

Digestibilidad de fósforo y proteína de raciones suplementadas con fitasa en tilapia, *Oreochromis sp.*

Phosphorous and protein digestibility in phytase-supplemented rations in tilapia, *Oreochromis sp.*

Digestibilidade do fósforo e da proteína de rações suplementadas com fitasa em tilápia, *Oreochromis sp.*

Wilson E. Rueda-Uribe¹, Wálter Vásquez-Torres^{2*}, Mariana C. Gutiérrez-Espinosa^{3*}

¹ MVZ, MSc, Universidad Santo Tomas de Aquino

² Biólogo, PhD,

³ Zootecnista, MSc.

* Instituto de Acuicultura - Universidad de los Llanos, Grupo GRANAC

Email: weru77@gmail.com

Recibido: agosto 24 de 2011

Aceptado: enero 24 de 2012

Resumen

El presente estudio tuvo por objeto evaluar el efecto de la suplementación de fitasa sobre la digestibilidad del fósforo y la proteína del gluten de maíz (GM), harina de trigo duro (HTD) y soya integral cruda (SI) en dietas para tilapia roja, *Oreochromis sp.* Para calcular los coeficientes se utilizó el método indirecto con marcador de óxido de cromo III, recolectando las heces por el sistema Guelph modificado. Se seleccionaron juveniles de Tilapia roja, *Oreochromis sp.*, con un peso promedio de 100 g. Las raciones estaban constituidas por dieta referencia (DR) (69.5%), 0.5% de marcador inerte (óxido de cromo III), el ingrediente a evaluar (30%) y para cada uno de ellos, fitasa en niveles de 0.0, 500 y 1000 Unidades de fitasa (UDF)/kg dieta. Los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) de la proteína obtenidos fueron: sin inclusión de fitasa 94.7, 84.5 y 90.3%, con 500 UDF 95.1, 84.1 y 89.3% y con 1000 UDF 97.6, 90.8 y 92.9% para GM, HTD y SI respectivamente; en cuanto a CDA del fósforo los resultados para GM variaron entre 30.7% y 69.8%, para HTD entre 46.6% y 51.1% y entre 44.0% y 54.7% para SI. Los CDA de la proteína y fósforo de la soya integral y del trigo duro no fueron afectados significativamente por el nivel de adición de la fitasa ($P>0.05$); sin embargo, los CDA de la proteína y el fósforo mostraron tendencia a ser mayores cuando se adicionó 1000 UDF. Los CDA de la proteína del gluten de maíz mostraron diferencias significativas entre la dieta de 0 UDF de fitasa y la que tenía 1000 UDF ($p<0.05$) y para el CDA del fósforo las diferencias se presentaron entre 500 UDF y 1000UDF.

Palabras claves: Nutrición, Coeficientes de digestibilidad aparente, ácido fítico, peces.

Abstract

The present study was aimed at evaluating the effect of phytase supplement on the digestibility of phosphorous and protein in corn gluten (CG), hard wheat flour (HWF) and whole soya (WS) in red tilapia (*Oreochromis sp.*) diets. The chromium III oxide indirect labelling method was used for calculating the coefficients; fish faeces were collected using the modified Guelph system. Juvenile red tilapia weighing 100 g were selected. The rations consisted of reference diet (RD) (69.5%),

0.5% inert marker (chromium III oxide), the ingredient to be evaluated (30%) and phytase in 0.0, 500 and 1,000 units of phytase (PU)/kg diet for each of them. The apparent digestibility coefficients (ADC) for the proteins obtained were 94.7%, 84.5% and 90.3% without including phytase, 95.1%, 84.1% and 89.3% with 500 PU and 97.6%, 90.8% and 92.9% with 1,000 PU for CG, HWF and WS respectively. Regarding phosphorous ADC, the results for CG varied from 30.7% to 69.8%, 46.6% to 51.1% for HWF and 44.0% to 54.7% for WS. WS and HWF protein and phosphorous ADC were not significantly affected by added phytase level ($p>0.05$); however, protein and phosphorous ADC tended to be greater when 1,000 PU were added. CG protein ADC had significant differences between the diet including 0 PU of phytase and that containing 1,000 PU ($p<0.05$); there were phosphorous ADC differences between 500 PU and 1,000 PU.

Key words: Nutrition, apparent digestibility coefficient, phytic acid, fish.

Resumo

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação da fitasa na digestibilidade do fósforo y da proteína dos ingredientes glúten de milho (GM), farinha de trigo duro (HTD) e soja integral crua (SI) em dietas para tilápia vermelha, *Oreochromis sp.* Para calcular os coeficientes foi utilizado o método indireto com marcador de óxido de cromo (III), coletando as fezes pelo sistema Guelp modificado. Foram selecionados juvenis de tilápia vermelha com 100 gramas de peso médio. As dietas estavam constituídas de 65.5% da dieta referência (DR), 0.5% de marcador inerte (óxido de cromo III), 30% do ingrediente a avaliar e, em cada uma delas, fitasa em níveis de 0.0, 500 e 1000 unidades de fitasa (UDF)/kg de ração. Os Coeficientes de Digestibilidade Aparente (CDA) da proteína obtidos foram: sem inclusão de fitasa, 94.7, 85.5 e 90.3%, com 500 UDF 95.1, 84.1 e 89.3% e com 1000 UDF, 97.6, 90.8 e 92.9 para GM, HTD e SI respectivamente. Quanto ao CDA do fósforo, os resultados para GM variaram entre 30.7 e 69.8%, para HTD entre 46.6 e 51.1% e para SI, entre 44.0 e 54.7%. Os CDA da proteína e do fósforo da SI e da HTD não foram afetados pelo nível de adição da fitasa ($p>0.05$); porém, os CDA da proteína e do fósforo mostraram tendência a ter maior valor quando foram adicionadas 1000 UDF. Os CDA da proteína do glúten de milho mostraram diferenças significativas entre a dieta sem fitasa e aquela que tinha 1000 UDF ($p<0.05$); para o fósforo, as diferenças nos CDA foram observadas entre os níveis de 500 e 1000 UDF.

Palavras chave: nutrição, coeficientes de digestibilidade aparente, ácido fítico, peixe

Introducción

La acuicultura mundial continua creciendo más rápidamente que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal, siendo del 6.6% promedio anual desde la década del 70 (FAO, 2009). Como parte de ella, la piscicultura intensiva y semiintensiva ha tenido rápida expansión en los recientes años demandando permanentes avances en aspectos diversos, entre otros, formulación y elaboración de dietas balanceadas de bajo impacto ambiental.

Inherente a la práctica de la acuicultura intensiva la generación de residuos que causan impacto negativo sobre el ambiente acuático es un hecho común (Bureau *et al.*, 1999). Se ha demostrado que la baja digestibilidad de las dietas suministradas a los peces incrementa la carga de los efluentes en los sistemas como resultado de mayores contenidos de nutrientes en la heces (Rodehutsord *et al.*, 2000 ; Bock *et al.*, 2006).

Una condición que debe regir el desarrollo de dietas con baja carga contaminante es el uso de ingredientes de alta digestibilidad (Cho y Bureau, 2001). Estos aspectos permitirán la obtención de mejores resultados de conversión alimenticia, aumento de las tasas de crecimiento, mayor desempeño de los peces y lo

más importante, reducción del impacto ambiental negativo generado por el uso de alimentos artificiales (Vásquez-Torres *et al.*, 2010).

El fósforo (P) es un mineral esencial para los animales porque es vital en estructuras óseas, hace parte de moléculas como el ATP y GTP, ARN y ADN, de fosfolípidos y de enzimas diversas (Vásquez-Torres, 2004). El P contenido en las materias primas se encuentra en la forma orgánica e inorgánica, principalmente como ortofosfatos (PO_4^{3-}). La hidrólisis del P orgánico en el tracto gastrointestinal libera PO_4^{3-} , que es la única forma en que el animal puede absorberlo y utilizarlo (Lall, 2002). En los ingredientes de origen vegetal, especialmente en cereales y sus subproductos, entre un 60-80% del P se encuentra como ácido fítico (AF) y su biodisponibilidad para peces es muy baja (NRC, 1993). En su estado nativo el AF se presenta en la forma de fitatos que son complejos con el P y con otros cationes (Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}). En situaciones normales, la mayor parte del P fítico contenido en la dieta es eliminado con las heces generando problemas de contaminación ambiental y estimulando el proceso de eutrofización en los sistemas de cultivo (Nwana y Schwarz, 2008). La acción adversa del AF también puede afectar la actividad de algunas enzimas digesti-

vas reduciendo la digestibilidad de las proteínas de la dieta (Guillaume *et al.*, 2004); en animales monogástricos se ha demostrado que a pH bajo, el AF se une con los residuos básicos (grupo amino) de la lisina, arginina e histidina formando complejos insolubles que cambian la estructura de las proteínas y por tal razón reducen su solubilidad y su digestibilidad (Adeola y Sands, 2003) en salmónidos (Guillaume *et al.*, 2004) se refieren a un efecto depresivo del ácido fítico en la utilización de las proteínas.

La hidrólisis del AF solamente es posible mediante la acción de las fitasas (mioinositol hexafosfato fosfohidroxilasas), enzimas que son producidas por microorganismos (hongos y bacterias) que degradan el AF en sus sales (fitatos) liberando inositol, inositol monofosfato y fosfato orgánico (Kumar *et al.*, 2011). En aves Ravindran *et al.* (1999) demostraron que la fitasa también destruye los complejos con aminoácidos liberando las proteínas y mejorando con esto su digestibilidad. Esto implica que la problemática de la contaminación ambiental por minerales puede reducirse hasta en un 50% cuando se utilizan alimentos ricos en fitasas naturales o se adicionan fitasas exógenas.

Las fitasas de origen fúngico son producidas por numerosas especies. La mayoría de ellas dan lugar a enzimas extracelulares, siendo el género *Aspergillus* el principal microorganismo utilizado como fuente en la actualidad (Rebolla y Mateos, 1999). La capacidad de la fitasa de origen fúngico para hidrolizar el P fítico ha sido ampliamente demostrada en especies, carnívoras como trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss*, (Dalsgaard *et al.*, 2009) y hasta omnívoras como jundiá, *Rhamdia quelen*, (Rocha *et al.*, 2007), entre otras. Se ha demostrado que la incorporación de fitasa en las dietas puede mejorar la utilización del fósforo (Gonçalves *et al.*, 2007) y podría aumentar la disponibilidad de la proteína de ingredientes de origen vegetal (Liebert y Portz, 2005). Considerando los posibles beneficios del uso de este compuesto en dietas para peces, se realizó esta investigación con el objetivo de determinar el efecto de la suplementación con fitasa de origen fúngico sobre la digestibilidad del fósforo y de la proteína de tres materias primas utilizadas en la fabricación de raciones para tilapia roja híbrida, *Oreochromis sp.*

Materiales y métodos

Localización

Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio Experimental de Alimentación y Nutrición de Peces (LEANP) de la Estación Piscícola del Instituto de Acuicultura

de la Universidad de los Llanos (IALL), ubicado en el kilómetro 4 vía Puerto López, en la vereda Barcelona del Municipio de Villavicencio, Departamento del Meta, Colombia (Latitud 4° 4'25.06" Longitud N 73°34'56.63"O) a 386 m.s.n.m.

Material biológico y unidades experimentales

Se adquirieron en una granja comercial de la región 800 alevinos de tilapia roja, *Oreochromis sp.*, fueron alimentados en estanques hasta cuando alcanzaron un peso promedio de 100 g. Se conformaron cuatro grupos de 180 animales cada uno y se trasladaron a piletas circulares de 3500L de capacidad donde permanecieron por dos semanas en período de aclimatación a las condiciones experimentales, alimentados con una dieta de referencia semipurificada (Tabla 1). Para la colecta de heces se usó una batería de nueve tanques de fibra de vidrio de 200L con fondo cónico (Sistema Guelph modificado) cada tanque estaba abastecido con agua a una tasa de 1 L/min reciclándola a través de un sistema de biofiltros en serie con el fin de mantener constante los parámetros fisicoquímicos de calidad (temperatura 26±1,2 °C, pH 7,1 ± 0,2, dureza >40 ppm y concentración de nitritos, nitratos y amonio <0,02). Cada tanque estaba provisto de un dispositivo para airear el agua en forma permanente y mantener el nivel de oxígeno superior a 60% de saturación. La calidad del agua fue controlada una vez por semana utilizando sonda Orión 5 StarThermo (USA).

Dietas experimentales

Como base para la formulación de las dietas experimentales (Tabla 1) se empleó la dieta de referencia semipurificada (DR) propuesta por Vásquez-Torres *et al.* (2002).

Las materias primas (MP) evaluadas fueron: gluten de maíz (GM), trigo duro (HTD) y soya integral cruda (SI). Para cada MP fue elaborada una dieta experimental compuesta por una mezcla de 69.5% de DR, 30% de la MP, 0.5% de óxido de cromo III (Cr₂O₃) como marcador inerte y fitasa de origen fúngico (RONOZYME® P5000 – *Aspergillus oryzae*) en cantidades equivalentes a 0.0 (dieta 1 o control), 500 y 1000 UDF/kg dieta (Tabla 2).

Las MP fueron pulverizadas, mezcladas con la DR y el marcador inerte y sometidas al proceso de extrusión a 123 °C (micro-extrusora Extec®, Riberão Preto -Brasil). Posteriormente se adicionó la fitasa diluida en agua por proceso de aspersión manual para evitar alteraciones en su estructura por efecto del aumen-

to de la temperatura durante el proceso de extrusión (temperaturas >70 °C puede causar inactivación parcial o total); las dietas se secaron en horno a temperatura de 45 °C y se almacenaron en bolsas plásticas con cierre hermético. La composición proximal de las materias primas evaluadas y de las dietas experimentales se muestra en la tabla 3.

Tabla 1. Composición de ingredientes de la dieta referencia semipurificada utilizada como base para la elaboración de las dietas experimentales.

Ingredientes	g/100g dieta
Caseína ¹	33.3
Gelatina ²	3.4
Dextrina	40.0
Alfa-Celulosa	14.1
Aceite de pescado	2.4
Aceite vegetal	2.4
Premezcla Vitaminas ³	0.2
Premezcla microminerales ⁴	0.1
Premezcla macrominerales ⁵	4.0
Vitamina C ⁶	0.1

¹ Composición analizada: MS 93 %; PB 86,42 %; lípidos 2,29%, cenizas 3,66%.

² Composición analizada: MS 91%; PB 94,02%.

³ Rovimix Vitaminas® Lab. Roche S.A: Vit A 8.0*10⁶ UI, Vit D3, 1.8*10⁶ UI, Vit E 66.66 g, Vit B1 6.66 g, Vit B2 13.33 g, Vit B6 6.66 g, Pantotenato de Ca 33.33 g, Biotina 533.3 mg, Ac. Fólico 2.66 g, Ac. Ascórbico 400.0 g, Ac. Nicotínico 100.0 g, Vit B12 20.0 mg, Vit K3 6.66 g, vehículo csp 1.0 kg.

⁴ Premix microminerales® Lab. Roche S.A.: Composición por 100 g: Magnesio 1.0, Zinc 16.0, Hierro 4.0, Cobre 1.0, Yodo 0.5, Selenio 0.05. Cobalto 0.01.

⁵ Composición por 100 g de mezcla: Ca(H₂PO₄) 13,6 g; Lactato de Ca 34,85 g; 2MgSO₄.7 H₂O, 13,2 g; KH₂PO₄ 24.g; NaCl 4.5 g; AlCl₃ 0.015 g, CMC 9.835 g.

⁶ Rovimix Stay-C35® DSM.

Colecta de heces

Después del período de aclimatación en las piletas circulares de 3500 litros cada grupo de animales fue alimentado con las dietas experimentales durante 5 días; el último día, pasadas 10 horas después de suministrar la ración de la mañana (tiempo medio de tránsito gastrointestinal en esta especie), los peces fueron transferidos a los tanques del sistema Guelph modificado ubicando aleatoriamente 20 animales por tanque de 200 L para la recolección de heces a intervalos de una hora durante 14 horas; cada tres tanques conformaron una repetición de tres planeadas para cada set experimental. Los peces fueron devueltos a las piletas en donde permanecieron en descanso durante cinco días alimentados con la DR y luego se procedió con la siguiente dieta experimental. Este procedimiento se utilizó para las nueve dietas experimentales (tres ingredientes cada una con tres niveles de inclusión de fitasa).

Inmediatamente retiradas las heces del tanque colector se eliminó el agua en exceso y luego se deshidrataron en un horno a una temperatura de 60°C por 24 horas. Seguidamente se pulverizaron en micromolino (Science ware) y se almacenaron a -17°C para realizar los análisis de contenido proteico, energía, fósforo y concentración de óxido de cromo III.

Tabla 2. Composición de las dietas experimentales.

Ingredientes (%)	Dieta								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DR*	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5
Cr ₂ O ₃	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
GM		30			30			30	
HTD	30			30			30		
SI			30			30			30
Fitasa (UDF /kg dieta)*	0	0	0	500	500	500	1000	1000	1000

* DR: Dieta de Referencia; Cr₂O₃: óxido de cromo III (marcador inerte); GM: glúten de maíz; HTD: harina de trigo duro; SI: Soya integral; UDF: unidades de fitasa (RONOZYME® P5000)

Tabla 3. Composición química analizada de las materias primas (MP) y de las dietas experimentales.

MP	Dietas	MS (%)	% MS*				EB (kcal/kg)
			PB	EE	P	CZ	
GM		91.7	57.7	2.1	0.49	1.8	5546
HTD		88.8	12.1	1.9	0.33	1.8	4214
SI		86.3	34.3	19.8	0.61	5.8	5745
	DR	90.6	24.5	1.6	0.55	3.8	4482
	DR + GM	88.0	34.8	2.6	0.55	2.8	4782
	DR + HTD	87.2	20.7	1.6	0.47	3.1	4469
	DR +SI	94.5	27.3	3.6	0.70	5.4	4959

* MS: Materia seca, PB: Proteína bruta, EE: Extracto etéreo, P: Fósforo total, Cz: Cenizas y EB: Energía bruta (determinada en bomba calorimétrica, PARR 121EA)

Análisis de laboratorio

Los análisis de composición proximal de las materias primas, dietas y heces, se realizaron con base en materia seca y por triplicado, conforme a las metodologías estándar descritas por la (AOAC, 1995). La energía bruta fue medida en bomba calorimétrica PARR (121EA, USA). Para la determinación de la concentración de fósforo se empleó el método colorimétrico del ácido vanadomolibdoyodofosfórico (AOAC, 1995); las muestras se leyeron en espectrofotómetro (Spectronic® 20 Genesys) a 420 nm de absorbancia. La concentración de óxido de cromo (Cr₂O₃) en la dieta referencia, las dietas experimentales y en las heces, se determinó por el método de digestión ácida propuesto por (Furukawa y Tsukahara, 1966). Para estimar los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) de fósforo y proteína de las diferentes materias primas se recurrió al método indirecto, propuesto por (Cho *et al.*, 1985). El coeficiente de digestibilidad aparente del fósforo y de la proteína, tanto de la dieta referencia como de las experimentales, se calculó utilizando la ecuación de Nose (1960):

$$CDANut(\%) = 100 - \left(100 \times \left(\frac{\%Cr2O3d}{\%Cr2O3h} \times \frac{\%Nuth}{\%Nutd} \right) \right)$$

Donde:

- CDANut(%) = Coeficiente de digestibilidad aparente del Nutriente
- %Cr₂O₃d = Porcentaje de óxido de cromo de la dieta
- %Cr₂O₃h = Porcentaje de óxido de cromo de las heces
- %Nuth = Porcentaje del nutriente en las heces.
- %Nutd = Porcentaje del nutriente en la dieta

La digestibilidad total de cada materia prima se estableció teniendo en cuenta la ecuación descrita por Bureau *et al.* (1999):

$$CDAM_p = CDANutde + \left[(CDANutde - CDANutds) * \frac{X * Dds}{Y * Ding} \right]$$

Donde:

- CDA_{MP}(%) = Coeficiente de digestibilidad aparente del nutriente de la Materia Prima.
- CDANutde = Coeficiente de digestibilidad aparente del Nutriente en la dieta experimental.
- CDANutds = Coeficiente de digestibilidad aparente del Nutriente en la dieta semipurificada.
- D_{ds} = % del nutriente en la dieta semipurificada
- D_{ing} = % del nutriente de la materia prima evaluada.
- X = Proporción de la dieta semipurificada (69.5%).
- Y = Proporción de la materia prima (30%).

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental se basó en un modelo completamente al azar, tres tratamientos con tres réplicas para cada una de las materias primas seleccionadas. Los resultados de las variables fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de significancia de P<0.05; las medias que presentaron diferencias significativas fueron comparadas utilizando el test de Tukey (P<0.05). Los análisis fueron realizados utilizando software SAS/STAT® versión 9.0 para Windows.

Resultados

Los datos de composición proximal de las materias primas evaluadas, presentados en la tabla 3, son similares a los reportados por otros investigadores (Köprücü y Özdemir, 2005; Silva *et al.*, 2005). El uso de estos ingredientes de origen vegetal es común en la industria de las raciones comerciales para peces como alternativa para reducir el uso de harina de pescado (Riche y Brown, 1996; Biswas *et al.*, 2007; Lim y Lee, 2009) que es un insumo cada día más costoso y escaso en el mundo (FAO, 2009).

En la tabla 4 se presentan los valores de los Coeficientes de Digestibilidad Aparente (CDA) de proteína y fósforo de las materias primas seleccionadas, con y sin adición de fitasa. El nivel de fitasa no influyó significativamente en los CDA de la proteína y fósforo de la SI y de la HTD ($p > 0.05$). Para el GM el nivel de fitasa aumentó la digestibilidad de la proteína significativamente cuando se emplearon 1000 UDF ($p < 0.05$).

Discusión

Uno de los limitantes del empleo de materias primas de origen vegetal en la alimentación de animales es la presencia de factores anti nutricionales como el ácido fítico; este compuesto atrapa el fósforo y restringe su biodisponibilidad para los monogástricos en general (incluidos los peces), debido a que ellos no producen la enzima fitasa que es la encargada de romper los

enlaces de esta molécula para hacer que los minerales queden disponibles (Liebert y Portz, 2007; Dalsgaard *et al.*, 2009). Generalmente entre 60 y 70% del fósforo presente en materias primas de origen vegetal se encuentra en la forma de fósforo fítico (Liebert y Portz, 2007); en el presente experimento los CDA de P de los tres ingredientes investigados arrojaron valores de 46.6, 47.9 y 53.7% para HTD, GM y SI respectivamente, en las dietas sin adición de fitasa; esto indicó que apenas un poco más de la mitad del P presente era biodisponible como nutriente para la tilapia roja; esos valores fueron mayores que los reportados para tilapia nilótica por Köprücü y Özdemir (2005) quienes solo obtuvieron un 30.1% para la soya integral y de 28.2% para el gluten de maíz; en una investigación realizada con tilapia, Liebert y Portz (2007) evaluaron la digestibilidad del P contenido en una dieta compuesta por una mezcla de estos tres ingredientes, más harina de maíz y obtuvieron un CDA de 43.1%, valor que fue menor que el promedio de 49.5% observado en el presente experimento; comparando con otros trabajos, los resultados obtenidos en esta investigación fueron concordantes con los coeficientes observados en dietas que contenían estos tres ingredientes en dietas para carpa común (Nwana y Schwarz, 2007), para el pez loro (*Oplegnathus fasciatus*) (Lim y Lee, 2009) y para róbalo rayado (*Moronesaxatilis*) (Hughes y Soares Jr., 1998), entre otros.

Tabla 4. Coeficientes de digestibilidad de la proteína y del fósforo de las materias primas evaluadas por efecto de la suplementación con fitasa (Tratamientos = 9, n = 3).

Materia Prima	UDF /(kg dieta)	CDA	
		Proteína	Fósforo
GM	0	94.7 0.7 ^a	47.9 15.0 ^{ab}
	500	95.1 1.2 ^{ab}	30.7 17.7 ^b
	1000	97.6 1.2 ^b	69.8 4.80 ^a
HTD	0	84.5 5.4	51.1 21.1
	500	84.1 3.7	46.6 8.80
	1000	90.8 7.7	50.4 6.30
SI	0	90.3 0.8	53.7 14.3
	500	89.3 1.7	44.0 20.4
	1000	92.9 2.1	54.7 7.20

Medias seguidas por letras diferentes en las columnas para cada materia prima indican diferencias significativas ($p < 0.05$) por test de Tukey.

La eficacia de la incorporación de fitasa en dietas para liberar minerales atrapados en los complejos del ácido fítico de materias primas de origen vegetal ha sido investigada en diferentes peces con resultados que indican que el nivel óptimo de suplementación difiere entre estudios y entre especies (Cheng y Hardy, 2003); en esta investigación la adición de fitasa de origen microbiano mostró tendencia a mejorar los CDA de fósforo contenidos en los tres ingredientes evaluados, sin embargo las diferencias entre tratamientos solamente fueron significativas para el GM con la incorporación de 1000 UDF.

Estudios diversos han demostrado que el fitato en su estado nativo en granos y subproductos tiene la propiedad de formar complejos fitato-proteína que son insolubles y resistentes a la digestión proteolítica en el intestino de los organismos que los consumen (Adeola y Sands, 2003). El ácido fítico se une a algunos aminoácidos formando compuestos que hacen que una parte de la proteína ingerida tenga reducida disponibilidad para los peces (Cao *et al.*, 2007); igualmente se han reportado algunos casos de complejos insolubles entre ácido fítico y almidones que también reducen su biodisponibilidad para el organismo que los consume (Ravindran *et al.*, 1999).

En esta investigación los CDA de la proteína de los ingredientes evaluados en los tratamientos sin adición de fitasa arrojaron valores similares a los reportados en la literatura para tilapias (Furuya *et al.*, 2001; Sklan *et al.*, 2004; Köprücü y Özdemir, 2005; Guimaraes *et al.*, 2008; Vásquez-Torres *et al.*, 2010). Los resultados de digestibilidad de fósforo y proteína observados sugieren que un promedio de 50% del fósforo y 10% de nitrógeno contenido en las materias primas evaluadas no pudieron ser absorbidos en el intestino de la tilapia, es decir, que fueron eliminados con las heces; normalmente los productos de desecho y de excreción causan un impacto negativo en el agua que consiste en propiciar y favorecer procesos de eutrofización, agotamiento de oxígeno en las noches y estrés en los animales cultivados. Tales efectos han sido documentados en diversas investigaciones (Sugiura *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2006).

En este estudio se evidenció una mejora en los coeficientes de digestibilidad de la proteína con la adición de 500 y 1000 UDF por efecto de la adición de fitasa; sin embargo, a pesar de la tendencia de aumento, las diferencias entre tratamientos solo alcanzaron significancia estadística en GM ($p < 0.05$) donde la digestibilidad pasó de 94.7% en la dieta sin fitasa, a 97.6% con 1000 UDF (Tabla 4); para HTD y SI los efectos no fueron estadísticamente significativos ($p > 0.05$); resul-

tados similares fueron descritos en trucha (Dalsgaard *et al.*, 2009), en tilapia (Liebert y Portz, 2005) y en jundiá (Rocha *et al.*, 2007). Aunque Ravindran *et al.* (1999) reconocen los efectos benéficos de la adición de fitasa microbiana en dietas para pollos de engorde sobre la digestibilidad aparente de proteína y aminoácidos, Cao *et al.* (2007) discuten los resultados sobre el efecto de la fitasa en la destrucción de los complejos fitato-proteína en peces indicando que estos son controversiales como lo ilustran los siguientes reportes: Vielma *et al.* (2004) trabajaron con trucha arcoíris suplementando la dieta con niveles entre 500-4000 UDF y observaron un aumento en la digestibilidad de la proteína proporcional al contenido de fitasa hasta 2000 UDF, nivel a partir del cual los incrementos dejaron de ser significativos; Cheng y Hardy (2003) suplementaron con niveles entre 200 y 1000 UDF/kg y reportaron efectos positivos a partir de 400 UDF. En *Pangasius pangasius*, Debnath *et al.* (2005) observaron una mejora significativa con suplementación entre 500 – 2000 UDF; en besugo (*Pagrus major*) 2000 UDF fueron necesarios para mejorar la digestibilidad de la proteína de soya integral cruda (Biswas *et al.*, 2007); en contraste, en carpa común Nwana y Schwarz (2008) no obtuvieron mejoras significativas utilizando dietas con 500, 750 y 1000 UDF; Bock *et al.* (2006), quienes experimentaron siete niveles de fitasa entre 500 y 4000 UDF en dietas para tilapia del Nilo, no observaron efecto sobre la digestibilidad de la proteína con ningún tratamiento; los resultados obtenidos en la presente investigación podrían indicar que el máximo nivel de fitasa utilizado en el actual experimento probablemente no fue suficiente para mejorar significativamente los coeficientes de digestibilidad de la SI y de la HTD. Las diferencias entre resultados reportados en la literatura con respecto al adecuado nivel de suplementación con esta enzima son frecuentes y de acuerdo con Liebert y Portz (2005) y Cao *et al.* (2007) se deben a factores diversos, entre otros, solubilidad y origen del fitato, tipo y nivel de actividad de la fitasa utilizada y condiciones fisiológicas en el intestino de los peces. Por lo general la fitasa alcanza una óptima actividad a pH de 2.5-5.5 y las discrepancias entre especies también pueden ser debidas a diferencias en la estructura y funcionamiento del sistema digestivo; otro factor que puede influir en la actividad de la fitasa es la sensibilidad que esta tiene a la temperatura; según Cao *et al.* (2007), condiciones fuera del rango óptimo de pH y de temperatura pueden reducir la acción enzimática de la fitasa. Los peces sin estómago presentan un pH entre 6.8 y 7.3 en el sistema digestivo y comparado con peces gástricos que funcionan en pH ácidos (2.0-2.5), la actividad de la fitasa tiende a ser menor.

Conclusiones

Los resultados muestran que un mínimo de 1000 UDF en la dieta fueron necesarios para aumentar la biodisponibilidad de fósforo y de proteína en GM en dietas para tilapia; para HTD y SI, los resultados no fueron concluyentes y será necesario investigar el efecto de niveles de suplementación superiores. En conjunto los resultados de esta investigación y los descritos con otras especies de peces, dejan claro que la suplementación con fitasa en niveles variables dependiendo de la especie y de las materias primas investigadas, puede ser eficaz para reducir los efectos negativos del fitato sobre el aprovechamiento del fósforo y de la proteína contenidas en los ingredientes de origen vegetal comúnmente utilizados en la elaboración de raciones para peces.

Referencias

- Adeola O, Sands JS. 2003. Does supplemental dietary microbial phytase improve amino acid utilization? A perspective that it does not. *Journal of Animal Science* 81, E78-E85 http://jas.fass.org/content/81/14_suppl_2/E78.
- AOAC. 1995. (Association of Official Analytical Chemists). *Official methods of analysis*. 16th ed. AOAC. Arlington, Virginia, 1108 pp.
- Biswas AK, Kaku H, Ji SC, Seoka M, Takii K. Use of soybean meal and phytase for partial replacement of fish meal in the diet of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 2007;267:284-291.
- Bock CL, Pezzato LE, Cantelmo OÂ, Barros MM. Fitase e digestibilidade aparente de nutrientes de rações por tilápias-do-nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2006;35:2197-2202.
- Bureau WP, Harris AM, Cho CY. Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 1999;180:345-358.
- Cao L, Wang W, Yang C, Yang Y, Diana J, Yakupitiyage A, Luoa Z, Li D. Application of microbial phytase in fish feed - review. *Enzyme and Microbial Technology* 2007;40:497-507.
- Cheng ZJ, Hardy RW. Effects of extrusion and expelling processing, and microbial phytase supplementation on apparent digestibility coefficients of nutrients in full-fat soybeans for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 2003;218:501-514.
- Cho CY, Bureau DP. A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. *Aquaculture Research* 2001; 32(Suppl. 1): 349-360.
- Cho CY, Cowey CB, Watanabe T. 1985. *Finfish Nutrition in Asia: Methodological approaches to research and development*. Ottawa, Ont. (Canadá), IDRC, 154 pp.
- Dalsgaard J, Ekman KS, Pedersen PB, Verlhac V. Effect of supplemented fungal phytase on performance and phosphorus availability by phosphorus-depleted juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and on the magnitude and composition of phosphorus waste output. *Aquaculture* 2009; 286:105-112.
- Debnath D, Pal AK, Sahu NP, Jain KK, Sona Y, Mukherjee SC. Effect of dietary microbial phytase supplementation on growth and nutrient digestibility of *Pangasius pangasius* (Hamilton) fingerlings. *Aquaculture Research* 2005; 36:180-187.
- FAO. 2009. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura -2008*. Roma- Italia, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 218 pp.
- Furukawa A, Tsukahara H. On the acid digestion for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries* 1966;32:502-506.
- Furuya WM, Pezzato LE, Pezzato AC, Barros MM, Miranda EC. Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes para Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia* 2001; 30: 1143-1149.
- Gonçalves GS, Pezzato LE, Padilha P, Barros MM. Disponibilidade aparente do fósforo em alimentos vegetais e suplementação da enzima fitase para tilápia-do-nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2007; 36: 1473-1480.
- Guillaume J, Kaushik S, Bergot P, Métailler R. 2004. *Nutrición y alimentación de peces y crustáceos*. Madrid, España, 475 pp.
- Guimaraes IG, Pezzato LE, Barros DMM, Tachibana L. Nutrient digestibility of cereal grain products and by-products in extruded diets for Nile Tilapia. *Journal of the World Aquaculture Society* 2008; 39: 781-789.
- Hughes KP, Soares Jr JH. Efficacy of phytase on phosphorus utilization in practical diets fed to striped bass *Morone saxatilis*. *Aquaculture Nutrition* 1998; 4(2): 133-140.
- Köprücü K, Özdemir Y. Apparent digestibility of selected feed ingredients for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 2005; 250: 308-316.
- Kumar V, Sinha AK, Makkar HPS, Boeck GD, Becker K. 2011. Phytate and phytase in fish nutrition *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (Article first published online: DOI: 10.1111/j.1439.0396.2011.01169.x).
- Lall SP. 2002. *The minerals*. Fish Nutrition. J. E. H. Halver, Ronald W. San Diego, California, Academic Press, Inc., 824 p.
- Liebert F, Portz L. Nutrient utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed plant based low phosphorus diets supplemented with graded levels of different sources of microbial phytase. *Aquaculture* 2005; 248: 111-119.
- Liebert F, Portz L. Different sources of microbial phytase in plant based low phosphorus diets for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* may provide different effects on phytate degradation. *Aquaculture* 2007; 267: 292-299.
- Lim SJ, Lee KJ. Partial replacement of fish meal by cottonseed meal and soybean meal with iron and phytase supplementation for parrot fish *Oplegnathus fasciatus*. *Aquaculture* 2009; 290(3-4): 283-289.

- Nose T. 1960. On the digestion of food protein by gold-fish (*Carassius auratus* L.) and rainbow trout (*Salmo irideus* G.). Bulletin Freshwater Fishes Research Lab. 10, 11-22.
- NRC. 1993. Nutrients requirements of fish. Washington. D. C., National Research Council, 115 pp.
- Nwana LC, Schwarz FJ. Effect of supplemental phytase on growth, phosphorus digestibility and bone mineralization of common carp (*Cyprinus carpio* L). Aquaculture Research 2007; 38:1037-1044.
- Nwana LC, Schwarz FJ. Effect of different levels of phytase on growth and mineral deposition in common carp (*Cyprinus carpio*, L.). Journal of the Applied Ichthyology 2008; 24: 574-580.
- Ravindran V, Cabahug S, Ravindran G, Bryden WL. Influence of microbial phytase on apparent ideal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. Poultry Science 1999; 78: 699-706.
- Rebollar PG, Mateos GG. 1999. El fósforo en nutrición animal. Necesidades, valoración de materias primas y mejora de la disponibilidad. En XV Curso de Especialización. Avances en nutrición y alimentación animal. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal FEDNA. Madrid.p.31.
- Ribeiro FB, Lanna EAT, Bomfim MAD, Donzele JL, de Freitas AS, de Sousa MP, Quadros M. Níveis de fósforo total em dietas para alevinos de tilápia-do-nilo. Revista Brasileira de Zootecnia 2006; 35: 1588-1593.
- Riche M, Brown PB. Availability of phosphorus from feedstuffs fed to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 1996; 142: 269-282.
- Rocha CB, Osório JL, Pouey F, Enke DBS, Xavier EG, Almeida DB. Suplementação de fitase microbiana na dieta de alevinos de jundiá: efeito sobre o desempenho produtivo e as características de carcaça. Ciência Rural 2007; 37: 1772-1778.
- Rodehutsord M, Gregus Z, Pfeffer E. Effect of phosphorus intake on faecal and non-faecal phosphorus excretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the consequences for comparative phosphorus availability studies. Aquaculture 2000; 188: 383-398.
- Silva TSdC, Furuya WM, de Santos VG, Botaro D, Silva L CR, Sales PJP, Hayashi C, de Santos LD, Furuya VRB. Coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes do farelo de soja integral sem e com fitase para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Acta Scientiarum. Animal Science 2005; 27: 371-376.
- Sklan D, Prag T, Lupatsch I. Apparent digestibility coefficients of feed ingredients and their prediction in diets for tilapia *Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus* (*Teleostei*, *Cichlidae*). Aquaculture Research 2004; 35: 358 -364.
- Sugiura SH, Gabaudan J, Dong FM, Hardy RW. Dietary microbial phytase supplementation and the utilization of phosphorus, trace minerals and protein by rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)] fed soybean meal-based diets. Aquaculture Research 2001; 32: 583-592.
- Vásquez-Torres, W. 2004. Principios de nutrición aplicada al cultivo de peces. Villavicencio, Meta, Colombia, Universidad de los Llanos, 101 pp.
- Vásquez-Torres, W.,Pereira-Filho, M. y Arias-Castellanos, J. A. Estudos para composição de uma dieta referência semipurificada para avaliação de exigências nutricionais em juvenis de pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818). R. Bras. Zootec. 2002; 31: 283-292.
- Vásquez-Torres W, Yossa MI, Hernandez G, Gutiérrez-Espinosa MC. Digestibilidad aparente de ingredientes de uso común en la fabricación de raciones balanceadas para tilapia roja híbrida (*Oreochromis sp*). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 2010; 23: 207-216.
- Vielma J, Ruohonen K, Gabaudan J, Vogel K. Top-spraying soybean meal-based diets with phytase improves protein and mineral digestibilities but not lysine utilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research 2004; 35: 995-964.