FTU kg⁻¹) y P inorgánico (P, %) en dietas sorgo-pasta de soya en la excreción (EXC), absorción (ABS, g d⁻¹), y digestibilidad ileal aparente (DIA, %) de P, Ca y N.
Table 3. Effect of phytase (F, FTU kg⁻¹) and inorganic P (P, %) in sorghum-soybean meal diets in the excretion (EXC), absorption (ABS, g d⁻¹), and apparent ileal digestibility (AID, %) of P, Ca and N.

Dieta [†]	+PI	-PI-FTU	-PI+FTU			Contrastes, p= [‡]			
			0	250	500	1000	C ₁	C ₂	C ₃
PI	0.22	0	0	0	0				
FTU	0	0	250	500	1000	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
P									
ABS	2.59 [§]	1.29	1.77	1.83	1.88	0.001	0.001	0.001	0.003
EXC	2.36	1.88	1.40	1.35	1.29	0.010	0.001	0.024	0.004
DIA	52.3	40.8	55.8	57.6	59.3	0.024	0.220	0.001	0.002
Ca									
ABS	2.68	1.82	2.17	2.00	2.16	0.001	0.001	0.043	0.158
EXC	2.27	1.77	1.41	1.59	1.42	0.008	0.001	0.041	0.110
DIA	54.1	50.7	60.6	55.7	60.3	0.466	0.178	0.034	0.200
N									
ABS	17.2	18.2	18.1	17.9	17.6	0.090	0.158	0.467	0.271
EXC	9.16	7.96	8.07	8.21	8.56	0.043	0.066	0.474	0.269

[†] Dietas: +PI, testigo con P inorgánico; -PI-FTU, base sin P inorgánico ni fitasa; +PI+FTU, base con fitasa. [‡] Contrastes: C₁, +PI vs. -PI-FTU; C₂, +PI vs. -PI+FTU; C₃, -PI-FTU vs. -PI+FTU; C₄, efecto lineal de fitasa. [§] EE: ABS P, 0.11; EXC P, 0.11; DIA P, 3.28; ABS Ca, 0.11; EXC Ca, 0.11; DIA Ca, 3.00; ABS N, 0.38; EXC N, 0.37. [¶] Diets: +IP, control with inorganic P; -IP-FTU, basal without inorganic P nor phytase; +IP+FTU; basal with phytase. [‡] Contrasts: C₁, +IP vs. -IP-FTU; C₂, +IP vs. -IP+FTU; C₃, -IP-FTU vs. -IP+FTU; C₄, linear effect of phytase. [§] EE: ABS P, 0.11; EXC P, 0.11; DIA P, 3.28; ABS Ca, 0.11; EXC Ca, 0.11; DIA Ca, 3.00; ABS N, 0.38; EXC N, 0.37.

(p=0.008) y en las -PI+FTU (p=0.001); en estas últimas este valor fue menor (p=0.041) que en la -PI-FTU. La DIA en la dieta +PI no fue diferente a la de -PI-FTU (p=0.466) o al promedio de las -PI+FTU (p=0.178); pero en éstas fue mayor que en la -PI-FTU (p=0.034). No se observó tendencia lineal para ABS (p=0.158), EXC (p=0.109) o DIA (p=0.200) de Ca en respuesta al aumento en fitasa.

La ABS de N tendió a ser mayor (p=0.090) y la EXC fue menor (p=0.043) en las dietas sin P inorgánico que en la +PI. Asimismo, la EXC tendió a ser menor (p=0.066) en las dietas con fitasa, comparadas con la +PI. No hubo efecto de fitasa en la ABS y EXC de N, en comparación con la dieta base.

En el Cuadro 4 se presentan los resultados de la DIA de PC y AA, y la DF de EB. La DF de EB en la dieta +PI fue mayor que en la -PI-FTU (p=0.001) o el promedio de las -PI+FTU (p=0.022). Este valor fue mayor que en la dieta -PI-FTU (p=0.043), pero no se observó tendencia lineal (p=0.285). La DIA de PC fue superior en la dieta -PI-FTU (p=0.009) y en las -PI+FTU (p=0.034) que en la +PI, pero no hubo efecto de fitasa en la dieta

RESULTS

Table 3 shows the absorption data (ABS) and excretion (EXC) of P, Ca and N, as well as the AID of P and Ca. With respect to P, ABS (p=0.001) and AID (p=0.024) were higher in +IP diet than in -IP-FTU. The ABS average in -PI+FTU diet (T3 to T5) was lower (p=0.001), but AID was not different from +IP diet (p=0.220). Phytase increased linearly ABS (p=0.003) and AID (p=0.002) in response to the increase in its levels. In contrast, EXC in -PI-FTU diet (p=0.010) or the average in -IP+FTU diet (p=0.001) was lower than in +PI diet; phytase reduced linearly EXC (p=0.004).

In the case of Ca, ABS in +IP diet was higher than in -IP-FTU and in the average of -IP+FTU diets (p=0.001); in these latter diets, ABS was higher than in -IP-FTU diet (p=0.043). EXC was higher in +IP diet than in -IP-FTU (p=0.008) and in -IP+FTU diets (p=0.001); in these latter diets, this value was lower (p=0.041) than in -IP-FTU diet. AID in diet +IP was not different from diet -IP-FTU (p=0.466) or to the average of diets -IP+FTU (p=0.178); but in these diets it was

Cuadro 4. Efecto de fitasa (F, FTU kg⁻¹) y P inorgánico (P, %) en dietas sorgo-pasta de soya en la digestibilidad fecal (DF) de energía bruta (EB) e ileal aparente (DIA) de proteína cruda (PC) y aminoácidos, %.**Table 4. Effect of phytase (F, FTU kg⁻¹) and inorganic P (P, %) in sorghum-soybean meal diets in the fecal digestibility (FD) of gross energy (GE) and apparent ileal digestibility (AID) of crude protein (CP) and amino acids, %.**

Dieta [†]	-PI+FTU					Contrastes, p= [‡]			
	+PI	-PI-FTU	0	500	1000	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
PI	0.22	0	0	0	0				
F	0	0	250	500	1000	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
EB	87.9 [§]	86.3	86.8	87.6	87.1	0.001	0.022	0.043	0.285
PC	65.1	70.6	70.6	68.9	68.2	0.009	0.034	0.192	0.198
Arg	86.1	86.1	88.4	87.3	86.8	0.904	0.131	0.168	0.821
Fen	77.8	79.0	80.5	79.0	78.7	0.422	0.195	0.729	0.613
His	78.8	79.9	80.6	79.1	77.9	0.470	0.745	0.571	0.152
Ile	75.5	77.0	78.3	76.9	76.3	0.374	0.236	0.910	0.498
Leu	77.4	78.8	79.7	78.1	77.5	0.379	0.429	0.768	0.279
Lis	83.9	85.0	86.4	85.6	85.4	0.548	0.199	0.559	0.945
Met	77.0	79.4	79.7	79.3	78.1	0.171	0.153	0.801	0.431
Tre	70.6	72.7	74.5	73.0	70.9	0.338	0.215	0.933	0.313
Val	70.0	70.8	73.0	71.6	70.0	0.694	0.369	0.667	0.553

[†] Dietas: +PI, testigo con P inorgánico; -PI-FTU, base sin P inorgánico ni fitasa; +PI+FTU, base con fitasa. [‡] Contrastes: C₁, +PI vs. -PI-FTU; C₂, +PI vs. -PI+FTU; C₃, -PI-FTU vs. -PI+FTU; C₄, efecto lineal de fitasa. [§] EE: EB, 0.16; PC, 1.26; Arg, 0.77; Fen, 1.02; His, 1.09; Ile, 1.14; Leu, 1.09; Lis, 1.18; Met, 1.16; Tre, 1.43; Val, 1.38. [¶] Diets: +IP, control with inorganic P; -IP-FTU, basal without inorganic P nor phytase; +IP+FTU; basal with phytase. [‡] Contrasts: C₁, +IP vs. -IP-FTU; C₂, +IP vs. -IP+FTU; C₃, -IP-FTU vs. -IP+FTU; C₄, linear effect of phytase. [§] EE: GE, 0.16; PC, 1.26; Arg, 0.77; Phen, 1.02; His, 1.09; Ile, 1.14; Leu, 1.09; Lys, 1.18; Met, 1.16; Thre, 1.43; Val, 1.38.

base (p=0.192). La DIA de los AA no fue diferente (p>0.10) entre las dietas +PI y -PI-FTU; tampoco hubo diferencia entre las dietas -PI+FTU y +PI (p>0.10). En promedio, la fitasa tampoco afectó la DIA de AA no esenciales.

DISCUSIÓN

Fitasa se incluye en dietas sorgo- o maíz-PS para cerdos con dos propósitos: liberar el P de los fitatos y reducir o eliminar el uso de fuentes inorgánicas de P. Con esto se busca también disminuir la EXC de P en las excretas y el riesgo de contaminar suelos y agua con P. Lo anterior se debe a que la mayor parte del P en los cereales y en la PS está ligada al ácido mio-inositol-hexafosfórico o fitato, donde no está disponible debido a que los cerdos no producen fitasa (Lei y Stahl, 2001). De acuerdo con Cromwell (1992), sólo 10 a 15 % del P en maíz y sorgo, y de 25 a 30 % en la PS está disponible para cerdos.

La eliminación de P inorgánico de dietas formuladas con sorgo-PS para cerdos, reduce la EXC de P y Ca en las heces. En la Figura 1 se presentan los porcentajes en que se redujo la EXC debido a la eliminación de P inorgánico y la adición de fitasa a la

higher than in -IP-FTU (0.034). No linear trend was observed for ABS (p=0.158), EXC (p=0.109) or AID (p=0.200) of Ca in response to increase of phytase.

ABS of N tended to be higher (p=0.090) and EXC was lower (p=0.043) in diets free of inorganic P than in +IP diet. Also, EXC tended to be lower (p=0.066) in diets with phytase, compared with the +IP. There was no effect of phytase in ABS and EXC of N, compared to the basal diet.

Table 4 shows the results of AID of CP and AA, as well as FD of GE. FD of GE in the +IP diet was higher than in -IP-FTU diet (p=0.001) or the average of -IP+FTU diets (p=0.022). This value was higher than in -IP-FTU diet (p=0.043), but there was no linear trend (p=0.285). AID of CP was higher in -IP-FTU diet (p=0.009) and in -IP+FTU diets (p=0.034) than in +IP diet, but there was no effect of phytase in the basal diet (p=0.192). AID of AA was not different (p>0.10) between +IP and -IP-FTU diets; nor was there difference between -IP and FTU and +IP diets (p>0.10). On average, phytase did not affect AID of non-essential amino acids in growing pigs.

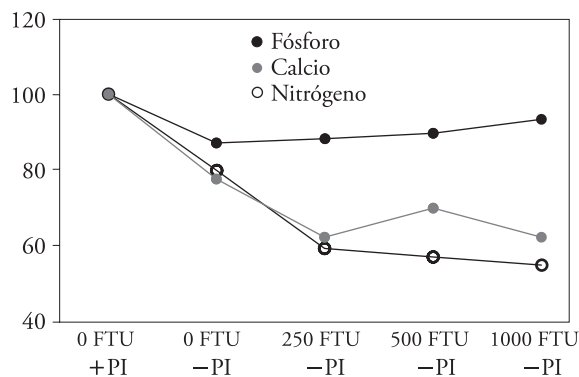


Figura 1. Reducción en la excreción de P, Ca y N en cerdos, en respuesta a la eliminación de P inorgánico y la adición de fitasa (FTU) a dietas sorgo-pasta de soya. +PI, dieta con P inorgánico; -PI, dietas sin P inorgánico; 0 FTU, 250 FTU, 500 FTU, 1000 FTU, dietas -PI, adicionadas con fitasa.

Figure 1. Reduction in the excretion of P, Ca and N in pigs, in response to the exclusion of inorganic P and addition of phytase (FTU) to sorghum-soybean meal diets. +IP, diet with inorganic P; -IP, diets without inorganic P; 0 FTU, 250 FTU, 500 FTU, 1000 FTU, diets -IP, supplemented with phytase.

dieta; a la dieta testigo se le dio un valor arbitrario de 100. La EXC de P y Ca se reduce en 20 y 22 % por la eliminación de fosfato dicálcico de la dieta. Esta eliminación combinada con la adición de fitasa redujo en 43 y 35 %, en promedio, la EXC de P y Ca. El análisis de estos datos muestra que la fitasa en la dieta -PI puede ayudar a cubrir el requerimiento de P disponible para cerdos en crecimiento. Estos resultados coinciden con los obtenidos cuando se usan dietas elaboradas con trigo, maíz o cebada (Liao *et al.*, 2005; 2007).

En la Figura 2 se presentan los porcentajes en que se incrementó la ABS de P (37 a 45 %) y Ca (10 a 20 %) debido a la adición de fitasa a la dieta base. La dieta base contenía 0.16 % de P disponible y la adición de 500 FTU lo elevó a 0.23 %, el cual es semejante al requerimiento de cerdos con pesos de 20 a 50 kg (NRC, 1998). El análisis de estos datos indica que la fitasa puede sustituir al P inorgánico en dietas sorgo- o maíz-PS, sin afectar el suministro de P disponible requerido, coincidiendo con lo publicado por Liao *et al.* (2005, 2007). El comportamiento lineal en la ABS y EXC de P en respuesta a la adición de fitasa (Cuadro 3), indica que niveles superiores a las 500 FTU kg⁻¹ recomendadas, adicionalmente incrementan la ABS y reducen la EXC de P. Sin

DISCUSSION

Phytase is included in sorghum- or corn-SBM diets for pigs with two purposes; to release P from phytate and reduce or remove the use of inorganic P sources. This also seeks to decrease EXC of P in excreta and the risk of contaminating soil and water with P. This is because most of P in cereals and in SBM is related to the myo-inositol-hexaphosphoric acid or phytate, which is not available due to the fact that pigs do not produce phytase (Lei and Stahl, 2001). According to Cromwell (1992), only 10 to 15 % of P in maize and sorghum, and 25 to 30 % in SBM is available to pigs.

Removal of inorganic P from diets formulated with sorghum-soybean meal for pigs reduces EXC of P and Ca in feces. Figure 1 shows percentages in which EXC was reduced due to the removal of inorganic P and phytase supplementation to the diet; an arbitrary value of 100 was given to the control diet. EXC of P and Ca were reduced in 20 and 22 % by the removal of the dicalcium phosphate from the diet. This removal combined with the phytase addition reduced 43 and 35 %, on average, the EXC of P and Ca. The analysis of these data shows that phytase in the -IP diet can help to meet the available P requirements for growing pigs. These results are consistent with those obtained when diets formulated with wheat, corn or barley, are used (Liao *et al.*, 2005, 2007).

Figure 2 presents the percentage in which ABS of P (37 to 45 %) and Ca (10 to 20 %) was increased due to phytase addition to the basal diet. The basal diet contained 0.16 % of available P and the addition of 500 FTU raised it to 0.23 % which is similar to the requirement of pigs within the 20 to 50 kg weight range (NRC, 1998). Analysis of these data indicates that phytase can replace inorganic phosphorus in sorghum-or corn-SBM diets, without affecting the supply of available P required, coinciding with reports from Liao *et al.* (2005, 2007). The linear behavior in ABS and EXC of P in response to phytase supplementation (Table 3) indicates that levels in excess of 500 FTU kg⁻¹ recommended, additionally increase ABS and decrease EXC of P. However, it is important to emphasize that with 500 FTU kg⁻¹ of feed, the P availability increases to levels similar to those required for pigs weighing more than 20 kg.

embargo, es importante enfatizar que con 500 FTU kg^{-1} de alimento aumenta la disponibilidad de P a niveles semejantes a los requeridos por cerdos con peso mayor a 20 kg.

La falta de efecto de fitasa en la EXC y la ABS de N (Figura 1 y 2) coincide con lo observado en la DIA de PC y AA y con lo publicado por otros autores. Traylor *et al.* (2001) y Woyengo *et al.* (2008) no encontraron efecto de fitasa en pasta de soya; Pomar *et al.* (2008) en dietas elaboradas con trigo, maíz y pasta de soya; Yáñez *et al.* (2011) en residuos secos de destilería. Liao *et al.* (2005) tampoco observaron efecto de fitasa en la DIA de AA en dietas trigo-PS-pasta de canola, y sugieren que el efecto de la fitasa en la DIA de AA depende de la composición de la dieta. La interacción de fitatos con proteínas y AA de la dieta y con enzimas pancreáticas e intestinales podría explicar la falta de respuesta en esta variable (Reddy *et al.*, 1982). En este sentido, estudios *in vitro* sugieren que los fitatos pueden formar complejos con proteína y AA libres en el tubo digestivo de cerdos. Honig y Wolf (1991) encontraron complejos fitato-proteína en concentrados proteínicos de soya a pH 8. Esta interacción puede provocar cambios en la estructura de la proteína, afectar la actividad enzimática y la digestibilidad de la proteína (Greiner y Konietzny, 2006). Reddy *et al.* (1982) señalan que los fitatos podrían inhibir la actividad enzimática mediante la interacción directa o a través de cationes necesarios para su activación. Con base en estos hallazgos, se esperaría que la fitasa liberara a las proteínas y AA de los fitatos e incrementara su DIA. Sin embargo, los resultados de éste y otros estudios *in vivo* (Liao *et al.*, 2005, 2007; Woyengo *et al.*, 2008; Yáñez *et al.*, 2011), no coinciden con los realizados *in vitro*.

La explicación de esta discrepancia es compleja y debe incluir el análisis de aspectos bioquímicos y físico-químicos asociados a la digestión de las proteínas. Una explicación parcial es que los complejos proteína-AA-fitatos se estabilizan por interacciones electrostáticas débiles (Láztity y Láztity, 1995), las cuales pueden romperse con los cambios normales de pH en el intestino delgado de cerdos, sin necesidad de adicionar ninguna enzima específica a la dieta. Okubo *et al.* (1976) encontraron que la capacidad máxima de unión de fitatos con glicinina de PS era a pH 2.5, pero no hubo ninguna unión al punto isoelectrónico de la proteína (pH 4.9). Desphande y

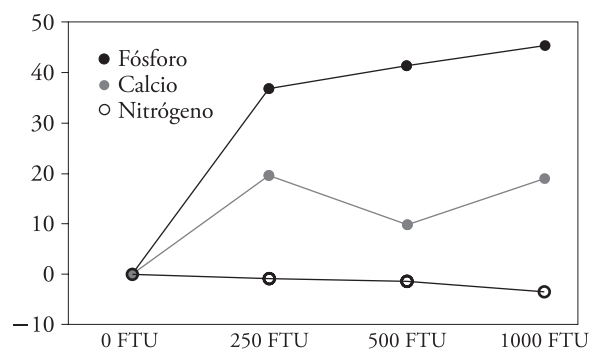


Figura 2. Cambios (%) en la absorción de P, Ca y N en cerdos en respuesta a la adición de fitasa (FTU) a dietas sorgo-pasta de soya sin P inorgánico, con respecto a la dieta sin fitasa.

Figure 2. Changes (%) in the absorption of P, Ca, and N in pigs in response to addition of phytase (FTU) to sorghum-soybean meal without inorganic P, respect to the diet without phytase.

The absence of phytase effect in the N EXC and ABS (Figure 1 and 2) coincides with that observed in the AID of CP and AA and with that published by other authors. Traylor *et al.* (2001) and Woyengo *et al.* (2008) did not find an effect of phytase in soybean meal; Pomar *et al.* (2008) in diets formulated with wheat, corn and soybean meal; Yáñez *et al.* (2011) in distillers dried grains with solubles. Liao *et al.* (2005) did neither observe effect of phytase in the AID of AA in wheat-SBM-canola meal diets, and suggest that the effect of phytase on the AID of AA depends on the composition of the diet. The interaction of phytates with proteins and AA of the diet and with pancreatic and intestinal enzymes may explain the absence of response in this variable (Reddy *et al.*, 1982). In this regard, *in vitro* studies suggest that phytate can form complexes with protein and free AA in the digestive tract of pigs. Honig and Wolf (1991) found phytate-protein complexes in soybean protein concentrates at pH 8. This interaction may cause changes in protein structure, affect enzymatic activity and protein digestibility (Greiner and Konietzny, 2006). Reddy *et al.* (1982) show that phytate could inhibit enzyme activity by interacting directly or through cations required for their activation. Based on these findings, it would be expected that phytase would release proteins and AA from phytates and would increase their AID. However, the results of this and other *in vivo* studies (Liao *et al.*, 2005, 2007;

Damodaran (1989) observaron interacciones de fitatos con tripsina y quimotripsina a pH 3.0, pero ninguna a pH 7.8. A este pH, proteínas y fitatos poseen cargas negativas que impiden su interacción. Aunque esos autores reportan una reducción en la actividad de tripsina a pH ácido, éste no ocurre en el intestino delgado de cerdos (pH 6.2 a 7.4; Jongbloed *et al.*, 1992). Rawlings y Barret (1994) indican que en el sitio activo de estas enzimas radican residuos de serina, histidina y aspartato; ninguno de estos interactúa con fitatos a pH neutro o alcalino en la ausencia de Ca^{2+} . Además, la cantidad de fitatos que permanecen libres y podrían inhibir las enzimas digestivas es muy baja y de escaso impacto debido a la fuerte afinidad de los fitatos por los cationes al pH intestinal (Desphande y Damodaran, 1989). Por tanto, el efecto de adicionar fitasa a dietas sorgo-pasta de soya en la DIA de PC y AA parece ser insignificante.

La adición de fitasa incrementó menos de 1 % la DF de la EB. Este aumento coincide con lo publicado por Liao *et al.* (2005) en dietas trigo-PS-pasta de canola (0.63 %); sin embargo, no se observó ningún efecto en estudios realizados por Liao *et al.* (2005) en dietas maíz-PS, trigo-PS o cebada-pasta de canola; Woyengo *et al.* (2008) en dietas base trigo; Yáñez *et al.* (2011) en residuos secos de destilería. La reducida magnitud del efecto de fitasa en la DF de EB se puede explicar de manera similar a lo explicado con respecto a la DIA de AA.

CONCLUSIONES

La adición de fitasa a dietas sorgo-pasta de soya aumenta la absorción y la digestibilidad, y reduce la excreción de P y Ca, pero no afecta la digestibilidad ileal aparente de proteína y aminoácidos en cerdos en crecimiento. Niveles superiores a 500 FTU kg^{-1} aumentan la absorción de P y Ca. Aunque la fitasa incrementó la digestibilidad de nutrientes energéticos, la magnitud del incremento tiene un impacto mínimo en la alimentación de los cerdos.

LITERATURA CITADA

- Akinmusire, A. S., and O. Adeola. 2009. True digestibility of phosphorus in canola and soybean meals for growing pigs: Influence of microbial phytase. *J. Anim. Sci.* 87: 977-983.
- AOAC. 2006. Official Methods of Analysis of AOAC. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, MD, USA. 2000 p.

Woyengo *et al.*, 2008; Yáñez *et al.*, 2011), did not coincide with those performed *in vitro*.

The explanation for this discrepancy is complex and must include the analysis of biochemical and physical-chemical aspects related to digestion of proteins. A partial explanation is that the protein-AA-phytate complexes are stabilized by weak electrostatic interactions (Láztity and Láztity, 1995), which may break with the normal changes of pH in the small intestine of pigs, without adding any specific enzyme to the diet. Okubo *et al.* (1976) found that the maximum binding ability of phytates with SBM glycinin was at pH 2.5, but there was no binding at the isoelectric point of the protein (pH 4.9). Desphande and Damodaran (1989) observed interactions of phytates with trypsin and chymotrypsin at pH 3.0, but none at pH 7.8. At this pH, proteins and phytate have negative charges that prevent their interaction. Although these authors report a reduction in the activity of trypsin at acid pH, this does not occur in the small intestine of pigs (pH 6.2 at 7.4; Jongbloed *et al.*, 1992). Rawlings and Barrett (1994) indicate that the active site of these enzymes involves serine, histidine and aspartate residues, none of which interact with phytate at neutral or alkaline pH in the absence of Ca^{2+} . In addition, the amount of phytates which remain free and could inhibit the digestive enzymes is very low and of limited impact due to the strong affinity of phytate by cations at the intestinal pH (Desphande and Damodaran, 1989). Therefore, the effect of adding phytase to sorghum-soybean meal diets in the AID of CP and AA appears to be negligible.

Phytase addition increased less than 1 % the FD of GE. This increase is consistent with reports by Liao *et al.* (2005) in wheat-SBM-canola meal diets (0.63 %); however, no effect was observed in studies carried out by Liao *et al.* (2005) in corn-SBM, wheat-SBM or barley-canola meal diets; Woyengo *et al.* (2008) in wheat-based diets; Yáñez *et al.* (2011) in distillers dried grains with solubles. The reduced magnitude of the effect of phytase in the FD of GE can be explained in a similar way as explained respect to the AID of AA.

CONCLUSIONS

Phytase addition to sorghum-soybean meal diets increases absorption and digestibility and reduces excretion of P and Ca, but did not affect the apparent

- Cromwell, G. L. 1992. The biological availability of phosphorous in feedstuffs for pigs. *Pig News and Information* 13: 75N-78N.
- Desphande, S. S., and S. Damodaran. 1989. Effect of phytate on solubility, activity and conformation of trypsin and chymotrypsin. *J. Food Sci.* 54: 695-699.
- Engelen, A. J., F. C. van der Heeft, P. H. G. Ransdorp, and E. L. C. Smit. 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.* 77: 760-764.
- Greiner, R., and U. Konietzny. 2006. Phytase for food application. *Food Technol. Biotech.* 44: 125-140.
- Hill, F. N., and D. L. Anderson. 1958. Comparison of metabolizable energy and productive energy determination with growing pigs. *J. Nutr.* 64: 587-603.
- Honig, D. H., and W. J. Wolf. 1991. Phytate-mineral-protein composition of soybeans: gel filtration studies of soybean meal extracts. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1037-1042.
- Jongbloed, A. W., Z. Mroz, and P. A. Kemme. 1992. The effect of supplementary *Aspergillus niger* phytase in diets for pigs on concentration and apparent digestibility of dry matter, total phosphorus, and phytic acid in different sections of the alimentary tract. *J. Anim. Sci.* 70: 1159-1168.
- Lázity, R., and L. Lázity. 1995. Phytic acid in cereal technology. *In: Pomeranz, Y. (ed). Advances in Cereal Science and Technology.* American Association of Cereal Chemists. pp: 309-372.
- Lei, X. G., and C. H. Stahl. 2001. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 474-481.
- Liao, S. F., A. K. Kies, W. C. Sauer, Y. C. Zhang, M. Cervantes, and J. M. He. 2005. Effect of phytase supplementation to a low- and a high- phytate diet for growing pigs on the digestibilities of crude protein, amino acids and energy. *J. Anim. Sci.* 83: 2130-2136.
- Liao, S. F., W. C. Sauer, J. K. Htoo, M. Cervantes, A. K. Kies, B. A. Araiza, and A. Morales. 2007. Effect of phytase supplementation to a high- and a low-phytate diet for growing pigs on the utilization of phosphorus and calcium. *Interciencia* 32: 195-201.
- Maga, J. A. 1982. Phytate: Its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. *J. Agric. Food Chem.* 30: 1-9.
- Nortey, N., J. F. Patience, P. H. Simmins, N. L. Trottier, and R. T. Zijlstra. 2007. Effects of individual or combined xylanase and phytase supplementation on energy, amino acid, and phosphorus digestibility and growth performance of grower pigs fed wheat-based diets containing wheat millrun. *J. Anim. Sci.* 85: 1432-1443.
- ileal digestibility of protein and amino acids in growing pigs. Levels above 500 FTU kg⁻¹ increase P and Ca absorption. Although phytase increased energetic nutrient digestibility, the magnitude of the increase has minimal impact in feeding pigs.

—End of the English version—



- NRC. 1998. *Nutrient Requirements of Swine*. 10th ed. National Academy Press. Washington, DC, USA. 183 p.
- Okubo, K., D. V. Meyers, and G. A. Iacobucci. 1976. Binding of phytic acid to glycinin. *Cereal Chem.* 53: 513-524.
- Pomar, C., F. Gagné, J. J. Matte, G. Barnett, and C. Jondreville. 2008. The effect of microbial phytase on true and apparent ileal amino acid digestibilities in growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 86:1598-1608.
- Radcliffe, J.S., R. S. Pleasant, and E. T. Kornegay. 2006. Estimating equivalency values of microbial phytase for amino acids in growing and finishing pigs fitted with steered ileo-cecal valve cannulas. *J. Anim. Sci.* 84: 1119-1129.
- Rawlings, N. D., and A. J. Barrett. 1994. Families of serine peptidases. *Meth. Enzymol.* 244: 19-61.
- Reddy, N. R., S. K. Sathé, and D. K. Salunkhe. 1982. Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.* 28: 1-92.
- SAS (Statistical Analysis System). 1996. *SAS/STAT User's Guide* (Release 6.12.). SAS Institute Inc., Cary, N. C. 1028 p.
- Steel, D. R. G., J. H. Torrie, and D. A. Dickey. 1997. *Principles and Procedures of Statistics: a Biomedical Approach* (3rd ed.). McGraw-Hill Book Co., New York. 622 p.
- Traylor, S. L., G. L. Cromwell, M. D. Lindeman, and D. A. Knabe. 2001. Effects of level of supplemental phytase on ileal digestibility of amino acids, calcium, and phosphorus in dehulled soybean meal for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 79: 2634-2642.
- Woyengo, T. A, J. S. Sands, W. Guenter, and C. M. Nyachoti. 2008. Nutrient digestibility and performance responses of growing pigs fed phytase- and xylanase-supplemented wheat-based diets. *J Anim Sci* 86: 848-857.
- Yáñez, J. L., E. Beltranena, M. Cervantes, and R. T. Zijlstra. 2011. Effect of phytase and xylanase supplementation or particle size on nutrient digestibility of diets containing distillers dried grains with solubles (DDGS) co-fermented from wheat and corn in ileal-cannulated grower pigs. *J. Anim. Sci.* 89: 113-123.