



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

Casa abierta al tiempo

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**EFFECTO DE FITASA *Aspergillus niger* EN LA
DIGESTIBILIDAD DE NUTRIENTES Y ACTIVIDAD DE
TRIPSINA Y QUIMOTRIPSINA EN CERDOS DESTETADOS**

T E S I S

(Idónea Comunicación de Resultados)

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

PRESENTA

MVZ Martha Salas Ramírez

COMITÉ TUTORAL

Director:

Ph D. Germán David Mendoza Martínez

Asesora:

M. en C. Adelfa Del Carmen García Contreras

Asesor:

Ph D. Miguel Cervantes Ramírez

MÉXICO D. F, FEBRERO, 2008.

RESUMEN

Se realizaron dos experimentos para evaluar el efecto de la adición de fitasa fungal (*Aspergillus niger*) en la actividad de tripsina y quimotripsina y digestibilidad de nutrientes en cerdos cruzados (Yorkshire x Landrace, 11.5 kg peso vivo). En ambos experimentos se empleó una dieta base formulada con sorgo y pasta de soya; los tratamientos (T) fueron los siguientes: T1, dieta base, y T2, base adicionada con 500 unidades de actividad fitásica (FTU) por kg de alimento. En el Exp. 1, se utilizaron seis cerdos canulados en conducto pancreático, los cuales fueron adaptados a las dietas durante 5 d, previo a la colecta de muestras. La colección de jugo pancreático se hizo a intervalos de 15 min, de 08:00 a 20:00 h, durante 5 d. El alimento se ofreció dos veces al día (08:00 y 20:00 h). En el Exp. 2, se utilizaron 20 cerdos alimentados con dietas similares del Exp. 1 para estimar la digestibilidad total aparente de MS, MO, FDN, P, Ca, Mg, Zn y Fe. La fitasa no tuvo efectos en el peso y la longitud del páncreas, ni tampoco en la actividad de la tripsina y de la quimotripsina. La adición de fitasa incrementó la digestibilidad de la proteína ($p < 0.10$) de 78.81 a 81.60% y la de la FDN ($p < 0.11$) de 81.87 a 85.54%. No se observaron diferencias en la digestibilidad del Ca, P y Fe. La digestibilidad de Mg y Zn tampoco se afectó por la adición de fitasa. En conclusión, estos resultados indican que la adición de fitasa fungal a dietas para cerdos no afecta la actividad de tripsina y quimotripsina ni la digestibilidad en tubo digestivo total de minerales en cerdos.

Palabras Clave: Lechones, Enzimas, Digestión, Páncreas.

ÍNDICE

RESUMEN	i
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Desarrollo Embrionario	4
2.2. Desarrollo Postnatal	5
2.3. Desarrollo Posdestete	7
2.4. Regulación de la Secreción Pancreática	13
2.5 Técnicas de Evaluación de Digestibilidad y Función Pancreática Exócrina en el Cerdo	19
2.6. Aditivos en dietas para lechones	26
2.6.1. Antibióticos	26
2.6.2. Acidificantes	27
2.6.3. Enzimas	29
2.6.3.1. Fitasa	30
2.6.3.2. Ácido Fítico ó Fitato	33
2.6.3.3. Complejos Fitato – Proteína	36
2.6.3.4. Complejo Fitato – Minerales	36
2.6.3.5. Digestibilidad de Proteína – Aminoácidos y Fitato	37
2.6.3.6. Interacción del Fitato con Enzimas Endógenas	40
3. OBJETIVOS	42

4. MATERIAL Y MÉTODOS	
4.1. Tratamientos, Dietas y Animales	43
4.2. Análisis de Muestras de Heces y Alimento	44
4.3. Análisis de Enzimas en Jugo Pancreático	45
4.4. Análisis Estadístico.....	46
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
6. CONCLUSIONES	51
7. LITERATURA CITADA.....	52

1. INTRODUCCIÓN

La adición de enzimas a dietas para cerdos aumenta la digestibilidad de los ingredientes e incrementa la productividad, debido a que se pueden utilizar ingredientes de menor valor biológico y costo, obteniendo el mismo comportamiento productivo (Bedford, 1995; Beauchemin et al., 1999).

Distintas enzimas como glucanasa, amilasa, celulasa, y hemicelulasa, algunas proteasas y fitasa, se adicionan a la dieta para degradar factores anti-nutricionales que pueden interferir con el proceso digestivo, incrementar la disponibilidad de nutrientes deficientemente degradados por enzimas endógenas, suplir la actividad digestiva en animales jóvenes y hacer más eficiente la absorción de nutrientes y disminuir la contaminación ambiental por heces (Boyce et al., 2004).

La fitasa (mio-inositol hexafosfato hidrolasa) esta presente en mínima cantidad en la pared intestinal y microflora bacteriana del cerdo (Pointillart et al., 1984). En granos de cereales y oleaginosas se encuentra en variables cantidades. Algunos hongos y levaduras son los mayores sintetizadores (Nelson, 1967; Ravindran et al., 1995).

La fitasa tiene la capacidad de degradar al fitato hasta convertirlo en inositol y P inorgánico (Turk et al., 2000). El fitato se considera como agente antinutricional, debido a que forma complejos (quelatos) con gran variedad de minerales esenciales como Ca, Zn, Mg y Fe, puede reaccionar con proteínas y almidón reduciendo su disponibilidad (Maga, 1982; Reddy et al., 1982; Laztity y Laztity, 1995). Por esta razón, la biodisponibilidad de minerales, proteínas y almidón, se mejora si el fitato es

hidrolizado por fitasa, la excreción de P, Ca, Zn y N se puede reducir si las dietas se formulan con fitasa (Cromwell, 1996; Jongbloed et al., 1996).

Hay evidencia que el ácido fítico tiene un efecto negativo en la actividad de las proteasas. Se ha demostrado que el fitato se liga con la tripsina in Vitro, reduciendo la digestión de proteínas. La actividad de la tripsina disminuye hasta 46% en presencia de fitato, forma complejos terciarios con la tripsina vía Ca, inhibiendo de esta forma su actividad (Singh y Krikorian, 1982). Hasta ahora, la teoría de que el fitato inhibe la tripsina y otras enzimas digestivas importantes, pero no hay un estudio que muestre resultados concisos en animales vivos (Selle et al., 2000).

Con base en lo anterior se realizó un nuevo método de canulación pancreática con el fin de coleccionar muestras de jugo y tejido pancreático (Romero et al, 2006) en las que se estudió el efecto de la adición de fitasa fungal en la dieta sobre la secreción de tripsina y quimotripsina, en cerdos en crecimiento y en la digestibilidad de nutrientes.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

El páncreas conformado por dos componentes celulares histológicamente distintos y funcionalmente independientes, los islotes endocrinos y células acinares exocrinas. Las células de los islotes endocrinos producen hormonas que regulan el metabolismo del cuerpo vía la circulación de la sangre, mientras las células acinares exocrinas secretan enzimas digestivas (Xu et al., 1999).

En el cerdo el páncreas consiste en un lóbulo duodenal (derecho) y un lóbulo esplénico (izquierdo). El lóbulo duodenal se localiza en la primera vuelta del duodeno y el lóbulo esplénico se extiende hacia la izquierda del bazo. Los dos lóbulos son unidos por un cuerpo extenso localizado en la curvatura menor del estómago (Balén et al., 2000; Niebergall et al., 1997). En cerdos, el conducto biliar entra en el duodeno solo a 1 ó 2 cm del píloro. El conducto pancreático accesorio (conducto de Santorini) sale del lóbulo duodenal de 10 a 13 cm posterior a la apertura del conducto biliar. En algunos individuos puede haber un conducto pancreático adicional (conducto de Wirsung) (Niebergall et al., 1997; Balén et al., 2000).

El componente del páncreas exócrino consiste en glándulas tubuloacinares, organizadas de forma que asemejan un racimo de uvas, con las células acinares secretoras que corresponde a las uvas y el sistema de conductos que corresponden a los tallos. La glándula es cubierta por tejido conjuntivo fibroelástico que pasa por la glándula y la divide en dos lóbulos. El conducto pancreático (accesorio) se extiende casi toda la longitud del páncreas y emite ramas a todo el lóbulo. Estas ramas sufren

bifurcación en conductos interpuestos estrechos largos que a su vez tienen ramas antes de entrar en las glándulas secretoras terminal. (Niebergall et al., 1997).

El ácino pancreático es una estructura redondeada compuesta de células epiteliales piramidales. Las células del ácino producen enzimas digestivas y son notables por sus grandes cantidades de retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi extenso (Xu et al., 1999).

2.1 Desarrollo Embrionario

El páncreas se desarrolla del epitelio endodermal, aparece inicialmente como dos tejidos epiteliales aproximadamente cuatro semanas posteriores a la concepción, consisten en cadenas densas de células epiteliales. A causa del crecimiento diferencial de la pared del duodeno, el crecimiento ventral recibe una orientación dorsal poco después de su formación y se fusiona con el desarrollo dorsal, formando un solo páncreas primordial. La germinación dorsal crece hacia la izquierda para formar el lóbulo esplénico, las germinaciones ventrales forman la parte principal del lóbulo duodenal y la parte que une los dos lóbulos forma el cuerpo (Debas 1997; Xu et al., 1999).

Varios vestigios de las dos germinaciones pancreáticas fetales todavía son visibles en la madurez. Durante el desarrollo fetal, la parte distal del conducto que drena al lóbulo esplénico se fusiona con los que drenan al lóbulo duodenal y forman un conducto pancreático común, en algunos individuos tal fusión no puede ocurrir y puede producir un conducto pancreático principal y un conducto accesorio. Otro

vestigio de desarrollo fetal es el suministro vascular separado del lóbulo duodenal y el lóbulo esplénico (Xu et al., 1999).

El desarrollo prenatal del páncreas endocrino es afectado por la nutrición maternal durante el embarazo. El daño al páncreas endocrino durante la vida fetal es aparentemente permanente porque una dieta normal al nacimiento y en la madurez restaura el peso corporal y el peso del páncreas pero no recupera los niveles de insulina normal en un desafío de glucosa oral (Botermans et al., 1999c).

2.2. Desarrollo Postnatal

Inmediatamente después del nacimiento, el páncreas del neonato sufre un crecimiento notorio en varias especies de mamíferos, incluso en los cerdos. En los lechones naturalmente amamantados, el peso absoluto del páncreas aumenta a un 50-80% durante el primer día postnatal y 100-130% el tercer día postnatal. La proporción de crecimiento del páncreas durante este periodo postnatal es mayor que todo el cuerpo (Botermans, et al., 1999c).

El crecimiento pancreático postnatal en cerdos es bifásico. La primera fase coincide con el periodo postnatal inmediato, y el segundo con el periodo del postdestete. Corresponde a los dos desafíos fisiológicos más importantes que enfrenta el sistema digestivo en cerdos durante su vida postnatal, cambiando de la nutrición de la placenta a la nutrición oral en el momento de nacimiento y cambiando de una dieta de leche líquida a alimento sólido en el momento del destete. El

crecimiento pancreático acelerado durante estos periodos de tiempo puede representar un proceso de adaptación a estos desafíos. Durante la primera fase, el crecimiento pancreático es debido a una hiperplasia, mientras en la segunda fase hay hiperplasia e hipertrofia (Makkink y Verstegen, 1990). El mecanismo que regula el crecimiento pancreático postnatal no se entiende totalmente.

El crecimiento pancreático postnatal temprano se relaciona con el amamantamiento, el crecimiento no ocurre si a los lechones recién nacidos se les impide amamantar y sólo se les da agua o solución de lactosa al 5% (Botermans et al., 1999c).

Antes del cierre intestinal a 18-36 horas después del nacimiento, las cantidades grandes de macromoléculas son transportadas a la sangre. Este proceso es vital para una construcción adecuada del sistema de defensa inmune, y para los procesos de maduración intestinales, esto es con la colaboración del calostro de la cerda, probablemente debido a su incremento de proteínas e inhibidores de proteasas. Durante el periodo de destete, el sistema digestivo es principalmente adaptado a la digestión de leche. La secreción de amilasa lingual y pancreática es baja mientras la lactasa de la mucosa del intestino delgado esta involucrada en la digestión y absorción de lactosa. Las proteínas son digeridas por pepsina y quimosina en el estómago; en el intestino la quimotripsina pancreática está envuelta, mientras la tripsina pancreática juega un papel menor pero importante. Falta de tripsina en el jugo pancreático en cerdos lactantes tiene correlación a una falta

completa de ganancia de peso (Pierzynowski et al., 1995). Sesenta por ciento de la grasa de toda la leche es digerida por la lipasa lingual y gástrica, la lipasa pancreática no es tan importante, en animales en crecimiento que consumen alimento sólido no pueden digerir la grasa con la lipasa lingual y gástrica (Botermans et al., 1999c).

Hay numerosos factores que afectan el desarrollo del páncreas exócrino, como los nutrimentos del lumen intestinal, péptidos intestinales reguladores y glucocorticoides, el retraso de crecimiento prenatal parece tener un impacto en el desarrollo pancreático fetal y la maduración funcional al nacimiento.

En cerdos lactantes la secreción pancreática exocrina es baja; sin embargo, juega un papel indispensable en la digestión y absorción de componentes de la leche. Pierzynowski et al. (1995), mencionan que la leche regula la cantidad y tipo de enzimas pancreáticas requeridas para su digestión.

2.3. Desarrollo Posdestete

La rentabilidad de la producción porcina está determinada principalmente por el éxito o fracaso de la transición de la leche de la madre a dietas secas sin que ocurra una reducción del crecimiento o enfermedades. El potencial de crecimiento de los lechones es alto inmediatamente después del destete, pero el limitado consumo de alimento junto con un sistema digestivo inmaduro impide a menudo que se alcance este potencial en condiciones prácticas.

En la vida del cerdo, el destete (3-5 semanas de edad en producción) provoca modificaciones importantes en su alimentación por el cambio de la leche, como la principal fuente de nutrimentos, a una dieta sólida (Rantzer et al., 1996; Ries de Sousa et al., 2000; Marion et al., 2002), lo que caracteriza al periodo posdestete, desde un punto de vista nutricional, como un periodo crítico, ya que el cambio abrupto de dieta es normalmente acompañado de un menor consumo de alimento, de una mayor susceptibilidad a las enfermedades digestivas y a un menor crecimiento (Ries de Sousa et al., 2000), sobretodo cuando los ingredientes utilizados en las dietas de iniciación no son los apropiados debido a sus características fisicoquímicas. La habilidad del lechón recién destetado para sobreponerse a esta fase crítica y asimilar los nutrimentos provenientes de una dieta sólida, está comprometida con la capacidad para secretar una cantidad suficiente de enzimas digestivas y con la cantidad de alimento ofrecido.

Como resultado los cerdos tienen que cambiar su comportamiento de ingesta, de consumir comida líquida muchas veces poca cantidad (aproximadamente de 25-50 ml por amamantada) a comer cantidades más grandes de alimento seco, administrado una o dos veces al día o consumo ad libitum. El comportamiento cambia de dar masajes y succionar a tragar y masticar. Antes del destete, el consumo de nutrimentos es regulado predominantemente por la cerda. Después de destete, el cerdo tiene que regular su propio consumo de alimento. De tres a seis días después del destete, los cerdos se pasan de 40-60 minutos diariamente comiendo y bebiendo (Rantzer et al., 1997).

Antes del destete, los nutrimentos del alimento sólidos en el tracto gastrointestinal pueden estimular la secreción pancreática exocrina, sin embargo la presencia de factores inhibitorios de la leche no permiten la secreción (Pierzynowski et al., 1995). La leche de la cerda tiene que ser completamente reemplazada por alimento sólido antes de que la secreción pancreática muestre un aumento (Pierzynowski et al., 1993).

El destete por si mismo causa cambios físicos en el aparato gastrointestinal, es común una disminución en el consumo de alimentación inmediatamente después del destete y puede contribuir a la inflamación de intestino. A menudo se observan aumento en la profundidad de las criptas y disminución de las vellosidades de intestino delgado, esto conduce a una reducida capacidad digestiva y de absorción, aumentando el riesgo de diarreas (McCracken et al., 1999).

La mayoría de los estudios del desarrollo de las enzimas pancreáticas en cerdos se realizan dentro del tejido pancreático (Rantzer et al., 1995), la actividad de tripsina en tejido pancreático permanece sin cambios antes del destete. Sin embargo, este aumento también ocurre a las 6 semanas de edad en cerdos no destetados. Esto no concuerda con los datos reportados en cerdos cateterizados. Aumentos significativos en la producción basal y posprandial no ocurrieron hasta después del destete, independientemente del destete a las 4 ó 6 semanas de edad (Pierzynowski et al., 1993). La edad del destete no parece influenciar con la secreción pancreática. Pierzynowski et al. (1995) reportan que en lechones destetados a las 4 y 6 semanas

de edad no hubo diferencia en la secreción pancreática, sin embargo había un aumento constante en la secreción pancreática posterior al destete. Los cambios cualitativos y cuantitativos de la secreción pancreática alrededor del destete en cerdos no son dependientes de la edad hay otros factores (estrés, cambios en el alimento) que pueden ser importantes (Pierzynowski et al., 1993, 1995). Podría ser especulado que los cambios en la secreción pancreática en el destete se correlacionen con la edad y maduración neuro-humoral, sin embargo el reflejo enteropancreático es más probable, por que el aumento de la secreción pancreática no estaba relacionado con la edad. (Pierzynowsk et al., 1993, 1995). Rantzer et al (1995) mencionan que la energía consumida no determina el nivel de secreción pancreática, la alimentación (composición, sabor, fuente de proteína, contenido de materia seca y viscosidad) parece ser el factor más importantes (Makkink y Verstegen, 1990; Jacob et al., 2001; Pedersen et al., 2003). Botermans et al. (2000) mencionan que la alimentación por si sola regula la secreción pancreática y no depende de la cantidad de dieta consumida.

Rantzer et al. (1996) reportan que la lactancia de la mañana y la de tarde estimulan de forma diferente la secreción pancreática; en la tarde se estimula la producción de proteínas totales y de tripsina y la de la mañana no.

Durante los primeros 2 ó 3 días posdestete la secreción exocrina parece ser insuficiente para la digestión y absorción de nutrimentos de los cerdos, la adaptación a estos cambios requiere un ajuste morfológico y enzimático severo del aparato

gastrointestinal (McCracken et al., 1999; Marion et al., 2002). Esto puede facilitar la multiplicación rápida de *E. coli* (Rantzer et al., 1996), que es frecuentemente asociada con la ocurrencia de diarrea durante el periodo posdestete. La presencia de sustancias antibacterianas de la secreción pancreática juega un papel importante, reduciendo el consumo de alimento durante el día 3 a 8 posdestete lo que disminuye el crecimiento bacteriano y produce menos diarrea (Botermans et al., 1999a).

Laubitz et al. (2003) caracterizaron un polipéptido anti-bacteriano del jugo pancreático de cerdos destetados, corroborando los resultados de Pierzynowski et al. (1992).

En el posdestete los niveles de secreción pancreática exocrina total, proteína total, amilasa, y tripsina aumentan ligeramente, mientras que los niveles posprandiales aumenten considerablemente (Pierzynowski et al., 1990; 1993; 1995; Rantzer et al., 1997). Durante los primeros días después posdestete la secreción todavía puede ser insuficiente para la cantidad y difícil alimentación. Esto no sólo puede afectar la producción, también la ocurrencia de desórdenes del tracto gastrointestinales (Pedersen et al., 2003). Se ha demostrado que durante el periodo de crecimiento, las técnicas de alimentación alteran la secreción pancreática exocrina (Botermans et al., 2000). Hay una relación positiva entre la secreción exocrina y la ganancia de peso diaria en cerdos en crecimiento cateterizados (Botermans y Pierzynowski, 1999). La secreción exocrina puede limitar el rendimiento en cerdos en crecimiento, considerando que en cerdos en finalización la

tendencia de la deposición de grasa puede estar limitando por la función de la secreción pancreática.

Una característica del destete es el acortamiento de las vellosidades intestinales (McCracken et al., 1999) y una reducción en la capacidad de absorción, esto provocado por la incapacidad del intestino delgado de digerir y absorber alimentos, esto predispone a la mala absorción y diarreas. Aunque hay muchos factores a los cuales se les pueden atribuir estos cambios morfológicos, la alimentación es una de los más importantes; el retiro de la leche materna, factores de crecimiento, glutamina, hipersensibilidad a diferentes componentes de la dieta, bajo consumo de alimento, y niveles de energía en la dieta son mencionados (Marion et al., 2002).

Las consecuencias hormonales del estrés en el destete tienen un papel importante en la maduración del páncreas. Los corticosteroides podrían ser uno de los mediadores del desarrollo pancreático en destete temprano. La inyección de dexametasona o hidrocortisona de 2 a 6 días antes del destete incrementan la actividad de las enzimas digestivas, en particular la actividad de la amilasa pancreática, en cerdos destetados. Este aumento en la secreción pancreática exocrina reduce la mortalidad en el posdestete como resultado de niveles de cortisol más incrementados (Botermans et al., 1999 a, b, c).

La cantidad de alimento consumido respecto a la etapa de producción del cerdo tiene influencia en su rendimiento. Posterior a la etapa del crecimiento (20-60 Kg de peso vivo), se requiere un incremento del consumo de alimento para una ganancia de peso diario mayor y una eficaz conversión alimenticia. Sin embargo, al final del periodo de engorda (60-110 kg de peso vivo), el consumo de alimento incrementado no sólo puede llevar a una ganancia de peso diario alta, también a la deposición de mas grasa, produciendo una canal baja en porcentaje de carne magra y pobre conversión alimenticia, sobre todo en individuos castrados. Así, un consumo de alimento diario alto durante el periodo crecimiento tiene un efecto positivo en el rendimiento, mientras que durante el periodo de engorda puede tener efectos adversos. Por consiguiente, una consumo del alimento restringido se recomienda a menudo durante el periodo de engorda y depende de la raza y sexo de los animales (Botermans et al., 1999c).

2.4. Regulación de la Secreción Pancreática

La regulación y desarrollo del páncreas durante la vida del cerdo, y el efecto de diferentes nutrimentos en la secreción pancreática exocrina se ha estudiado. Sin embargo, no hay suficientes datos disponibles en animales jóvenes y la relación de la secreción pancreática exocrina con el rendimiento del cerdo (Makkink y Verstegen, 1990).

Aparentemente, la secreción pancreática se ajusta a la composición del alimento, la cantidad y calidad de grasa, proteína e hidratos de carbono presentan en la dieta (Makkink y Verstegen, 1990). La fibra tiene un efecto estimulante de

secreción exocrina (Fen et al., 2004), mientras la secreción es baja en presencia de leche (Botermans et al., 1999c). La secreción exocrina también se ajusta a las necesidades biológicas del animal y cambia durante el desarrollo del cerdo. Mientras el páncreas exócrino no parece ser el principal responsable para la digestión de la leche durante el periodo de lactancia, juega un papel crucial en la digestión y absorción de nutrimentos en cerdos después del destete (5-10 kg de peso vivo postdestete hasta 20 kg de peso vivo) y durante el periodo de crecimiento (Botermans et al., 1999 a, c).

La respuesta de la secreción pancreática a los alimentos es regulada por interacciones complejas mediadas por nervios y hormonas. La inervación parasimpática (vagal) del páncreas desempeña un papel importante en la secreción pancreática (Niebergall y Singer, 2001). Zabielski y Gill, (2003) mencionan que la colesistocinina (CCK) además de tener un efecto directo sobre los receptores de las células acinares pancreáticas, también estimula la secreción pancreática indirectamente desde la mucosa del duodeno por medio de estímulos vágales.

La CCK es una hormona peptídica secretada en el duodeno, estimula la secreción pancreática de enzimas. La secreción de CCK es estimulada por la presencia de ácidos grasos y proteína en el duodeno. Dos tipos de células producen CCK: endocrinas y nerviosas. El primer tipo de células está situado en la parte proximal del intestino delgado, las células nerviosas que producen CCK están situadas principalmente en el cerebro y sistema nervioso periférico de la zona

digestiva y al rededor de los islotes de Langerhans. Se encuentran dos subtipos de CCK; Cck-a y Cck-b, algunos autores mencionan un subtipo Gastrin (Moran et al., 1993; Niebergall y Singer, 2001).

Durante las dos primeras semanas de vida la administración intravenosa de colesistocinina (CCK) y secretina no estimularon la secreción pancreática exocrina, un efecto significativo se alcanza a partir de 3 a 4 semanas de vida. Estos resultados demuestran que hay un aumento en la funcionalidad pancreática exocrina y un cambio cualitativo enzimático durante el desarrollo postnatal, correlacionado probablemente con el estímulo de la dieta (Pierzynowski et al. 1990), en contraste la edad del cerdo al destete parece no tener mucha importancia. Pierzynowski et al. (1993) reportan que no encontraron cambios significativos en la secreción pancreática exocrina a las 4 ó 6 semanas de edad.

Hee et al. (1988) y Thaela et al. (1995), reportan que la secreción pancreática exocrina presenta un ritmo circadiano que fue relacionado con la frecuencia de la alimentación. Thaela et al. (1995) mencionan que la secreción pancreática tiene un patrón bifásico. La secreción durante la primera fase (pico posprandial) contiene grandes cantidades de proteínas y enzimas, con una duración de 1 a 1.5 horas, esta secreción aparece inmediatamente después de la ingestión de alimentos probablemente por estímulos de CCK y secretina vía neuronal. En la segunda fase (entre los alimentos) hay poca cantidad de proteína y enzimas, pero es mas larga de 2 a 4 horas.

La secreción pancreática exocrina (es decir la secreción de proteínas, enzimas y líquido) fluctúa diariamente. También se ha demostrado que el patrón circadiano de la secreción pancreática y la mayoría de sus componentes tienen una periodicidad que no es debida solamente al comportamiento de alimentación. (Thaela et al., 1995).

De acuerdo con Owsley et al. (1986) la actividad de tripsina, permanece sin cambios durante las primeras semanas de vida del lechón; pero está incrementa hasta 5 veces a los 42 días de edad. Resultados similares fueron publicados por Lindeman et al. (1986) en lechones alimentados con dietas elaboradas con base en maíz y pasta de soya y suero de leche. Estos autores indican que el incremento en la actividad de tripsina estuvo asociado a un consumo de alimento sólido por los lechones, coincidiendo con lo observado por Makkink et al. (1994). Así, estos autores concluyen que, tanto la edad como el consumo de alimento sólido son factores que afectan la capacidad digestiva de los lechones.

Jacob et al. (2000) en un estudio con cerdos preparados quirúrgicamente con un catéter directo en el conducto pancreático y administración intraduodenal de péptidos y CCK, concluyeron que la respuesta pancreática a la presencia de grasas depende de la longitud de su cadena, coincidiendo con lo reportado por Cera et al. (1989) y Jacob et al. (2001). Diversos autores han utilizado diferentes estímulos en la dieta de cerdos para evaluar la respuesta del páncreas, por ejemplo, Gabert et al. (1996c) añadieron a la dieta de cerdos aceite de coco, nabo y grasa de pescado;

Encontraron una secreción más alta de quimotripsina en cerdos alimentados con aceite de coco y una secreción más alta de hidrolasa de carboxilesterasa con aceite de pescado.

Rantzer et al. (1997), utilizando cerdos de cuatro semanas de edad con una cánula en el conducto pancreático y alimentados con aceite de coco, aceite de pescado y manteca de cerdo, concluyo que los cerdos alimentados con 10% de aceite de pescado secretan un volumen más alto de jugo pancreático y tienen una secreción mayor de enzimas pancreáticas a diferencia de los cerdos alimentados con manteca de cerdo o aceite de coco, no se encontró ningún incremento significativo de lipasa.

Se ha estudiado la secreción pancreática con diferentes estímulos, utilizando una cánula de reentrada para la colección del jugo pancreático, por ejemplos; Gabert et al. (1996 a, b) utilizando dietas a base de habas y chícharos, en cerdos en crecimiento demostraron que estos ingredientes no afectaba secreción pancreática, así como la cantidad de nitrógeno, proteínas, amilasa, lipasa, quimotripsina y aminoácidos. Aunque se han descubierto enzimas del páncreas de cerdos jóvenes, difieren cualitativamente y cuantitativamente, de animales en crecimiento, Puede haber varias explicaciones para esto. Debido al comportamiento de ingesta de los lechones, se exponen a un paso constante de ingesta en el duodeno, produciendo estímulos constantes del páncreas exócrino, la inmadurez de los receptores hormonales del tracto gastrointestinal y los reflejos entero-pancreáticos que también

juegan un papel importante. Además, las observaciones en cerdos cateterizados crónicamente han mostrado que la administración intra-duodenal de enterostatina inhibe la secreción de jugo pancreática. Así la digestión de lípidos, descrita para neonatos, y los niveles relativamente incrementados de colipasa que contiene el enterocina, podrían asociarse con regulación directa de secreción pancreática exocrina (Botermans et al., 1999c).

La competencia y agresión provocan una baja actividad de amilasa preprandial, pero no afectan el volumen de secreción pancreática exocrina ni la actividad de la tripsina. Estímulos estresantes más duraderos como la administración de hormona Adenocorticotrófica por varios días (la imitación de factores estresante duraderos), estimula la secreción pancreática exocrina, este estímulo puede ser por el cortisol o por un aumento de los receptores para el cortisol en el páncreas. Esto puede ser de importancia para la supervivencia animal en condiciones naturales y puede tener impacto en el cerdo en producción. (Botermans et al., 1999b).

La presencia de lactosa en la dieta para lechones recién destetados promueve el desarrollo del páncreas y del intestino delgado en los primeros días posdestete. Esto fue concluido por Ries de Sousa et al. (2002) en un estudio con lechones recién destetados, alimentados con dos fuentes diferentes de lactosa.

2.5 Técnicas de Evaluación de Digestibilidad y Función Pancreática Exócrina en el Cerdo.

Se han desarrollado y utilizado diversas técnicas para obtener muestras de contenido intestinal. Una de las más utilizadas es el sacrificio posterior a la alimentación experimental por cierto tiempo, esta técnica permite obtener muestras de todo el intestino (Fen et al., 2004). Sin embargo, aparte del aspecto de bienestar animal, el muestreo se puede hacer solamente una vez por animal, y puede no ser suficiente la cantidad de muestra presente en el aparato gastrointestinal a la hora del sacrificio, se requiere un número mayor de animales y estos no pueden usarse como sus testigos (Cervantes et al., 2000a). También, esta técnica puede dar solamente información momentánea sobre acontecimientos que ocurren a la hora del sacrificio.

Diversos autores han utilizado esta técnica en estudios de digestibilidad con diferentes sustratos y en diferentes etapas productivas, por ejemplo; Fen et al. (2004) utilizaron cerdos de 13.5 Kg de peso vivo, alimentados con una dieta basada en cebada y suplementada con polisacáridos sin almidón por 40 días, sacrificados al final del tratamiento, concluyendo que con este suplemento se disminuye la actividad de proteasas, quimotripsina, amilasa y lipasa.

Otro método para obtener muestras gastrointestinales es insertando una cánula a la región del intestino que se requiera. Esta técnica permite el continuo muestreo. Sin embargo, la inserción quirúrgica por sí misma puede influenciar el metabolismo del animal y cambiar las condiciones del aparato gastrointestinal.

Las cánulas más comunes son: cánula en T simple y post-válvula cecal (CPVC). La cánula tipo T simple se inserta frecuentemente en la parte distal del intestino delgado y la CPVC se inserta en el ciego, cercana a la válvula ileocecal. Al insertar la cánula tipo T ninguna parte del intestino se resecciona, se reportan algunos inconvenientes como la homogeneidad de la muestra, especialmente con dietas altas en fibra (Yin et al., 2000). Al aplicar la cánula CPVC una parte del ciego se resecciona (Van Leeuwen et al., 1991), se ha demostrado que esto puede alterar las condiciones gastrointestinales, pero no está demostrado que influya en la digestibilidad, esta cánula tiene un diámetro más grande y se puede utilizar en cualquier tipo de dieta.

Diversos estudios han utilizado estas técnicas para evaluar la digestibilidad con diferentes estímulos, por ejemplo, Jorgensen et al. (2000) colocando una cánula-T simple en el íleon terminal evaluaron la digestibilidad de las grasas con diferentes dietas (aceite de coco, aceite de pescado y aceite de rábano) concluyendo que la digestibilidad de las grasas y ácidos grasos eran relativamente más altas utilizando estas dietas. Cervantes et al. (2000a) utilizando una cánula similar en cerdos en crecimiento concluyeron; La canulación en duodeno e íleon de cerdos es un procedimiento simple que ofrece la oportunidad para determinar simultáneamente la digestibilidad ileal de aminoácidos y la actividad de las proteasas pancreáticas. Este procedimiento también permite analizar los cambios que ocurren en la función digestiva del cerdo a diferentes tiempos después de la alimentación.

En otro estudio similar Morales et al. (2002) utilizó cerdos en crecimiento con la inserción de una cánula en el ileon y alimentando a los cerdos con una dieta a base de trigo, adicionados con una proteasa fungal, donde demostraron que la adición de una proteasa fungal a dietas bajas en proteína, con trigo como ingrediente principal y aminoácidos, no tiene efecto en la digestibilidad ileal aparente de aminoácidos y en el comportamiento productivo en el cerdo en crecimiento.

La canulación del páncreas es uno de los más valiosos métodos experimentales que permite evaluar las funciones exocrinas del órgano, realizar estudios por tiempos más prolongados, utilizar al mismo individuo como su propio testigo ante diferentes estímulos y evaluar el jugo pancreático en distintas etapas del desarrollo del cerdo, a diferentes horas del día (Makkink y Verstegen, 1990; Niebergall et al., 1997). Asimismo, es posible coleccionar la secreción pancreática pura por un periodo largo, así como en los momentos específicos sin influir en función normal del órgano o del animal. Sin embargo, debido a su estructura delicada, el páncreas es excepcionalmente sensible a las manipulaciones quirúrgicas (Niebergall et al., 1997), por ello las técnicas quirúrgicas deben ser mejoradas.

La evaluación permanente del páncreas es posible con la colocación quirúrgica de una cánula, aunque la pérdida de enzimas y de bicarbonato impide que los animales digieran los alimentos y absorban los nutrientes; en consecuencia pueden morir. Por esta razón, Pekas (1965) ideó una cánula re-entrante para que las secreciones pancreáticas pudieran volver al duodeno al finalizar la recolección de muestras de jugo pancreático.

Los métodos de canulación a largo plazo que se usan actualmente, incluyen la canulación directa del conducto pancreático accesorio o del conducto pancreático principal (Pierzyrowski et al., 1988; Winnicki y Brzowski, 1997). La canulación directa del conducto pancreático en el cerdo es a menudo difícil de realizar sin dañar el parénquima pancreático. La mayoría de los métodos de canulación pancreática a través de la papila duodenal (mayor o menor) lleva a la inmovilización del duodeno debido a su fijación a la pared abdominal. Algunos de los métodos también causan una tensión en los animales experimentales durante cada colección de secreciones pancreáticas (Thaela et al., 1995).

Hee et al. (1985) utilizaron un procedimiento quirúrgico en donde aislaron un segmento de duodeno proximal (bolsa) que contenía el conducto pancreático. Con esta técnica se colecta jugo pancreático por meses e incluso años (Makkink y Verstegen, 1990). Este método, sin embargo, implica el corte de intestino en dos sitios que podrían provocar problemas de motilidad, también se puede colectar jugo pancreático contaminado con secreciones de la mucosa intestinal, así como la activación del jugo por enterocinasa duodenal (Makkink y Verstegen, 1990). Por ello se han propuesto varios métodos para colectar el jugo reunido del duodeno para mantener la homeostasis vía la reutilización fisiológica de la secreción, todos estos métodos tienen el riesgo de que la secreción pancreática se derrame en la cavidad abdominal provocando peritonitis. Otros problemas son: estrechamiento, dilatación o ulceración del colon provocado por pancreatitis, pancreatitis obstructiva provocada por las ligaduras o fibrosis por respuesta celular e incluso la muerte del animal.

(Pierzynowski et al., 1988; Makkink y Verstegen, 1990; Boerma et al., 2003; Cheeseman et al., 1998).

El páncreas exócrino en el cerdo, como en otros mamíferos, produce jugo pancreático que contiene enzimas, proteínas y sales, que pueden digerir proteínas, carbohidratos, lípidos, y ácidos nucleicos, también produce electrolitos que neutralizan la acidez del estómago estableciendo el pH apropiado para la acción enzimática. Así el páncreas, como la glándula secretoria más grande del sistema digestivo, está directamente relacionado con la digestión, absorción y utilización de nutrientes (Makkink y Verstegen, 1990).

La función exocrina del páncreas se ha estudiado en animales con manipulación quirúrgica bajo anestesia, colocando una catéter en el conducto pancreático por tiempo prolongado, obteniendo resultados contradictorios, se ha sugerido que el trauma quirúrgico y la manipulación experimental por si mismos son responsables de los diferentes resultados obtenidos, mientras que el efecto de anestésicos y sedantes es considerado raramente (Radberg et al., 1999). Schnoor et al., (2003) en un estudio para medir la motilidad gastrointestinal en cerdos reporta que la utilización de fentanilo y ketamina disminuyen la motilidad, encontrando que la combinación de ketamina y propofol dan mejores resultados.

Winnicki y Brzowski. (1997) evaluaron tres métodos de canulación pancreática: el primero era un método control descrito por Pierzynowski et al. (1988); segundo método era similar al primero con la variante de canular al conducto pancreático por

el lumen intestinal directamente en la papila pancreática y la colocación de tubos transversales en la cánula de salida de la secreción pancreática para evitar la salida de la cánula. El tercero es similar al segundo con la diferencia de colocar una cánula para reingresar la secreción pancreática, concluyendo que el tercer método es más fácil de realizar, con la ventaja de que no se inmoviliza al duodeno, en la necropsia no se reportan cambios relacionados con la cánula.

Usando distintos modelos de colección a largo plazo de jugo pancreático se ha estudiado la función del páncreas exócrino. En cerdos jóvenes el desarrollo de métodos de canulación es complicado debido a su tamaño y crecimiento rápido, deben ser técnicas que permitan el desarrollo de cerdo y no interfiera con su rendimiento (Pierzynowski et al., 1988).

Gabert et al. (1996), utilizaron tres diferentes dietas (aceite de coco, aceite de pescado y aceite de rebina), en cerdos preparados quirúrgicamente con dos técnicas, la técnica de la bolsa y la cateterización directa del conducto pancreático, encontrando diferencias en la secreción pancreática, probablemente estas diferencias sean inducidas por los cambios fisiológicos provocados por las diferentes técnicas utilizadas.

Pocos informes han considerado los efectos de factores externos en la evaluación de la secreción pancreática en cerdos canulados a largo plazo (procedimiento quirúrgico, anestesia, manipulación para la colección, aislamiento).

Herskin y Hedemann. (2001) en un estudio para evaluar los efectos de la cateterización quirúrgica y el aislamiento en cerdos destetados, concluyo que no hubo ningún efecto en la secreción pancreática en cerdos aislados.

La dificultad para canular el conducto pancreático puede deberse a patologías del duodeno o del páncreas, variabilidad en la anatomía o inexperiencia del operador, por lo cual diversos autores a un usado productos sintéticos de secreción porcina en humanos obteniendo resultados satisfactorios (Benedict et al., 2002; Benedict et al., 2003; Somogyi et al., 2000; Darwin et al., 2003).

Puesto que el cerdo tiene solamente un conducto pancreático funcional, la canulación quirúrgica de este conducto priva totalmente al cerdo de la secreción pancreática, esto causa que el páncreas hipersecrete y el cerdo pierda bicarbonato, cloro, potasio, iones de magnesio y calcio, si no se reintroduce esta secreción el cerdo muere en un plazo de 5 a 8 días (Niebergall et al., 1997).

La secretina es un polipéptido de 27 aminoácidos secretado en la mucosa duodenal en repuesta a la acidez del lumen intestinal y actúa en receptores específicos para aumentar el volumen de bicarbonato y relajando el esfínter de Oddi. La administración intravenosa de secretina puede facilitar la canulación del conducto pancreático con alguna patología o en casos de ser conductos de individuos pequeños como resultado del ensanchamiento del conducto y relajación del esfínter. No sé ha documentado ningún efecto adverso con la aplicación de secretina en humanos (Benedit et al., 2002; Benedict et al., 2003).

2.6. Aditivos en dietas para lechones

La eficiencia productiva de las granjas porcinas ha orillado a los productores a realizar destetes tempranos, así como a la utilización eficiente de los ingredientes utilizados en dieta para destete y al uso de aditivos como acidificantes orgánicos e inorgánicos, antibióticos, probióticos, enzimas, inmuno-moduladores, vitaminas, minerales, saponinas, *Yuca schidigera* y oligosacáridos, la incapacidad de los lechones para secretar suficientes cantidad de ácido clorhídrico (Risley et al., 1992; Close, 2000), jugo pancreático (Lindemann et al., 1986; Jensen y Jakobsen, 1997), disminución de la digestibilidad de nutrimentos y paso de patógenos al intestino delgado son los principales problemas en la etapa del destete.

2.6.1 Antibióticos

Los antibióticos se han utilizado extensamente para promover el crecimiento de cerdos. Sin embargo, el uso excesivo de antibióticos puede tener consecuencias serias, por ejemplo el desarrollo de poblaciones bacterianas resistentes, antibióticos residuales en carne. El uso del probióticos ha atraído la atención de investigadores (Fuller, 1989; Fumiaki et al., 1994). *Lactobacilo acidophilus*, *Streptococcus faecalis*, y otras bacterias ácido lácticas se han probado como probióticos para ganado (Mayra-Makinen et al., 1983; Ozawa et al., 1983). Pollmann et al. (1980) reportan mejores ganancias de peso y conversión alimenticia con el uso de *L. acidophilus* en cerdos. Fumiaki et al. (1994) reportaron una disminución de bacterias coliformes en intestino y heces con el uso de *L. acidophilus* resultados similares se reportan con el uso de antibióticos.

2.6.2 Acidificantes

Los ácidos orgánicos se han utilizado por décadas en la preservación de alimentos, protegiéndolos de microorganismos. El ácido fórmico y propiónico se han utilizado ampliamente para este propósito.

Los experimentos con cerdos han demostrado que varios ácidos orgánicos, incluyendo ácido cítrico, fumárico, fórmico, y propiónico tienen una influencia positiva en la nutrición porcina (Partanen y Mroz, 1999). Se ha publicado que el efecto nutritivo de los ácidos orgánicos es más notorio en cerdos destetados (Roth y Kirchgessner, 1998), en esta etapa se presentan desordenes digestivos dando por resultado diarrea que se relacionan con infecciones por *E. coli*. Los problemas presentes en el destete se asocian con diversos factores. Una producción escasa de ácido hidrocórico y enzimas digestivas, y dieta con el alto contenido proteínico.

La dificultad para digerir dietas a base de cereales en cerdos jóvenes puede ser el resultado de la baja producción de HCl y la baja actividad de enzimas proteolíticas en el estómago (Cranwell et al., 1976; Denis et al., 1994; Mahan et al., 1999).

La acidificación incluye la reducción del pH en alimento y zonas digestivas, principalmente en estómago (Partanen y Mroz, 1999; Blanchard y Wright, 2000). La acidificación de dietas no es un concepto nuevo en la porcicultura, los objetivos de su utilización son: mantener el pH óptimo en estómago, permitiendo una activación y función de enzimas proteolíticas, estimular el consumo de alimento, mantener concentraciones reducidas de amoníaco y regular el paso de patógenos hacia el

intestino delgado (Risley et al., 1992; Kirchgessner et al., 1992; Roth y Kirchgessner, 1998).

Los ácidos orgánicos han demostrado beneficios en la ganancia de peso, digestibilidad y absorción de proteínas, minerales y otros nutrimentos de la dieta (Falkowski y Aherne, 1984; Edmonds et al., 1985; Jensen, 1998; Radcliffe et al., 1998; Roth et al., 1998; Partenen y Mroz, 1999; Mroz et al., 2000). Sin embargo la respuesta a la acidificación en dietas para destete varía dependiendo del tipo y nivel de acidificante utilizado, ingredientes de la dieta y edad del animal (Blank et al., 1999). Los efectos benéficos del uso de acidificantes son más notorios en las primeras dos semanas posdestete. Krause et al. (1994) no encontraron repuesta con la utilización de ácido fumárico en cerdos en la etapa de engorda.

Los animales jóvenes tiene poca capacidad de sintetizar ácido clorhídrico en el estómago, al nacimiento la producción de ácido clorhídrico es insignificante, tiene un aumento gradual con la edad (Mahan et al., 1999). La pepsina se secreta como zimógeno inactivo (pepsinógeno), su conversión a pepsina activa se realiza en un pH de 2.0, en un pH más alto la actividad se reduce. La actividad proteolítica iniciada en el estómago por la pepsina es necesaria para la actividad de la tripsina en el intestino delgado. Según lo divulgado por Meyer y Kelly et al. (1976), en estudios en humanos y perros, los productos finales de la digestión de la pepsina (péptidos y amino ácidos) estimulan la secreción pancreática. Una proteolisis inadecuada en el estómago debido a un pH alto puede ser una razón de la baja secreción enzimática (Lindemann

et al., 1986). Thaela et al., (1998), demostraron un incremento en el volumen de secreción pancreática, así como de tripsina y quimotripsina en lechones destetados con dieta suplementada con ácido láctico.

2.6.3. Enzimas

Las enzimas son compuestos orgánicos, de origen proteico, que actúan como catalizadores biológicos de procesos digestivos y metabólicos. Estos incluyen todas las reacciones de síntesis y digestión-degradación que ocurren en el animal, convirtiéndose en el motor que mueve la actividad de todas las células del organismo, controlando todas las funciones de mantenimiento, crecimiento y reproducción (Underkofler et al., 1958; Cervantes, 2000b).

La adición de enzimas a dietas para cerdos, aumenta la digestibilidad de los ingredientes e incrementa la productividad, debido a que se pueden utilizar ingredientes de menor valor biológico y costo, obteniendo el mismo comportamiento productivo del animal (Bedford, 1995; Beauchemin et al., 1999).

Las nuevas tecnologías en la industria de alimentos balanceados han utilizado a las enzimas para disminuir los factores antinutricionales, como la fibra no digestible que impide la digestión y absorción de otros nutrimentos, también para reducir la variación de la calidad de los ingredientes, aunque la respuesta al uso de enzimas puede ser más marcado en ingredientes con baja calidad nutritiva (Marquardt, 1997).

Las enzimas se caracterizan por su marcada especificidad, debido a que existe una forma de enzima para cada sustrato. Lo anterior tiene una aplicación importante en nutrición animal, permite ejercer efectos específicos sobre la digestibilidad de algún nutrimento en particular, sin afectar al resto (Cervantes, 2000b).

Distintas enzimas tales como glucanasa, amilasas, celulasa, y hemicelulasa, algunas proteasas y fitasa, se adicionan a la alimentación para promover uno o más de los cuatro efectos beneficiosos que se pueden obtener: a) degradar factores anti-nutricionales en la dieta que pueden interferir con el proceso digestivo; b) incrementar la disponibilidad de nutrientes insuficientemente degradados por enzimas endógenas; c) para suplir la actividad digestiva en animales jóvenes y d) hacer más eficiente la absorción de nutrientes (Boyce et al., 2004).

2.6.3.1 Fitasa

La fitasa (myo-inositol hexafosfato hidrolasa) está presente en mínima cantidad en la pared intestinal y microflora bacteriana del cerdo (Pointillart et al., 1984). Las aves carecen de la enzima fitasa. En granos de cereales y oleaginosas se encuentra en variables cantidades. Algunos hongos y levaduras son los mayores sintetizadores (Nelson, 1967, Ravindran et al., 1995). Existen dos tipos: la 3-fitasa, que hidroliza primero al fosfato en posición 3 del mioinositol, y la 6-fitasa, que hidroliza en posición 6. La 3-fitasa está presente en animales, mientras que la 6-fitasa está presente en plantas (Laztity y Laztity, 1988). La actividad de la fitasa

vegetal es menor de 100 U/kg en casi todos los granos (maíz, soya, sorgo, arroz y avena). Una unidad de actividad de fitasa (UFA) equivale a 1 micromol de fosfato liberado de fitato por minuto. Todas las especies de cereales, leguminosas y oleaginosas poseen alguna fitasa activa, pero solo cereales como cebada, trigo, centeno y triticale poseen cantidades apreciables (Pointillart et al., 1993; Eeckhout y De Paepe, 1991; Weremko et al., 1997). En trigo, dependiendo de la variedad, su actividad varía entre 450 y 850 U/Kg. (Barrier-Guillot et al., 1996).

Una de las fitasas comercialmente disponibles es extraída del hongo *Aspergillus ficcum*, también llamado *Aspergillus niger*. Es muy activa e hidroliza al fitato, comenzando con el fosfato en posición 3, el producto final de esta hidrólisis es el mioinositol monofosfato. Gracias a la manipulación genética del hongo, expresando múltiples copias del gene que codifica para la producción de la proteína, por lo que se han obtenido *Aspergillus niger* recombinantes con capacidad de producción de fitasa 10 veces mayor que la cepa de campo. Agregada a dietas para cerdos, 500 unidades de dicha fitasa incrementan la cantidad de fósforo digestible en alrededor de 0.8 g/kg. Esta actividad, puede reemplazar el suplemento de 1g de fósforo proveniente de fosfato monocálcico (FMC) o de 1.15g de fosfato dicálcico (FDC). Es decir, cerca de 4.4 kg de FMC (conteniendo 22.7% de P) o 6.4 kg de FDC pueden ser reemplazados por 100g del producto comercial, que contiene 5000 FTU/g, por tonelada de alimento. El principal inconveniente para el amplio uso de las fitasas fue por la inactivarse esta enzima a temperaturas de peletización. Si las dietas se peletizan puede reducirse o destruirse la actividad de la fitasa. Esto se ha

observado cuando la temperatura ha excedido los 60°C (NRC, 1998). Schwarz y Hoppe, (1992) reportaron que el peletizado a temperatura de 70° reduce de 15-25% la actividad de la fitasa.

La fitasa tiene la capacidad de desfosforilar al fitato hasta convertirlo en éster inositol fosfato (pentafofato de myo-inositol a monofosfato de myo-inositol) y finalmente a inositol y P inorgánico (Turk et al., 2000).

La fitasa también puede utilizarse para incrementar la disponibilidad de los ingredientes, y con ello reducir los efectos por contaminación provocada con las excretas, gran cantidad de P presente en los ingredientes (cereales, granos, etc.) es biológicamente indisponible para los monogástricos (Bedford, 2000). El fósforo esta almacenado en forma de ácido fítico, el tubo digestivo del cerdo está desprovisto de enzimas que hidrolicen el ácido fítico, quedando este como un factor antinutricional, siendo necesaria la adición de fósforo inorgánico a las dietas (Maga, 1982).

La actividad de la fitasa no es totalmente previsible, considerar beneficios de su inclusión en la dieta depende de factores como: materia prima utilizada, fuente de fitasa, edad de los animales, contenido de calcio, fósforo, vitamina D y actividad de fitasa en cada uno de los ingredientes utilizados (Bedford, 2000; Matsui et al., 2000). Los fitatos en los cereales se concentran en el germen y/o en la capa de la aleurona, concentrando también a las proteínas como albúmina y globulina, las cuales son las de mayor calidad nutricional por su elevado contenido en lisina y treonina (Tatham et al., 1995; Stone y Savine, 1999; Bedford, 2000).

La fitasa que tiene actividad en el tracto gastrointestinal proviene de la mucosa intestinal y flora microbiana (Greiner et al., 1993). Algunos reportes oficiales sugieren que la fitasa intestinal contribuye a la digestibilidad del fitato en los cerdos, pero generalmente se asume que esta contribución es mínima o nula. La fermentación en los cerdos tiene la capacidad de hidrolizar al fitato pero este proceso tiene poco valor nutritivo (Hu et al., 1996).

El pH óptimo de la fitasa fungal ocurre en dos picos; la actividad más alta se observa a pH de 5.0 a 5.5 y el segundo de máxima actividad se observa a pH de 2.5 (Simons et al., 1990).

Jongbloed et al. (1992) encontraron que la hidrólisis del fitato con fitasa microbiana en cerdos canulados ocurría preferentemente en estómago (43%) y reducidamente en intestino delgado (7%).

2.6.3.2 Ácido Fítico ó Fitato

El fitato o ácido fítico, cuyo nombre químico es mioinositol 1,2,3,4,5,6-hexafosfato, consiste de un núcleo de inositol con seis radicales fosfato. El fitato se considera como agente antinutricional, debido a que forma complejos (quelatos) con gran variedad de minerales esenciales como Ca, Zn, Mg y Fe, además, los fitatos pueden reaccionar con las proteínas y el almidón reduciendo su disponibilidad (Maga, 1982; Reddy et al, 1982; Laztity y Laztity, 1995). Por esta razón, la biodisponibilidad de los minerales, proteínas y almidón, se mejora si el fitato es

hidrolizado por fitasa, la excreción de P, Ca, Zn y N se puede reducir si las dietas se formulan con fitasa (Cromwell, 1996; Jongbloed et al., 1996).

Los monogástricos digieren pobremente el fitato, la biodisponibilidad del fósforo en maíz y soya, principales ingredientes en dietas comerciales de cerdos y aves es del 10 al 30 %. Considerando que la excreción del mismo fluctúa entre el 90 y 70% (Kornegay, 1995). Por ello, las dietas de cerdos y aves deben ser suplementadas con fuentes minerales de fósforo (fosfatos dicálcico, monocálcico, etc.), cuyo fósforo es altamente biodisponible.

La disponibilidad de nutrientes, sobre todo minerales, ha recibido una importante atención desde el descubrimiento del ácido fítico hace 150 años. En la nutrición animal, el interés en el ácido fítico o fitato se ha centrado en la utilización del fósforo. Reduciendo la disponibilidad de este mineral, el fitato contribuye a la contaminación medioambiental por la pérdida de fósforo no digerido (Kornegay, 1996a).

La contaminación por fósforo ha sido de interés desde la publicación de Simons et al. (1990) y la introducción comercial de fitasa en Los Países Bajos (Lenis y Jongbloed, 1999). La utilización de fitasa microbiana tiene buenos resultados en la alimentación con un pH óptimo y en condiciones gástricas favorables donde el fitato es muy soluble (Campbell y Bedford, 1992). La cantidad de fósforo fítico liberado esta influenciado por el nivel y fuente de fitasa, substrato y los niveles dietéticos de fósforo no fítico, Ca, calciferol y Ca:P (Ravindran et al., 1995).

El papel del fitato en la etiología de la parakeratosis del cerdo, una manifestación por deficiencia de Zn (Oberleas et al., 1962), es otra muestra de los efectos negativos del fitato.

El ácido fítico constituye entre el 0.7 y 20% de los granos de cereales y oleaginosas, representa el 50 a 85% del fósforo total (Cheryan, 1980). Se concentra principalmente en el salvado. En el trigo y arroz, el fitato se concentra en el pericarpio, en el caso del maíz más del 90% del fitato se distribuye en el endospermo (O'Dell et al., 1972). En la soya como en otras oleaginosas se encuentra asociado con las proteínas, y no se ha especificado su sitio de almacenamiento (de Boland et al., 1975). Los granos lo utilizan como fuente de fosfato, myo-inositol y cationes durante la germinación (Reddy et al., 1982). La concentración de P en el ácido fítico es 282 g/kg y el P fítico, lo que constituye la mayoría del P en las semillas de las plantas. Debido al uso común de ingredientes derivados de las plantas, las concentraciones de P fítico oscilan entre 2.5 y 4.0 g/kg en las dietas (Ravindran, 1995).

El ácido fítico, molécula polianiónica, forma fácilmente complejos insolubles (quelatos) con muchos minerales en forma catiónica, incluyendo, además del fósforo, importantes elementos nutricionales como Ca, Zn, Cu, Mg, Fe, y Mn, disminuyendo su digestibilidad. Además puede formar sales insolubles con la proteína de la dieta e inhibir enzimas digestivas como la amilasa, tripsina, tirosinasa y pepsina (Agudelo, 2002).

2.6.3.3 Complejos Fitato -Proteína

Los primeros reportes de la existencia de complejos entre la fitasa y proteína fueron reportados desde los años 20 (Jones y Csonka, 1925). Se acepta que el fitato actúa recíprocamente con la proteína para formar dos complejos diferentes que dependen del pH (Anderson, 1985). Los complejos binarios entre proteína y fitato están presentes en pH ácidos, y los complejos terciarios proteína-mineral-fitato se forma por un puente catiónico como pH cercano a la neutralidad. Teóricamente, la hidrólisis del fitato libera proteína y P que es utilizado por los animales.

Las proteínas pueden formar complejos binarios a través de eslabones electroestáticos, se forman en pH ácido en el intestino (Selle et al., 2000).

Okubo et al. (1976), estudiaron el rango óptimo del pH para formar complejos fitato-proteína, encontraron que un pH de 4.6 era el ideal. La interacción entre proteínas y fitato puede influir en la digestión de proteínas en el estómago. Yi y Kornegay, (1996), mencionan que el estómago es el sitio principal de hidrólisis del fitato. La digestibilidad ileal es un método adecuado para evaluar la influencia de la fitasa sobre la utilización de proteína y aminoácidos (Gabert, 2001).

2.6.3.4 Complejos Fitato -Minerales

El ácido fítico forma complejos solubles y quelatos insolubles con minerales como Zn, Cu, Co, Mn, Ca y Fe (Maenz et al., 1999). El grado de solubilidad de los complejos depende de la cantidad de ácido fítico, mineral y pH (Cheryan, 1980). Los complejos con cationes monovalentes como K y Na son solubles independientemente del pH, y los quelatos con cationes divalentes son solubles a pH

menores a 3.5 (Selle et al., 2000). La adición de fitasa a dietas para cerdos mejora la biodisponibilidad de cobre y zinc (Adeola et al., 1995).

2.6.3.5 Digestibilidad de Proteína – Aminoácidos y Fitato

Selle et al. (2000) y Kies et al. (2001) en revisiones publicadas mencionan cuatro posibles complejos proteína-fitato que afectan la digestibilidad de proteína, estos incluyen los presentes en alimento, los que se forman durante el tránsito intestinal, Barnett et al. (1993) encontraron que la adición de fitasa a la dieta de lechones, aumentó significativamente ($P < 0.05$) la digestibilidad de N (0.66 a 0.71), de igual forma lisina y proteína.

Officer y Batterham (1992), determinaron el efecto de la adición de fitasa en la digestibilidad de aminoácidos, mejorando el 14% la digestibilidad de 10 amino ácidos con esta adición, y un aumento significativo ($P < 0.05$) sólo se observó para lisina, histidina y N.

Se han publicado dos estudios en los Países Bajos en que los procedimientos de canulación se utilizaron para obtener muestras. La fitasa se incluyó en dietas para crecimiento (tapioca, maíz, cebada y girasol) con valores altos de Ca:P (2.03:1; Mroz et al., 1994). La adición de la enzima, mejoró significativamente ($P < 0.01$) la digestibilidad de metionina y arginina, pero encontraron un bajo efecto en los demás amino ácidos que parece incoherente con el aumento significativo ($P < 0.01$) en la retención de N (20.4 a 25.9 g/d). En una segunda evaluación (Mroz et al., 1995) utilizaron fitasa en dietas de maíz-soya con bajos niveles de proteína y Ca:P (1.77:1)

reportaron que aumentó la digestibilidad significativamente para treonina ($P < 0.01$), isoleucina, lisina, triptofano y seis aminoácidos no esenciales ($P < 0.05$).

Kornegay et al. (1998) determinaron los efectos de adición de fitasa en la digestibilidad de aminoácidos en cerdos canulados del ileon y sacrificados. En los animales canulados la fitasa tenían un efecto lineal significativo ($P < 0.05$) en la digestibilidad de cuatro aminoácidos importantes, encontraron efectos significativos ($P < 0.057$ - $P < 0.001$) observados para la digestibilidad de diez aminoácidos con la técnica de sacrificio. La digestibilidad de aminoácidos en el grupo control era similar, independiente del método de determinación. Sin embargo, la fitasa (500 FTU/kg) aumentó la digestibilidad en cerdos canulados en 3.5% y 10.7% en cerdos sacrificados.

Kornegay et al. (1998) reportaron que la fitasa mejoró la tasas de crecimiento 10.1 % en cerdos; este incremento era comparado con el 12.0% obtenidos aumentando la proteína dietética de 100 a 120 g/kg. Esta respuesta en crecimiento era congruente con los resultados de digestibilidad de aminoácidos obtenidos utilizando fitasa en la dieta en cerdos sacrificados y un aumento discreto en los cerdos canulados. Las diferencias en la digestibilidad de aminoácido por la fitasa en animales canulados y sacrificados pueden ser un efecto del procedimiento de canulación (Sauer et al., 1989). Puede ser que la canulación cambie el microclima del intestino y/o los regimenes de alimentación marquen un efecto en el pH. El

acumulo de proteína es el método más apropiado para determinar el efecto de la fitasa en la digestibilidad de proteína en cerdos.

Varios estudios han demostrado mejora en el crecimiento con la utilización de fitasa y el suplemento adecuado de fósforo, que puede estar relacionado con una mejor biodisponibilidad de proteína. Esta mejora parece ser particularmente en dietas para destete (Campbell et al., 1995; Cadogan et al., 1997), la fitasa ha demostrado mejoras en la utilización de proteína con deficiencia de amino ácidos en dietas para destete a base de maíz y soya (Biehl y Baker, 1996).

En un estudio con cerdos en crecimiento Ketaren et al. (1993) demostraron que la adición de fitasa aumento la deposición de tejido magro. La dieta utilizada fue a base soya y sacarosa, con un P total de 2.5 g/kg, se complementó con fosfato monosódico (244 g P/kg) o harina de soya (6.7 g P/kg) para obtener niveles del P de 3.25 y 4.0 g/kg. Como resultados obtuvieron que la fitasa en dietas en la etapa de crecimiento incrementaba la deposición de proteína 13.9% (de 108 a 123 g/d) y retención 9.1% (del 0.33 a 0.36 kg/kg) estos resultados son congruentes con las tasas significativas ($P < 0.05$) de crecimiento y la conversión alimenticia ($P < 0.01$). La disponibilidad de fósforo parece que tiene un efecto directo en la utilización de proteína en este estudio.

Hasta que punto los complejos proteína-fitato están presentes en las semillas es incierto, aunque una asociación física entre proteína y fitato en el dicotiledóneo de

las semillas y en las capas ricas en proteína de la aleurona está reconocida (Ravindran et al., 1995). Los reportes sugieren que los complejos proteína-fitato están presentes en frijoles (Bourdillon, 1951) y soya (Prattley y Stanley, 1982). De Boland et al. (1975) encontraron que el fitato de las hojuelas de soya era soluble, considerando que el fitato de la soya era completamente insoluble; esta observación hace pensar que los complejos proteína-fitato no están presentes en la soya, se forma en el proceso e industrialización. Es posible que estos procesos (por ejemplo el calor y extracción de aceite) puedan permitir las interacciones entre el fitato y proteína. Los complejos fitato-proteína-minerales que están presentes en las semillas, se piensa que se pueden romper en las condiciones ácidas del tracto gastrointestinal.

2.6.3.6 Interacción del Fitato con Enzimas Endógenas

Hay evidencia que el ácido fítico tiene un efecto negativo en la actividad de las proteasas. Se ha demostrado que el fitato se liga con la tripsina *in vitro* y así reduce la digestión de proteínas. La actividad de la tripsina disminuye hasta 46% en presencia de fitato, forman complejos terciarios con la tripsina vía Ca, inhibiendo de esta forma la tripsina (Singh y Krikorian, 1982). La fitasa aumentó la digestibilidad iléica de nitrógeno 3.7% y la actividad de tripsina 10.9% en un estudio in vivo en cerdas (Mroz et al., 1995).

Sin embargo, la mayoría de los estudios en animales de producción no han demostrado que el ácido fítico disminuya la actividad de las proteasas (Reddy et al.,

1988; Knuckles et al., 1989; Vaintraub y Bulmaga 1991). Desphande y Damadaran (1989) demostraron que el fitato reduce la solubilidad de la tripsina en presencia de Ca a pH 7.8, con estudios de espectroscopia mostraron que el fitato causo cambios de conformación en la tripsina. Caldwell (1992) investigó los efectos in vitro del fitato de sodio y CaCl₂ en la activación del tripsinógeno y la estabilidad de la tripsina. La adición de fitato a una mezcla que contenga calcio reduce la activación tripsinógeno aproximadamente 90% a un pH 8.1 y reduce la actividad de la tripsina. Los complejos Ca-fitato aumentan la formación de tripsina inactiva. Aunque el páncreas tiene la capacidad de compensar los niveles bajos de tripsina aumentando la síntesis y liberación de tripsinógeno como un mecanismo de retroalimentación negativa, (Selle et al., 2000) consideran que los efectos del fitato en la tripsina puede tener otros efectos adversos.

Se ha demostrado que la inhibición de la tripsina aumenta la pérdida de proteína endógena en cerdos (Barth et al., 1993). Varias investigaciones in vivo (Sharma et al., 1978; Desphande y Cheryan, 1984; Thompson y Yoon, 1984) ha encontrado que el fitato es un inhibidor non-competitivo potente de la actividad de la α amilasa.

Hasta ahora, la posibilidad de que la fitasa inhibe la tripsina y otras enzimas digestivas es importante, pero no hay un estudio que muestre resultados concisos en animales vivos (Selle et al., 2000).

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluación del efecto de la adición de fitasa fungal sobre la secreción de tripsina y quimotripsina en cerdos en crecimiento y en la digestibilidad de nutrientes.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluación del efecto de la adición de fitasa fungal sobre la digestibilidad de fósforo (P), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Hierro (Fe).

Evaluación del efecto de la adición de fitasa microbiana sobre la secreción de tripsina y quimotripsina en cerdos en crecimiento y en la digestibilidad de nutrientes.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Tratamientos, Dietas y Animales

Se utilizaron 26 cerdos híbridos Yorkshire x Landrace, en etapa de crecimiento (11.5 kg peso vivo). Seis cerdos se sometieron a un procedimiento de cirugía de canulación de conducto pancreático de acuerdo al procedimiento descrito por Romero (2006), y los 20 restantes se usaron en un ensayo de digestibilidad y comportamiento productivo. Los cerdos canulados se alojaron en jaulas individuales, a $28 \pm 2^\circ \text{C}$ y $45 \pm 2\%$ humedad relativa.

Los 20 cerdos sin canular se alojaron en jaulas con piso elevado y se asignaron aleatoriamente a dos tratamientos: a) fitasa fungal en el alimento y b) grupo testigo sin fitasa; cada tratamiento estuvo formado por 10 repeticiones.

Los cerdos no canulados fueron alimentados con dietas sólidas para crecimiento (**Tabla I**), durante siete días de adaptación. Posteriormente se les ofreció alimento adicionado con 500 unidades fitasa (UF) de *Aspergillus niger* (Natuphos® BASF) por kg de dieta durante 7 días y agua *ad libitum*. La dieta fue formulada de acuerdo con NRC (1998). A los cerdos canulados se les dio un periodo de adaptación a la dieta (tabla I) y la cánula durante cinco días, posteriormente a la mitad de los cerdos (3) se les ofreció alimento adicionado con 500 UF por kg de dieta, durante cinco días. Estos cerdos se alimentaron *ad libitum* y no se registró el consumo debido a que el tiempo se dedicó al muestreo de jugo pancreático. La colección de jugo pancreático se hizo en etapa postprandial con 4 intervalos de 15 min por hora, dos veces al día (08:00 y

20:00 h), del jugo colectado se obtuvo una muestra de 1 ml el cual conservó en nitrógeno líquido a -20° C, y el volumen restante se reintrodujo al duodeno vía cánula implantada.

Tabla I. Composición porcentual de las raciones usadas para los cerdos canulados y para el ensayo de digestibilidad.

Ingrediente	Cerdos canulados	Ensayo de digestibilidad
Pasta de soya	20.566	27.00
Sorgo grano	75.553	69.00
Aceite de soya	1.042	1.00
Premezcla vitamínica	0.250	0.27
Premezcla mineral	0.150	0.19
Sal	0.350	0.12
Saborizante		0.10
Carbonato de calcio	1.112	1.00
Fosfato monodivale	0.684	
Ortofosfato		0.98
L-Lisina HCl	0.259	0.14
DL-Metionina	0.014	0.17
L-Treonina	0.020	0.02
L-Triptofano		0.01

NRC (1998).

4.2. Análisis de Muestras de Heces y Alimento

Se hizo una muestra compuesta de heces por cada cerdo, para determinar los nutrientes y las cenizas insolubles en ácido como marcador interno. Se determinó la materia seca (MS), materia orgánica (MO) (AOAC, 1990), fibra detergente neutro (FDN) (Van Soest *et al.*, 1991), fósforo total por la técnica de Harris y Popat (1954), y otros minerales (calcio, magnesio, zinc y hierro), por espectrofotometría de absorción atómica (Slavin, 1968).

Se analizaron las cenizas ácido insolubles (Keulen y Young, 1977), para calcular la digestibilidad *in vivo* con las siguientes ecuaciones (Osuji et al., 1993):

$$\text{Digestibilidad nutriente} = 100 - [(100 * \text{CIA d} \times \text{nutriente h}) / (\text{CIAh} + \text{nutriente d})]$$

Donde:

CIA d = cenizas insolubles en ácido en la dieta (%)

CIA h = cenizas insolubles en ácido en heces (%)

Nutriente h = nutriente en heces (%)

Nutriente d = nutriente en dieta (%)

4.3. Análisis de Enzimas en Jugo Pancreático

Se analizó en jugo pancreático la proteína soluble por el método de Bradford (1976) usando seroalbúmina bovina como estándar. Las enzimas fueron activadas con enteroquinasa porcina (Sigma). La actividad de la tripsina se determinó por el método de Erlanger et al. (1961) usando benzoil-L-arginina-etil-ester como sustrato.

Una unidad de actividad de tripsina fue igual a la hidrólisis de 1 μmol de sustrato por minuto por mg de proteína. La actividad de la quimotripsina se determinó con la hidrólisis de N-acetil-L-tirosina-etil-ester (Hibbard et al., 1992). Una unidad de actividad de quimotripsina fue igual a la hidrólisis de 1 μmol de sustrato por minuto por mg de proteína.

El análisis de enzimas en jugo pancreático se realizó en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California.

4.4. Análisis Estadístico

Se realizó el análisis de varianza de las variables respuesta con un modelo estadístico con un solo criterio de clasificación (nivel de fitasa): El modelo estadístico usado fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + P_i + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijkl} = variable respuesta

μ = Media general

P_i = Efecto del nivel de fitasa

ε_{ijkl} = Error aleatorio

Los resultados de ganancia de peso se analizaron usando el peso inicial como covariable (Steel y Torrie, 1996). Los resultados de actividad enzimática (tripsina y quimotripsina), se analizaron con el procedimiento de mediciones repetidas del SAS (1999).

5. RESULTADOS Y DISCUSION

De los nutrientes analizados (**Tabla II**), la adición de la fitasa fungal de *Aspergillus Níger*, incrementó la digestibilidad de la proteína ($P<0.10$) en 2.8 unidades porcentuales y la fracción de la FDN en 3.6 unidades ($P<0.11$). A pesar de que numéricamente la digestibilidad del calcio fue mayor con la fitasa en 6 unidades porcentuales no se detectaron diferencias ($P=.28$). Numéricamente hubo una mayor digestibilidad del fósforo y del hierro en 2.2 unidades, pero tampoco fueron significativas ($P<0.05$). La digestibilidad de magnesio y zinc no fue afectada por la fitasa (**Tabla II**).

Tabla II. Efecto de una fitasa fungal (500 unidades/kg alimento) en la digestibilidad aparente de nutrientes y en el comportamiento de lechones destetados.

Nutriente	Testigo	Fitasa	C.V. (%)	P ^c
Digestibilidad:				
Materia seca (%)	87.58	88.55	2.16	0.27
Proteína (%)	78.81	81.60	4.44	0.10
FDN (%)	81.87	85.54	5.77	0.11
Ca (%)	71.57	77.56	15.79	0.28
P (%)	51.73	53.98	19.08	0.63
Mg (%)	94.32	93.47	4.31	0.65
Zc (%)	92.47	92.79	3.91	0.92
Fe (%)	86.42	88.62	5.66	0.36
Peso inicial (kg)	11.24	11.68	15.35	0.58
Peso final	13.88	14.75	11.90	0.26
Ganancia diaria (kg)	0.187 ^a	0.219 ^b	13.67	0.02

^{ab}. Medias con distinta literal son diferentes ($p<0.05$).

^c. Probabilidad de error tipo I.

Harper et al. (1997), en cerdos en crecimiento y finalización, observaron una respuesta lineal al incrementar la dosis de la fitasa Natuphos® de 250 a 500 U por kg de alimento; sin embargo, no encontraron respuesta en la digestibilidad del calcio en

dietas con baja concentración de fósforo, a pesar de haberse estimado que la digestibilidad del P se podría incrementar en un 30%. Estos autores no encontraron efecto de la fitasa en la digestibilidad de la materia seca.

Olukosi et al. (2007), evaluaron dosis crecientes de fitasa (0, 500 y 1000 unidades de fitasa) en cerdos destetados y observaron una respuesta lineal en la digestibilidad del fósforo (47, 49, 56%) y del calcio (53, 60 y 68%), sin encontrar efectos en la materia seca, proteína y energía.

Adeola et al. (1995), observaron que con 1500 unidades de fitasa en el alimento, se incrementaba la disponibilidad aparente de Ca, P, Zn y Cu; sin embargo, no encontraron efectos en la digestibilidad de Mg y Mn.

En un experimento con cerdos suplementados con Natuphos® (0, 250 y 500 Unidades por kg de dieta) realizado por Radcliffe et al. (2006) en cerdas adultas con cánula ileocecal, detectaron efectos en la digestibilidad ileal de la fitasa en la digestibilidad del P (lineal, $p < 0.01$), Ca ($p < 0.004$), MS ($p < 0.11$), proteína ($p < 0.07$) y aminoácidos ($p < 0.10$).

Zhang et al. (2000), evaluaron la fitasa Natuphos® (dosis de 0, 250, 500 y 2500 Unidades por kg de dieta) en cerdos recién destetados (9 kg), similares a los de este estudio, estimando la digestibilidad con óxido de cromo como marcador externo.

La digestibilidad de la materia seca se incrementó en forma lineal ($p = 0.08$), así

como la del calcio y del fósforo ($p < 0.01$). El uso de fitasa ha demostrado que es posible reducir la excreción de P y la contaminación de este mineral hasta en un 30 a 40% Harper et al. (1997).

Se ha reportado que el fitato puede formar sales insolubles con Ca, Fe, Zn, Mn y Cu, Vohra et al. (1965), disminuyendo la disponibilidad de esos minerales Shelton et al. (2004). Adeola et al. (1995), reportó que la digestibilidad del Zn se mejoró al adicionar fitasa a la dieta de cerdos destetados. Sin embargo, en este estudio no se detectó efecto de la fitasa en la digestibilidad de Mg, Zn y Fe (**Tabla II**).

Las investigaciones con fitasa se han enfocado a micro-minerales y aminoácidos, y solamente en algunos estudios se han combinado con enzimas fibrolíticas, pero no han medido los efectos en la digestibilidad en la FDN. En un experimento con aves, la combinación de fitasa con xilanasas mejoró la energía metabolizable del alimento Ravindran et al. (1999), mientras que en otros estudios no han obtenido respuesta, Juanpere et al. (2005), por lo que no existe evidencia directa de que la fitasa puedan mejorar la digestión de la FDN. No obstante es importante tener presente que el ácido fítico es un componente común de las plantas y es almacenado en un complejo grande con sales de Mg y K junto con proteínas dentro de membranas simples en partículas de granos y semillas, López et al. (2000).

En este estudio, la adición de fitasa mejoró ($p < 0.05$) la ganancia de peso (**Tabla II**) lo cual podría asociarse a la mayor disponibilidad de proteína de la dieta.

Harper et al. (1997) en cerdos en crecimiento y finalización, observaron mayores ganancias de peso con la fitasa Natuphos® en dietas con baja concentración de fósforo, asociadas a mayor consumo de alimento y a una mayor digestibilidad de fósforo.

En un estudio similar con cerdos destetados (9 kg), Zhang et al (2000) con la fitasa Natuphos® (dosis de 0, 250, 500 y 2500 Unidades por kg de dieta) observaron una respuesta lineal en la ganancia de peso, lo cual concuerda con los resultados observados en este experimento. Esos investigadores solo observaron una respuesta en el consumo (lineal) en las últimas semanas, lo cual sugiere que la mayor respuesta en esta etapa estaría asociada al mayor aporte de nutrientes digestibles por la fitasa. En forma contraria, en el experimento de Olukosi et al. (2007) donde evaluaron dosis crecientes de fitasa (0, 500 y 1000 unidades de fitasa) en cerdos destetados, no observaron efecto en la ganancia de peso ni en el consumo de alimento. La dosis puede ser un factor importante en la respuesta a la enzima, así como el tipo de enzima usada.

La adición de fitasa no tuvo efectos ($p < 0.05$) en el peso y la longitud del páncreas, ni tampoco en la actividad de la tripsina y de la quimotripsina en los 5 días de colección de jugo pancreático (**Tabla III**). Solamente se observó una tendencia a mayor actividad de la tripsina ($p = 0.11$) en el primer día de suministro de la fitasa.

Mroz et al. (1991) reportaron una mayor actividad de la tripsina al adicionar fitasa. Otra posible respuesta en páncreas sería mediada por efecto indirecto de los aminoácidos (Niederau et al., 1986), lo cual estaría reflejado en la digestibilidad de la proteína. De hecho, se ha reportado que uno de los problemas es la hidrólisis de la

fitasa por enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal del cerdo (Pagano et al., 2007). Otro problema es que el ácido fítico puede formar complejos con la proteína, e inhibir las amilasas, tripsina y pepsina (Mroz et al., 1994) y posiblemente la quimotripsina, sin embargo, estos resultados no mostraron ese efecto.

Tabla III. Efecto de una fitasa fungal (500 unidades/kg alimento) en características del páncreas y actividad de tripsina y quimotripsina.

Nutriente	Testigo	Fitasa	C.V. (%)	P ^a
Peso páncreas (g)	32.62	33.34	10.24	0.63
Longitud del páncreas (mm)	14.16	14.40	3.13	0.25
Tripsina (Unidades/mg proteína)				
Día 1	3.785	4.184	6.12	0.11
Día 2	3.951	4.276	7.44	0.26
Día 3	3.835	3.673	10.14	0.63
Día 4	3.731	3.661	27.35	0.93
Día 5	3.752	3.893	11.64	0.71
Quimotripsina (Unidades/mg proteína)				
Día 1	2.191	3.731	41.23	0.19
Día 2	2.391	3.222	39.73	0.41
Día 3	2.789	3.811	23.14	0.17
Día 4	2.510	2.421	60.01	0.94
Día 5	3.076	2.680	34.03	0.62

^a Probabilidad de error tipo I.

6. Conclusiones

El uso de fitasa fungal en raciones de cerdos destetados incrementó la disponibilidad de proteína y favoreció una mayor ganancia de peso, sin modificar la disponibilidad de otros nutrientes de la dieta, ni la actividad de la tripsina y quimotripsina.

7. LITERATURA CITADA

- Adeola, O., B.V. Lawrence, A.L. Sutton and T.B. Cline. 1995. Phytase-induced changes in mineral utilization in zinc supplemented diets for pigs. *J. Anim. Sci.*, 73:3384-3391.
- Agudelo, T. J. 2002. Producción animal y contaminación por fosfatos. Alternativas de solución desde la porcicultura. *Rev. Col. Cienc. Pec.* Vol. 15: 3, 2002.
- Anderson, P.A. 1985. Interactions between proteins and constituents that affect protein quality. In *Digestibility and Amino Acid Availability in Cereals and Oilseeds*, pp. 31 - 45 [JW Finley and DT Hopkins, editors]. St Paul, MN: American Association of Cereal Chemists, Inc.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Vol. 1. 15th Ed. Assoc. Offic. Anal. Chem. Washington, D.C. pp. 69-88.
- Balén, E. M., Sáez, M. J., Cienfuegos, J. A., Zazpe, C. M., Ferrer, J. V., Herrera, J., Lera, J.M. 2000. Anatomía del cerdo aplicada a la experimentación en cirugía general. *Cir Esp*; 67: 586-593.
- Barrier-Guillot. B., Casado. P., Maupetit. P., Jondreville. C. y Gatel. F. (1996). Wheat phosphorus availability: 1 ± In vitro study: factors affecting endogenous phytasic activity and phytic phosphorous content. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70, 62 - 68.

- Barth, C.A., Lunding, B., Schmitz, M. and Hagemester, H.1993. Soybean trypsin inhibitor(s) reduce absorption of exogenous and increase loss of endogenous protein in miniature pigs. *J.Nutrit.*123, 2195 - 2200.
- Beauchemin, K. A., Rode, L. M. And Karen, D. 1999. Use of feed enzymes in feedlot finishing diet. *Can. J. Anim. Sci.* 79:243-246.
- Bedford, M.R. 1995. Mechanism of action and potential enviromental benefits from the use of feed enzymes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 53:145-155.
- Bedford, M. R. 2000. Exogenous enzymes in monogastric nutritión, their current value and future benefits. *Anim. Feed Sci. Tech.* 86:1-13.
- Benedict, M.D., Glen, A. L., Seymour. F., Susan, P., Evan, L. F., Stuart, S. 2002.Facilitation of pancreatic duct cannulation using a new synthetic porcine secretin. *American Journal of Gastroenterology*, Vol. 97, No. 9, Pag 2281.
- Benedict, M.D., Seymour F., Edward, P., Richard, T., Glen, A. L., Evan, L. F., Susan, P., Robert, R. N., Pául, J., Phillip, P. and Stuart S. 2003. A new synthetic porcine secretin for facilitation of cannulation of the dorsal pancreatic duct atercp in patient with pancreas divisum: a multicenter, randomized, double-blind comparative study. *Gastrointestinal Endoscopy*, Vol. 57, No, 6, Pag. 643.
- Biehl, R.R. y Baker, D.H.1996. Eficacy of supplemental 1a-hydroxycholecalciferol and microbial phytase for young pigs fed phosphorus- or amino acid-de Ecient corn-soyabean meal diets. *Journal of Animal Science* 74, 2960 - 2966.
- Boerma, D., Straatsburg, I.H., Offerhaus, J.A., Gouma, D.J. and Guilk, T.M. 2003. Experimental model of obstructive, chronic pancreatitis in pigs. *Diges. Surg.* Vol. 20, No. 6, pp. 520-526.

- Botermans, J. A. M., Svendsen, J., Svendsen, L. S. and Pierzynowski, S. G. 1999a. The exocrin pancreas in pig growth and performance. In: Pierzynowski and Zabielski (Editores). Biology of the pancreas in growing animal. Elseiver science, 1999, p 395-408.
- Botermans, J. A. M., Svendsen, J., Westrom, B. R. and Pierzynowski, S. G. 1999b. The effect of stress conditions on exocrine pancreatic secretion in growing pigs. *J. Animal Physiology And Animal Nutrition*. 1999, 82, Pp 150-162.
- Botermans, J. A. M. and Pierzynowski, S. G. 1999c. Relations between body weight, feed intake, daily weight gain, exocrine pancreatic secretion in chronically catheterized growing pigs. *J. Anim. Sci.* 77:450–456.
- Botermans, J. A. M., Hedemann, M.S., Sorhede-Winzell, M., Erlanson-Albertsson, C., Svendsen, J., Evilevitch, L. and Pierzynowski, S.G. 2000. The effect of feeding time (day versus night) and feeding frequency on pancreatic exocrine secretion in pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 83 (1), p.24-35.
- Bourdillon, J. 1951. Crystalline bean seed protein in combination with phytic acid. *Journal of Biological Chemistry* 189, 65 - 72.
- Boyce, A. A. y Walsh, G. 2004. A phytase enzyme-based biochemistry practical particularly suited to students undertaking courses in biotechnology and environmental science. *Biochemi and mol biolo educat*. Printed in U.S.A. Vol. 32, No. 5, pp. 336–340, 2004.
- Blanchard, P and Wright, F. 2000. Lees buffering more enzymes and organic acids. *Pig Prog*. 2000;16(3):23-25.

- Blank, R., Mosenthin, R., Sauer, M. C. and Huang, S. 1999. Effect of fumaric acid and dietary buffering capacity on ileal and fecal amino acid digestibilities in early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 77:2974–2984
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-252.
- Cadogan, D.J., Selle, P.H., Campbell, R.G. & Walker, A.R. 1997. Effects of dietary phytate phosphorus and microbial phytase on the performance of weaner pigs. In *Manipulating Pig Production*, vol. 6, p. 245 [PD Cranwell, editor]. Werribee, Victoria: Australasian Pig Science Association.
- Caldwell, R.A. 1992. Effect of calcium and phytic acid on the activation of trypsinogen and the stability of trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 43 - 46.
- Campbell, G.L. y Bedford, M.R. 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: A review. *Canadian Journal of Animal Science* 72, 449 - 466.
- Campbell, R.G., Harrison, D.T., Butler, K.J. & Selle, P.H. 1995. Effects of dietary available phosphorus and phytase (Natuphos) on the performance of pigs from 19 to 40 days post-weaning. In *Manipulating Pig Production*, vol. 5, p. 193 [DP Hennessy and PD Cranwell, editors]. Werribee, Victoria: Australasian Pig Science Association.
- Cera, K. R., Mahan, D. C. & Reinhart, G. A. 1989 Apparent fat digestibilities and performance responses of postweaning swine fed diets supplemented with coconut oil, corn oil or tallow. *J. Anim. Sci.* 67: 2040–2047.

- Cervantes, R. M. 2000 a. Canulación duodenal e ileal para estudios de digestión en cerdos. *Agrociencias*, Vol.34, No.2, Pp. 135-139.
- Cervantes, R. M. 2000 b. Utilización de enzimas exógenas en dietas para cerdos. VIII Congreso Internacional de Nutrición Animal. Chihuahua, México pp. 3-15.
- Cheeseman, M. T., Kelly, D. F. and Birnie. D.C. 1998. Heterotopic pancreas at a site of colon stricture and ulceration in a guinea pig. *Laboratory Animals*; 32, 219-222.
- Cheryan, M. 1980. Phytic acid interactions in food systems. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 13, 297 - 335.
- Close, W. H. 2000. Producing pigs without antibiotic growth promoters. *Advances in pork production*. Volume 11, pg. 47.
- Cranwell, P. D., Noakes, D. E. and Hill, K. J. 1976. Gastric secretion and fermentation in the young suckling pig. *Br. J. Nutr.* 36:71.
- Cromwell, G. L. 1996. The effects of phytase on phosphorus utilization in swine. *BASF Technical Symposium*. Des Moines, Iowa. pp. 70-93.
- Darwin, L. C., Zuccaro G., Vargo, J. J., Trolli, P. A., Frederick, M. D., Obuchowski. N., Dumot, J. A., Laughlin, C. 2003. An endoscopic pancreatic function test with synthetic porcine secretin for the evaluation of chronic abdominal pain and suspected chronic pancreatitis. *Gastrointestinal Endoscopy*, Vol. 57, No. 1, pp. 37-40.
- Debas, T. H. 1997. Molecular insights into development of the pancreas. *Am. J. Sur.* 1997; 174:227-231.

- De Boland, A.R., Garner, G.B. y O'Dell, B.L. 1975. Identification and properties of phytate in cereal grains and oilseed products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23, 1186 - 1189.
- Denis, O. K., Harrison, P. H., and Easter, R. A. 1994. Characterization of the nutritional interactions between organic acids and inorganic bases in the pig and chick. *J. Anim. Sci.* 1994. 72:1257-1262.
- Desphande, S.S. y Cheryan, M. 1984, Effects of phytic acid divalent cations and their interactions on α -amylase activity. *Journal of Food Science* 49, 516 - 519.
- Desphande, S.S. y Damadaran, S. 1989. Effect of phytate on solubility, activity and conformation of trypsin and chymotrypsin. *Journal of Food Science* 54, 695 - 699.
- Eeckhout, W. Y De Paepe, M. (1991). The quantitative effects of an industrial microbial phytase and wheat phytase on the apparent phosphorus absorbability of a mixed feed by piglets. *Medical Faculty Landbouw Rijkuniversiteit, Gent* 56,1643-1647.
- Edmonds, M. S., Izquierdo, O. A. and Baker, D. H. 1985. Feed additive studies with newly weaned pigs: Efficacy of supplemental copper, antibiotics and organic acids. *J. Anim. Sci.* 60:462.
- Erlanger, B.F., N. Kokowski and W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95:271-278.
- Falkowski, J. F. and Aherne, F. X. 1984. Fumaric and citric as feed additives in starter pig nutrition. *J Anim. Sci.* 58: 935-938.

- Fen, L. W., Feng, J., Rong, X. Z. and Yang, C.M. 2004. Effects of non-starch polysaccharides enzymes on pancreatic and small intestinal digestive enzyme activities in piglet fed diets containing high amounts of barley. *World J Gastroenterol*; 10(6): pp. 856-859.
- Fuller, R . 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66:365.
- Fumiaki, A., Ishibashi, N. and Shimamura, S.1994. Effect of administration of bifidobacteria and lacticacid bacteria to newborn calves and piglets. *J Dairy Sci.*, 78: 2838 – 2846.
- Gabert, V. M., Sauer, W. C., Li, S., Fan, M. Z. and Rademacher, M. 1996a. Exocrine pancreatic secretions in young pigs fed diets containing faba beans (*Vicia faba*) and peas (*Pisum sativum*): nitrogen, protein and enzyme secretions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70 (2), 1996 p.247-255.
- Gabert, V. M., Sauer, W.C., Li, S. Y. and Fan, M. Z. 1996b. Exocrine pancreatic secretions in young pigs fed diets containing faba bean (*Vicia faba*) and peas (*Pisum sativum*): concentrations and flows of total, protein-bound and free amino acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 70 (2), p.256-262.
- Gabert, V. M., Jensen, M. S., Jorgensen, H., Engberg, R. M., Jensen, S. K. 1996C. Exocrine pancreatic secretions in growing pigs fed diets containing fish oil, rapeseed oil or coconut oil. *J. Nutr*; 126:2076-2082.
- Gabert, V. M., Jorgensen, H. And Nyacochoti. 2001. Bioavailability of amono acids in feedstuffs for swine. In a.J. Lewis ans L.L. Southern (ed). *Swine nutrition.* Pp 151-186.

- Greiner, R., Konietzny, U. y Jany, K. D. (1993). Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303, 107- 113.
- Harper, A.F., E.T. Kornegay and T.C. Schell. 1997. Phytase supplementation of low phosphorous growing-finishing pig diets improves performance, phosphorous digestibility, and bone mineralization and reduces phosphorous excretion. *J. Anim. Sci.*, 75:3174-3186.
- Harris, W.D. and P. Popat. 1954. Determination of the phosphorus content of lipids. *Amer. Oil Chem. Soc. J.*, 31:124.
- Hee, J. H., Sauer, W.C., Berzins, R. and Ozimek, L. 1985. Permanent re-entrant diversion of porcine pancreatic secretions. *Can. J. Anim. Sci.* 65:451 ~ 457.
- Hee, J., Sauer, W. C. and Mosenthin. R. 1988. The effect of frequency of feeding on pancreatic secretions in the pig. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 60:249.
- Herskin, M.S. and Hedemann, M.S. 2001. Effects of surgical catheterization and degree of isolation on the behavior and exocrine pancreatic secretion of newly weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 79:1179–1188.
- Hibbard, B., J. P. Peters, R.Y.W. Shen and S.T. Chester. 1992. Effect of recombinant porcine somatotropin and dietary protein on pancreatic digestive enzymes in the pig. *J. Anim. Sci.*, 70: 2188-2194.
- Hu HL, Wise A & Henderson C (1996) Hydrolysis of phytate and inositol tri-, tetra-, and penta-phosphates by the intestinal mucosa of the pig. *Nutrition Research* 16, 781-787.

- Jacob S., Zabielski R., Mosenthin R., Valverde P., Evilevitch L., Kuria M., Rippe C., Sorhede, M. and Pierzynowski, S. 2001. Influence of intraduodenally infused olive and coconut oil on postprandial exocrine pancreatic secretions of growing pigs. *J. Anim. Sci.* 79:477–485.
- Jensen, B. B. 1998. The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *J. Anim Feed Sci.* 7 (Suppl 1):45-64.
- Jensen, M.S. and K. Jakobsen. 1997. Development of digestive enzymes in pigs with emphasis on lipolytic activity in the stomach and pancreas. *J. Anim. Sci.*, 75:437–445.
- Jones, D.B. y Csonka, F.A. 1925. Proteins of the cottonseed. *Journal of Biological Chemistry* 64, 673 - 683.
- Jongbloed, A. Mroz, Z. and Kemme, P. A. 1992. The effect of supplementary *Aspergillus niger* phytase in diet 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.
- Jongbloed, A., Kemme, P. A. and Mroz, Z. 1996. Phytase in swine ration: impact on
- Jorgensen, H., Gabert, V. M., Hedemann, M.S. and Jensen, S.K. 2000. Digestion of fat does not differ in growing pigs fed diets containing fish oil, rapeseed oil or coconut oil. *J. Nutr.* 130: 852–857.
- Juanpere, J., V.A.M Pérez., E. Angulo and J. Brufau. 2005. Assessment of potential interaction between phytase and glycosidase enzyme supplementation on nutrient digestibility in broilers. *Poultry Sci.*, 84:571-580.

- Ketaren, P.P., Batterham, E.S., Dettmann, E.B, & Farrell, D.J.1993. Phosphorus studies in pigs. 3. Effect of phytase supplementation on the digestibility and availability of phosphorus in soya-bean meal for grower pigs. *British Journal of Nutrition* 70, 289 - 311.
- Keulen, J.V. and B.A. Young. 1977. Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *J. Anim. Sci.*, 44:282-287.
- Kies, A. K., Van Hemert, K. H. F. and Sauer, W. C. 2001. Effect of phytase on protein and amino acid digestibility and energy utilization. *World Poult. Sci. J.* 57:109–125.
- Kirchgessner, M. B., Gedek, S., Wiehler, A., Eidelsburger, U. and Roth, F. X.1992. Influence of formic acid, calcium formate and sodiumhydrogencarbonate on the microflora in different segments of the gastrointestinal tract. Communication. Investigations about the nutritive efficacy of organic acids in the rearing of piglets. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 68:73–81.
- Knuckles, B.E., Kuzmicky, D.D., Gumbmann, M.R. and Betschart, A.A. 1989. Effect of myo-inositol phosphate esters on in vitro and in vivo digestion of protein. *Journal of Food Science* 54, 1348 - 1350.
- Kornegay, E.T. 1995. important considerations for using microbial phytase in swine diets. In: BASF Technical symposium. University of Illinois Pork Industry conference. P. 28. champaign.
- Kornegay, E.T. 1996a Nutritional, environmental and economic considerations for using phytase in pig and poultry diets. In *Nutrient Management of Food*

Animals to Enhance and Protect the Environment, pp. 277 - 302 [ET Kornegay, editor]. Boca Raton, FL: CRC Press.

Kornegay, E.T., Radcliffe, J.S. and Zhang, Z.1998. Influence of phytase and diet composition on phosphorus and amino acid digestibilities, and phosphorus and nitrogen excretion in swine. BASF Technical Symposium Preceding Carolina Swine Nutrition Conference, pp. 125 - 155. Mount Olive, NJ: BASF Corporation.

Krause, D. O., Harrison, P. C and Easter, R. A. 1994. Characterization of the nutritional interactions between organic acids and inorganic bases in the pig and chick. J. Anim. Sci. 72:1257-1262.

Laubitz, D., Zabielski, R., Wolinski, J., Nieminuszcz, J. and Grzesiuk, E. 2000. Physiological and chemical characteristics of antibacterial activity of pancreatic juice. J. of Physiol. and pharmacol. 54, 2, 283-290.

Laztity, R. and Laztity, L. 1995. Phytic acid in cereal technology. In: Advances in cereal science and technology. (Pomeranz, Y. Ed). American Association of Cereal Chemists. Pp. 309-372.

Lenis NP & Jongbloed AW (1999) New technologies in low pollution swine diets: diet manipulation and use of synthetic amino acids, phytase and phase feeding for reduction of nitrogen and phosphorus excretion and ammonia emission Review. Asian-Australasian Journal of Animal Science 12, 305±327.

Lindemann, M.D., S.G. Cornelius, S.M. Kandelgy, R.L. Moser and J.E. Pettigrew. 1986. Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme levels in the piglet. J. Anim. Sci., 62:1298.

- López, H.W., F. Vallery, M.A Levrat., Ch. Coudray, Ch Demigne and Ch. Rémésy 2000. Dietary phytic acid and wheat bran enhance mucosal phytase activity in rat small intestine. *J. Nutr.*, 130:2020-2025.
- Maenz. D.D., Engele-Schann, C.M., Newkirk, R.W. & Classen, H.L. 1999. The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytate-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. *Animal Feed Science and Technology* 77, 177 - 192.
- McCracken, B., Spurlock, M. E., Roos, M.A., Zuckermann, F.A. & Gaskins, H.R. 1999. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *Journal of Nutrition* 129, 613-619.
- Maga, J.A. 1982. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30, 1-9.
- Mahan, D. C., Wiseman, T. D., Weaver, E. and Russell, L. 1999. Effect of supplemental sodium chloride and hydrochloridric acid added to initial starter diets containing spray-dried blood plasma and lactose on resulting performance and nitrogen digestibility of 3 week old weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 77:3016-3021.
- Makkink, C. A. and Verstegen, M.W.A. 1990. Pancreatic secretion in pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 64: 190-228.
- Makkink C.A., Negulescu G.P., Qin G. and Verstegen M.W. 1994. Effect of dietary protein source on feed intake, growth, pancreatic enzyme activities and jejunal morphology in newly-weaned piglets, *Br. J. Nutr.* 72, 353–368.

- Marion, J., Biernat, M., Thomas, F., Savary, G., Le Breton, Y., Zabielski, R., Le Huërrou-Luron I. and Le Dividich, J. 2002. Small intestine growth and morphometry in piglets weaned at 7 days of age effects of level of energy intake. *Reprod. Nutr. Dev.* 42; 339–354.
- Marquardt, R. R. 1997. Enzyme enhancement of the nutritional value of cereals: role of viscous, water-soluble, nonstarchides in chicks performance. In: Marquardt, R.R., Zhengkang, H. Editors. *Enzymes in poultry and swine nutrition*. Booktique IDRC, Ottawa, Canada. 154p.
- Matsui, T., Nakagawa, Y., Tamura, A., Watanabe, C., Fujita, K., Nakajima, T. and Yano, H. 2000. Efficacy of yeast phytase in improving phosphorus bioavailability in a corn-soybean meal-based diet for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 78: 94-99.
- Mayra-Makinen, A., Manninen, M. and Gyllenberg, H. 1983. The adherence of lactic acid bacteria to the columnar epithelial cells of pigs and calves. *J. Appl. Bacteriol.* 55:241.
- Meyer J.H., Kelly G.A. 1976. Canine pancreatic response to intestinally perfused proteins and protein digest. *American Journal Physiology*; 231:682-691.
- Morales, M.M., Cervantes, R.M., Cuca, G.M., Figueroa, V.J., Pro, M.A., Araiza, P.B., Cervantes, R.M. y Torrentera, O.N. 2002. Digestibilidad ileal de aminoácidos y comportamiento productivo de cerdos alimentados con dietas a base de trigo, adicionados con una proteasa fungal. *Agrociencias*; Vol.36, No.2, pp. 515-522.

- Moran, T.H., Ameglio, P.J., Jackson, P.H., Schwartz, G.J., Mchugh. 1993. Blockade of type a, but not type b, cck receptors postpones satiety in rhesus monkeys. *American Journal Physiology*, 265: R620-R624.
- Mroz, Z., A.W. Jongbloed, A Kemme and N.P Lenis. 1991. Ileal and overall digestibility of nitrogen and amino acids in a diet for pigs as influenced by *Aspergillus niger* phytase and feeding frequency levels. Proc. 6th Int. Sym. Protein Metab. Nutr. Herning Denmark, 225 p.
- Mroz, Z., A.W. Jongbloed and A.P. Kemme. 1994. Apparent digestibility and retention of nutrient bound to phytate complexes as influenced by microbial phytase and feeding regimen in pigs. *J. Anim. Sci.*, 72:126-132.
- Mroz, Z, Jongbloed, A.W., Kemme. P.A. & Makinen. M.1995. Apparent ileal digestibility of amino acids and overall digestibility of crude protein and minerals in relation to microbial phytase and phytate levels in diets for growing/Finishing pigs. Rapport ID-DLO no. 276. Leystad, The Netherlands: DLO-Institute for Animal Science and Health.
- Mroz, Z., Jongbloed, A. W., Partanen, K. H., Vreman, K., Kemme, P.A. and Kogut J. 2000. The effects of calcium benzoate in diets with or without organic acids on dietary buffering capacity, apparent digestibility, retention of nutrients, and manure characteristics in swine. *J Anim Sci.* 78(10):2622–2632.
- Nelson, T. S., 1967. The utilization of phytate phosphorus by poultry. A review. *Poult. Sci.* 46:862-871.

- Niebergall, R. E., Teyssen, S. and Singer, M. V. 1997. Pancreatic exocrine studies in intact animals: historic and current Methods. *Lab. Anim. Sci.* Vol.47, No 6, 606-616.
- Niebergall, R. E. and SINGER, M. V. 2001. Central and peripheral neural control of pancreatic exocrine secretion. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 52, (4), 523—538.
- Niederau, C., J.H.Grendell and S.S. Rothman. 1986. Digestive end products release pancreatic enzymes from particular cellular pools, particularly zymogen granules. *Biochimica et Biophysica Acta*, 881:218-291.
- NRC. 1998. Nutrient Requirements of Swine. National Academy Press. 10th ed. Washington, D. C. 189p.
- Oberleas. D., Muhrer, M.E. & O'Dell, B.L. 1962. Effects of phytic acid on zinc availability and parakeratosis in swine. *Journal of Animal Science* 21, 57± 61.
- O'Dell, B.L. y De Boland, A. 1976. Complexation of phytate with proteins and cations in corn grain and oilseed meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24, 804 - 808.
- Officer, D.I. & Batterham, E.S. 1992. Enzyme supplementation of Linola™ meal. In Fourth Biennial Pig Industry Seminar, p 56. Wollongbar, NSW: Wollongbar Agricultural Institute.
- Okubo, K., Myers, D.V. y Lacobucci, G.A. 1976. Binding of phytic acid to glycinin. *Cereal Chemistry* 53, 513± 524.

- Olukosi, O.A., J.S. Sands and O. Adeola. 2007. Supplementation of carbohydrases or phytase individually or in combination to diets for weanling or growing finishing-pigs .*J. Anim. Sci.*, 85: 1702-1711.
- Osuji, P.A., I. Nsahlai and H. Kahlili. 1993. Feed evaluation. ILCA Manual. Internacional Livestock Center for Africa. 40 p.
- Owsley, W. F., Orr, D. E. and Tribble, L. F. 1986. Effects of age and diet on the development of the pancreas and the synthesis and secretion of pancreatic enzymes in the young pig. *J. Anim. Sci.* 63:497.
- Ozawa. K., Yabu-uchi, K., Yamanaka, Y., Ymashita, Y., Nomura. S. and Oku, I. 1983. Effect of *Streptococcus faecalis* BIO-4R on intestinal flora of weanling piglets and calves. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 15 13.
- Pagano, A.H., K.R. Roneker and X.G. Lei. 2007. Distribution of supplemental *Eschericia coli* AppA2 phytase activity in digesta of various gastrointestinal segments of young pigs. *J. Anim. Sci.*, 85:1444-1452.
- Partanen, K. H. and Mroz, Z. 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutr. Res. Rev.* 12:1–30.
- Pedersen, C., Laerke, H.N., Lindberg, J.E., Hedemann, M.S., Laurinen, P., and Knudsen E.B. 2003. Digestibility and performance in newly weaned piglets fed diets with contrasting fibre levels and fibre properties. 9th International Symposium On Digestive Physiology In Pigs, Banff, AB, Canada Volume 2, Page 128.
- Pekas, J. C. 1965. Permanent physiological fistula of the pancreas and other digestive glands. *J. Appl. Physiol.* 20:1082.

- Pierzynowski, S. G., Westrom, B. R., Karlsson, B. W., Svendsen, J., and Nilsson, B. 1988. Pancreatic cannulation of young pigs for long term study of exocrine pancreatic function. *Can. J. Anim. Sci.* 68:953.
- Pierzynowski, S.G., Westrom, B.R., Svendsen, J. and Karlsson B.W. 1990. Development of exocrine pancreas function in chronically cannulated pigs during 1-13 weeks of postnatal life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* Feb; 10(2):209-12.
- Pierzynowski, S.G., Sharma, P., Sobczyk, S. and Garwacki, S. 1992. Influence of feeding regiment and postnatal developmental stages on antibacterial activity of the pancreatic juice. *Int. J. Pancreatol.* 12:121-125
- Pierzynowski, S.G., Westrom, B.R., Erlanson-Albertsson, C., Ahre'n, B., Svendsen, J. and Karlsson, B.W. 1993. Induction of exocrine pancreas maturation at weaning in young developing pigs. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.* Apr; 16(3):287-93.
- Pierzynowski, S.G., Westrom, B.R., Svendsen, J., Svendsen, L. and Karlsson BW. 1995 Development and regulation of porcine pancreatic function. *Int J Pancreatol.* Oct; 18(2):81-94.
- Pollmann, D. S., Danielson, D. M., Peo, E. R. and Shahani, K. M. 1980. Effects of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 51577.
- Pointillart, A., Fontaine, N. and Thasset M. 1984. Phytate phosphorus utilization and intestinal phosphatases in pigs fed low phosphorus: wheat or corn diets. *Nutr. Rep. Int.* 29:473.

- Pointillart, A. 1993. Importance of phytates and cereal phytases in the feeding of pigs. In: *Enzymes in Animal Nutrition* (C. Wenk and M. Boessinger, Eds.). Proc. 1st Symp. Kartause Ittingen, Switzerland: 473.
- Prattley, C.A. & Stanley, D.W. 1982. Protein-phytate interactions in soyabeans. I. Localisation of phytate in protein bodies and globoids. *Journal of Food Biochemistry* 6, 243 - 253.
- Radberg, K., Botermans, J., Westrom, B. and Pierzynowski, S. 1999. Depressive effects of anesthesia or sedation on exocrine pancreatic function in pigs. *Laboratory Animal Science*, Vol. 49, No.6, p 662-664.
- Radcliffe, J. S., Zhang, Z. and Kornegay, E. T. 1988. The effect of microbial phytase, citric, acid and their interaction in a corn soybean meal based diet for weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 7: 1880-1886.
- 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 calve cannulas. *J. Anim. Sci.*, 84:119-1129.
- Rantzer, D., Kiela, P., Thaela, M.J., Svendsen, J., Ahre, N.B., Karlsson, S. and Pierzynowski, S. G. (1997) Pancreatic exocrine secretion during the first days after weaning in pigs. *J. Anim. Sci.* 75: 1324–1331.
- Rantzer, D., Svendsen, J. and Westrom B. 1995. Weaning of pigs raised in sow-controlled and in conventional housing systems. *J. Agric. Res.* 1995, 25:37.
- Ravindran, V. 1995. Phytases in poultry nutrition. An overview. *Proceedings of the Australian Poultry Science Symposium*, vol. 7, pp. 135 - 139 [D Balnave,

- editor]. Sydney, NSW Poultry Research Foundation and The World's Poultry Science Association.
- Ravindran V., Bryden, W.L. and Kornegay, E.T. 1995. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poultry and Avian Biology Reviews* 6, 125-143.
- Ravindran, V., P.H Selle and W.L Bryden. 1999. Effects of phytase supplementation, individually and in combination, with glycanase, on the nutritive value of wheat and barley. *Poultry Sci.*, 78:1588-1595.
- Reddy, N. R., Sathé, S. K. and Salunkhe, D. K. 1982. Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.* 28: 1-92.
- Reddy, N.R., Sathe, S.K. and Pierson, M.D.1988. Removal of phytate from great northern beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science* 53, 107± 147.
- Ries de Sousa T. C., Mar Botello, B y Mariscal, G. L. 2000. Canulación de cerdos posdestete para pruebas de digestibilidad ileal: desarrollo de una metodología. *Técnica Pecuaria México*; Vol. 38, No. 2, Pp. 143-150.
- Ries de Sousa, T. C., Marisca, G.L. and Aguilera, B.A. 2002. Empleo de dos fuentes de lactosa en la dieta de lechones y sus efectos en el aparato digestivo. *Técnica Pecuaria México*: 40(3); Pp 299-308.
- Risley, C. R., Kornegay, E. T., Lindemann, M. D., Wood, C.M. and Eigel, W.N. 1992. Effect of feeding organic acids on selected intestinal content measurements at varying times postweaning in pigs . *J. Anim. Sci.* 70:196-206.

- Romero, N. C. 2006. Implantación quirúrgica de una cánula en el conducto pancreático en cerdos. Tesis de Maestría en Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. 55 p.
- Roth, F. X. and Kirchgessner, M. 1998. Organic acids as feed additives for young pigs: Nutritional and gastrointestinal effects. *J. Anim. Feed Sci.* 7:25–33.
- Sauer, W., Dugan, M., de Lange, K., Imbeah, M. & Mogenthin, R. 1989. Considerations in methodology for the determination of amino acid digestibilities in feedstuffs for pigs. In *Absorption and Utilization of Amino Acids*, vol. 3, pp. 217± 230 [M Friedman, editor]. Boca Raton, FL: CRC Press.
- SAS. 1999. SAS User's Guide Statistics, version 8.1. SAS Inst. Inc., Cary, North Carolina.
- Schnoor, J., Bartz, S., Klosterhalfen, B., Kuepper, W., Rossaint, R. and Unger, J. 2003. A long-term porcine model for measurement of gastrointestinal motility. *Labor Anim*; 37, 145–154.
- Schwarz, G. y Hoppe, P.P. 1992. Phytase enzyme to curb pollution from pigs and poultry. *Feed Magazine* 1:22-26.
- Selle, P. H., Ravindran, V., Caldwell, R. A. and Bryden, W. L.. 2000. Phytate and phytase: Consequences for protein utilization. *Nutr. Res. Rev.* 13:255–278.
- Simons PCM, Versteegh HAJ, Jongbloed AW, Kemme PA, Slump P, Bos KD, Wolters MGE, Beudeker RF y Verschoor GJ (1990) Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *British Journal of Nutrition* 64, 525 - 540.

- Sharma, C.B., Goel, M. y Irshad, M. 1978. Myoinositol hexaphosphate as a potential inhibitor of α -amylases. *Phytochemistry* 17, 201± 204.
- Singh, M. y Krikorian, A,D, 1982. Inhibition of trypsin activity by phytate. *J of Agricul and Food Chemis.*30: 799-800.
- Somogyi, L., Cintron, M. and Toskes, P.P. 2002. Synthetic porcine secretin is highly accurate in pancreatic function testing in individuals with chronic pancreatitis. *Pancreas*, Vol. 21, No. 3, pp. 262–5.
- Slavin, W. 1968. *Atomic Absortion Spectroscopy*. John Wiley and Sons, N. Y., N.Y.
- Steel, R.G.D. y J.H. Torrie. 1996. *Bioestadística: Principios y Procedimientos Segunda Edición*. McGraw- Hill. 622 p.
- Stone, P. G. y Savine, R. 1999. Grain quality and its physiological determinants. In: *Wheat: Ecology ans physiology of yield determination*. (E.H: Satorro and G. A. Slafer eds). Food Products Press. Binghampton, NY. 504p.
- Thaela, M. J., Pierzynowski, S. G., Jensen, M. S., Jakobsen, K., Westrom, B. R. and Karlsson, B. W. 1995. The pattern of the circadian rhythm of pancreatic secretion in fed pigs. *J. Anim. Sci.*73:3402.
- Thaela, M.-J., Jensen, M. S., Pierzynowski, S. G., Jakob, S. and Jensen, B. B. 1998. Effect of lactic acid supplementation on pancreatic secretion in pigs after weaning. *J. Anim. Feed Sci.* 7(Suppl. 1):181–183.
- Tatham, A S., Shewry, P. R. and Belton, P. S. 1995. Structural studies of cereal prolamines. Including wheat gluten. In: *Advances Association of cereal Chimestris*. pp 18-78.

- Thompson, L.U. y Yoon, J.H. 1984. Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. *Journal of Food Science* 49, 1228 - 1229.
- Turk. M., Sandberg, A.S., Carlsson. N.G. and Andlid. T. 2000. Inositol hexaphosphate hydrolysis by baker's yeast. Capacity, kinetics and degradation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 100-104.
- Underkofler, L. A., Barton, R.R. and Rennert, S.S.1958. Micribial Process report. Production of microbial enzymes and their applications. *Appl. Microbiol.* 6(3):212-220.
- Vaintraub, I.A. y Bulmaga, V.P. 1991. Effect of phytate on the in vitro activity of digestive proteinases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 859 - 861.
- Van Soest, P J., J.B. Robertson and B.A. Lewis. 1991. Symposium: Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3697.
- Vohra, P., G.A. Gray and F.H. Kratzer. 1965. Phytic acid-metal complexes. *Proc.Soc. Exp. Biol. Med.* 120:447-449.
- Weremko, D., Fandrejewski, H., Zebrowska, T., Han, K., Kim, J.H. y Cho, W.T. (1997). Bioavailability of phosphorus in feeds of plant origin for pigs. Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 10, 551- 556.
- Winnicki, T. and Brzeski, W. 1997. An evaluation of a new method for collection of exocrine pancreatic secretion in the pig. *Can. J. Anim. Sci.* 77: 339-341.
- Xu, R.J., Wang, T. and Zhang, S.H. 1999. Functional structure and growth of the pancreas in posnatal growing animals. In: Pierzynowski and Zabielski

- (Editores). Biology of the pancreas in growing animal. Elsevier science, 1999, p.15-26.
- Yi, Z. y Kornegay, E.T. 1996. Sites of phytase activity in the gastrointestinal tract of young pigs. *Animal Feed Science and Technology* 61, 361 - 368.
- Yin, Y. L., Mcevoy, J. D. G., Schulze, H. and Mccracken, K.J. 2000. Studies on cannulation method and alternative indigestible markers and the effects of food enzyme supplementation in barley-based diets on ileal and overall apparent digestibility in growing pigs. *Animal Science* 70, 63-72.
- Zabielski R. and Gill, J. 2003. Gastroenterological research in domestic animals past, present and future perspectives. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54, S3, 263-281.
- Zhang, Z. B., Kornegay, E.T., Radcliffe, J.S., Wilson, J.H. and Veit, H.P. 2000. Comparison of phytase from genetically engineered *Aspergillus* and canola in weanling pig diets. *Journal of Animal Science* 78: 2868- 2878.