



FACULTAD DE AGRONOMÍA  
**Universidad Nacional de La Pampa**

## **CARRERA INGENIERIA AGRONOMIA**

### **TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN**

#### ***ALUMNOS:***

**Matías Emanuel Martín**

**Agustín Reimer**

#### ***DIRECTOR:***

**Dr. Rodolfo Oscar Braun**

**Profesor Asociado exclusivo regular de  
Sistemas de producción Animal no Rumiante**

#### ***TÍTULO:***

**Utilización de enzimas exógenas en la alimentación porcina**

## INDICE

• <u>RESUMEN</u>	3
• <u>PALABRAS CLAVE</u>	3
• <u>INTRODUCCION</u>	3
✓ HISTORIA DE LA ENZIMOLOGIA INDUSTRIAL	8
✓ CLASIFICACION DE LAS ENZIMAS	10
✓ TIEMPO DE UNA REACCION BIOQUIMICA	13
✓ MODO DE ACCION	13
• <u>OBJETIVO GENERAL</u>	13
• <u>HIPOTESIS</u>	13
• <u>MATERIALES Y METODOS</u>	14
• <u>JUSTIFICACION DE LA REVISION BIBLIOGRAFICA Y DE TRABAJOS DE INVESTIGACION</u>	14
✓ ¿COMO SELECCIONAR LA MEJOR FITASA?	25
✓ FITASAS	27
✓ CARBOHIDROLASAS	40
✓ PROTEASAS	70
✓ TIPOS DE ENZIMAS PROTEOLITICAS	71
• <u>CONCLUSIONES</u>	75
• <u>BIBLIOGRAFIA</u>	79

## **RESUMEN**

La utilización de enzimas en la obtención de alimentos data de hace siglos. En la actualidad está teniendo cierto auge el empleo de enzimas exógenas en la alimentación de monogástricos, centrando nuestro estudio sobre dicha utilización en formulaciones para porcinos.

La adición de productos enzimáticos a la formulación genera ciertos efectos tanto a nivel productivo, como ecológico. Las enzimas son sustancias que actúan de catalizador en reacciones bioquímicas. La aplicación de enzimas en la formulación dietaría favorece la asimilación de ciertos nutrientes que en ausencia de la enzima pasan por el tracto digestivo del animal en una forma química imposible de digerir.

El objetivo del trabajo se centró en describir como la presencia de las enzimas exógenas en el escenario productivo porcino disminuyen el impacto ambiental generado por esta actividad, debido a una menor utilización de fósforo en dieta ya que mediante la catálisis generada por las enzimas se aprovechan muchos nutrientes que de no ser así pasarían vía heces al suelo y luego a las napas freáticas, provocando, en producciones intensivas contaminación por ejemplo, exceso de fosforo. Además de la reducción de los costos de producción por la escasa necesidad de suplementación.

De allí la importancia de la utilización de enzimas exógenas en las dietas de porcinos.

## **PALABRAS CLAVE**

Monogástricos; Enzimas exógenas; Eficiencia de dietas; Contaminacion ambiental.

## **INTRODUCCIÓN**

La digestión es un proceso químico en el que interviene una gran cantidad de enzimas que se unen específicamente a diferentes moléculas de alimento y provocan su ruptura, de modo que estas moléculas más pequeñas puedan ser

absorbidas a través de la membrana intestinal. La digestibilidad de los alimentos puede verse afectada en algunos animales por diversas razones como insuficiente producción primaria de enzimas o insuficiente producción secundaria de enzimas (% alto de proteína en la dieta); tracto digestivo inmaduro de los animales jóvenes, presencia de factores antinutricionales como los betaglucanos y los xilanos y por limitaciones propias de cada especie animal, como por ejemplo la dificultad de algunas aves para digerir la cebada. Pueden participar en la digestión, enzimas endógenas que las produce el propio animal en diferentes partes del tracto intestinal, en cantidad dependiendo de la especie y la edad, con actividad proteolítica, lipolítica, carbohidrolítica. Pueden también participar enzimas exógenas a través de la suplementación en el alimento con enzimas de origen fúngico y bacteriano. En la Unión Europea, los microorganismos a partir de los que se obtienen enzimas han sufrido un proceso de evaluación de su seguridad y son bien aceptados por el consumidor, ya que no se absorben y no dejan residuos en los productos animales. Las enzimas exógenas son proteínas que catalizan reacciones bioquímicas y son eficaces si se utilizan en las condiciones idóneas tales como: 1. especificidad enzima-sustrato, 2. condiciones de la aplicación y 3. características físico-químicas del tracto digestivo que condicionan la actividad. El complejo enzima-sustrato es la aplicación de combinaciones de enzimas adecuadas para cada alimento que se van incorporando a las raciones en las distintas etapas de la producción animal, con conocimiento del perfil de polisacáridos de la ración y del porcentaje de proteína bruta. Se requiere además la necesidad de colaboración entre el nutrólogo de la planta de alimentos y el técnico del fabricante de las premezclas enzimáticas. Entre los tipos de enzimas exógenas existen: 1. Carbohidrasas (amilasas, betaglucanasas y xilanasas), son enzimas indicadas para mejorar la digestibilidad de los almidones y de la fracción PNA (polisacáridos no amiláceos) de los cereales; 2. Proteasas (subtilisina), enzimas indicadas para mejorar la digestibilidad de las proteínas, y 3. Fitasas, enzimas para aprovechar el P bloqueado como ácido fítico presente en los granos de cereales y oleaginosas. Las fitasas son las de mayor uso en la alimentación animal de monogástricos.

Las fitasas son enzimas que mejoran la digestión del fósforo en los alimentos utilizados en la alimentación porcina. Por tanto, su interés radica, principalmente, en que van a permitir una mejor utilización del fósforo de la dieta. Tengamos en cuenta que el fósforo es el segundo mineral en importancia, desde el punto de vista cuantitativo, en el organismo del cerdo; localizándose sus depósitos, en un 80%, en los huesos y dientes, el resto se distribuye por todo el organismo animal, en tejidos y fluidos blandos. Al margen de su importancia cuantitativa, el fósforo va a cumplir una serie de funciones dentro del organismo animal de vital importancia, por lo que puede ser considerado como el mineral más importante. Entre estas funciones podemos destacar las siguientes: Interviene en la formación y mineralización de la matriz orgánica de los huesos. Interviene en el crecimiento y diferenciación celular, al formar parte de los ácidos nucleicos ADN y ARN. Mantiene la integridad de las membranas celulares, al formar parte de los fosfolípidos. Como fosfato contribuye a mantener el equilibrio osmótico. Interviene en el metabolismo de los glúcidos, ácidos grasos, síntesis de aminoácidos y proteínas, a través del AMP, ADP y ATP.

Por todas estas funciones, sus necesidades deben ser perfectamente cubiertas por los nutricionistas, para que de esta manera el rendimiento productivo no se vea afectado.

Ahora bien, el principal problema con el que nos encontramos es que el aporte de fósforo vegetal, a través de las materias primas vegetales de los alimentos, es insuficiente para cubrir estas necesidades, debido a que las dos terceras partes del fósforo vegetal (60-85%) está ligado al ácido fítico, en forma de fitatos, cuya biodisponibilidad para los cerdos es casi nula, ya que una pequeñísima cantidad de fósforo ligado al ácido fítico llega a estar biológicamente disponible. Por lo tanto, para cubrir dichas necesidades, se hace imprescindible la suplementación con una fuente extra de fósforo mineral, principalmente, en forma de fosfato bicálcico y monocálcico. Sin embargo, ello plantea un problema, al margen del costo económico de la suplementación, como es la excesiva eliminación de fósforo en las deyecciones de los cerdos, provocando un verdadero problema medio ambiental (Cromwell, 2002). Recordemos que gran parte del fósforo introducido en el medio ambiente por el

sector agrícola procede del estiércol animal. Los cerdos excretan el 90% del fósforo sobrante a través de los purines. Así, cuando se abusa del abono o bien el estiércol es muy rico en fósforo, la planta no es capaz de extraer todo el fósforo. La filtración de este exceso de mineral, a través de la tierra, puede acelerar el crecimiento de algas en cauces de aguas y mares (eutrofización), lo cual representa una amenaza para la vida acuática, debido a la disminución del oxígeno disuelto. Para hacer frente a este problema medio ambiental de los fosfatos se han ofrecido varias soluciones. Así, en los últimos años se han abierto nuevas líneas de investigación en producción vegetal para obtener materias primas con un menor contenido en fitatos. En este sentido, se ha experimentado con un maíz modificado genéticamente, que contiene un gen Lpa 1 (low phytic acid 1) que codifica para una baja acumulación de fitato sin que ello altere el contenido normal del fósforo. Autores como, Campbell y van der Poel (1998) han conseguido reducir en un 65% el nivel de fitato en el maíz, sin que ello afecte al aporte de fósforo total del grano. De igual manera, Pierce (1999) trabajando con maíz bajo en fitatos detectó una digestibilidad verdadera del fósforo superior en un 26%. Por otra parte, Thacker *et al.*, (2003) utilizando variedades de cebada bajas en fitatos, comprobaron que la digestibilidad del fósforo aumentaba, sin que ello afectara a la digestibilidad de otros nutrientes. Sin embargo, ha sido el empleo de fitasas la solución más efectiva para el problema, al tratarse de una enzima que actúa liberando el fósforo unido al ácido fítico, de manera que es absorbido, reduciéndose la excreción del mismo por parte del cerdo. Por lo tanto, tanto la utilización de materias vegetales bajas en fitatos o la inclusión fitasas en los alimentos, mejoran la digestibilidad del fósforo; si bien ambas estrategias, en opinión de Thacker *et al.*, (2004) no tienen un efecto aditivo, por lo que no recomiendan el uso de fitasas en dietas con bajo contenido en fitatos. Contrariamente, Gourley *et al.*, (2002) en un experimento con cerdos de 28 kg, encontraron un efecto aditivo en la utilización de dietas con un maíz bajo en fitatos a las que se añadía 300 UF/kg, de tal manera que la incorporación de fitasas o la inclusión de una variedad de maíz bajo en fitatos reducía la excreción de fósforo en un 25%, mientras que cuando se incorporaban fitasas a la dieta con maíz bajo en fitatos se reducía en un 54%.

Gracias a la Biotecnología e Ingeniería Genética, se ha conseguido obtener fitasas comerciales a un precio muy atractivo, ampliamente utilizadas en producción porcina, tanto desde el punto de vista productivo como desde la óptica medioambiental.

El mercado de las enzimas en la alimentación es tan diverso como la gama de sustratos sobre las cuales actúan. Su uso en particular depende de la magnitud de la respuesta animal y el costo del producto de la enzima, como también del resultado que se obtenga, pues estas enzimas exógenas mejoran la digestibilidad de los sustratos, disminuyendo las pérdidas de nutrientes.

Las enzimas exógenas pueden mejorar la digestibilidad de los nutrientes en el intestino delgado, dando mejores resultados en todos los estados fisiológicos productivos. El uso de las preparaciones enzimáticas también tiene como ventaja reducir la excreción de nitrógeno y de fósforo metabólico al ambiente. No existen evidencias de perjuicios como resultado de la adición de enzimas en el alimento. A pesar de que buena parte de la ración para porcinos es preparada en forma de harina, los nutrientes necesitan ser digeridos en moléculas menores para que puedan ser absorbidas en el tracto digestivo del animal. De la misma forma que ocurre en los demás animales monogástricos, la digestión de los alimentos en los porcinos ocurre a través del uso de enzimas endógenas que el animal secreta naturalmente de su estómago, páncreas e intestino delgado. Sin embargo, estas enzimas no son capaces de digerir todos los componentes de su alimentación. Por tanto los porcinos son incapaces de utilizar plenamente todos los componentes de su dieta, por dicha razón se pueden adicionar enzimas exógenas al alimento para ayudar en la digestión de carbohidratos y proteínas. Por otro lado, uno de los cuestionamientos que surge es si debemos o no utilizar enzimas en las dietas porcinas. El objetivo principal para el uso de las enzimas en la dieta de estos animales ha sido el de mejorar el valor nutritivo de los alimentos. Esto es alcanzado a través de diferentes mecanismos incluyendo la eliminación de factores antinutricionales presentes en los alimentos, eliminación del efecto de encapsulamiento de nutrientes tomando los más disponibles, el quiebre de ligaciones específicas presentes en las materias primas las cuales no son

digeridas por las enzimas endógenas y la complementación de enzimas producidas por los animales más jóvenes.

### **Historia de la enzimología industrial.**

Comenzó hace más de 2000 años, con el uso de enzimas en procesos de fermentación como la fabricación de quesos, fabricación del pan, alcohol, vino y cerveza. Se cree que la investigación de las fermentaciones se inició en 1810, con la determinación del etanol y el bióxido de carbono como productos primarios de la descomposición del azúcar en levaduras.

En 1833 Berzelius publicó la primera teoría general de catálisis química e incluyó una referencia de la enzima diastasa como catalizador (Sears y Walsh, 1993). Fue el comienzo de la enzimología industrial el inicio del siglo XIX en el que Payen Persoz (1833), reconoció que un alcohol precipitado de un extracto de malta contenía una sustancia termolábil que convertía el almidón en azúcares fermentables; se la nombró diastasa a causa de su capacidad de separar dextrinas solubles en el almidón insoluble en granos. La existencia de la pepsina, polifenol oxidasa, peroxidasa e invertasa fue reconocida a mediados del siglo XIX. En 1884, fue concedido a Jokichi Diastasa llevar su apellido la enzima diastasa, enzima particular derivada del hongo, *Aspergillus oryzae*, el cual se desarrolla en el arroz.

El término enzima fue propuesta por William Kuhne en 1876 y proviene del griego que significa "en levadura" para evitar el uso de nombres como fermentos "desorganizados" y "organizados" comenzados a usar por Pasteur y Libeig (Dierick y Decuypere, 1994). A partir de este descubrimiento y de diversos substratos se empezaron a extraer enzimas muy diversas y con destinos diferentes que hicieron que su empleo se extendiera a diversas ramas de la industria, tales como detergentes, fabricación del papel, fabricación textil, tratamiento de cueros, farmacia, destilería, aceites y grasas, almidones y azúcares, etc. Luis Pasteur fue el primero que comunicó que las enzimas estaban íntimamente ligadas con la estructura vital de las células de la levadura (Holloway, 1994). En 1897, Eduardo Buchner probó que las enzimas podían ser extraídas de las células de las levaduras y ser usadas por sí mismas.

Emil Fisher desarrolló el concepto de especificidad de las enzimas por sus sustratos en 1894. Sus estudios sobre sustratos sintéticos produjeron la famosa analogía "cerradura y llave" para la interacción de una enzima y sustrato. Esta forma de correspondencia propia y específica entre la enzima y el sustrato ha continuado influenciando el pensamiento sobre el complejo enzima sustrato hasta el presente (Gómez, 1993; Charlton, 1999). Los efectos de la concentración inicial del sustrato sobre la actividad enzimática iniciaron a finales del siglo XIX. En 1882 se introdujo el concepto enzima-sustrato, como intermediario del proceso de catálisis enzimática. En 1913, Leonor Michaelis y Maud Mentón desarrollaron esta teoría y propusieron una ecuación de velocidad que explica el comportamiento cinético de los enzimas. Con el siglo veinte llegó el desarrollo de métodos cuantitativos para describir la acción de las enzimas. Michaelis y Mentón produjeron su expresión matemática que describe cuantitativamente el comportamiento cinético del complejo enzima sustrato en el año 1913 (Gentry *et al.*, 2002), donde:

$$V = V \text{ máx. } (S) / k_m + (S)$$

V = Velocidad Inicial de Reacción.

(S) = Concentración del Sustrato.

V máx. = Velocidad máxima de reacción a alta concentración del Sustrato.

Km = Carácter constante de Michaelis para cada enzima.

La purificación de las enzimas comenzó después de 1920 y muchas de estas purificaciones fueron llevadas a cabo por Willstatter y sus colegas entre 1922 y 1928. Sin embargo, la pureza completa no fue obtenida.

Willstatter y sus colegas fueron capaces de purificar peroxidasa al punto que mostró, apreciable actividad y a un nivel donde ellos ya no pudieron detectar proteína. Partiendo de que los métodos de análisis de proteína de esos tiempos no eran lo suficiente sensitivos, Willstatter concluyó que las enzimas no eran proteínas. Si encontraba proteína, el concluyó que era solo un portador (Gómez, 1993).

Sumner (1926), tuvo éxito en la cristalización de la enzima ureasa. Sin embargo, debido a la influencia de Willstatter, el hecho que la ureasa fuese

realmente una proteína, no fue aceptado hasta 1929. Summer, fue posteriormente premiado con el premio Nobel por su contribución con la enzimología. Cuando Northrop cristalizó pepsina, tripsina y quimiotripsina, probando sin duda alguna que las enzimas son proteínas (Sears y Walsh, 1993).

Koshland (1959), marcó el concepto llamado "correspondencia inducida de la combinación enzima sustrato". Esta teoría retenía el concepto de conformación específica entre la enzima y sustrato al resultar en la conversión del sustrato - producto. La extensión de flexibilidad del sitio activo probablemente varía entre diferentes enzimas. En 1982 la compañía finlandesa "Cultor" comenzó a desarrollar enzimas específicas para nutrición animal y 1986 empieza a comercializarse una enzima para aves. (Liener, 1996).

En 1988 se desarrolla una enzima para cerdos que mejora la producción y la absorción de nutrientes. Esta enzima comenzó a emplearse en dietas de lechones y destetes precoces (Taylor y Headon, 1992).

### **Clasificación de enzimas**

Las enzimas son biocatalizadores, producidos por células vivas que ocasionan reacciones bioquímicas específicas, formando parte del proceso metabólico de las células. Las enzimas son específicas en su acción sobre el sustrato y frecuentemente, muchas enzimas diferentes son requeridas para producir por acción concertada, una secuencia, de reacciones metabólicas ya realizadas por células vivas. Todas las enzimas que han sido purificadas son proteínas en naturaleza y pueden o no poseer un grupo protésico no-proteína (Gómez, 1993). Las enzimas son clasificadas de acuerdo a su especificidad generalmente cómo proteasa, carbohidrasa, pectinasa, lipasa, y fueron asignadas usando una convención simple, las letras "asa" que fueron agregadas al final el nombre del sustrato sobre el cual la enzima mostró actividad. Las enzimas son clasificadas dentro de seis diferentes grupos dependiendo del tipo de reacción catalizada. (Sears y Walsh, 1993).

Otros definen que una enzima es un catalizador biológico que incrementa la reacción, en ocasiones hasta en un millón de veces a la velocidad que ocurriría

espontáneamente. Sin embargo, la característica más sobresaliente de las enzimas es su elevada especificidad. Las enzimas llevan reacciones específicas diferentes, un pH y temperatura óptimos, para su actividad y tienen una determinada terminología para cada una de estas enzimas (Bedfor, 2000). El sustrato es la molécula sobre la que la enzima ejerce su acción catalítica. Cada clasificación es luego subdividida otra vez hasta que las enzimas son identificadas por una químicamente significativa figura de seis códigos (Holloway 2004), que a continuación se detallan:

**Oxidoreductasas:** Catalizan reacciones de oxido reducción. Deshidrogenasas, oxidasas, oxigenasas, reductasas, peroxidasas.

**Transferasas:** Catalizan transferencias de grupos químicos. transcarboxilasas, transaminasas, transmetilasas.

**Liasas:** Catalizan la eliminación de grupos para formar un doble enlace. descarboxilasas, deshidratasas, desaminasas.

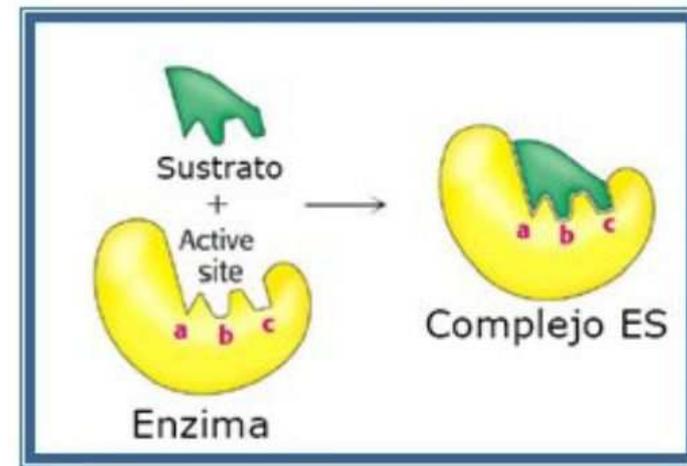
**Isomerasas:** Catalizan reordenamientos moleculares. Epimerasas, mutasas.

**Ligasas:** Catalizan formaciones de enlace entre dos sustratos, con energía aportada por la hidrólisis de ATP. Fosforilasas.

**Hidrolasas:** Catalizan la rotura de enlaces por adición de agua. Esterasas, fosfatasas, peptidasas.

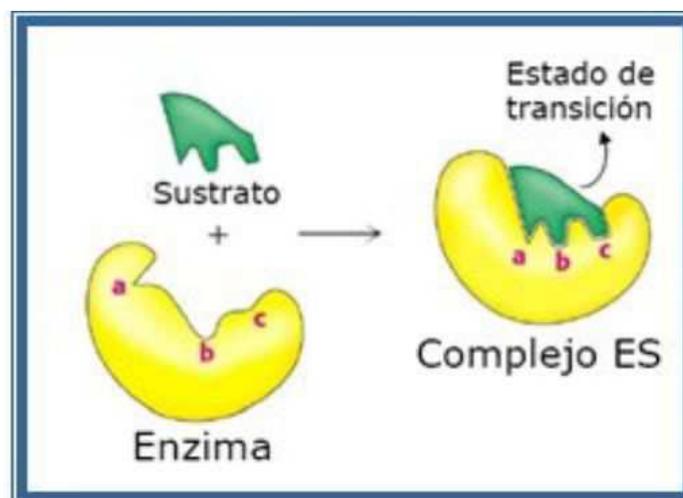
Las enzimas son proteínas producidas de manera natural por los seres vivos; aceleran reacciones químicas del organismo. La digestión es una reacción química en la cual diferentes enzimas se unen a moléculas de alimento de alto peso molecular (sustratos) para formar complejos enzimáticos. Las enzimas aceleran la ruptura de grandes moléculas haciéndolas más pequeñas. Cada enzima específica a su sustrato. El mecanismo de unión de enzimas se realiza a través de la termodinámica de las reacciones químicas (Gómez, 1993; Lyons, 1992). En el esquema 1 se representa la llave y cerradura dónde centro activo y sustrato son complementarios.

**Esquema 1:** La llave y la cerradura (Fisher, 1890) - Centro activo y sustrato son perfectamente complementarios. Reconocimiento molecular.



En el esquema 2 se expresa el reconocimiento molecular dinámico ya que la unión enzima - sustrato induce a un cambio.

**Esquema 2:** Ajuste inducido (Koshland, 1958) -La unión del sustrato induce un cambio en el centro activo que aumenta la complementariedad. Reconocimiento molecular dinámico



### **Tiempo de una reacción bioquímica**

La energía requerida para activar los reactantes, "a" y "b", se llama energía de activación. La energía liberada del complejo activado en "b" a los productos de "c" es llamada energía libre de reacción. La cantidad de energía requerida para activar los reactivos, es disminuida y la reacción se procede a mayor velocidad. La reacción procede de ambos sentidos, por lo que la enzima favorece tanto la formación de sustrato como la del producto (Hoyos, 1992)

### **Modo de acción**

Uno de los problemas más importantes en el estudio de las enzimas es su modo de acción, sobre todo en la velocidad y en su concentración y en la del sustrato. Se ha observado que si la concentración de la enzima permanece constante, la velocidad de reacción aumenta rápidamente con el incremento de la concentración del sustrato, para explicar este hecho, se considera que la enzima y el sustrato se ligan entre sí para formar un complejo enzima - sustrato, transitorio, que se establece en producto final y enzima: el punto de máxima velocidad corresponde al momento en que toda enzima esta empleada para formar el complejo sustrato enzima.

### **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo del presente trabajo final de graduación es analizar, actualizar y valorar la utilización de enzimas exógenas en las dietas de porcinos, con el fin de realizar una revisión moderna sobre el beneficio del uso de éstas en la formulación de alimentos, que mejoran la digestibilidad de algunos nutrientes y por tal disminuyan la contaminación ambiental.

### **HIPOTESIS**

Existen enzimas exógenas que adicionadas a las dietas porcinas, mejoran la digestibilidad de la ración, el aprovechamiento de nutrientes y la gestión medio ambiental.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se propuso revisar fuentes bibliográficas de información, trabajos de investigación, sitios específicos de Internet de nutrición de monogástricos y consultas a expertos sobre la información relevante. Se construyó un documento actualizado del tema para la utilización de los procesos de enseñanza/aprendizaje de los alumnos de la Facultad de Agronomía, UNLPam. Dicho documento tendrá divulgación desde la biblioteca de la Casa de Estudios.

## **JUSTIFICACION DE LA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y DE TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN**

Durante los últimos años, las aplicaciones tecnológicas han brindado un nuevo impulso al conocimiento más detallado de elementos cuyo valor nutricional ya se conocían tradicionalmente pero que interactuando con otros brindan una mayor variedad de beneficios adicionales con lo cual se obtiene un desarrollo de productos y aditivos interesantes dentro del campo de la nutrición animal.

Es en este sentido que los nutricionistas actualmente se ven impulsados en la búsqueda de nuevas opciones y productos a favor del uso de una mayor variedad de materias primas en beneficio de mejorar la sanidad y por ende la economía de los productores de país. Como ejemplo tenemos el caso del fósforo. El fósforo es un mineral crítico en la alimentación, se encuentra en cada célula del cuerpo y está muy relacionado con los procesos metabólicos. El esqueleto contiene 80% del fósforo total y el 20% restante está distribuido en los tejidos suaves del cuerpo. Sus funciones son las más conocidas en comparación con los otros minerales del cuerpo animal. Actúa junto con el calcio en la formación de huesos y dientes. En combinación con otros elementos, interviene en el mantenimiento osmótico y en el equilibrio ácido-base del organismo. Es componente de los ácidos nucleicos que son importantes en la transmisión genética. Los ácidos grasos – fosfolípidos, son un componente y activador de muchos sistemas enzimáticos. Intervienen en el traslado de energía dentro de las células vivientes al producirse la formación y ruptura de enlaces químicos entre fósforo y carbono ó compuestos de carbono-nitrógeno. En las aves y cerdos el riñón es la ruta principal de excreción de

fósforo. El Adenosintrifosfato (ATP) es el compuesto más importante del fosfato. Cuando se hidroliza hacia a Adenosindifosfato (ADP), libera la energía directamente. Los dos tercios del fósforo contenido en los granos y forrajes están en forma de fitato, complejo que puede considerarse como un factor antinutricional ya que reduce la disponibilidad del fósforo así como la de los minerales, proteína y almidón de los granos y forrajes. En la figura 1 se detalla la eficacia con la que usan los elementos N, P, K y C algunas especies domésticas.

**Figura 1:** Eficacia (%) con la que se usan algunos elementos en la producción animal.

Especie / Elemento	N	P	K	C
Rumiantes	15	25	4	12
Cerdos	30	33	5	25
Aves	32	22	9	15

Eficacia (%) con la que se usan algunos elementos en la producción animal.

- La metabolización es importante. Los cerdos usan la energía con más eficiencia que cualquier otra especie.
- El sistema de producción determina la eficiencia de transformación:
- Sistemas tecnificados con un buen uso de la tecnología pueden producir 100 kg de productos comestibles del cerdo en 140 días, vs. los 180 tradicionales y con 220 vs los 310 kg de alimento de antes.

Datos reconstruidos de la información de Laboratorios DSM, López, 2012

Para mejorar la disponibilidad del fósforo de origen vegetal y de los otros nutrientes contenidos en el fitato existe la fitasa, enzima que libera las uniones de fitato de estos nutrientes y que es producida en pequeñas cantidades en forma natural por aves y cerdos. Estudios realizados muestran que para mejorar la asimilación de estos nutrientes, se debe agregar fitasa a la producida en forma natural, ¿cómo? A través de su suplementación en la ración alimenticia (Figura 2).

**Figura 2:** Rangos de proteína, lisina, calcio y fósforo que recomiendan algunas tablas de requerimientos nutricionales.

Rangos de proteína, lisina, Ca y P encontrados en alimentos para la engorda de cerdos en América Latina

Nutriente, %	NRC'98	Tabelas Brasileiras	Mínimo	Máximo
Proteína	14.50	16.50	15.00	20.50
Lisina total	0.70	0.84	0.72	1.20
Calcio	0.47	0.65	0.65	0.95
Fósforo	0.42	0.42	0.55	0.75
Selenio	0.14		0.25	0.40

Cerdos con un peso promedio de 85 kg y ganancia de tejido magro, libre de grasa de 330 g/día

Datos reconstruidos de la información de Laboratorios DSM, López, 2012  
En la figura 3 se detalla el balance de nitrógeno y la relación de aminoácidos en dietas porcinas.

**Figura 3:**

Balance de nitrógeno de cerdos con dietas crecientes en proteína y con el perfil ideal de amino ácidos

Castañeda y Cuarón, 2001

Medias de mínimos cuadrados N = 24	Proteína en la dieta, %				EEM
	12	15	18	21	
Nitrógeno, g/d					
Consumido	43.94	53.97	62.02	73.55	0.972
Fecal	12.05	13.31	15.08	15.06	0.799
Urinario	12.30	19.37	25.73	32.77	0.673
Retenido	18.58	21.29	21.21	24.73	1.207
Digestibilidad aparente, %	71.85	75.34	75.70	79.30	1.081
Urinario, % del consumo	28.65	35.91	41.58	45.21	1.304
Retenido, % del consumo	43.20	39.43	34.12	34.10	1.661
Retenido, % del digerido	60.09	52.40	45.22	43.13	1.743

Cerdos de 57 kg. Dietas con 3.25 Mcal de EM/kg  
Lisina total = 5.8% de la Proteína. Respuesta lineal, P<0.02

Datos reconstruidos de la información de Laboratorios DSM, Castañedo y Cuarón, 2001

A medida que aumenta el consumo de proteína en los animales, mayor es la emisión de NH<sub>3</sub> al ambiente como lo señala Braña *et al*, 2007 (Figura 4).

**Figura 4:** Producción de amoníaco en función del consumo de proteína

### Producción de Amoniaco en función del consumo de proteína

	Proteína cruda de la dieta, %		EEM
	19	14	
Consumo de alimento, kg/d	1.12	1.18	0.760
Ganancia de peso, kg/d	0.60	0.61	0.072
pH de las excretas (P<0.01)	6.71	6.21	0.186
NH <sub>3</sub> , g/cerdo/día (P<0.001)	0.84	0.19	0.093

Cerdos con un peso inicial de 17±0.4 kg; 21 días en cámaras con flujo dinámico de aire.

Braña *et al.*, 2007

Señalan Cahan *et al.*, 1998 y Haynes *et al.*, 2004, que una reducción del 25 de proteína en las dietas porcinas y avícolas generan una reducción del 77% en las emisiones de NH<sub>3</sub>; y que por cada 1% de reducción en la proteína cruda de la dieta, se logra reducir las emisiones de NH<sub>3</sub> en un 15%. Es muy importante aprovechar los estados fisiológicos más eficientes en el uso de proteína por parte de los monogástricos y alimentar por fases de acuerdo a los requerimientos nutriciones del estado fisiológico en cuestión, porque al aumentar la edad fisiológica aunque se requiera menos proteína hay mayor excreción de NH<sub>3</sub> al ambiente por la propia ineficiencia metabólica a mayor edad del animal (Figura 5).

**Figura 5:** Flujo de nutrientes de acuerdo al estado fisiológico

Las estrategias de alimentación alteran el flujo de nutrientes (alimentación por fases)

N, cerdos de 25 a 105 kg de peso corporal.

	1 Fase 17% PC	2 Fases 17 y 15 % PC	3 Fases 17, 5 y 13 % PC
Excreción de N, g/d	31.9	29.0	26.7
Proporción del resultado con 2 fases	110 +10%	100	92 -8%

- Para evitar desperdicios, es necesaria la exactitud de los programas de alimentación.
- La alimentación por fases es el primer paso.
- Para alcanzar las mejores eficiencia, es necesario discernir las fases y las concentraciones de nutrientes en cada una de estas.

Henry y Dourmard, 1993.

Datos reconstruidos de la información de Laboratorios DSM, Henry y Dourman, 1993

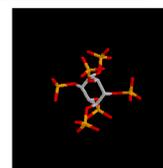
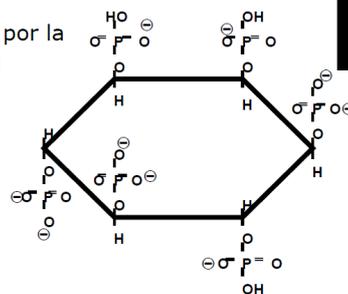
Hay fitasas de origen vegetal y de origen microbiano. Las fitasas (myo-inositol hexofosfato hidrolasas) son fosfomonoesterasas capaces de hidrolizar ácido fítico (myo-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6 hexakisfosfato) para producir ortofosfato inorgánico y una serie de ésteres fosfóricos menores (inositol penta a monofosfato como productos intermediarios) y finalmente para liberar el myoinositol. En la figura 6 se detalla la estructura química del ácido fítico.

**Figura 6:** Estructura química del ácido fítico

Ácido fítico

- Es la principal fuente de almacenamiento de fósforo en las plantas.

- Esta formado por la estereoficación del inositol con 6 fósforos.



Datos reconstruidos de la información de Laboratorios DSM, 2012

Dos fitasas están reconocidas por el IUPAC-IUB (1976): una 3-fitasa (EC 3.1.3.8) y otra 6-fitasa (EC 3.1.3.26), estas enzimas comienzan la defosforilación del myo-inositol en las posiciones 3 y 6 respectivamente. La 3-fitasa es encontrada en animales y microorganismos mientras la 6-fitasa está presente en las plantas. Ambas enzimas tienen diferentes actividades enzimáticas: la fitasa del trigo tiene un solo pH óptimo, a pH 5, la fitasa proveniente de hongos (*Aspergillus niger*) tiene un pH óptimo a pH 2 y a 5.5. Tales diferencias en el tracto digestivo afectan la eficacia de las enzimas.

Se han evaluado pollos y cerdos *in vivo* para determinar la eficacia relativa de la fitasa de origen vegetal y microbiano, encontrándose que la fitasa de origen vegetal es un 40% menos efectiva que la fitasa microbiana (Frapin y Nys, 1995). Este potencial más elevado de la fitasa microbiana para liberar fósforo disponible para pollo de engorde también fue confirmado por Oloofs *et al.* (1998). Recientes estudios han mostrado que al agregar la enzima fitasa a la dieta de las aves y cerdos se puede aumentar la cantidad de fósforo disponible al animal. Lo cual debe de permitir a los productores poder reducir de 0,1 a 0,12% la cantidad de fósforo inorgánico. De esta manera se reduce la cantidad de fósforo en el estiércol y por consiguiente la contaminación ambiental. El peligro de contaminación ambiental es de primordial interés en el mundo y debe de serlo también en América Latina. De hecho, América Latina, produce el 47% de la producción de porcinos en el continente. En la Figura 7 se muestran los resultados de García *et al*, 2003 de la digestibilidad aparente de dietas porcinas que llevan fitasas en su composición.

**Figura 7:** Efecto de la adición de fitasas sobre la digestibilidad fecal aparente de nutrientes en dietas de cerdos en crecimiento

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE FITASAS SOBRE LA DIGESTIBILIDAD FECAL APARENTE DE NUTRIENTES EN DIETAS PARA CERDOS EN CRECIMIENTO

EM, Mcal/kg	3.30	3.16	<b>3.16</b>	<b>3.16</b>	<b>3.16</b>	
Fitasa, g/ton	0	0	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>300</b>	EEM
Materia Seca <sup>a,b,c</sup>	76.22	77.79	78.41	78.51	80.65	0.32
<b>Energía<sup>a,b,c</sup></b>	<b>78.20</b>	<b>76.42</b>	<b>77.14</b>	<b>78.28</b>	<b>80.54</b>	0.33
Proteína Cruda <sup>a,c</sup>	66.05	65.58	63.82	66.78	71.92	0.29
Cenizas <sup>a,c</sup>	40.02	37.68	39.12	43.11	48.28	0.54
<b>Fósforo<sup>a,b,c</sup></b>	<b>47.24</b>	<b>33.88</b>	<b>35.10</b>	<b>43.23</b>	<b>48.71</b>	0.29

<sup>a</sup> Efecto del tratamiento (P<0.010);  
<sup>b</sup> Diferencia entre controles (P<0.010);  
<sup>c</sup> Efecto lineal de Fitasa (P<0.010)

García, B. G., et al, 2003

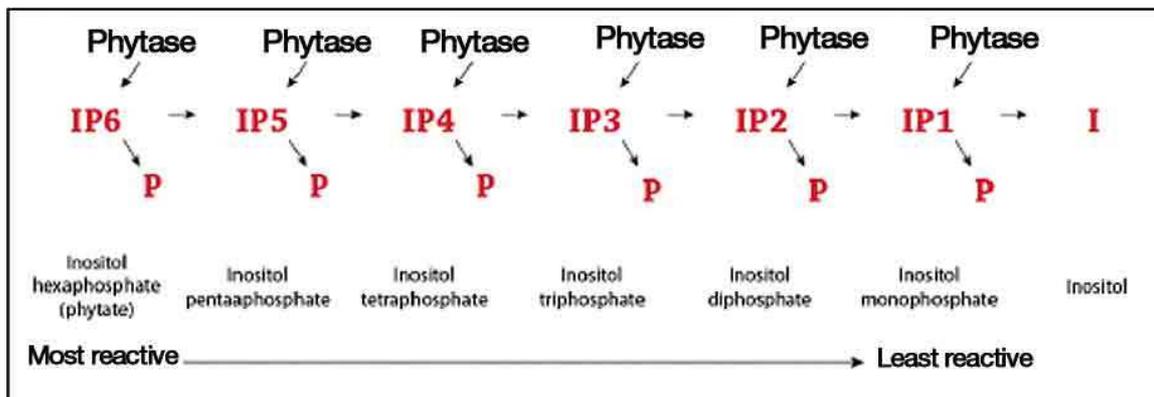
Datos reconstruidos de la información de Laboratorios DSM, García *et al.*, 2003

La inclusión de menores cantidades de fósforo en las dietas es una de las maneras de reducir la excreción de fósforo en las heces, este fósforo excretado es el que contribuye a la contaminación ambiental. De hecho, con la adición de fitasas microbianas a las dietas para mejorar el aprovechamiento del fósforo se puede reducir el desperdicio de fosfato y evitar estos sedimentos nocivos para la salud. Los valores de la matriz asignada para la fitasa están dados en forma particular por cada empresa fabricante de la enzima en función a sus procedimientos y a los aditivos adicionales que le puedan agregar a su producto terminado. Esto se aprecia en el mercado con las diferentes presentaciones de la enzima. Inclusive una misma enzima tiene diferentes valores nutricionales (matrices) asignados para cada especie (gallina, pollos para carne, pavo y cerdo) e incluso dentro de la misma especie se le asigna valores diferentes a la matriz para cada categoría (inicio, crecimiento o terminación y para la etapa en producción o engorde). Por este motivo se puede decir que cada matriz asignada a cada enzima es particularmente propia para ésta.

A continuación se describe la opinión de Maria F. Soto-Salanova del laboratorio DSM internacional (2012): El elevado costo de la suplementación de las raciones de los pollos y cerdos con una fuente adecuada de fósforo a fin de

cubrir sus necesidades en este nutriente, de delicado equilibrio especialmente tras la prohibición del empleo de harinas de procedencia animal en las raciones, ha supuesto la introducción de unas fitasas a fin de optimizar el mejor aprovechamiento del fósforo de los productos vegetales. Este ha sido un apasionante campo de estudio en los últimos años, en el cual se han volcado diversas empresas que ahora ofrecen en el mercado los frutos de sus investigaciones. Es importante combinar con precisión calcio, fósforo y fitasas. El interés en los beneficios de la aplicación de las fitasas más allá de la simple liberación de fósforo (P) procedente de los fitatos vegetales está aumentando con gran rapidez. El uso de dosis más altas de fitasa para eliminar los efectos antinutritivos de los fitatos y mejorar sustancialmente el resultado productivo de los monogástricos – (superdosing) – se ha extendido hasta representar un 7% del valor de mercado de la fitasa desde que se introdujo este concepto en 2012. Está claro que una mejor comprensión del funcionamiento del “superdosing” es la clave para una mejora en su implementación y en el incremento de los resultados productivos previstos. En la figura 8 se detalla la descomposición del fitato en inositol y fósforo por la acción de la fitasa.

**Figura 8:** Descomposición del fitato en inositol



Datos reconstruidos de la información de Laboratorios DSM, 2012

Según lo expresado por Pattacini *et al.*, (2012) los beneficios que se observan en los resultados productivos de los animales cuando se utiliza el “superdosing” se deben a algo más que a la mera eliminación de los efectos antinutritivos del fitato. Este descubrimiento es extremadamente importante y va a jugar un papel fundamental a la hora de seleccionar con éxito una fitasa que no sólo sea

capaz de liberar la cantidad esperada de fósforo, sino que sea además efectiva para utilizarla en altas dosis, y consecuentemente poder implementar una estrategia de “superdosing” con garantías de éxito. En producción de carne, ya sea de cerdos, broiler o pavos, la mejora esperada al utilizar una fitasa a niveles de “superdosing” es de tres a cuatro puntos en el índice de conversión (IC). En producción de huevos, se obtienen mejoras tanto en la calidad de la yema (mayor contenido de minerales) como en la calidad de la cáscara. Asimismo, se ha constatado una reducción de la mortalidad de las gallinas en las últimas fases de la puesta. Todo ello representa cuantiosos beneficios para el productor. Se estima un aumento de 4 huevos comercializables por gallina. El primer paso es definir de forma precisa lo que denominamos “superdosing”. En monogástricos, hablamos de la aplicación a altas dosis (normalmente de tres a cuatro veces la dosis estándar) de una 6-fitasa de *E. coli* de última generación, muy eficiente e intrínsecamente termoestable, única en el mercado. Las citadas fitasas han sido desarrolladas específicamente para alcanzar la destrucción casi total del fitato. Un dato importante es que, si aplicamos el “superdosing”, debemos aplicar solamente la matriz mineral de la dosis estándar en la formulación de la dieta. Las fitasas de *Escherichia coli* de nueva generación son capaces de alcanzar hasta un 90% de destrucción tanto del fitato (IP6 –hexafosfato de inositol) como de los ésteres inferiores intermedios producidos cuando el fósforo ha sido desprendido del fitato por la acción de la fitasa, como el IP4 y el IP3. Estos ésteres inferiores también actúan como antinutrientes y junto con el fitato (IP6) producen múltiples efectos negativos.

Por ejemplo, el fitato se unirá a minerales cargados positivamente y a proteínas del alimento dentro del intestino y los hará menos utilizables. También se ha demostrado que el fitato puede reducir la activación de la enzima pepsina del estómago, que es responsable de la digestión de las proteínas.

El consecuente aumento de proteínas no digeridas que llegan al intestino delgado incrementa las pérdidas endógenas, acelerando la producción de ácido clorhídrico adicional y de pepsinógeno (el precursor de la pepsina) en el estómago y el proventrículo. Otras pérdidas se producen por una mayor

secreción de mucosidad (para proteger la pared intestinal del efecto irritante de este ácido), y de bicarbonato sódico (para neutralizar el ácido extra).

También existe evidencia de que el fitato afecta negativamente al mecanismo por el cual los aminoácidos se absorben desde el intestino delgado, mientras que se ha demostrado que el IP3 y el IP4 interfieren con la actividad de la pepsina y reducen la absorción de zinc, calcio y cobre. Estos efectos antinutritivos adicionales evidencian lo importante que es alcanzar la degradación del fitato por debajo del IP3 cuando se aplica el “superdosing”. Igualmente importante es el hecho de que hasta el 30% de la respuesta a la “superdosing” observada en los pollos de engorde parece deberse a los efectos beneficiosos del inositol, que es la molécula que permanece una vez que todo el fósforo ligado al fitato ha sido liberado por la acción de la fitasa.

El efecto positivo del inositol en el crecimiento y en los resultados productivos de los pollos es un hecho conocido desde los años 40. Al inositol se le atribuyen importantes funciones metabólicas: participa en el metabolismo de las grasas y el funcionamiento celular. El inositol también se combina con fosfato a nivel celular para regenerar el fitato (que actúa como un potente antioxidante a nivel celular) y algunos de los ésteres inferiores de fitato (tanto el IP3 como el IP4 son importantes para la función celular).

De hecho, resultados muy recientes demuestran que el inositol favorece el crecimiento y mejora los resultados productivos independientemente de si la dieta es deficiente o no en fósforo. La razón exacta por la que se produce este efecto no se conoce todavía, pero una prueba reciente realizada en pollos de engorde en la que se suplementó la dieta con niveles de inositol equivalentes a la degradación total del fitato del alimento, ha confirmado su papel fundamental en la respuesta global del “superdosing”. Cuando se implementa una estrategia de “superdosing” el reto es, por tanto, conseguir en la medida de lo posible la casi completa degradación de fitato en inositol, algo considerablemente más difícil de conseguir que la descomposición parcial necesaria para liberar el objetivo nutricional de 0,15% de P disponible (0,12% P digestible aves) que se consigue con una dosis estándar de fitasa. Como tal, el “superdosing” acentúa aún más la necesidad de contar con una fitasa de gran eficiencia y con las características que permitan alcanzar la total eliminación del fitato y maximizar

así la liberación de inositol. En este sentido, es esencial la termoestabilidad del producto para poder resistir las altas temperaturas durante la elaboración del alimento manteniendo la actividad, preferentemente sin tener que recurrir a un recubrimiento, ya que éste retardaría el inicio de la actividad en el estómago. Es aquí, en condiciones ácidas, donde el fitato es soluble y por tanto disponible para su degradación. Una buena estabilidad y tolerancia gástrica son también necesarias para resistir la acción de las propias enzimas digestivas de las aves, mientras que la actividad de la fitasa debería ser óptima al pH bajo del estómago (pH 2-3). Además, es esencial un alto grado de descomposición del fitato, y ha de producirse con la celeridad suficiente para prevenir que se produzcan efectos antinutritivos. Además, esta descomposición ha de continuar incluso a bajas concentraciones de fitato, para poder alcanzar su práctica eliminación. La pregunta lógica que se plantea a este nivel de destrucción del fitato es si sería posible aumentar la valoración de la matriz de formulación para beneficiarse –a través de mayores reducciones en el costo de la dieta– del fósforo adicional liberado con respecto a la dosis estándar de fitasa. Sin embargo, hasta la fecha, la experiencia indica que no es posible garantizar la liberación de un 0,20 0,25% de P disponible, por ejemplo, cuando las materias primas (y por tanto las concentraciones del fósforo fítico) de la dieta, varían. Además, es probable que las necesidades de fósforo de aves alimentadas con “superdosing” sean más altas debido a factores tales como el aumento en el ritmo de crecimiento, o el uso de fósforo para re fosforilar el inositol adicional disponible a nivel celular. La totalidad de los datos recogidos en la práctica durante al menos los últimos dos años muestra que tanto la mejora en los resultados productivos como en los beneficios económicos que resultan del “superdosing” se alcanzan sólo cuando se aplica la matriz mineral estándar. La clave está en la elección de una fitasa capaz de destruir totalmente el fitato, lo más eficazmente posible para conseguir eliminar el efecto antinutritivo del fitato y maximizar la liberación de inositol.

Esto no es una tarea sencilla, ya que la variedad de productos comerciales de fitasa ha crecido considerablemente en los últimos años. Así pues, el éxito de “superdosing” de una fitasa va a depender tanto de la elección del producto adecuado como de una dosificación y aplicación correctas. Lo importante es

entender mejor qué factores y mecanismos determinan las respuestas en las aves y cerdos así como el papel emergente que desempeña el inositol en esa respuesta. Sólo así conseguiremos tener resultados fiables, consistentes y reproducibles al utilizar el “superdosing”. Las fitasas *E. coli* de nueva generación son capaces de llegar al 90% de destrucción tanto del fitato (IP6 - fitato es hexafosfato de inositol) como de los ésteres inferiores intermedios (como el IP4 y el IP3), también con efecto antinutritivo, producidos cuando el fitato es liberado de las moléculas de fosfato por la acción de la fitasa.

### **¿Cómo seleccionar la mejor Fitasa?**

La que dé mayor ahorro por tonelada de alimento preparado, es decir, la que tenga la matriz con los valores más altos y funcionales para producir IP1 e inositol ya que va a dar los mejores resultados económicos. Esta elección pasa inicialmente por una prueba de confianza en base al laboratorio que lo ofrece y luego por una prueba de campo que valida los cálculos estimados.

Por consiguiente la mejor manera de elegir una fitasa, no es por su costo por kg; ni por su valor de costo por tonelada medicada (precio de la enzima por la cantidad de gramos incluidos por tonelada), sino por la cantidad de dinero que nos hace ahorrar por tonelada de alimento preparado después formular la ración a mínimo costo.

Considerando los factores expuestos se debe usar la 3-fitasa de origen microbiano y no la 6-fitasa de origen vegetal; ya que comparativamente, esta última tiene 40% de menos efectividad.

Para el uso frecuente de la 3-fitasa en granja, las pruebas de campo van a ser importantes ya que permitirán cuantificar el costo beneficio que genera esta enzima al liberar nutrientes (almidón, proteína y minerales) ligados al fitato de los insumos.

La principal ventaja de la utilizar enzimas en la formulación de raciones alimenticias es la reducción del costo de la ración sin perder las características nutricionales deseadas.

No debemos olvidar que el cuidado del medio ambiente es tarea de todos y ver por la economía de nuestro negocio es nuestro mayor empeño. La FDA de USA recomienda reemplazar el 0.1% hasta el 0.12% del fósforo inorgánico por

fitasa. Para que esto sea rentable y posible es necesario que tanto los productores como los empresarios proveedores de enzimas evalúen sus costos de esta manera se logrará un mayor beneficio para la población en general. Los trabajos de investigación han demostrado que, la utilización de enzimas exógenas en las dietas puede traer resultados significativos en la producción de suinos, por la mejora de la digestibilidad de los nutrientes, por la economía en el costo de producción, por la reducción de contaminación ambiental y hasta para la mejora del desempeño de los animales. El peligro de contaminación ambiental es importante en el mundo y también en América Latina que produce el 47% de los porcinos en el continente, el resto lo hace USA y Canadá. La inclusión de menores cantidades de fósforo en las dietas es una de las maneras de reducir la excreción de fósforo en heces. Este fósforo excretado es el que contribuye a la mayor contaminación ambiental especialmente del suelo. Con la adición de fitasas microbianas y/o fúngicas a las dietas para mejorar el aprovechamiento del fósforo se puede reducir el desperdicio de fosfato y evitar estos sobrantes nocivos para la salud. La elevación reciente en los precios de los cereales y las semillas de oleaginosas no sólo han aumentado los costos de los alimentos, si no que han planeado a los nutriólogos el reto de encontrar nuevas alternativas para mejorar la eficiencia en el aprovechamiento de los alimentos. En este sentido el uso de algunas enzimas exógenas puede mejorar la digestibilidad de las dietas y también reducir los efectos dañinos de algunos de los factores antinutricionales presentes en las fuentes de proteínas vegetales desde 1958, la mayoría de los esfuerzos de las investigaciones en el campo de las enzimas se orientaron a mejorar la digestibilidad de los cereales que podrían remplazar al maíz en los alimentos de los animales, existe un gran potencial en mejorar la digestibilidad en particular la pasta de soja. La utilización de enzimas en la nutrición de cerdos, puede ser una buena alternativa como aditivo en raciones formuladas con materias primas tradicionales con el fin de mejorar la digestibilidad de los alimentos e incrementar la productividad de las explotaciones porcinas.

## **FITASAS**

La primera enzima que fue ampliamente investigada y evaluada en la alimentación animal fue la fitasa. En los vegetales cerca de 2/3 del P se encuentra ligado a los fitatos y en general, sería suficiente para cubrir las funciones esenciales de los porcinos, si no fuese su baja disponibilidad, variando de 15 a 50% dependiendo del vegetal. Eso ocurre debido a que el fósforo está presente en forma de fitato, el cual es prácticamente indigerible, siendo eliminado en las heces. La ocurrencia del fitato como factor antinutricional para los animales monogástricos provoca la necesidad de suplementación de fósforo como fuente inorgánica, que en general es onerosa, a pesar de estar presente en las dietas en cantidades por encima de las exigencias de los animales.

Como consecuencia, el fósforo fítico, por ser de baja disponibilidad, juntamente con el exceso de fósforo inorgánico adicionado a las raciones, es eliminado en las heces de los animales. La enzima fitasa ha sido utilizada con éxito en las raciones de suinos y aves para liberar parte del fósforo que se encuentra en forma de fitato y mejorar la digestibilidad de la proteína bruta, de los aminoácidos y la absorción de minerales (Mcknight, 1996). Varios factores pueden influenciar la eficiencia de la fitasa, incluyendo la cantidad de fitato en la dieta, la cantidad de fitasa adicionado a la dieta y el tipo fitasa. Estudios han demostrado mayores respuestas a fitasas en suinos alimentados con dietas que contienen mayores cantidades de fitatos. (Selle *et al.*, 2008). Fitasas derivadas de bacterias *E. Coli* también son más eficientes que las fitasas fúngicas en términos de cantidad de fósforo liberado por unidad de fitasa. (Kornegay *et al.*, 1996; Aufspurner *et al.*, 2007). Sin embargo, las técnicas analíticas utilizadas para determinar liberación de fósforo varían entre los fabricantes de fitasa comercial. Debido a esto, la cantidad de fósforo liberado por unidad de fitasa puede diferir entre dos productos de fitasa, como fue demostrado por Jones (2009). Así, dependiendo del ensayo utilizado, resultados diferentes de actividades de fitasa pueden ser relatados. Tsai (2007) evaluó el uso de la enzima fitasa en la alimentación de suinos desde el periodo pos destete hasta la edad de beneficio, observando efectos positivos en el desempeño, calidad ósea y rendimiento de carcasa (cuadro 1). La adición de

fitasa en la dieta reduce el nivel de fósforo en los desechos de suinos. No obstante, las reducciones de fósforo con fitasa puede variar para cada sistema de producción, debido a la variación en la cantidad y tipos de ingredientes contenidos en la dieta, por el nivel de fósforo de la formulación y, posiblemente, por la dilución de los desechos con las aguas residuales. McMullen & Karsten (2012) evaluaron una mejora de hasta 22% en la excreción de fósforo en la dieta de suinos (cuadro 2).

**Cuadro 1:** Efecto de la suplementación de fitasa sobre el desempeño, calidad ósea y digestibilidad de nutrientes.

	Control	Control	Control	Control	Control	SEM	P
	+	-	-	-	-		
Fitasa	-	-	*	**	***		
GPD, g/d	986 <sup>a</sup>	721 <sup>c</sup>	896 <sup>b</sup>	952 <sup>a</sup>	1014 <sup>a</sup>	20	<0,0010
Cenizas óseas, %	45,5 <sup>a</sup>	37,2 <sup>b</sup>	44,0 <sup>a</sup>	45,4 <sup>a</sup>	45,9 <sup>a</sup>	1,0	<0,0001
Largo óseo, mm	17,1 <sup>ab</sup>	15,3 <sup>c</sup>	16,0 <sup>bc</sup>	17,3 <sup>ab</sup>	17,5 <sup>a</sup>	0,5	0,0151
Rendimiento de carcasa, %	75,6 <sup>a</sup>	74,1 <sup>b</sup>	74,9 <sup>b</sup>	75,5 <sup>a</sup>	75,4 <sup>a</sup>	0,3	0,0016

Fósforo disponible control positivo (0,35/0,30/0,25%); Fósforo disponible control negativo

(0,13/0,10/0,10%). Igual letra en la fila no difiere estadísticamente ( $p < 0,01$ ) Tukey – HSD.

Fitase \* (500/500/500); Fitase \*\* (12.500/500/500); Fitase \*\*\* (12.500/12.500/500); Tsai, 2007

**Cuadro 2:** Efecto del uso de fitasa en la eliminación de fósforo en los desechos de los cerdos.

	Control	Fitasa	P	% reducción
<b>Sólidos</b>				
Materia natural (%)	1,63 <sup>b</sup>	1,34 <sup>a</sup>	0,0006	17,79
Materia seca (%)	5,90	4,92 <sup>a</sup>	0,0001	16,61
<b>Líquidos</b>				
Materia natural (%)	0,208 <sup>b</sup>	0,162 <sup>a</sup>	0,05	22,11
Materia seca (%)	7,29 <sup>b</sup>	6,07 <sup>a</sup>	0,004	16,74

Números con igual letra no difieren estadísticamente ( $p < 0,05$ ) Tukey – HSD . McMullen & Karsten, 2012

Un importante factor en la industria de alimentos para animales lo constituyen las fuentes proteicas vegetales que contienen ácido fítico y sus sales, por ser la principal forma de almacenamiento de fósforo (P) en cereales y leguminosas. En los animales monogástricos la presencia de enzimas fitasas degradantes de las formas en que se presenta el ácido fítico es nula o mínima en sus tractos gastrointestinales, lo que provoca que la baja biodisponibilidad del P presente en ingredientes de origen vegetal sea un problema a nivel de este tipo de alimentación (Cromwell y Coffey, 1991; Tomshy *et al.*, 2000). El ácido fítico presente en los alimentos elaborados con proteínas vegetales se exhibe como un factor antinutricional para los animales monogástricos al formar complejos con proteínas y una variedad de iones metálicos causando una disminución en la disponibilidad de estos nutrientes (Reddy *et al.*, 1982; Wodzinski y Ullah, 1996). Debido a estos problemas hay mucho interés en la degradación enzimática de las formas en que se presenta el ácido fítico en los alimentos de origen vegetal (Wyss *et al.*, 1999). Por ello, el uso y la aplicación de la enzima fitasa se ha generalizado en la industria elaboradora de alimentos de aves y cerdos como una estrategia para mejorar la biodisponibilidad de fosfato.

El peligro de contaminación ambiental es importante en el mundo y también en América Latina que produce el 47% de los porcinos en el continente, el resto lo hace USA y Canadá. La inclusión de menores cantidades de fósforo en las

dietas es una de las maneras de reducir la excreción de fósforo en heces. Este fósforo excretado es el que contribuye a la mayor contaminación ambiental especialmente del suelo. Con la adición de fitasas microbianas y/o fúngicas a las dietas para mejorar el aprovechamiento del fósforo se puede reducir el desperdicio de fosfato y evitar estos sobrantes nocivos para la salud.

Las fitasas microbianas se pueden obtener a partir de numerosas bacterias como *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella aerogenes* y *Pseudomonas spp.* También en levaduras y hongos, siendo la fuente fúngica más importante la del género *Aspergillus*. No se han detectado sinergias en la utilización de fitasas de origen fúngico y bacterianas sobre el nivel plasmático de fósforo (Stahl *et al.*; 2004). La fitasa microbiana tiene un rango óptimo de pH de actuación entre 2,5 y 5,7 y una temperatura recomendable de 60°C (Simons *et al.*, 1992). Si bien actualmente se cuenta con fitasas microbianas más resistentes térmicamente en el año 2000 se obtuvo a partir de *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente, una fitasa capaz de resistir temperaturas de 90°C durante 30 segundos (Ferreira, 2003). La fitasa obtenida del hongo *Aspergillus oryzae* con cubierta termoestable (CT) es una fitasa que aumenta tanto la disponibilidad del fósforo fítico y otros nutrientes ligados a los fitatos en los alimentos de porcinos y aves, como también minerales como calcio, magnesio y minerales traza siendo muy estable al calor. Las mejoras en la persistencia al calor se atribuyen a la mayor estabilidad intrínseca de la molécula de fitasa en combinación con la nueva generación de la tecnología de formulación con CT. Esta incomparable composición de tecnologías permite la protección de la proteína fitasa a las temperaturas de procesado del alimento hasta 95° C (Ferreira, 2003).

La mejor manera de evaluar la eficiencia de una fitasa es por medio de pruebas que tengan en cuenta la liberación de P inorgánico *in vivo* y parámetros productivos. Con base en estos criterios se puede definir y cuantificar las unidades de fitasas necesarias para cada formulación de alimentos para los distintos estados fisiológicos de las diferentes especies de importancia económica-zootécnica (Fuller, 1989). Debido a la gran variación intrínseca entre las fitasas, no existe una metodología estándar internacional para expresar las cantidades de fitasas (Selle y Ravindran, 2006). La actividad

mínima se puede determinar mediante unidades FYT /Kg, que es la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1  $\mu\text{Mol}$  de P inorgánico por minuto, a partir de 5 mM de fitato de sodio a pH 5.5 tamponado a 37°C.

Con la adición de 500 UF (unidades de fitasa)/kg de alimento se consigue una reducción del 33% en la excreción del fósforo, existiendo una respuesta al incremento de las dosis de fitasas pero sólo hasta 1000 UF/kg, a partir de esa concentración no hay una mayor digestibilidad de fósforo. La dosis recomendada por la mayoría de los autores es de 500 UF/kg de alimento, lo que equivale a 1 g de fósforo digestible/kg de alimento. La mayoría de los productos comerciales se encuentran en forma de polvo, gránulo o forma líquida (Vanbelle, *et al.*, 1990).

Se han evaluado pollos y cerdos *in vivo* para determinar la eficacia relativa de la fitasa de origen vegetal y microbiano, encontrándose que la fitasa de los cereales es 40% menos efectiva que la fitasa microbiana.

Este potencial más elevado de la fitasa microbiana para liberar fósforo disponible para pollo de engorde también fue confirmado por Oloofs *et al.* (1998). Recientes estudios de estos autores han demostrado que al agregar la enzima fitasa a las dietas de aves y cerdos se puede aumentar la cantidad de fósforo disponible al animal, lo cual debe permitir a los productores poder reducir de 0,1 a 0,12 % la cantidad de fósforo inorgánico dietario. De esta manera se reduce la cantidad de fósforo en el estiércol y por consiguiente la contaminación ambiental.

Pattacini (*et al.*, 2011) realizaron una investigación cuyo objetivo fue determinar si el agregado de monofosfato dicálcico ( $\text{Ca}_2\text{PO}_4$ ) y fitasa de origen fúngico (*Aspergillus oryzae*) en dietas destinadas a la alimentación de cerdos en terminación reducen la excreción de P y Ca inorgánico a través de las heces luego de ser digeridas, generando así efluentes menos contaminantes al ambiente. Se llevó a cabo en una granja porcina del centro este de la provincia de La Pampa, Argentina (Latitud 36° 46' Sur; Longitud 64° 16' Oeste; Altitud 210 m sobre el nivel del mar).

Los cerdos experimentales estuvieron constituidos por machos castrados F2 provenientes de un cruzamiento de hembras híbridas F1 (Yorkshire x Landrace) por macho terminal Duroc Yersey de valor genético comprobado. Se

seleccionaron de camadas de igual edad cronológica cuya obtención fue programada por servicios mediante inseminación artificial en cerdas híbridas primerizas pertenecientes a un rodeo de manejo reproductivo estacionado. Cumplieron con una lactancia de 32 días en confinamiento. Se les suministró alimentación adicional en lactancia mediante iniciadores comerciales de alta calidad. Posteriormente fueron recriados en pistas de cemento con 75% de la superficie techada, provistas de comederos tolva y patio con bebedero tipo niple. Cuando los cerdos arribaron a 30 kg de peso vivo luego de un período de socialización de 30 días con sus compañeros de tratamiento comenzaron a consumir las raciones de crecimiento hasta alcanzar 60 kg de peso vivo. De allí a 105 kg de peso vivo se les suministró dietas de terminación.

Finalizado este período se ordenaron en cuatro grupos de 5 cerdos cada uno de peso vivo y edad cronológica afín que se dispusieron en pistas de recría-terminación de piso de cemento y 75% de la superficie techada, también provistas de comederos tolva y patio con bebederos tipo niple, lugar donde culminaron el crecimiento y la terminación con una superficie de alojamiento por cerdo de 1,968 m<sup>2</sup>, hasta el momento de iniciarse el experimento. Las unidades experimentales fueron 20 cerdos que se ordenaron en un diseño completamente aleatorizado. A cada cerdo se le asignó al azar un tratamiento y fueron señalados en las orejas por el sistema australiano de identificación, constituyendo así cuatro tratamientos (dietas) totalizando 5 unidades experimentales (repeticiones) por tratamiento alojadas individualmente. El experimento se realizó durante las dos últimas semanas (14 días), donde los cerdos se ubicaron en jaulas individuales a los efectos de llevar adelante el ensayo de digestibilidad *in vivo*. Se adaptaron al sitio durante 8 días y el resto de los 6 días siguientes se utilizaron para recoger las heces y realizar los análisis posteriores. Durante los días de ensayo se le suministró a cada cerdo experimental 3,5 kg de ración diaria y cada 24 hs previo a la nueva reposición de alimento se pesaba el sobrenadante existente en los comederos en caso de encontrarse alimento residual. Las heces se recogían también cada 24 hs, y luego de pesadas se realizaba el lavado completo del piso de las jaulas. Luego de pesadas, se tomaba una muestra de las heces y se las acondicionaba en bolsas plásticas identificadas por animal y por día. Posteriormente se

congelaban hasta el momento del análisis. Se recogieron también muestras representativas de los alimentos suministrados a los animales para la evaluación de la composición química y bromatológica de las dietas.

Los tratamientos y el testigo estuvieron caracterizados por: Tratamiento 1= dieta testigo (D1) balanceada peleteada, con harina de carne y ceniza de hueso como fuentes de fósforo y calcio en la formulación. Tratamiento 2= dieta (D2) balanceada peleteada, con 0,15 g de fitasas y 4 g de monofosfato dicálcico ( $\text{Ca}_2\text{PO}_4$ ) por kg de alimento formulado. Tratamiento 3= dieta (D3) balanceada peleteada, con 0,10 g de fitasas y 5 g de monofosfato dicálcico ( $\text{Ca}_2\text{PO}_4$ ) por kg de alimento formulado. Tratamiento 4= dieta (D4) balanceada peleteada, con 0,05 g de fitasas y 6 g de monofosfato dicálcico ( $\text{Ca}_2\text{PO}_4$ ) por kg de alimento. Los T2, 3 y 4 se formularon sin agregado de harina de carne y ceniza de hueso. Las dietas fueron formuladas a partir de las necesidades nutritivas de los cerdos en las categorías en cuestión. Se utilizaron las tablas del NRC (2001). Los constituyentes de las dietas experimentales fueron maíz, sorgo, harina de carne, fitasas fúngicas, monofosfato dicálcico ( $\text{Ca}_2\text{PO}_4$ ), expeller de soja, afrechillo, sal común, bentonita, lisina sintética, metionina sintética, aceite vegetal, ceniza de hueso, núcleos vitamínico-minerales, conchilla y antiparasitarios. En el cuadro 3 se detalla la composición nutricional de las dietas experimentales.

**Cuadro 3:** Composición nutricional de las dietas experimentales por kg.

COMPOSICIÓN	D1	D2, D3, D4
Energía Bruta (Kcal/kg)	4390,08	4374,5
Ca (%)	0,863	0,884
P Total (%)	0,520	0,523
Proteína bruta (%)	15,01	15,44
Fibra bruta (%)	3,113	3,44
Materia Grasa bruta (%)	3,00	2,98
Cenizas brutas (%)	7,080	7,078
Materia Seca (%)	90,56	90,17

Se alimentaron *ad-libitum* y la forma de presentación de las dietas durante toda la experiencia fue peleteada. Las dimensiones de los pellet fueron de 3 mm de diámetro y 10 mm de longitud. La digestibilidad del fósforo en función de la concentración de fitasas sigue ecuaciones no lineales que son exponenciales y logarítmicas, pero de las cuales se puede deducir un incremento lineal del 0,016 % en la digestibilidad por unidad de fitasa (Kornegay, 1999). Debido a la gran variación intrínseca entre las fitasas, no existe una metodología estándar internacional para expresar las cantidades de fitasas (Selle and Ravindran, 2009). En la experiencia el blanco sobre la actividad mínima se determinó mediante unidades FYT /Kg, que es la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1  $\mu$ Mol de P inorgánico por minuto, a partir de 5 mM de fitato de sodio a pH 5.5 tamponado a 37°C. En la presente investigación la fuente de obtención de la fitasa utilizada en las dietas porcinas fue extracto seco de fermentación de *Aspergillus oryzae*. Es una 6-Fitasa que comienza la defosforilación del ácido fítico (myo-inositol) en la posición del carbono 6 para producir ortofosfato inorgánico y una serie de ésteres fosfóricos menores, por tales condiciones las proporciones agregadas de fitasa más monofosfato dicálcico en los tratamientos 2,3 y 4 equiparan el aporte de Ca y P que otorga la ceniza de hueso y la harina de carne en la dieta testigo (T1). A continuación se detallan las variables medidas en la experiencia. La digestibilidad aparente (DA) de las dietas fue calculada diariamente de la siguiente manera: % Digestibilidad= /MS ingerida (Kg) – MS excretada (Kg)/ MS ingerida (Kg)/ x 100. Al final de los 6 días se realizó el promedio de las observaciones y el respectivo desvío estándar de cada tratamiento. También se calcularon los coeficientes de digestibilidad aparente de la proteína bruta, energía bruta, fibra bruta, materia grasa, cenizas brutas, calcio y fósforo a través de la fórmula descrita por Pond et al., (1995) donde la DA de cada nutriente se calculó como % Digestibilidad = /nutriente consumido (g) – nutriente en heces (g)/ nutriente consumido (g)/ x 100. El valor de Ca y P en heces se utilizó para el cálculo de eficiencia de utilización de estos nutrientes en el alimento y el grado de contaminación que producen al ambiente sus residuos. Los análisis de los nutrientes se realizaron a través de la siguiente metodología: Calcio Método Oficial: R.D. 2257/1994 n°10. (FEDNA, 2010), Fósforo método Oficial: R.D.

2257/1994 n° 17 (FEDNA, 2010); Proteína Bruta Método Oficial: RD 2257/1994 n° 6 (FEDNA, 2010); Fibra Bruta Método Oficial: RD 2257/1994 n°7 (FEDNA, 2010); Materia Grasa Método Oficial B: RD 609/1999 n°4 (FEDNA, 2010); Cenizas Brutas Método Oficial: RD 2257/1995 n° 12 (FEDNA, 2010) y Energía Bruta por Bomba calorimétrica AOAC, (1995). Los análisis de los datos se realizaron por ANOVA y las diferencias de medias por el Test de Tukey HSD. En el cuadro 4 se detallan los coeficientes de digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS), de la proteína bruta (DAPB), energía bruta (DAEB), fibra bruta (DAFB) y de la materia grasa bruta (DAMG) de las dietas suministradas a los grupos experimentales.

**Cuadro 4:** Medias de los coeficientes de digestibilidad aparente (%) de la MS (Materia Seca), PB (Proteína Bruta), EB (Energía Bruta), FB (Fibra Bruta) y MG (Materia Grasa) de los grupos experimentales  $\pm$  1 error estándar.

<b>Tratamientos</b>	<b>DAMS</b>	<b>DAPB</b>	<b>DAEB</b>	<b>DAFB</b>	<b>DAMG</b>
<b>T1</b>	72,12 <b>a</b> (1,92)	67,24 <b>a</b> (0,86)	77,22 <b>a</b> (1,76)	45,06 <b>a</b> (0,46)	52,64 <b>a</b> (0,65)
<b>T2</b>	78,23 <b>bc</b> (2,03)	67,12 <b>a</b> (0,92)	78,25 <b>b</b> (1,83)	44,68 <b>a</b> (0,51)	53,10 <b>a</b> (0,71)
<b>T3</b>	76,15 <b>b</b> (1,97)	68,09 <b>b</b> (0,89)	79,01 <b>b</b> (1,78)	45,17 <b>a</b> (0,44)	53,27 <b>a</b> (0,68)
<b>T4</b>	74,12 <b>a</b> (1,83)	67,95 <b>ab</b> (1,01)	79,19 <b>b</b> (2,03)	44,73 <b>a</b> (0,49)	52,92 <b>a</b> (0,72)

Números con igual letra en la columna no difieren estadísticamente. Test de Tukey HSD ( $p \leq 0,05$ )

Se aprecian las diferencias significativas de DAMS entre el T2 y T3 con el Testigo y el T4. No se observan diferencias con T1 y T4 por tal, valores inferiores a 0,05 g de fitasas y 6 g de monofosfato dicálcico por kg de alimento no mejora la digestibilidad de la MS de la dieta, posiblemente porque tampoco incrementa la digestibilidad aparente de las cenizas, P y Ca (Cuadro 3), aumentando el total de la MS excretada en heces en concordancia a lo citado por Selle y Ravindran, (2006). La DA de la EB fue superior significativamente en T2 respecto de los otros tratamientos, probablemente por la mejor DA de los

nutrientes en este tratamiento que posee mayor proporción de fitasa en la dieta, que implica incorporar menor cantidad de minerales solubles a la formulación en reciprocidad a los estudios de Fuller, (1989). La mayor DAPB en T3 y T4 ( $p < 0,05$ ) respecto de los tratamientos T1 y T2 puede deberse a una menor excreción de nitrógeno fecal justamente por la no presencia de proteínas de origen animal en la dieta de menor valor biológico o bien que, proporciones mayores de P disponible en el metabolismo mejoren la utilización metabólica de la proteína dietaria. Del mismo modo la presencia de fitasas en las dietas incrementa significativamente la utilización energética en el metabolismo celular, respecto de T1. Factiblemente la presencia de mayor proporción P inorgánico disponible mejora la utilización de los nutrientes a nivel celular porque beneficia el transporte energético a través de moléculas de ATP para la síntesis de tejido de crecimiento, y también la relación Ca:P que en los monogástricos es trascendente para mantener el ritmo cardíaco y en consecuencia optimizar los procesos metabólicos y fisiológicos. No obstante la mayor biodisponibilidad de P en el metabolismo animal podría actuar como mecanismo sinérgico junto a otras enzimas e incluso con microorganismos digestivos que potencien sustancialmente la utilización de los nutrientes. Aunque la DAFB no presenta diferencias significativas entre los tratamientos, solamente alrededor del 50% de la fibra ingerida fue utilizada como fuente energética, situación que coincide con la bibliografía sobre digestibilidad de la FB en monogástricos y además el aporte dietario de este nutriente es mínimo. No existieron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos en la DAMG, proporción también pequeña en la formulación dietaria. En el cuadro 5 se detallan los coeficientes de digestibilidad aparente de calcio (DACa), fósforo (DAP) y cenizas brutas totales (DACB) de las dietas suministradas a los grupos experimentales.

**Cuadro 5:** Medias de los coeficientes de digestibilidad aparente (%) de Ca (DACa), P (DAP) y Cenizas brutas totales (DACB) de los grupos experimentales  $\pm$  1 error estándar.

<b>Tratamientos</b>	<b>DACa</b>	<b>DAP</b>	<b>DACB</b>
<b>T1</b>	55,12 <b>a</b> (1,27)	52,19 <b>a</b> (1,12)	55,83 <b>a</b> (0,96)
<b>T2</b>	67,13 <b>c</b> (0,98)	70,02 <b>d</b> (1,17)	68,34 <b>c</b> (1,01)
<b>T3</b>	60,10 <b>b</b> (0,86)	67,29 <b>cd</b> (0,97)	61,23 <b>b</b> (1,13)
<b>T4</b>	57,14 <b>ab</b> (1,05)	60,35 <b>b</b> (0,87)	59,11 <b>b</b> (0,99)

Números con igual letra en la columna no difieren estadísticamente. Test de Tukey HSD ( $p \leq 0,05$ )

Las excretas con elevadas proporciones de minerales y residuos orgánicos con contenidos de pared celular indigestibles tales como celulosa y lignina son vistas como contaminantes ambientales de importancia por los residuos inorgánicos y la mayor DQO (demanda química de oxígeno) para oxidar polímeros de alto peso molecular. Sin embargo, pueden generar recursos muy valiosos mediante su procesamiento de forma tal que al reciclarse parte de la energía en producción de biogás y de sus nutrientes como compost contribuyen a hacer sostenible la producción porcina y de otras especies animales integradas, aspecto que tiene alta correlación con la DA de los nutrientes (Cuadro 4 y 5). Del mismo modo la producción diaria de excretas y purines varía en función del tipo y peso vivo de cada especie animal, del alimento que consume comparativamente a los estudios de Wyss *et al.*, (1999), temperatura y humedad en que vive y además, de la cantidad de agua de lavado que se utilice en caso de producciones confinadas. En la experiencia los tratamientos con fitasas mejoraron la DA de la MS y minerales totales respecto al Testigo T1 tal como lo expresan Oloofs *et al.* (1998); situación que proporciona residuos menos contaminantes, alimentos más eficientes y

tratamientos de efluentes menos costosos. En la construcción de lagunas para los tratamientos de los residuos es fundamental saber la carga de materia orgánica del efluente, porque las lagunas aeróbicas estrictas sólo soportan cargas orgánicas bajas y contienen oxígeno disuelto en todo instante y en todo el volumen del líquido. Las anaeróbicas se proyectan para altas cargas orgánicas y no contienen oxígeno disuelto, aspecto que eliminaría esta posibilidad en los procesos productivos porcinos que suministren raciones dietarias ausentes de harina de carne y ceniza de hueso como ocurre en T1, T2 y T3 en correspondencia a la alta DA de la MS y los nutrientes, reduciéndolo así, a manejos de lagunas facultativas que operan con una carga orgánica media ya que en las capas superiores hay un proceso aeróbico y en las inferiores se tiene un proceso anaeróbico, donde se produce simultáneamente fermentación ácida y metánica. Las dietas con fitasas pueden prescindir de lagunas anaeróbicas estrictas pero no de facultativas ya que necesariamente requieren la digestión anaeróbica por un lado debido a que el 20% de las deyecciones sólidas no son biodegradables o se degradan lentamente, tal el caso de cenizas, ligninas y celulosa; y de aeróbica por contenidos medios de materia orgánica en suspensión. Este aspecto imprescindible (digestión anaeróbica-aeróbica) se aprecia para todos los tratamientos por la igualdad de residuos de FB ( $\pm 45\%$ ) y además por la proporción significativamente superior de CB en el T1 debido a menor digestibilidad aparente de las mismas (Cuadro 3). En el caso de los tratamientos 2 y 3 la significativa reducción de P y Ca en los residuos de purines mejorarían la calidad ambiental. Del mismo modo en ambos tratamientos la significativa mayor DA de la MS ( $\pm 77\%$ ) generaría almacenamiento de purines con menor contenido de materia orgánica y por tal reducción de la  $DBO_5$  (demanda biológica de oxígeno para sustratos nitrogenáceos y carbonáceos), medida que aportaría la proporción en que desaparece el oxígeno de una muestra de agua y que es utilizada como un indicador de la calidad del agua de efluentes residuales; y de la DQO durante la digestión aeróbica por la poca presencia de materia orgánica con y sin pared celular en suspensión, cuantía que mide la cantidad de materia orgánica susceptible de ser oxidada por medios químicos que hay en una muestra

líquida, de modo que también es un indicador de la demanda de oxígeno para estas reacciones y por tal de la calidad de los efluentes residuales.

La alianza DSM-Novozymes lanzó durante el año 2014 en Europa al mercado Ronozyme NP, su nuevo producto estrella, una fitasa mejorada diseñada para satisfacer las demandas de los modernos sistemas de producción animal. Ronozyme NP de acuerdo a DSM es el más reciente producto de la amplia cartera de enzimas para alimentación animal dentro de la industria de alimentos, siempre bajo la marca Ronozyme. Ronozyme NP ha sido desarrollado exclusivamente dentro de la Alianza de DSM Nutritional Products y Novozymes. Además de su probada eficacia, en términos de liberación de fósforo, Ronozyme NP cumple con los criterios estrictos de la alianza en lo que respecta a la eficacia del producto, seguridad, calidad, trazabilidad y fiabilidad para superar las demandas de los clientes actuales. Basándose en los resultados de los ensayos realizados, Ronozyme NP CT (cubierta termoestable) aumenta aún más, tanto la disponibilidad del fósforo fítico y otros nutrientes ligados a los fitatos en los alimentos de porcino y avicultura, como también minerales como calcio, magnesio y otros minerales traza, mientras que sigue siendo la fitasa del mercado más estable al calor. Las mejoras en la estabilidad al calor se atribuyen a la mayor estabilidad intrínseca de la molécula de fitasa en combinación con la nueva generación de la tecnología de formulación CT. Esta incomparable combinación de tecnologías permite, la protección de Ronozyme NP a las temperaturas de procesado del alimento hasta 95° C. Estudios del laboratorio han demostrado una eficacia significativamente mayor de Ronozyme NP (CT) sobre el fósforo fítico en pollos de engorde y resultados aún mejores en porcino. Hoy este laboratorio está en condiciones de atender la creciente demanda mundial de una fitasa estable al calor. Gracias a sus nuevas propiedades, Ronozyme NP (CT) es la fitasa con mejor costo-eficacia del mercado. Además, por su flexibilidad en el nivel de inclusión por encima de la dosis estándar, los productores de alimentos pueden obtener beneficios aún mayores y aprovechar todo el potencial de este eficiente producto. Ronozyme NP, DSM Nutritional Products está ampliando su oferta para cubrir cualquier sistema de fabricación de alimentos. Ronozyme NP está disponible en una presentación con cubierta

termoestable (CT) para los alimentos granulados y en forma líquida (L) para su aplicación después de la granulación.

### **Carbohidrolasas**

Hasta pocos años atrás, existía el concepto de que no era necesario utilizar otras enzimas, además de fitasa, en la dieta a base de maíz y harina de soja. Entretanto, con el cambio en el escenario internacional en cuanto a disponibilidad, utilización y producción de estos ingredientes, llevó a reevaluar esta posibilidad. Cuando trabajamos con dietas vegetales, sus ingredientes presentan una considerable cantidad de polisacáridos no amiláceos (PNA) cuyos efectos antinutricionales son bien conocidos y son blanco de varias investigaciones. De esta forma, el uso de las carbohidrolasas tiene como objetivo principal la eliminación de los factores antinutricionales asociados con los componentes de PNA. Además diferentes estudios han demostrado que con una apropiada asociación de enzimas, los efectos de los factores antinutricionales pueden ser minimizados por la potencial mejora en el valor nutricional de los alimentos utilizados en las dietas. En el cuadro 6 están descritos la composición de ingredientes de algunos PNA y el modo de acción de las principales enzimas exógenas. En la figura 9 se detallan los tipos de polisacáridos.

**Figura 9:** Tipos de polisacáridos.

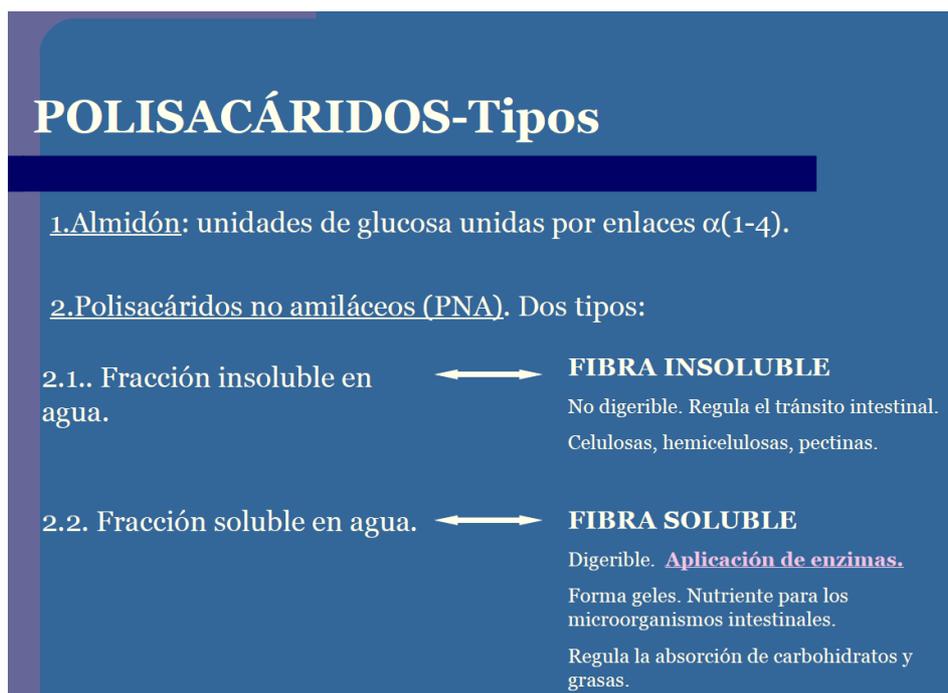


Figura extraída de la Tesis Doctoral de Braun, R.O.; 2012

El almidón es el polisacárido no estructural más importante de los granos, y por su composición química, representa polímeros amiláceos de alto peso molecular indigestibles en animales jóvenes que aún no cuentan con enzimas degradativas para esas estructuras, de manera que es indigestible. En la figura 10 se representan las estructuras químicas del almidón con y sin ramificaciones en las uniones  $\alpha 1 - 4$ .

**Figura 10:** Estructuras químicas del almidón.



Figura extraída de la Tesis Doctoral de Braun, R.O.; 2012

En el cuadro 6 se detallan la composición de polisacáridos no amiláceos de diferentes granos.

**Cuadro 6:** Composición de diferentes alimentos en polisacáridos no amiláceos (% de materia seca).

	Arabinosa	Xilosa	Manosa	Galactosa	Glicosa	Ác. Úrico	Total
Cebada	2,8	5,1	0,2	0,2	8,2	0,2	16,7
Maíz	1,9	2,4	0,2	0,4	2,6	0,6	8,1
Centeno	3,5	5,4	0,3	0,3	3,5	0,2	13,2
Sorgo	1,0	0,9	0,1	0,2	2,1	1,3	5,6
Trigo	3,3	4,8	-	0,3	2,8	0,2	11,4
F. Canola	4,3	1,7	0,2	1,6	5,8	4,6	18,8
F. Soya	2,0	1,8	0,6	2,9	6,7	2,5	17,2
F. Girasol	2,3	3,8	1,0	1,0	8,9	3,4	21,0

Adaptado de CLASSEN, 1996.

En el cuadro 7 las principales enzimas que actúan en sustratos no amiláceos y su forma de acción

**Cuadro 7:** Principales enzimas utilizadas y su modo de acción.

Enzima	Sustrato	Acción
Xilanasas	Arabinoxilanos	reducción de la viscosidad de la digesta
Glucanasas	Betaglucanos	reducción de la viscosidad de la digesta
Pectinasas	Pectinas	reducción de la viscosidad de la digesta
Celulasas	Celulosa	Degradación de la celulosa
Proteasas	Proteínas	suplementación de enzimas endógenas, degradación más eficiente
Amilasas	Almidón	suplementación de enzimas endógenas, degradación más eficiente
Fitasas	Ácido Fítico	mejora la utilización del fósforo de la planta, eliminar el ácido fítico
Galctosidasas	$\alpha$ - galactósidos	eliminación de los alfa galactósido
Lipasas	Lipídos e AG	Mejora la utilización de las grasas

Henn (2002)

En la figura 11 se detallan los sustratos de los polisacáridos en que actúan las enzimas

**Figura 11:** Sustratos de polisacáridos.

<b>SUSTRATOS POLISACARÍDICOS</b>		
<b>POLISACÁRIDO</b>	<b>ENZIMA</b>	<b>EFEECTO PRINCIPAL</b>
Betaglucano	Betaglucanasa	Reducción de la viscosidad
Xilanos/Arabinoxilanos	Xilanasas	
Amilosa	Amilasa	Mejor aprovechamiento del almidón

Además de la mejora en la utilización de nutrientes, las enzimas pueden incrementar el desempeño de lechones a través de la producción de una variedad de productos oriundos de la hidrólisis de polisacáridos que tienen un efecto directo sobre la salud intestinal, manipulando el crecimiento de microorganismos gastrointestinales (Bedford, 2000; Williams et al, 2001; Pluske *et al*, 2002). Las enzimas exógenas también pueden mejorar la salud intestinal reduciendo la viscosidad de la ingesta debido a la presencia de PNA solubles, el que puede reducir la tasa de pasaje, la difusión de enzimas digestivas y aumentar la secreción de proteínas endógenas del intestino. Esto a su vez aumenta la disponibilidad de sustrato en la parte inferior del intestino para la proliferación microbiana (Verstegen y Williams, 2002; Omogbenigun *et al.*, 2004). Por ello, la suplementación de las dietas con enzimas para digerir PNA minimiza la carga microbiana intestinal que a su vez aumenta la disponibilidad de nutrientes para el animal y disminuye la proliferación de bacterias patógenas.

En la figura 12 se detallan la localización de los polisacáridos en los granos.

**Figura 12:** Localización de los polisacáridos.



Así como las carbohidrolasas actúan sobre los carbohidratos, las proteasas actúan sobre las proteínas. Las proteasas pueden ser adicionadas a dietas de suinos para ayudar a digerir las proteínas que son resistentes a las enzimas digestivas que están naturalmente en el tracto digestivo de los animales. Sin embargo, debido a la digestibilidad de la proteína relativamente alta de harina de soja y otras fuentes de proteína utilizadas en las dietas, la cantidad de proteínas que no son descompuestas para la absorción es limitada. La capacidad de la enzima para las respuestas en la tasa de crecimiento o la eficiencia alimenticia es dependiente de la cantidad de sustrato disponible para su actuación.

¿Es necesario reformular las dietas a partir del momento que se utilizan enzimas? Cuando se piensa en fitasa, por ejemplo, no se justifica utilizar esta enzima en una formulación sin que haya una reducción del nivel de fósforo de la dieta, ya que una de sus funciones es convertir el fósforo, antes indisponible, en fósforo disponible para su utilización por el animal. Respecto a las demás enzimas, la valorización nutricional ganó mayor importancia principalmente en función del alza en los precios de las principales materias primas utilizadas en la formulación de las dietas.

Utilizando los conceptos descritos anteriormente, se pueden formular dietas combinando las diferentes enzimas para alcanzar un mejor desempeño de los animales. Owusu-asiedu *et al.* (2010) observaron una mejora en el desempeño

de los animales con la utilización de un complejo xilanasas- $\beta$  glucanasa en la alimentación de suinos. Volpi (2011) evaluó el uso de un complejo carbohidrolasa + fitasa en el período de 21 – 145 días y observó una mejora en el desempeño de los animales con la adición de este complejo en la dieta.

Ahora existen también otros mecanismos no enzimáticos que hidrolizan almidones de alto peso molecular como lo es la extrusión del endosperma de los granos. Es imprescindible detallar, los beneficios adicionales que otorgan procesamientos adicionales post molienda en la calidad nutritiva de los insumos. Estas mejoras pueden entenderse a partir de un análisis exhaustivo de cómo es el proceso, dónde actúa, qué fin persigue y qué ventajas en la producción concede la utilización de estos insumos en la nutrición animal y en particular la porcina y avícola.

Entre ellos, los tratamientos tecnológicos de tipo térmico o hidrotérmico unidos a uno mecánico, que se le adicionan a las harinas para mejorar su valor nutritivo, consisten en la combinación de las acciones del agua presente en las materias primas o la eventualmente añadida, con el calor y las acciones mecánicas. El fin es, desorganizar las estructuras celulares y moleculares de las materias primas. El principal interés se centra en desorganizar la estructura cristalina del almidón para alcanzar el estado de gelatinización del mismo (Kent, 1987; Irazusta, 1992; Serna Saldívar, 1998). El almidón puede clasificarse en cuanto a su interés nutricional en: almidón digerido rápidamente (ADR), almidón digerido lentamente (ADL), y almidón resistente (AR). Los de digestibilidad rápida se encuentran en las materias primas cocidas, en tanto los AR en los tubérculos y los ADL en los cereales que retrogradan rápidamente luego de la gelatinización del almidón.

Los procesos adicionales, a los cuales son sometidas las harinas, se pueden clasificar en fríos y calientes.

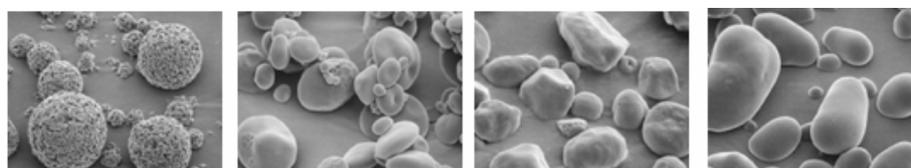
Dentro de los procesos fríos los más utilizados son el molido, quebrado y el aplastado. Entre los calientes el micronizado, la fabricación de copos (cocción – laminado), el peleteado y la extrusión y expansión. Los procesos calientes pueden a su vez ser divididos en métodos *húmedos* y *secos*. En los procesos húmedos se trabaja con agua y temperatura bajo la forma de vapor y en los

secos sólo con temperatura (Kent, 1987; Lorenz y Kulp, 1991; Irazusta, 1992; Serna Saldívar, 1998).

Estos procedimientos alteran los almidones que poseen grupos hidroxilos, los cuales son poco solubles en agua. La alteración de estos grupos por procesos hidrotérmicos, elevan el poder de retención del agua y facilitan la hinchazón y gelatinización de los granos de almidón (Cheftel, 1992). Los almidones pregelatinizados, cocidos por extrusión o sobre rodillos y después secos, aumentan de tamaño directamente en el agua fría, que a la vez retienen por su capacidad soluble después del tratamiento (Irazusta, 1992; Serna Saldívar, 1996). La forma física común del almidón en todos los cereales y tubérculos es el de agregados de moléculas poliméricas denominados gránulos. En la tabla 1 se presenta la forma y diámetro de los gránulos de almidón en algunos cereales y papa.

**Tabla 1:** Forma y diámetro ( $\mu$ ) de los gránulos de almidón en algunos cereales y papa.

	Arroz	Trigo	Maíz	Papa
Diámetro (micrones)	1-3	1-45	5-30	5-100
Forma	Poligonal esférico	Redondeado lenticular	Poligonal redondeado	Oval esférico



Extraída de la Tesis doctoral de Braun, 2012

También los granos de almidón son anisotrópicos debido a la presencia de regiones cristalinas en la masa predominantemente amorfa, razón que da como resultado el fenómeno de doble refringencia o birrefringencia que permite que el gránulo de almidón sea visto al microscopio de luz polarizada como dos

zonas de diferentes grises que asemejan a una cruz de malta. Esta birrefringencia se pierde cuando la cristalinidad se destruye. Ocurre cuando al grano de almidón se lo somete a la presencia de agua, calentada progresivamente. Este efecto se produce por la solvatación del coloide y en consecuencia la estructura se hincha, debido a los grupos polares hidroxilo que contiene. A cierta temperatura esta hinchazón es irreversible, pudiendo alcanzar en el caso del almidón de maíz un peso decenas de veces mayor en relación con el peso inicial del almidón previo al proceso (Cheftel & Cheftel, 1988; Cheftel, 1992). La imposibilidad de volver al estado original se debe a la pérdida de birrefringencia y a la destrucción del estado cristalino (Cheftel & Cheftel, 1988). Fuller (1990), menciona que existe una relación lineal positiva entre el porcentaje de pérdida de birrefringencia y la tasa de digestión *in vitro* del almidón usando amilogucosidasa. De acuerdo a Tscheuschner (2001), la temperatura a la cual ocurren estos fenómenos se llama temperatura de gelatinización y está asociada con la ruptura de los puentes secundarios de hidrógeno que mantienen las cadenas de polímeros unidas.

La gelatinización consiste en las modificaciones que se producen cuando los gránulos de almidón son tratados por calor en agua. A temperatura ambiente no tienen modificaciones aparentes en los gránulos nativos de almidón pero cuando se le aplica calor (60 - 70 °C), la energía térmica permite que pase algo de agua a través de la red molecular. Si se continúa aumentando la temperatura los enlaces de hidrógenos se rompen y la entrada de agua se produce más fácilmente cuando continúa el calentamiento, provocando el hinchamiento rápido de los gránulos de almidón (formación de pasta). El rango de temperatura que tiene lugar el hinchamiento de todos los gránulos se conoce como rango de gelatinización y es característico de la variedad particular de almidón que se esté investigando.

La gelificación es la formación de un gel y no se produce hasta que se enfría una pasta de almidón. Es decir, la gelatinización debe preceder a la gelificación. Al enfriarse una pasta de almidón se forman enlaces intermoleculares entre las moléculas de amilosa. Se forma una red donde queda el agua atrapada, al igual que cualquier otro gel, el de almidón es un líquido con características de sólidos. Los geles formados se hacen

progresivamente más fuertes durante las primeras horas de preparación, pero a medida que progresa el tiempo el gel tiende a envejecerse debido a la retrogradación del almidón, perdiendo su fortaleza y permitiendo la salida del agua del gel.

La temperatura de gelatinización en el caso de la cebada está en un rango de 59 - 64 °C, para el trigo 65 - 67 °C y para el sorgo entre 67 y 77 °C, (Kent, 1987; Hosney, 1991; Irazusta, 1992). La temperatura de gelatinización está asociada con la ruptura de los puentes secundarios de hidrógeno que mantienen las cadenas de polímeros unidas. En la tabla 2 se describen algunas de las temperaturas de gelatinización en cereales y papa.

**Tabla 2:** Temperatura en °C de gelatinización de cereales y papa.

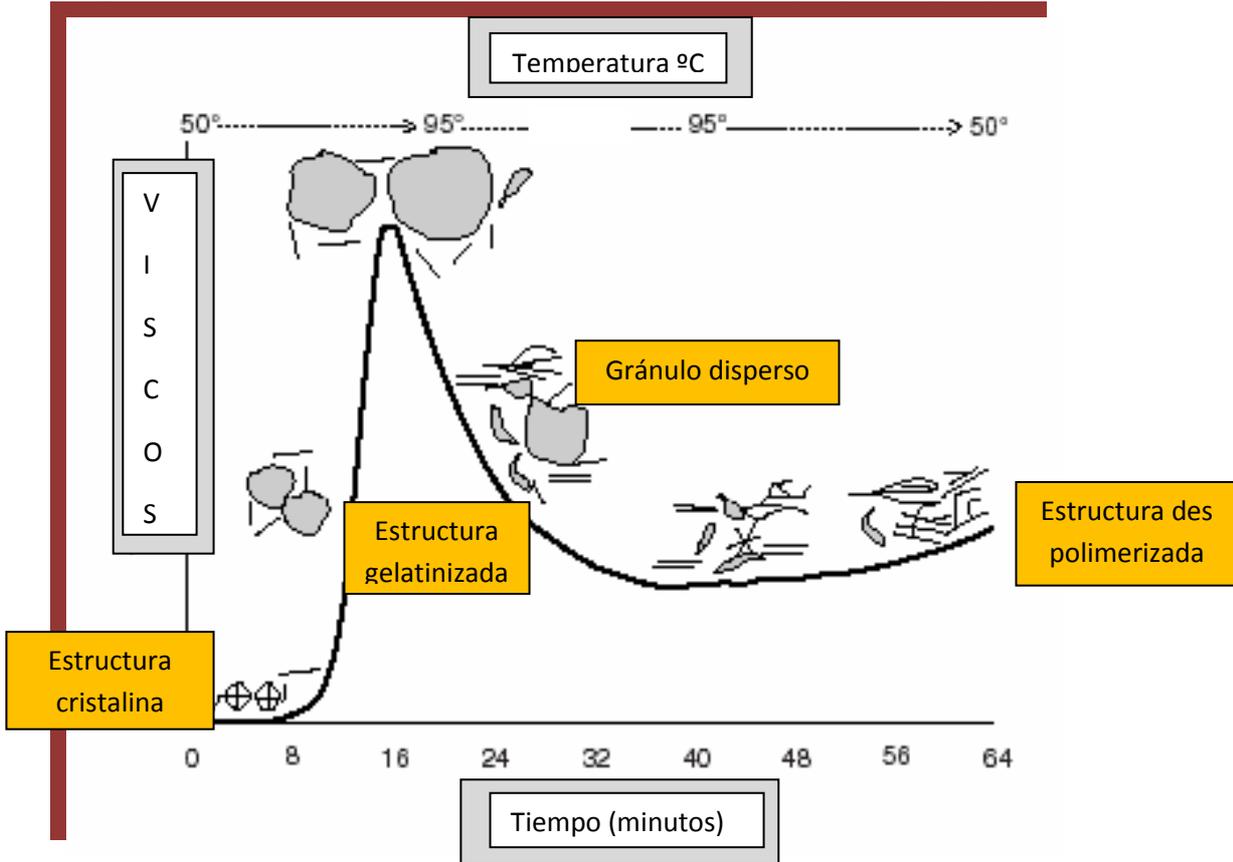
	Trigo	Cebada	Arroz	Papa	Maíz
Tº gelatinización (°C)	58-65	51-60	68-78	59-68	62-72

Extraída de la Tesis Doctoral de Braun, 2012

Entender el proceso de pre-gelatinización es importante para comprender la significancia práctica de una digestión facilitada de los almidones por los animales. Cuando los gránulos de almidón se exponen al mismo tiempo al calor y a la humedad, hay una gelatinización que ocurre por encima de 55 - 70 °C. En ese momento la viscosidad de la suspensión de almidón aumenta considerablemente, porque los gránulos hinchados se adhieren los unos a los otros. Si se prolonga el tratamiento hidrotérmico, puede surgir una ruptura de los gránulos, hidrólisis parcial y disolución más o menos completa de las moléculas constituyentes, lo que origina un descenso de la viscosidad (Cheftel & Cheftel, 1988; Mercier *et al.* 1989). Frecuentemente, cuando la solución es muy concentrada, se observa la formación de un gel, es decir, aumenta nuevamente la viscosidad, hasta incluso formar un precipitado (Figura 1.1). También se presenta el mismo fenómeno cuando se enfrían rápidamente o se

dejan en reposo soluciones menos concentradas, es lo que se denomina retrogradación. Esto se explica en parte por las modificaciones físico - químicas que surgen en los constituyentes del almidón. Es importante señalar que la gelatinización del almidón por cocción lo hace más digestible por la mejor acción de las enzimas amilolíticas (Matz & Matz, 1978; Cheftel & Cheftel, 1988). Este significativo aporte se constituye en la esencia fundamental de recurrir a la utilización de estos procesos, pues el almidón es una compleja molécula orgánica difícil de metabolizarse eficientemente como tal. Para entender la trascendencia de estos procesos tecnológicos es significativo advertir que el almidón del endosperma no es una sustancia pura, aspecto que desencadena el fin último de la eficacia y eficiencia de la utilización de procedimientos tecnológicos en los insumos, previo a la formulación de raciones. En este sentido, conocer la estructura orgánica y la funcionalidad de la molécula de este polímero, se constituye en la base principal para comprender la importancia de realizar una hidrólisis parcial del mismo, antes de ser incluido en las dietas alimenticias. Esta hidrólisis que culmina en la gelatinización del gránulo de almidón, está en función de la viscosidad y del tiempo en que se somete al gránulo a los efectos del calor - presión (Figura 13).

**Figura 13:** Gelatinización del almidón: Viscosidad (UB)/ tiempo (min)



Cheftel y Cheftel, 1988.

Como se ha expresado la molécula de almidón está compuesta químicamente por dos polisacáridos la amilosa y la amilopectina. Ambos son polímeros de glucosa, pero difieren en su estructura y en ciertas propiedades (Whistler *et al.* 1984; Watson & Ramstad, 1987; Cheftel & Cheftel, 1988). Generalmente el almidón contiene 20 a 25% de amilosa y el resto es amilopectina. Esta propiedad varía según el origen del almidón. La amilosa está constituida por 200 a 400 unidades de D-glucosa lo cual le da un peso molecular de 35.000 a 70.000 aproximadamente. Las unidades de glucosa se asocian entre sí por enlaces glucosídicos tipo alfa, desde el carbono 1 de una glucosa, al carbono 4 de la siguiente. Se forma así una larga cadena que se dispone enrollada a la manera de un resorte. A esta hermética disposición de la molécula se la denomina estructura en hélice que estos procesos tienden a desorganizar. La amilopectina tiene mayor tamaño molecular que la amilosa; puede llegar a un peso de 1.000.000, lo que implica la participación de más de 5.000 glucosas

en su estructura (Whistler *et al.* 1984; Cheftel & Cheftel, 1988). La disposición básica es similar a la de la amilosa, está constituida por glucosas unidas por enlaces alfa glucosídicos de carbono 1 a carbono 4, pero se distingue por poseer ramificaciones que se desprenden de esta cadena lineal. Las ramificaciones son cadenas lineales de unas 12 a 18 glucosas unidas entre sí por enlaces glucosídicos alfa 1 - 4. Se desprenden de la cadena principal por una unión alfa glucosídica que va desde el carbono 1 de la primera glucosa de la ramificación al carbono 6 de una glucosa de la cadena principal. Las ramificaciones nacen separadas entre sí por espacios de unas 12 unidades de glucosa de cadena base. De las ramificaciones primarias pueden desprenderse también por enlaces alfa 1 - 6 ramificaciones secundarias, y de éstas terciarias, que van dando al conjunto el aspecto de una compleja arborización (Whistler *et al.* 1984; Watson & Ramstad, 1987; Cheftel & Cheftel, 1988; Serna Saldívar, 1996).

Esta arborización, aunque compleja, es más simple desorganizarla que a la estructura en hélice de la amilosa mediante procesos térmicos e hidrotérmicos. Esto ocurre porque luego del calor y la fricción a la que es sometida la molécula de almidón, le es más sencillo a este polímero desorganizado ordenar una cadena lineal (amilosa) que una arborizada (amilopectina).

Como el almidón no tiene capacidad reductora, la unión glucosídica entre las unidades de glucosa en la molécula de amilosa o amilopectina bloquea las funciones aldehído potencial. Ahora, una vez hidrolizado el almidón por algún proceso enzimático o por acción del calor en unidades de glucosa, se evidencia el poder reductor de las mismas. Aspecto que puede valorarse cualitativamente con el reactivo de Felhing o de Tollens y demostrar la eficiencia de algún proceso térmico-mecánico sobre los granos, previo a la inclusión de dietas destinadas a la alimentación animal (Whistler *et al.* 1984; Dekker, 1996; Braverman, 1998).

La fuerte unión proteína-almidón intracelular en el endosperma de los granos de sorgo y el alto contenido de amilosa en algunas variedades, puede dificultar la obtención de una adecuada gelatinización del almidón, razón que requiere que el procesamiento del grano sea riguroso. Los almidones de alto contenido en amilosa son resistentes a la cocción por la naturaleza cristalina de la

amilosa, sólo hay hinchazón a temperatura elevada y si se mantiene moderada, no hay gran aumento de la viscosidad (Kramer & Twigg, 1983; Cheftel & Cheftel, 1988; Mercier *et al.* 1989).

Debido a la naturaleza cristalina que le otorga su hermética estructura en hélice, la amilosa sólo se hincha a temperatura elevada y siempre tiende a recristalizar, favoreciéndose la retrogradación. En tanto, la amilopectina presenta un grado de cristalinidad muy inferior al de la amilosa y por tal no tiene tendencia a la recristalización, posee entonces, un elevado poder de retención de agua contrariamente a la amilosa. Las soluciones de amilopectina no retrogradan (Belitz & Grosch, 1988). En cierto modo, el fenómeno de retrogradación complica los procesos industriales, pues las moléculas que componen el almidón luego del proceso tienden a organizarse de igual forma que en su estado original. Esto se constituye en un aspecto trascendente, sobre todo para el grano de sorgo, porque la industria en la actualidad sólo procesa por extrusión en escala cereales tradicionales y es poco o nulo el procesamiento de otros menos convencionales. Esta situación conlleva a la necesidad de estudios para establecer las temperaturas adecuadas de extrusión en sorgo, especialmente en los no céreos que poseen mayor contenido en amilosa. En la tabla 3 se exhibe la composición en % de amilosa y amilopectina en cereales y papa.

**Tabla 3:** Composición en % de amilosa y amilopectina en cereales y papa.

	Arroz	Trigo	Maíz	Papa
Amilosa (%)	18.5	25	24	20
Amilopectina (%)	81.5	75	76	80

Belitz y Grosch (1988), indican que en general la bibliografía cita que el contenido en amilosa de los gránulos de almidón en sorgo y maíz es del 25% y del 75% de amilopectina, aunque las modificaciones genéticas realizadas por el hombre han conseguido sorgos y maíces céreos con 100% de amilopectina, y también, híbridos actuales denominados amilomaíz o amilosorgo con proporciones de hasta 77% de amilosa y el resto de amilopectina.

Knabe (1990), señala que sorgos céreos y heterocéreos presentan pequeñas ventajas en la digestibilidad ileal de almidones y aminoácidos sobre los no céreos, aunque esas ventajas no fueron encontradas en la digestibilidad total, de modo que no se podría afirmar que los sorgos con mayor proporción de amilopectina mejoren el desempeño durante las fases de crecimiento en los cerdos.

Guerra (1985) y Martínez (1988), estudiaron las características del sorgo con glumas (integral) y sin glumas (decorticado) con relación al peso hectolítrico, color, expansión y densidad de los granos extruidos, composición química y propiedades de viscosidad.

En la tabla 4 se presentan los resultados obtenidos en peso hectolítrico, peso de 1.000 granos, dureza y color en grano y harina de sorgo integral y decorticado. Los resultados obtenidos en peso hectolítrico y peso de 1.000 granos se sitúan dentro de los valores ya obtenidos para sorgo. Estas características son importantes en el transporte y almacenamiento del grano. Los valores obtenidos en el color de grano y harina lo sitúan como un grano blanco, ligeramente crema que mejoró su coloración blanca ( $L^*$ ) durante el proceso de decorticado.

Los resultados sobre composición química de la materia prima obtenidos en grano integral y decorticado son presentados en la tabla 5. Estos resultados se sitúan dentro de los valores indicados para sorgo, Guerra (1985) y Martínez (1988), presentando el sorgo decorticado una reducción en el contenido de proteína, grasa, fibra, cenizas, taninos y fenoles.

**Tabla 4:** Análisis físico y color del sorgo integral y decorticado.

Muestra	Ph (kg/ha)	Peso de 100 granos (g)	Dureza (seg)	Color en grano *			Color en harina *		
				L	a	b	L	a	b
Sorgo integral	76,8	27,55	19	56,8	2,8	17,1	74,9	0,1	11,2
Sorgo decorticado	89,4	20,5	16	69,4	0,0	19,6	81,0	-0,8	9,4

n = 5

\*Determinado en el colorímetro Hunterlab D25LT (Para medir color de productos con texturas ásperas, no homogéneas y de formas irregulares. Escalas de color: CIE L\*a\*b\*, Hunter Lab, CIE LCh, Rdab, CIE Yxy, CIE XYZ). L\*: blanco, a\*: anaranjado: b\*: púrpura

**Tabla 5:** Composición química de sorgo integral y decorticado.

Muestra	Humedad (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Fibra (%)	Cenizas (%)	Fenoles mg ác. tánico	Taninos Equiv. catequina
Sorgo Integral	10,5	10,9	2,57	1,135	1,50	0,510	0,000
Sorgo decorticado	9,4	10,6	0,95	0,630	1,13	0,022	0,000

n=5

La composición química de los productos extruidos no fue alterada durante el proceso de extrusión. En general el color de los productos extruidos sufrió una reducción en el color blanco (L\*) aumentando su color amarillo (b\*) en relación a sus respectivas harinas no tratadas, obteniéndose los valores más altos de L\* en productos obtenidos de sorgo decorticado y más amarillos (b\*) en los obtenidos de sorgo integral (Tabla 6).

**Tabla 6:** Composición química y color\* de productos extruidos obtenidos del sorgo integral y decorticado.

Producto extruido	Humedad (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Fibra (%)	Cenizas (%)	Color		
						L	a	b
Integral extruido con 12 % de humedad	9,1	10,9	2,5	1,13	1,50	70,6	0,6	15,0
Integral extruido con 15 % de humedad	9,7	10,9	2,5	1,13	1,50	69,6	0,4	15,2
Integral extruido con 18 % de humedad	10,5	10,9	2,5	1,13	1,50	69,3	0,4	14,0
Decorticado extruido con 12 % de humedad	9,1	10,6	0,93	0,625	1,13	76,1	0,5	14,7
Decorticado extruido con 15 % de humedad	9,5	10,6	0,93	0,625	1,13	72,8	0,6	14,5
Decorticado extruido con 18 % de humedad	9,7	10,6	0,93	0,625	1,13	78,3	-0,7	12,4

Los índices de absorción y solubilidad en agua de los productos extruidos (Tabla 7), fueron modificados durante el proceso de extrusión en relación a sus respectivas harinas no tratadas. No fue observado un comportamiento genérico en los productos extruidos con relación a sus propiedades de viscosidad. Los índices de absorción de agua e índices de solubilidad en agua aumentaron, posibilitando el empleo diversificado de estos productos. Estos resultados son similares a los informados en salvado de sorgo (Harper, 1981 & Guerra, 1985).

**Tabla 7:** Propiedades de viscosidad, IAA, ISA de sorgo integral, decorticado y productos extruidos.

Muestra	Viscosidad				IAA	ISA
	PT	PV	V20 min	V50°C		
Sorgo integral	70	80	80	90	2,00	6,95
Integral extruido con 12 % de humedad	0	0	0	0	7,75	28,20
Integral extruido con 15 % de humedad	120	100	100	100	8,64	22,23
Integral extruido con 18 % de humedad	60	60	60	60	7,83	18,00
Sorgo decorticado	73	60	140	200	1,59	6,48
Decorticado extruido con 12 % de humedad	80	80	80	80	8,14	27,07
Decorticado extruido con 15 % de humedad	90	90	90	90	8,40	28,15
Decorticado extruido con 18 % de humedad	90	90	90	90	8,44	28,82

n=3

PV: pico de viscosidad (U.B)

IAA: Índice de absorción de agua

V20min: Viscosidad después de 20 min a 90°C

ISA: Índice de solubilidad del agua

V50°C: Viscosidad final a 50°C

PT: Temperatura de pasta (°C)

Se considera que la expansión se produce cuando el valor del grado de expansión es por lo menos 1.5 (Harper, 1981). Es importante señalar, que la expansión de un producto es una función compleja de varios factores, destacando la característica elástica del producto, el tiempo que el producto permanece plástico en el extrusor, la intensidad y velocidad de evaporación del agua.

El análisis de varianza y comparación de medias (Tabla 8), no mostró diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre tratamientos (12, 15 y 18% de humedad) entre sorgo integral y sorgo decorticado. Se obtuvieron productos menos densos en los provenientes de sorgo decorticado presentando diferencias significativas en relación a los productos obtenidos con sorgo integral, trigo integral y salvado de trigo; los cuales demostraron menor grado

de expansión procesados en las mismas condiciones de operación y también, menores valores de densidad en relación a sorgo (Martínez & Salinas, 1991). Además los productos extruidos de sorgo integral y decorticado exhibieron mayor grado de expansión en relación a los obtenidos por Guerra (1985) con sorgo decorticado, utilizando un extrusor de laboratorio Brabender, con diferentes condiciones de operación.

La comparación de medias por tratamientos (Tabla 9.), en el grado de expansión y densidad de los productos obtenidos presentó los mayores valores en expansión con los tratamientos de sorgo decorticado extruido con 15% de humedad y sorgo integral con 18% de humedad; estos tratamientos también mostraron los más altos grados de expansión en el caso de trigos cristalinos integrales (Martínez & Salinas, 1991).

**Tabla 8:** Comparación de medias del grado de expansión y densidad de los productos extruidos.

	Expansión		Densidad g/cm <sup>3</sup>	
	n	media	n	media
Sorgo integral	30	3,238 a	30	0,3624 a
Sorgo decorticado	30	3,205 a	30	0,2477 b

Los valores de las medias en la misma columna con la misma letra no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabla 9:** Comparación de medias por tratamiento del grado de expansión y densidad de los productos extruidos.

	Expansión		Densidad g/cm <sup>3</sup>	
	n	media	n	media
Sorgo integral				
12% humedad	10	2,81 b	10	0,3050 b
15%	10	3,20 b	10	0,5612 a
18%	10	3,70 a	10	0,2210 c
Sorgo decorticado				
12% humedad	10	3,28 b	10	0,1140 c
15%	10	3,76 a	10	0,3755 a
18%	10	2,46 c	10	0,2534 b

Los valores de las medias en la misma columna con la misma letra no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ).

En la prueba de aceptación de los tratamientos seleccionados, no existieron diferencias significativas entre los dos tratamientos. En general los productos

de sorgo expusieron buena aceptación aunque menor que el producto comercial, atribuido a que el producto comercial presentó una mayor concentración de saborizante que es preferido por el consumidor.

Los resultados obtenidos mostraron el potencial que representa el sorgo en la elaboración de productos expandidos o sus respectivas harinas que pueden ser empleadas en diversos usos.

Durante el proceso de extrusión no se observaron cambios en su composición química. Los productos obtenidos de sorgo decortinado revelaron mejores características tecnológicas con relación a los productos obtenidos de sorgo integral, aunque con el mismo grado de aceptación por los consumidores.

En cuanto a la nutrición en porcinos con estos granos tanto integrales como decortinados es un problema en lechones. Es que su aparato digestivo en las primeras semanas de vida no está maduro y la segregación de maltosa y amilasa son insuficientes para dietas ricas en cereales. Es por ello que el suministro de cereales extrusionados con un elevado grado de gelatinización de los almidones, facilita la digestión de los almidones haciendo el conjunto de la dieta más digestible y evitando así problemas sanitarios, favoreciendo un mayor consumo y un mayor crecimiento diario.

En el proceso de extrusión el gránulo de almidón absorbe agua y en el instante de salida de la matriz de la extrusora, el agua sometida a presión pasa a la forma de vapor y el almidón sufre un proceso de alineamiento, rizado y rotura.

El método analítico para determinar la calidad del producto procesado en forma cuantitativa es el método enzimático de la glucoamilasa. Este método mide el % de gelatinización (grado de cocción), que es la cantidad de almidón gelatinizado en la muestra expresada como un porcentaje del total del almidón.

El cambio sufrido en la estructura de los cereales durante la extrusión es de tal magnitud que podríamos decir que el resultado es un nuevo producto.

Los aceites que contienen los cereales, las grasas añadidas a los alimentos que posteriormente serán extrusionados, así como los aceites de leguminosas, al ser el producto extrusionado, sufren un proceso de emulsión debido a la fuerte presión a que son sometidas las finas gotas de grasa y son recubiertas por los almidones y proteínas, quedando la grasa encapsulada. Para realizar la determinación de aceites correctamente, es necesario emplear el método de

hidrólisis ácida y extracción posterior, debido a que con el método de Extracto Etéreo, no se consiguen los resultados que corresponden en realidad al producto. La grasa al ser emulsionada es más asimilada por los jugos digestivos de los animales aumentando por lo tanto la energía del producto. Generalmente las lipasas y peroxidasas son inactivadas durante el proceso de extrusión en condiciones normales mejorando la estabilidad posterior del producto (AOAC, 1976).

La extrusión de productos con elevado contenido proteico se suele realizar generalmente para controlar los inhibidores del crecimiento que están contenidos en las materias primas. Durante el proceso de extrusión, estos inhibidores son suficientemente inactivados para evitar bloquear la actividad enzimática en el intestino. Dentro de los procesos aplicables a productos proteicos con elevado contenido en grasa están los descritos anteriormente, en seco y húmedo. Estos procesos consiguen productos con factores antitróficos correctos desde el punto de vista de su uso en alimentación animal y su diferencia está en que el producto ha sido sometido a diferente humedad y temperatura durante la extrusión. Se intenta en estos procesos conseguir por un lado el mínimo contenido en factores antitróficos y por otro la máxima lisina disponible en el producto. Es conocido que la lisina es un aminoácido muy reactivo y el proceso que sea menos agresivo será el mejor desde el punto de vista nutritivo. La extrusión produce el desenredamiento de las cadenas proteicas vegetales. Las moléculas se alinean a largo de la matriz (Anderson *et al.* 1969).

En ausencia de cantidades importantes de almidón, la cocción por extrusión reduce la solubilidad de la proteína cuando la temperatura aumenta. Existe un proceso por el cual a medida que la temperatura se va elevando, la proteína se va perjudicando. La cantidad de proteína perjudicada se puede medir y cuantificar mediante la determinación de Nitrógeno en la fracción de Fibra Detergente Ácida. Muchas proteínas son desnaturalizadas y rotas por la extrusión y pierden por tanto sus propiedades funcionales. En productos con elevado contenido en almidón, la proteína queda dentro de la matriz formada por el almidón, con lo que queda enredada y encapsulada. Luego, las enzimas

digestivas del tracto intestinal disuelven la matriz de almidón liberando la proteína (Harper, 1989).

Existen pocos datos publicados del efecto de la extrusión sobre la fibra, aunque se haya estudiado. Para el caso del trigo se puede decir que la fibra del producto se solubiliza, incrementando la disponibilidad para su fermentación. Así por ejemplo, cuando se extrusiona salvado el contenido en fibra soluble se incrementa significativamente. Varias observaciones indican que las paredes de las celulosas del producto extrusionado se adelgazaron y la superficie era más rugosa que la inicialmente de partida. Para conseguir efectos significativos sobre la fibra hay que procesar los productos bajo condiciones muy severas, cosa que no ocurre en condiciones de trabajo normales (Martínez, 1988).

Cada vitamina tiene sus propias características de estabilidad durante los procesos térmicos. Los efectos en la estabilidad en las vitaminas durante la extrusión son complicados debido a la acción de la humedad, fricción y altas temperaturas y presiones. Las vitaminas liposolubles A, D y E en general son razonablemente estables durante la extrusión. El nivel de humedad del producto durante la extrusión tiene el mayor efecto sobre la retención de vitaminas. Como norma general, alto nivel de humedad en el proceso da más vitaminas retenidas. Las vitaminas hidrosolubles como la vitamina C o del grupo B, pueden perder estabilidad durante la extrusión. La extrusión húmeda produce una pérdida de vitamina C y tiamina (Rossem & Miller, 1973).

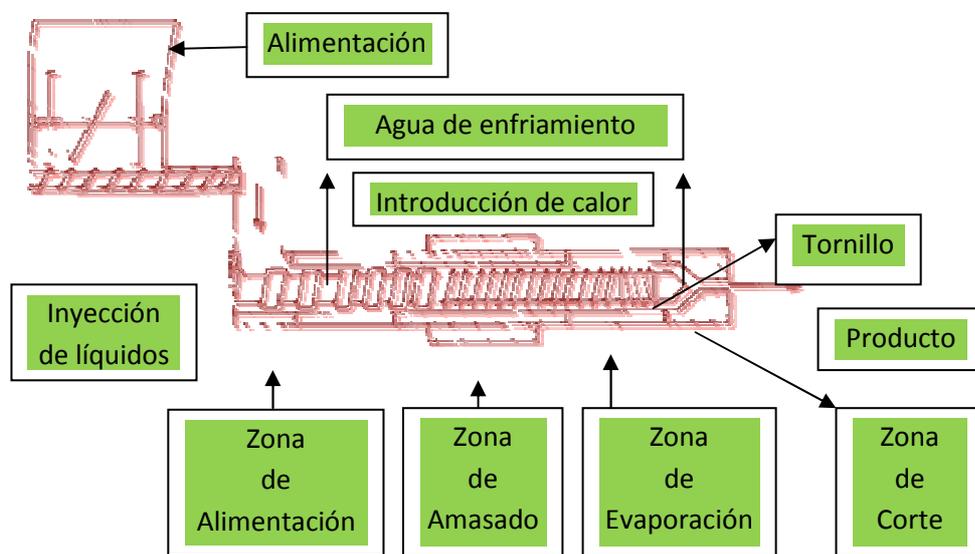
También existe una acción sobre las grasas y sobre la estabilidad de las mismas. Las lipasas de origen microbiano producidas por hongos y de otros orígenes (lipoxidasas), descomponen y alteran las grasas y aceites de los ingredientes y de los alimentos. Las lipasas son inactivadas a temperaturas de aproximadamente entre 50 y 75 °C, de modo que en estos procesos de altas temperaturas en tiempos cortos se logra un efecto adicional que se puede medir por la reducción de ácidos grasos libres presentes luego del tratamiento (Hanson, 1984).

Habiendo definido someramente en qué consiste el proceso físico de gelatinización, se puede mencionar que existen varias tecnologías disponibles para obtener este fin, algunas más precisas y más sofisticadas. Los equipos

extrusores combinados o no con expansores están más disponibles para la industria alimenticia que otros procesos similares a la extrusión.

Existen básicamente dos tipos de extrusores, los de tipo seco (Dry extrusion) y los que trabajan con inyección de agua o con el agregado de vapor (Wet extrusion). Independientemente del tipo de extrusión los equipos constan de un alimentador, el pre-acondicionador o cámara de pre - acondicionado, la cámara de extrusión y la matriz de salida. En la figura 14 corresponde a una planta de extrusión clásica.

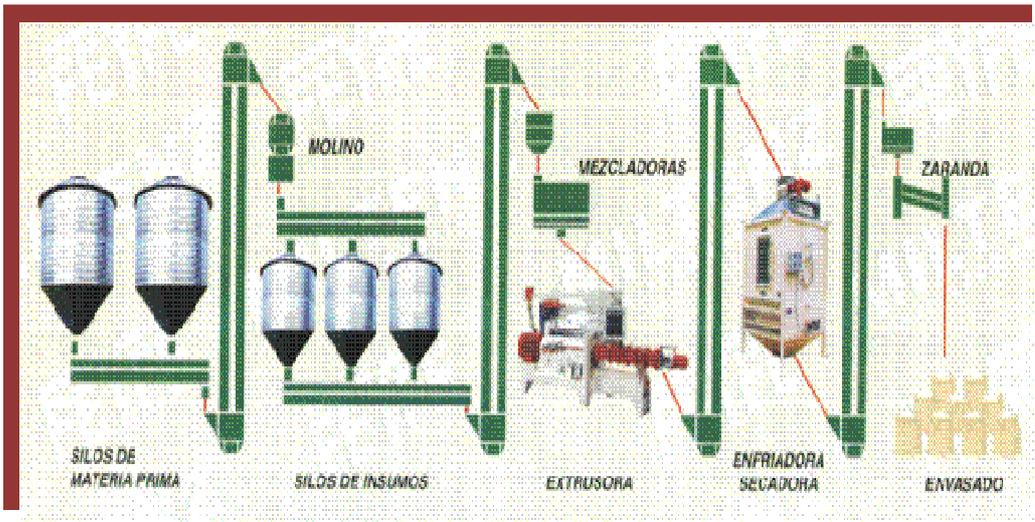
**Figura 14:** Diagrama de una planta de extrusión



Irazusta, 1992.

Son objetivos del proceso de extrusión la cocción, pasteurización, expansión, reducción de humedad, homogeneización y reestructuración de nutrientes. En la figura 15 puede observarse la planta completa de extrusión adicionada a todo el proceso de elaboración de alimentos balanceados.

**Figura 15:** Planta de elaboración de alimentos balanceados.



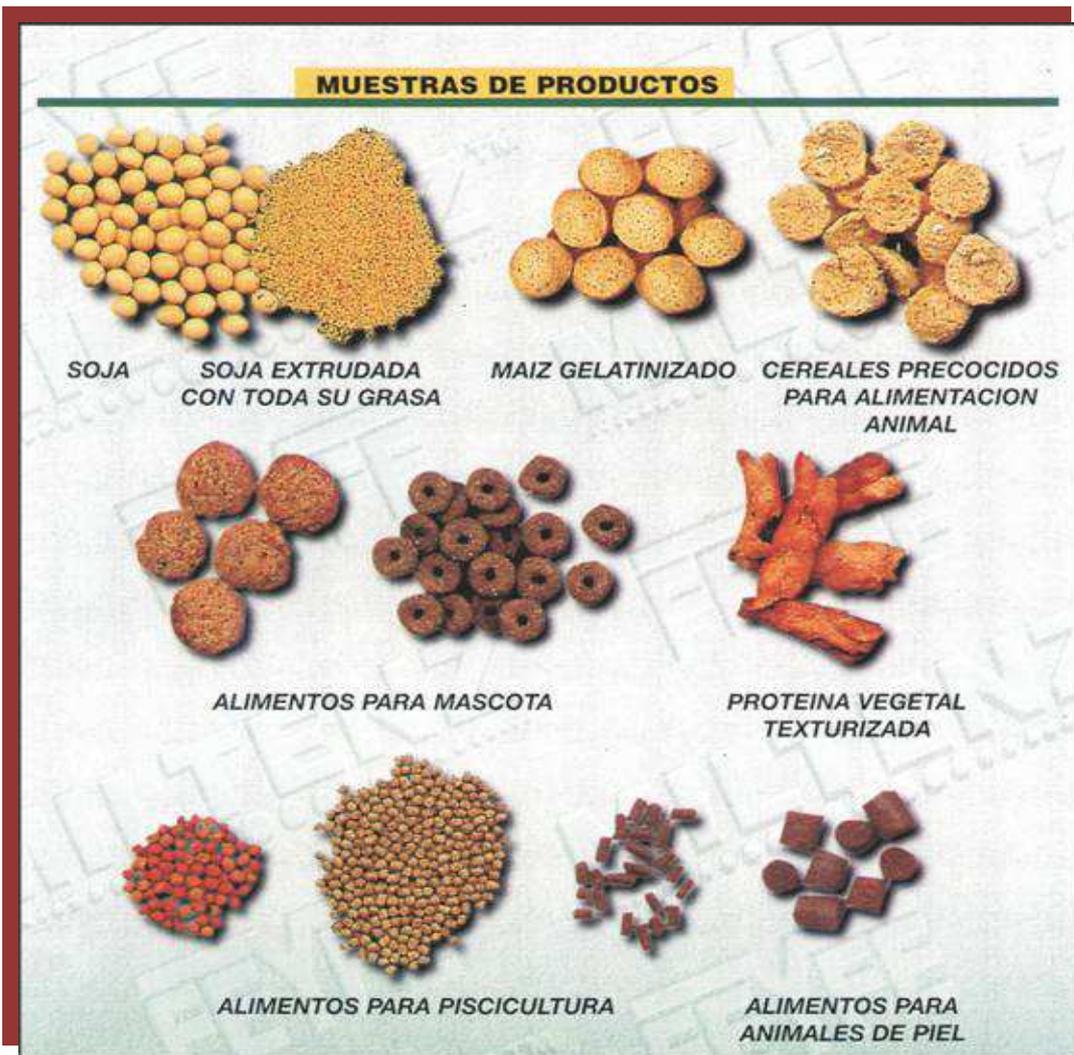
Bártoli, 2000.

El sistema de extrusión ofrece ilimitadas posibilidades y se caracteriza por su simplicidad de operación y mantenimiento, reducida inversión y bajo costo operativo. En general son tecnologías que se las clasifica bajo el nombre de procesos de altas temperaturas y tiempos cortos o HTST (High temperature, short time).

En otro orden las ventajas de los cereales y oleaginosas precocidos son: gelatinización de la fracción almidonosa de la fórmula para dar máxima digestibilidad; inactivación térmica de inhibidores del crecimiento y factores que alteran la digestibilidad o el gusto; interacción entre proteínas, vitaminas, minerales y carbohidratos que aseguren una buena distribución en el producto final; producción de un alimento sanitariamente adecuado; alta estabilidad del almacenaje; posibilidad de dar formas y textura diferentes y alternativas de agregar desiguales sabores, colores y ahorro de combustible.

En la figura 16 se detallan algunas materias primas y productos tratados por extrusión.

**Figura 16:** Detalle de algunos insumos y productos tratados por extrusión.



Cheftel, 1992.

El proceso de “extrusión en seco” consiste básicamente en la producción de calor (140 - 145 °C) causada por la fricción bajo presión (30 - 40 atmósferas) cuando el producto es forzado por un tornillo sinfín a través de una serie de restricciones dentro de cámaras de compresión. Este proceso toma menos de 30 segundos, por lo cual los nutrientes no se dañan ni se destruyen. Este procedimiento riguroso, corta y muele, para que las paredes de las células se rompan, aumentando así la disponibilidad de nutrientes.

Cuando el material pasó por estas fases ha sido cocido totalmente y permite así, aumentar la digestibilidad de los nutrientes, reducir los componentes antinutritivos y en forma simultánea aumentar la palatabilidad. El calor y la

presión producida en el extrusor provocan la destrucción de microorganismos tales como bacterias, mohos y levaduras.

La continua presión y el cocimiento, y el repentino alivio de la presión al salir el producto del extrusor, causan la expansión del mismo al romper las paredes celulares. El resultado es un producto texturizado, altamente apetitoso y durable, con un bajo contenido de polvo (Wiseman & Monari, 1996).

Aunque los granos enteros pueden ser extruidos la mayor eficacia de extrusión se logra al moler previamente, usando cribas inferiores a los 5 mm. El molido seguido de extrusión desactiva la acción de enzimas y organismos destructivos por acción del calor y presión (Wiseman & Monari, 1996; Desrosier, 1997).

El proceso de “extrusión en húmedo“, consiste en el mismo procedimiento que la extrusión en seco, solamente que cuando el grano molido entra en la cámara de acondicionamiento donde la presión es baja (presión atmosférica), se inyecta vapor de agua y de allí se traslada directamente al barril de extrusión donde también se agrega vapor de agua pero presurizada (Wiseman & Monari, 1996; Desrosier, 1997).

El proceso termo-mecánico “cocción - laminado” al cual se someten los cereales permite que el almidón primero por el calor a baja presión y luego por el aplastamiento en finas láminas se transforme en sustancias menos complejas, como son las dextrinas y los azúcares (efecto químico de calor-presión), y los granos de almidón pierdan la estructura cristalina dando origen al fenómeno de la gelatinización (efecto físico). El producto obtenido luego de la desecación se denomina “copos de cereales” cuyas ventajas son: eliminar bacterias y eventualmente el desarrollo de toxinas que pueden aparecer en condiciones de almacenaje prolongado (Katta *et al.* 1998), inactivar factores antinutricionales, modificar el aspecto físico de los alimentos, aumentar la voluminosidad, intensificar el grado de imbibición de las partículas e incrementar la digestibilidad del almidón por su transformación en dextrinas.

De acuerdo a Liebert (1998) el proceso de *laminación a vapor* puede ser dividido en tres etapas: acondicionamiento, laminación y secado/enfriado de las hojuelas (copos).

Durante el acondicionamiento, el grano es expuesto a la adición de agua y vapor directo a presión atmosférica durante un tiempo suficiente de retención o

“remojo” para que la humedad penetre en la estructura del grano. El grado de penetración requerido depende del material, del grado de gelatinización y del grosor de la hojuela (copo) requerido. En algunos sistemas, el grano es quebrado y limpiado antes del acondicionamiento para reducir el tiempo de retención requerido para la adecuada preparación del material a laminar. La adición de vapor y agua ocasiona que el grano se hinche y ablande y se vuelva un tanto plástico. Durante la hinchazón el calor hace que algunas células se rompan produciendo un grado de gelatinización de 20 a 22%.

Una vez acondicionado y con un contenido de humedad de aproximadamente 18 – 20%, el grano pasa entre un par de rodillos horizontales paralelos donde es comprimido, esto ocasiona la ruptura de las paredes celulares y produce el grado de gelatinización requerido. Tiempos largos de acondicionamiento tienden a incrementar la calidad de las hojuelas (copos), rebajar el consumo eléctrico del laminador y producir menos estrés de molienda, pues los granos duros requieren más energía para ser deformados y tienden a producirse fracturas en las hojuelas (copos) dando como resultado una gran cantidad de finos.

En el laminador, el espesor de la hojuela (copo) está determinado por: características del producto inicial, diámetro de los rodillos, separación entre los rodillos, fuerza de compresión aplicada y grado de acondicionamiento del grano. La superficie de los rodillos debe ser lisa o corrugada dependiendo del diámetro del rodillo y del tipo de hojuela a producir.

La acción de los rodillos de presionar, romper y exprimir el grano, continúa el proceso de gelatinización, rompiendo los gránulos de almidón. Mientras más delgadas sean las hojuelas (copos) se obtiene un mayor grado de gelatinización. Si se desean hojuelas muy delgadas (menos de 1 mm) los granos grandes deben ser quebrantados primero para que llegue una partícula más pequeña a los rodillos.

La humedad es el factor más limitante en el proceso de gelatinización. De acuerdo con expertos en cereales, niveles por debajo del 18% reducen significativamente la cantidad de almidón gelatinizado (convertido en forma soluble). Los niveles de humedad inicial afectan la velocidad de absorción del grano. Si es necesario se debe pre-humedecer el grano durante 24 horas antes

del proceso en un tanque adecuado. La velocidad de absorción de humedad de los granos es menor que la velocidad con que estos pierden agua.

Para sintetizar este procedimiento se puede decir que la fabricación de copos es un proceso termomecánico de "cocción - laminado" al cual se someten los cereales. La cocción se realiza con vapor a baja presión mientras que el laminado consiste básicamente en aplastar el grano en finas láminas. De esta forma se logra que el almidón de los granos se transforme en sustancias menos complejas como son las dextrinas y los azúcares (efecto químico de calor-presión) y los granos de almidón pierdan la estructura cristalina, dando origen al fenómeno de la gelatinización (efecto físico). El producto obtenido luego de la desecación se denomina "copos de cereales" cuyas ventajas son:

- Eliminar bacterias y eventualmente el desarrollo de toxinas que pueden aparecer en condiciones de almacenaje prolongado.
- Inactivar factores antinutricionales.
- Modificar el aspecto físico de los alimentos.
- Incrementar la voluminosidad.
- Intensificar el grado de imbibición de las partículas.
- Incrementar la digestibilidad del almidón por su transformación en dextrinas.

El proceso se articula en tres fases (Gott *et al.* 2006).

#### Fase 1: Tratamiento hidrotérmico.

Consiste en distribuir uniformemente en la cámara de cocción vapor de agua a baja presión (una atmósfera). Este es mezclado permanentemente con los cereales para que el producto reciba al mismo tiempo y a la misma temperatura el calor a presión. Para evitar sobrecalentamientos o en su defecto deficiente grado de cocción, se colocan sensores de temperatura en el sistema (Figura 17).

**Figura 17:** Cámara de cocción.



Gott *et al.* 2006.

Fase 2: Tratamiento mecánico.

Es realizado por un laminador con dos cilindros contrapuestos. En esta máquina es muy importante la uniforme alimentación a lo largo de toda la superficie laminadora. Es posible hacer un fino rayado de la superficie de aplastamiento que facilita el desprendimiento del copo y su conductividad térmica (Figura 18).

**Figura 18:** Laminador.



Gott *et al.* 2006.

Fase 3: Tratamiento de secado y enfriado.

La humedad y la temperatura son eliminadas en un desecador donde el producto en copos pasa por corrientes de aire caliente y frío. Se obtiene así un

producto con una humedad del 13% y con una temperatura cercana a la ambiental (Figura 19).

**Figura 19:** DeseCADador.



Gott *et al.* 2006.

Algunas materias primas empleadas en la producción de alimentos balanceados para animales deben ser procesadas para inactivar sustancias indeseables en los alimentos y para mejorar el aprovechamiento nutritivo de las mismas. Los tratamientos que dan mejores resultados en la reducción de la actividad de las sustancias antinutricionales son aquellos en los que se emplea humedad. Se recomienda el tratamiento de grano de soja como materia prima en la producción de alimentos balanceados para animales, mediante un reactor hidrotérmico en conexión con un expansor de abertura anular. Se sugiere el tratamiento de cereales por medio de la laminación a vapor para aumentar el grado de gelatinización de los almidones y así incrementar la eficiencia alimenticia de dichas materias primas (Liebert, 1998).

De Luca (1996) manifiesta que todas las modificaciones de la estructura del almidón hacen asumir que el termoprocesado de los cereales da al insumo o ingrediente la propiedad dietética de aumento de apetito, de tolerancia y de poder de imbibición del doble con respecto al grano molido. Además la modificación estructural provocada por el termoprocesado hace que las

dextrinas escapen en gran medida a la degradación ruminal y mayor cantidad de glucosa se encuentre a nivel intestinal para ser absorbida como tal, disminuyendo esto enormemente el costo energético. En este sentido en los no rumiantes la posibilidad facilitada del grano procesado expuesto a las enzimas digestivas para obtener glucosa también reduce el costo energético del proceso digestivo, aumenta la cuota de glucosa liberada en el primer tramo del intestino, favoreciendo una absorción rápida y eficiente ante las pérdidas por fermentación (Irazusta, 1992).

Rearte (1996) señala que el aumento de la disponibilidad digestiva del almidón en los rumiantes se debe fundamentalmente a la modificación estructural de la molécula de almidón, la cual es atacada más eficientemente por los microorganismos ruminales. Esto se traduce en mayor utilización del forraje y en una mayor síntesis de proteína bacteriana de alto valor biológico. Expresa además que una de las restricciones en el uso del sorgo en vacas lecheras es su baja palatabilidad con respecto a la de otros cereales más convencionales como maíz, avena, cebada y trigo.

De acuerdo a estos autores el procesamiento térmico del grano de sorgo permite incrementar la digestibilidad total y degradabilidad a nivel ruminal en vacas lecheras, traducidos en mayores beneficios en el aprovechamiento del grano debido a cambios físicos en la matriz proteica y químicos en las cadenas de glucosa que componen el almidón. Es relevante señalar que estos procesos modifican no sólo a los hidratos de carbono sino también a otros compuestos en especial a los lípidos dietarios que luego son metabolizados en los tejidos animales.

### **Proteasas**

Las enzimas proteolíticas (o proteasas), son las enzimas que digieren las proteínas. Incluyen a las proteasas pancreáticas quimotripsina y tripsina, la bromelina (enzima de piña), la papaína (enzima de papaya), proteasas fungales y la peptidasa de serratia (la enzima del "gusano de seda").

## **Tipos de enzimas proteolíticas**

### **PANCREATINA**

Es una enzima elaborada a partir de páncreas fresco de cerdo. Las dos proteasas primarias de la pancreatina son la quimotripsina y la tripsina (también se extrae de la bilis de buey). A la pancreatina de alta potencia se le asigna un número entero múltiple que indica su potencia. Por ejemplo, un extracto pancreático que sea 4 veces más activo que el 1X estándar, se califica como 4X USP.

### **BROMELAÍNA**

Son un grupo de proteasas que contienen azufre extraído de la planta de la piña (*Ananas comusus*). La bromelaína comercial suele derivarse del tallo, que es distinta de la bromelaína que se encuentra en la fruta.

### **PROTEASAS FUNGALES**

El *Aspergillus Oryzae* es un moho (hongo) que produce enzimas para la producción de soja fermentada (salsa de soja, tamari, miso). Estas mismas enzimas también se utilizan con fines terapéuticos. Las enzimas proteolíticas derivadas del *Aspergillus Oryzae*, ofrecen una ventaja sobre otras proteasas fungales en que demuestran una estabilidad y actividad inusualmente alta en una gama más amplia de estados de PH.

### **PAPAÍNA**

La papaína es una mezcla de enzimas digestivas de proteínas derivadas de la papaya verde e inmadura.

### **PEPTIDASA SERRATIA**

Es una enzima que se encuentra de forma natural en el intestino del gusano de seda. Se considera la enzima proteolítica más eficaz.

Una de las fases más importantes en la crianza de suinos ocurre durante el período post-destete. Los niveles de enzimas digestivas en el organismo del animal son influenciados por la edad y por el tipo de alimento. La función

digestiva en lechones recién destetados es comprometida, hasta la producción de enzimas pancreáticas (Partridge, 1993). Considerando el desarrollo fisiológico de los animales, la actividad de la amilasa en el intestino delgado aumenta durante los 10 primeros días de edad (Cantor, 1995). Lechones recién destetados alimentados con dietas ricas en almidón no muestran capacidad de sintetizar amilasa suficiente para la digestión de los sustratos. La maltasa, sacarasa y proteasa son inicialmente poco activas, en cuanto a la lactasa presenta gran actividad en los lechones recién nacidos, disminuyendo con la edad. Los aumentos de carbohidratos, proteínas y grasas en la dieta son acompañados de incrementos en amilasa, proteasa y lipasa respectivamente (Coring, 1978). En los lechones, la función pancreática aumenta en la tercera semana de edad, en cuanto la amilasa y la proteasa, presentes en bajas cantidades al nacimiento, aumenta en los periodos subsecuentes. El destete repentino en las primeras semanas de vida de los lechones causa una caída en la producción de amilasa y una reducción significativa en la producción de proteasa (Lindemann *et al.*, 1986, Owsley *et al.*, 1986). La producción de proteasas pancreáticas depende de la fuente proteica y de la cantidad de alimento ingerido. El consumo de alimento disminuye después del destete, ya que el sistema digestivo de los lechones debe adaptarse al alimento sólido, adecuando el pH a las secreciones enzimáticas y la motilidad intestinal, además de los trastornos digestivos ocasionados por la proteína de soja, la cual contiene factores antinutricionales y de antígenos, capaces de provocar a los lechones una serie de disfunciones intestinales (Makkink, 1994). Nery *et al.*, (2000) evaluaron el perfil enzimático de lechones destetados y el uso de proteasa en la dieta de lechones destetados. Observaron una mejora de los parámetros productivos evaluados.

Para hidrolizados de pescado, alimento muy rico en proteína de alta valor biológico para suinos, el uso de proteasas para este proceso es trascendente. Existen diferentes estrategias para recuperar la proteína del pescado (principalmente de aquellas especies menos favorecidas en el consumo humano), uno de ellos es mediante tratamientos químicos (acción directa de un ácido o una base 6N con el músculo de pescado) o enzimáticos (acción de un enzima con actividad proteolítica) que originan productos totalmente solubles,

liberando péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres que posteriormente son recuperados, además del bajo contenido graso que depende de la especie empleada (Pizardi *et al.*, 1999, Perera y Aurrekoetxea 2001, San Pedro *et al.*, 1986).

La hidrólisis enzimática presenta diferentes ventajas frente a los métodos químicos de procesado para la obtención de hidrolizados proteicos entre las que se pueden citar:

- La especificidad de acción de la enzima, lo que posibilita el control de las características en el producto final.
- Las condiciones de reacción son suaves en las que tiene lugar la digestión de las proteínas permitiendo obtener un producto soluble de elevada calidad, ya que el músculo no es sometido a temperaturas y pH extremos ni a la acción de disolventes orgánicos, bases o ácidos que pudieran disminuir el valor nutritivo del producto final.
- La no destrucción de aminoácidos esenciales que hace que la proteína retenga su valor nutritivo mejor que los hidrolizados ácidos y básicos tradicionales.
- Y la inactivación del enzima por calentamiento haciéndose innecesaria su eliminación del medio de reacción (Pizardi *et al.*, 1997). Por ello, la hidrólisis enzimática aparece como una de las tecnologías más extendidas para la obtención de hidrolizados proteicos a partir de subproductos de la pesca.

Hoy en día existen en el mercado enzimas de origen fúngico que se emplean para la obtención de hidrolizados como son: Bioproteasa LA450 (Gygyc Biocon), Delvolase (Gist.Brocades), Novozym FM 2,0L, Alcalase 2,4L grado alimenticio, Neutrasa 0.5L grado alimenticio, Flavourzyme 500 MG y Kojizyme (Novo Nordisk), por mencionar algunas (Perera y Aurrekoetxea, 2001; Bjoern y *et al.*, 2000). Pero el uso de este tipo de enzimas encarece la recuperación de la proteína, ya que su costo por gramo de enzima es elevado. Cabe señalar que existen varias posibilidades de elección de la enzima para una buena obtención de hidrolizados de proteína de pescado como es su origen microbiano, tipo de reacción catalizada, naturaleza del centro catalítico, especificidad del sustrato, concentración del sustrato, pH óptimo de actividad, así como la relación costo - rendimiento (Perera y Aurrekoetxea, 2001;

Bjoern *et al.*, 2000). Por esta razón se ha propuesto el uso de extractos proteolíticos obtenidos por Fermentación en Medio Sólido (FMS), ya que este es un método en el cual hay una alta producción de enzima (U/mLh) que puede ser específica para el tipo de sustrato de interés, presentando una mayor estabilidad frente a la temperatura y el pH, además que abarata el costo de obtención de hidrolizados (Perera y Aurrekoetxea, 2001; Pizardi, *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 2003).

La elevación reciente en los precios de los cereales y las semillas de oleaginosas no solo han aumentado los costos de los alimentos, si no que han planeado a los nutriólogos el reto de encontrar nuevas alternativas para mejorar la eficiencia en el aprovechamiento de los alimentos. En este sentido el uso de algunas enzimas exógenas puede mejorar la digestibilidad de las dietas y también reducir los efectos dañinos de algunos de los factores antinutricionales presentes en las fuentes de proteínas vegetales. Desde 1958, la mayoría de los esfuerzos de las investigaciones en el campo de las enzimas se orientaron a mejorar la digestibilidad de los cereales que podrían reemplazar al maíz en los alimentos de los animales, existe un gran potencial en mejorar la digestibilidad en particular la pasta de soja. La utilización de enzimas en la nutrición de cerdos, puede ser una buena alternativa como aditivo en raciones formuladas con materias primas tradicionales con el fin de mejorar la digestibilidad de los alimentos e incrementar la productividad de las explotaciones porcinas. Las enzimas son en realidad proteínas constituidas de aminoácidos. Poseen la capacidad única de catalizar o acelerar reacciones bioquímicas específicas, ya sea dentro o fuera (*in vitro*) de los micro organismos. Su función es la de facilitar las reacciones bioquímicas *in vitro*. Su sensibilidad a los ambientes hostiles, es el resultado de reacciones reverentes a su condición de vida. Los resultados hasta el presente muestran efectos significativos ( $P < 0.05$ ) y reportan que la actividad de las enzimas digestivas exógenos a la respuesta depende de una adecuada formulación de raciones y de la interacción positiva de los preparados enzimáticos con los componentes de la dieta. Se probó la efectividad de Allzyme Vegpro, mediante una dieta control a base de cereales cocidos y crudos, subproductos de cereales, productos y subproductos de oleaginosas y aceites vegetales. La dieta

problema se preparó adicionando Allzyme Vegpro a una tasa de 1,000 g / tonelada. La suplementación de enzimas de origen exógeno en alimentación de monogástricos pretende suplir las deficiencias enzimáticas de los cerdos y aves a edades muy tempranas, por eso es ahí donde deben incorporarse a la dieta.

Mediante la adición de enzimas proteolíticas, es posible eliminar o reducir los factores antinutricionales de la soja e incrementar su valor nutricional para dietas de cerdos, obteniendo una mejor conversión alimenticia de la soja, reflejando así un mejor desempeño en ganancias diarias de peso (Pérez, 2002, Khlebov, 2001).

## **CONCLUSIONES**

Las enzimas como aditivos en la alimentación animal, tendrán cada vez mayor impacto en la producción. La tendencia a utilizar enzimas incrementará el desarrollo de nuevos complejos enzimáticos a bajo costo y técnicas más desarrolladas para su empleo. Su uso no solamente mejorará la eficiencia de los ingredientes convencionales sino también permitirá el empleo de ingredientes no convencionales, resultará en una mejoría del comportamiento productivo de los animales. También mediante su utilización, se reducirá el empleo de antibióticos como aditivos y se reducirá la contaminación del medio ambiente. En resumen la magnitud de respuesta depende del tipo de enzima, las características de la dieta, la edad - etapa productiva de los animales, de tal manera, que esto tendrá un impacto económico en la producción animal.

Como se sabe, diversos ingredientes utilizados en la elaboración de las dietas para aves y cerdos contienen compuestos que inhiben la actividad de algunas enzimas digestivas o impiden el acceso de estas a los sustratos, afectando la digestibilidad de los nutrientes. Entre estos, se encuentran la soja integral, pasta de nabo, harinolina, y los granos y cereales. La pasta de soja contiene compuestos químicos denominados inhibidores de tripsina (IT); la pasta de nabo a los glucosinolatos, la harinolina al gosipol, y los granos (maíz, trigo, cebada y sorgo) contienen sales de ácido fítico (fitatos) combinados con algunos minerales (fósforo, hierro, zinc, etc.) y carbohidratos no almidonados (xilanos y glucanos). Los inhibidores de tripsina inactivan a la tripsina y

quimiotripsina al formar complejos con estas enzimas, mientras que los glucosinolatos y el gossypol tienen efectos tóxicos en el animal. Por su parte, los fitatos, xilanos y glucanos, aunque no inhiben la acción de ninguna enzima ni son tóxicos, sí impiden la digestión de proteína, y energía, principalmente.

La producción de enzimas extracelulares se hace de manera exitosa utilizando hongos filamentosos, tales como los de género *Aspergillus*. Existen ciertas cepas de *Aspergillus* capaces de producir cantidades de hasta algunos gramos por litro de estas proteínas. También, este género de hongos es capaz de desarrollar de manera correcta modificaciones por traslaciones de proteínas eucarióticas, además de que muchas cepas de *Aspergillus* son clasificadas como GRAS (generalmente reconocidas como seguras). La tecnología para fermentación a larga escala por *Aspergillus* y el procesamiento posterior de las proteínas ha sido bien establecida. El significado real de las excelentes características secretorias del *Aspergillus*, es que las proteínas producidas por este organismo pueden ser purificadas del medio de cultivo, y ahí, ser incluidas en el alimento de los animales.

La aplicación de enzimas en alimentos para animales se hace con la finalidad de:

- a) Remover o destruir factores antinutritivos en raciones para no rumiantes;
- b) Mejorar la digestibilidad total de la dieta. La baja digestibilidad de algunas materias primas es por la falta de enzimas endógenas del animal para extraer los nutrientes de los complejos dentro del ingrediente alimenticio;
- c) Aumentar la digestibilidad de polisacáridos no aminolíticos. De manera general, los no rumiantes carecen de la capacidad endógena para hidrolizar los carbohidratos de este tipo por lo que, cuando se adicionan las enzimas necesarias los componentes monosacáridos producto de su hidrólisis, se pueden absorber y utilizar;
- d) Complementar la adición de las enzimas endógenas producidas por el animal. En cerdos y aves jóvenes cuando el sistema enzimático aún no se desarrolla completamente, hay deficiencia de algunas enzimas;
- e) Liberan algunos de los nutrientes atrapados, como azúcares simples y lisina;
- f) para reducir el impacto contaminante de las heces de los animales en el ambiente. El contenido de fosfatos en las heces de algunos animales tiene un potencial muy elevado como contaminantes.

En la última década las enzimas se han establecido como un aditivo estándar en la industria de la alimentación animal. El uso de las enzimas exógenas en el alimento de los animales aumenta la utilización de todos los constituyentes del alimento y hace posible el uso de ingredientes de menor calidad. Esto por supuesto, se traduce en costos menores de alimentos y utilidades más altas.

La porcicultura va cambiando acorde a las presiones que provienen del consumidor, de tal forma que cada día se exige un cerdo más uniforme y carne más magra. Las variaciones de edad, ganancia diaria de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia y salud animal así como problemas biológicos con los que se convive, centrando estos esfuerzos en reducir la variabilidad y mejorar los parámetros de producción porcina. Los cerdos en la actualidad, pueden criarse en la mayoría del mundo, bajo condiciones climáticas muy variables y en diferentes tipos de explotaciones, proporcionándoles adecuadamente un medio ambiente confortable como lo son: temperaturas, instalaciones adecuadas que permitan al cerdo expresar su máximo potencial genético en rendimiento productivo, ya sea en magro o en número de lechones y número de camadas destetadas en las cerdas y todo con un solo fin "el proveer carne magra".

A lo largo de las últimas décadas, los avances genéticos, reproducción y nutrición han logrado obtener al cerdo actual, cuyas características corresponden a un animal con acelerada velocidad de crecimiento, un marcado desarrollo muscular, bajo contenido de grasa y una alta conversión alimenticia.

El desarrollo de tecnologías en los alimentos, va encaminado a crear fuentes alternas de proteínas de fácil digestión. Hoy los cerdos lactantes pueden ser introducidos en la alimentación sólida a partir de 3 a 5 días de edad, con el empleo de alimentos preiniciadores de alta calidad y elevada digestibilidad con materias primas denominadas de nueva generación (leche descremada, suero de leche, plasma porcino, aislado proteico de soja, harina de pescado, harina de sangre desecada por métodos spray y enzimas entre otros.

La mayoría de los ingredientes alimenticios usados normalmente en dietas para monogástricos contienen uno o más factores antinutricionales (FAN) que afectan la disponibilidad de los nutrientes, por ejemplo; todos los cereales, la pasta de soja que contienen fitatos hacen indisponibles al fósforo, calcio, zinc y

hierro. Además los granos contienen polisacáridos no almidón (PNA) como la celulosa y pentosas que pueden afectar también la disponibilidad de nutrientes; el trigo y cebada contienen cantidades importantes de arabinoxilanos y  $\beta$ -glucanos. Por otra parte, algunas variedades de sorgo contienen niveles considerables de taninos. El cerdo produce solo algunas de las enzimas responsables de la digestión de los FAN.

La soja contiene una serie de compuestos antinutricionales y/o alergénicos, tales como inhibidores de la tripsina, glicina, beta-conglicinina, oligosacáridos, lecitinas y saponinas; los cuales pueden causar daños gástricos, daño intestinal, incremento en la susceptibilidad a enfermedades y pobre desempeño de los animales.

El inhibidor de la tripsina, inhibe la acción de la misma, afectando por lo tanto la digestión proteica y originando una hipertrofia compensatoria del páncreas. Normalmente el calor usado durante el proceso de la soja es suficiente para destruir este factor. Las saponinas son sustancias que incrementan la permeabilidad de las células de la mucosa intestinal, inhibiendo el transporte activo de nutrientes facilitando la asimilación de sustancias, a las cuales normalmente el intestino sería impermeable. Las saponinas también afectan la morfología de las células del tracto gastrointestinal. El incremento en la permeabilidad del intestino puede llevar a la asimilación de antígenos por el intestino delgado, causando reacciones alérgicas.

Las lesiones estructurales a nivel intestinal y el resultante incremento en la tasa de reemplazo celular originan elevadas pérdidas de energía y proteína endógenas. Estos aumentos en pérdida de nutrientes pueden ser una de las causas de la depresión del crecimiento debido a las saponinas.

Desde hace muchos años se ha intentado incrementar el valor nutritivo de los alimentos con enzimas exógenas. Al principio se emplearon enzimas provenientes de vísceras de animales (pepsinas, tripsinas, amilasas pancreáticas), del árbol de higo (ficina, proteasa) y la papaína proveniente de la papaya (proteasa).

Con el avance de la ingeniería genética, se han producido enzimas provenientes de bacterias (*Bacillus subtilis*) y algunas especies de hongos (*aspergillus oryzae*), o levaduras.

Durante la última década han estado ocurriendo cambios en las plantas procesadoras de alimentos balanceados del mundo, cada vez se están usando enzimas en más raciones, y para los nutriólogos tener a la mano más herramientas de ingrediente para la formulación de alimentos balanceados.

Hoy en día, el empleo de enzimas en dietas de monogástricos ha logrado el abaratamiento de costos de las raciones nutricionales y por lo tanto la mejora de los parámetros en la producción. El cerdo es incapaz de digerir entre el 15 y el 25% del alimento, debido a la deficiente producción de enzimas para digerir todos los complejos de la soja, entre otros (FAN, PNA, fibra). La digestión es menos eficaz por factores antinutritivos como los beta-glucanos presentes en la cebada y los xilanos en el trigo. Después del destete el lechón necesita tiempo para madurar su sistema digestivo.

Las enzimas son sustancias que liberan nutrientes de las materias primas, mejorando la digestibilidad de las mismas y protegen el medio ambiente disminuyendo la excreción de nitrógeno y fósforo. En el mercado Argentino hoy contamos con una gran variedad de productos comerciales que incluyen fitasas, carbohidrasas y proteasas, ya sea solas o en sus diferentes combinaciones, y están disponibles para su aplicación. Las enzimas en la actualidad están a disposición de los nutricionistas para bajar los costos de producción o mejorar los resultados productivos, con un correcto uso de las mismas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Anderson et al. 1969. Anderson, R. A; Conway, H. F.; Pfeiffer, U.F.; Griffin, R.L. 1969. Gelatinization of corn grits by rolo and extrusion cooking. *Cereal Sci. Today*. 14(1):4-7, 11-12.
2. AOAC, 1976. American association of cereal chemist (AACC). 1976. *Approved methods of the AACC*. 9a. Ed. St. Paul Minn. USA. Association of analytical chemist (AOAC). 1975. *Official methods and purification*. Cam. J. Byochen. 37:911-913.
3. Augspurger N.R., Gaines A.M., Danielson J.R., Southern L.L. The phosphorus- releasing efficacy of an E. coli-derived phytase in young pigs is

- dose-dependent and is not affected by the addition of a lipid-based coating added for pelleting stability [Abstract # T216]. *J AnimSci.* 2007; 85E-Suppl 1.
4. Bedford, M. R. "Mechanism of action and potencial enviromental benefits from the use of feed enzymes." *Anima. Feed Sic. Tech.* 86 1-13 México 2000.
  5. Bedford, M.R., 2000. Exogenous enzymes in monogastric nutrition—their current value and future benefits. *Anim. FeedSci. Technol.* 86, 1–13.
  6. Belitz y Grosch 1988. INTA: Actualización Técnica N° 54. Maíz Cadena de Valor Agregado. Alternativas de transformación e industrialización. Fuente: Ing. Agrónomo Rodolfo Oscar Brauna, Facultad de Agronomía UNPLam "Técnicas de procesamiento de granos que mejoran la eficiencia alimentaria en la producción animal. INTA PRECOP II, Agregado de valor en origen - Pág. 23. Química de los alimentos. Segunda edición. Editorial Acribia, SA, Zaragoza. España 1988.
  7. Bravo, F. "Tratamiento enzimático del sorgo." *Acontecer Porcino* No. 0 Octubre 12-17 México 1992.
  8. Cadogan, J. D., Patridge, G. G. And Simminins, H. P. "Effect of xylanase addition in feed containing either pre-characterized wheat or wheat by products on performance of growing pigs." *Finnfeeds International Australia.* 4 (1) 48. California U.S.A. 2002.
  9. Cantor, A. Enzimas usadas na Europa, Estados Unidos e Asia. Possibilidades para uso no Brasil. In: Ronda Latinoamericana de Biotecnología 5, Curitiba, 1995. *Anais. Curitiba: Alltech, 1995. P.31-42.*
  10. Campbell, G.I., van der Poel, A.F.B., 1998. Use of enzymes and process technology to inactive antinutritional factors in legumes seeds and rapeseed. In: Jansman, A.J.M., Hill, G.D., Huisman, J., van der Poel, A.F.B. (Eds.), *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legumes Seeds and Rapeseed.* Wageningen Press, Wageningen, The Netherlands. Pág. 23-42.
  11. Cervantes, M. y Gómez R. "Uso de enzimas exógenas para dietas para cerdos. UNAM IV Jornada Internacional en Producción Porcina." *Memorias* 22 - 23 Mayo 91- 101. México 2003.

12. Charlton, P., "Expanding Enzyme applications. Biotechnology in the feed industry". T.P. 317-326 Lyons & K.A. Jacques. 1999
13. Conn E.E., Stumpf, P. K. "Bioquímica fundamental." 2° Ed Limusa, 45 - 49 México 1973.
14. Corring, T, Aumaitre, A, Durand, G. 1978. Development of digestive enzymes in the piglet from birth to 8 weeks. I. Páncreas and pancreaticenzymes. Nutr. Metab. 22(1):231-243.
15. Costa, A. R. C. DA; Lopes, P., S.; Torres, R. de A.; Regáis, A. J.; Almeida, E -Silva, M. de; Euclides, R. F.-; Pires, A. V. " Estimation of genetic parameter on performance traits of largewhite, landrace and durocswinebreeds." Revista Brasileira de Zootecnia. 30 (1) 49-55 2001.
16. Curtís S. E. "Estrategias para minimizar la perdida de energía metabolizable." Porcino cultura internacional, Mayo; 5, 38 - 40 México 2000.
17. Cromwell, G.L. 2002. Phytase, what is new and what needs to be done? J. Anim. Sci., 80 (Suppl. 1): 54. Ref. 211.
18. Deen, J. y Valencia C. "Reflexiones sobre la curvas de producción, su importancia económica y el impacto de la variación de pesos en la engorda." Boletín de practica especial para clientes, programa 110, 2000.
19. De Luca, (1996) y Rearte, (1996). Fuente: Ing. Agrónomo Rodolfo Oscar Brauna, Facultad de Agronomía UNPLam "Técnicas de procesamiento de granos que mejoran la eficiencia alimentaria en la producción animal". INTA PRECOP II, Agregado de valor en origen - Pág. 23.
20. Dierick, K. A. & Decuyper, G. "Ingeniería alimenticia animal." CECSA 544-549 Dublín, Irlanda, 1994.
21. Dierick, W. L. Y Weeb S. G. "Crecimiento de añejos alimentados con alfalfa o pasta de soya." J. Porcina Ve. Sci. 18(4) 266-269. Venezuela 1996.
22. Duran, O. "Reduciendo el impacto de las enfermedades de los cerdos en crecimiento." Porcinocultura internacional, Noviembre; 11, 45 México 1996.
23. Ferreira, C.L.L.F. 2003. Influência de probióticos e prebióticos na absorção de minerais. Prebióticos e probióticos. Atualizações e prospecção. UFV. Vicososa: 79 – 101.

24. Frapin, D. and Nys, Y. 1995. Relative efficiency of microbial and vegetal phytases and additionnal effect on phosphorus availability. Proceed. 10th European Symposium on Poultry Nutrition, Antalya, Turkey, 15-19 October, 352-354.
25. Fuller, R. 1989. Probiotic in man and animals. A review. J. Appl. Bacteriol., 66: 365-378
26. Gee, E. D.; Aron E. L. Lucas F. S. "La soya en las dietas porcinas como aportan su valor Nutricional." Feeding Times 8 (1) 2-3 U.S.A. 2000.
27. Gentry, J. G.; Mcglone, J. J.; Miller, M. F.; Blanton, J. R.; Jr. "Diverse birth and rearing environment effects on pig growth and meat quality." Journal Animal Science. 80 (70) 1707-1715 Saboy, USA 2002.
28. Gómez, J. B. "Nuevas aplicaciones de enzimas en la industria de alimentos balanceados: Allzyme Vegpro la alternativa ideal." 9° Roda Latinoamericana En Biotecnología 1993, Alltech, Inc. Septiembre 27 - 08 Octubre 30, 101-106 México D.F. 1993.
29. Gourley, G.; Sauber, T.E.; Jones, D.B.; Kendall, D. y Alle, G. 2002. Effect of lowphytate corn and dietary phytase addition on pig growth and fecal phosphorus excretion in a commercial environmental. J. Anim. Sci., Vol. 80 (Suppl. 2): 74. Ref. 174.
30. Guerra 1985 y Martínez 1988. GUERRA M. M. J. 1985. Desenvolvimento de um processo de moagem de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) e de produção de farinhas pre-gelatinizadas. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP. Brasil. MARTINEZ, B. F. 1988. Obtencao de farinhas instantaneas de sorgo para "tortillas" pelo processo de extrusao. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP. Brasil.
31. Hanson, 1984. HANSON, L. E., ALLEN, C. E., MEADE, R. J., RUST, J. y MILLER, K.P. (1970) Feedstuffs 42, 16-18.
32. Harper, 1981 & Guerra, 1985. GUERRA M. M. J. 1985. Desenvolvimento de um processo de moagem de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) e de producao de farinhas pre-gelatinizadas. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP. Brasil.

33. HARPER, J. M. 1981. Extrusion of foods. Vol. I and II. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, USA.
34. Harper, 1989. HARPER, J. M. 1989. Food extruders and their applications, In: Extrusion cooking. Edited by Mercier, Ch., Linko, P., and Harper, 1.M. Published by the AACC, St. Paul, Minnesota, USA.
35. HENN, J.D. Seminário a presentadona disciplina bioquímica do tecido animal do programa pós-graduação em ciencias veterinárias da UFRGS no primeiro semestre de 2002, On line, disponívelna Internet <http://www.ufrgs.com.br/trabalhosbioquimica>.
36. Holloway, M.R.; "The mechanism of enzyme action." The Oxford University Press, 2004.
37. Hoyos, G. C. "Mecanismos de acción propuestos de los probióticos en cerdos." biotecnología en la industria de alimentación animal Apligen, SETIC Vol. I 73-80 México D.F. Octubre 1992.
38. INEGI Enciclopedia de los municipios del estado de Puebla 2002.
39. Irazusta, 1992. INTA: Actualización Técnica Nº 54. Maíz Cadena de Valor Agregado . Alternativas de transformación e industrialización. Fuente: Ing. Agrónomo Rodolfo Oscar Brauna, Facultad de Agronomía UNPLam "Técnicas de procesamiento de granos que mejoran la eficiencia alimentaria en la producción animal". INTA PRECOP II, Agregado de valor en origen - Pág. 22.
40. Irazusta A. 1992. Uso de tecnología de extrusión y expansión en cereales y subproductos proteicos y su utilización en dietas para lechones. Actas del 2º Congreso Nacional de Producción Porcina. Rosario, Argentina. 16 p.
41. Jones CK. Effects of Dietary Enzymes or Specialty Proteins on Nursery Pig Performance [master's thesis]. Manhattan, Kansas: Kansas State University; 2009.
42. Kent N.L. 1987. Tecnología de los Cereales. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 362 p.
43. Kornegay, E.T., Qian, H. Replacement of inorganic phosphorus by microbial phytase for young pigs fed on a maize-soyabean-meal diet. Br J Nutr. 1996; 76: 563–578.

44. Kornegay. 1999. Phytase effects on ileal amino acid digestibility and nitrogen balance in finish- ing pigs fed a low-protein plant-based diet. J. Anim. Sci. 77(1) : 175.
45. Kitchen, D.I. "Enzymes applications in pig's diet." FeedCompouder. 14-18 February 1998.
46. Khlebov, V.; Sidukov, N.; "Some internal traits in purebred and crossbred pigs." Sinovodstvo No. 4, 9-11 MariiRepublic, Russia. 2001.
47. Knabe 1990. Ing. Agr. PhD. Oscar N. Di Marco\*. 2013. Producir XXI, Bs. As., 21(265):20-28. \*Unidad Integrada Balcarce.  
odimarco@balcarce.inta.gov.ar www.produccion-animal.com.ar.
48. Koshland, J. K. & Castillo, R. B. L.; "Importancia de la nutrición" Feed and Times, 50 14-18 1998. U.S.A.
49. Kramer & Twigg, 1983; Cheftel & Cheftel, 1988; Mercier et al. 1989. INTA: Actualización Técnica Nº 54. Maíz Cadena de Valor Agregado . Alternativas de transformación e industrialización. Fuente: Ing. Agrónomo Rodolfo Oscar Brauna, Facultad de Agronomía UNPLam "Técnicas de procesamiento de granos que mejoran la eficiencia alimentaria en la producción animal". INTA PRECOP II, Agregado de valor en origen - Pág. 22 y pág. 23.
50. Liebert, 1998. F. Liebert, Georg-August-UniversitätGöttingen, 4th International Kahl-Symposium, Reinbek, Alemania, 1998.
51. Lindemann, M.D., Cornelius, S.G., EL Kandelgy, S.M.. et al. 1986. Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme level in the piglet. J. Anim. Sci., 62(5):1298-130.
52. Lyons, T.P.; "La aplicación de productos microbianos naturales en la producción porcina." biotecnología en la industria de alimentación animal Apligen, SETIC Vol. II 43-75 México D.F. Octubre 1992.
53. López, C. D., Teixeira O. A., Nume M. M. P., et al "Efecto de la suplementacion con niveles crecientes de AllzymeVegpro sobre el desempeño de lechones en el crecimiento." Universidad Federal de VicosoAlltech 45 Brasil, 2001.
54. Lucas, I.A.M., Lodge G.A. "Alimentación de lechones." Zaragoza España: Editorial Acribia. P, 75 1998. Ovchinnikov, A.; Kalashnikova. G. "the

performance pigs from different types of rational crossbreeding". Timiryazev Agriculture Academy No. 4, 3-4 Moscow, Russia 2001.

55. Makkink, C.A., Berntsen, P.J.M., Kamp, B.M.L. Et al. 1994. Gastric protein breakdown and pancreatic enzyme activities in response to two different dietary protein sources in newly weaned pigs. *J. Anim. Sci.*, 72(11):2843-2850.

56. McKnight, W. F. Technical specifications and properties of photoset. In: COELHO, M. C.; KORNEGAY, E. T. Photoset in animal nutrition and waste management: A BASF reference manual 1996. New Jersey: BASF, 1996. p. 1-15.

57. Martínez & Salinas, 1991. MARTINEZ, B. F.; SALINAS, M. Y. 1991. Extrusión de trigos cristalinos, III Congreso Agroindustrial. UACH. Chapingo, México.

58. McMullen, L.K., Karsten, A. Phosphorus reduction in swine manure and pig performance by using dietary phytase. Recuperado de: [http://www.heartlandwq.iastate.edu/ManureManagement/AnimalFeeding/non\\_ruminant/phosphorusreduction.htm](http://www.heartlandwq.iastate.edu/ManureManagement/AnimalFeeding/non_ruminant/phosphorusreduction.htm). Accessed: 12/05/2012.

59. Tsai, T.C. The effect of E. coli phytase on a sustained benefit in swine growth performance, bone strength, and nutrient digestibility, and phosphorous balance in nursery pigs. [master's thesis]. Athens, Georgia: The University of Georgia; 2007.

60. Michalska, G.; Nowachowicz, J.; Rak, B.; Kapelanski, W. " The results of performance test of crossbred after pietrain sires and sows of different breeds including the zlotnika spotted breed." University of technology and agriculture, 10 85-90 Bydgoszez, Poland 2000.

61. Morales, M. M. A., Cervantes R. M., Cuca G. M. Figueroa V. J. L., Pro M. A. Araiza P. B., Cervantes R. M., y Torrentera O. N. "Digestibilidad ileal de los aminoácidos y comportamiento productivo de cerdos alimentados con dietas a base de trigo adicionadas con una proteasa fungal." Colegio de Posgraduados. Agrociencia. 36. P, 515-522 México. 1996. Liener, A. E. "Enzymes in animal feeds – application technology and effectiveness In Proc." 12th Carolina Swine Nutrition Conference, Raleigh, N.1 (5) 22-33 Carolina, USA 1996.

62. Oloofs, K., Dolbusin, A. and Jeroch, H. 1998. Einfluss von mikrobieller und nativerweizenphytase auf die phosphor-verwertung bei broilern. *Archiv für Geflügelkunde*, 62:260 – 263.
63. Omogbenigun, F.O., Nyachoti, C.M., Slominski, B.A., 2004. Dietary supplementation with multi-enzyme preparations improves nutrient and growth performance in weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 82, 1053–1061.
64. Owsley, WF, Orr, DE, Tribble, LF. 1986. Effect 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(2):497-504.
65. Owusu-Asiedu, A., Simmins, P. H., Brufau, J., Lizardo, R., Peron, A. 2010. Effect of xylanase and  $\beta$ -glucanase on growth performance and nutrient digestibility in piglets fed wheat-barley-based diets. *Livestock Science* 134, 76 – 78
66. Partridge, GR. In feed enzymes and antibodies. In: *Recent advance in animal nutrition*, Winchasin, Northwich, 1993. Anais. Northwich, p.34-50, 1993.
67. Pattacini, S.H.; Scoles, G.E.; y Braun , R.O. 2012. Digestibilidad aparente de nutrientes en cerdos alimentados con dietas compuestas por diferentes niveles de fitasas obtenidas de *Aspergillus oryzae*. *Contaminación ambiental de los residuos orgánicos derivados. Revista Argentina de Producción Animal*. 2012. Vol.32: (2): 107 – 115.
68. Partridge, G.G., Alcantara P.F. & Creswell D. "Effect of xylanase addition to corn/soybean meal/wheat pollard diets for grower/finisher pigs." p,45-49 London England. 2003.
69. Pérez, L. M. "Uso de concentrados de proteína de soya en dietas de lechones recién destetados." *Consultor de Nutrición Animal* 10 (2) 22 - 29 Madrid España. 2002.
70. Pizardi et al., 1999, Perera , Aurrekoetxea 2001 y Pizardi et al., 1997 y Bjoern, 2000, Pandey 2003. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Determinación de la especificidad de proteasas fúngicas en la hidrólisis de proteína. Tesis para obtener el grado de especialista en biotecnología. Directora de tesis: Dra. Lilia Arely Prado Barragan.

71. Pizardi, C.A., Gutiérrez, M.C, Fernández, C.D. y Fernández, J.A. (1999). Producción piloto de hidrolizado de residuos de pescado por fermentación en sustrato sólido con hongos filamentosos. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitari y Ciencias del Ambiente (CEPIS). Lima Perú. Perera, M.N. y Aurrekoetxea, G. (2001). Congreso Nacional de Acuicultura. Aprovechamiento de recursos pesqueros infrautilizados para la obtención de alimentos mejorados de peces de acuicultura. Sukarrieta Bizkaina España. <http://aquatic.inizar.es/N3/art1302/azti1.htm>. Bjoern, L., Lied, E. y Espe, M. (2000). Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterization and nutritional evaluation. *Journal of the Science of Food Agriculture*. 80: 581 – 589. Pandey, A., Germano, S., Osaku, C.A., Rocha, N.S. y Soccol, C.R. (2003). Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. Produced by Solid. State Fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 32: 246 – 251
72. Pluske, J. R. "Efecto de AllzymeVegpro sobre la digestibilidad de las proteínas vegetales en cerdos." Masseyuniversity, Palmerson 12 54-97 North, Nueva Zelanda 2000
73. Pluske, J.R., Pethick, D.W., Hopwood, D.E., Hampson, D.J., 2002. Nutritional influences on some major enteric bacterial diseases of pigs. *Nutr Res Rev* 15, 333–371.
74. Puaron, J., Hoyos G. "Evaluación de AllzymeVegpro en dietas de lechones en una granja comercial." Alltech de México.98-102 1997.
75. Ramírez, H. G., Segura, C. J. J. y Haro, T. M. "Evaluación de un aditivo alimenticio como poli vitamínico, estimulante del apetito y promotor de crecimiento en cerdos." *Memorias XXXVI Congreso Nacional Querétaro* p, 58 Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos Julio 25 - 29 de 2001.
76. Reddy, N.R., Sathe, S.K. and Salunkhe, D.K. 1982 Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res* 28: 1 - 92.
77. Reddy, N.R. y S.K. Sathé "Phytates in Legumes and cereals. *Adv. Food res.*" 28 P, 91-92.
78. Rossem& Miller, 1973. ROSSEM, J.L; MILLER, R.C. 1973. Food Extrusion. *Food Technology* 27(8):46-53.

79. San Pedro et al., 1986. SAMPEDRO, G., LÓPEZ-BENITO, M. y PASTORIZA, L. (1986) Cabezas y vísceras de tónidos: Su aprovechamiento para alimentación animal. Informe técnico nº 137 del Instituto de Investigaciones Pesqueras. Barcelona, noviembre 1986.
80. Sears, A.; Walsh, G. "Aplicaciones industriales de las Enzimas: usando estos conceptos para hacer corresponder animales, enzimas y sustratos en aplicaciones en la industria del alimento balanceado" 8° Roda Latinoamericana En Biotecnología 1993, Alltech, Inc. Septiembre 20 - Septiembre 30, 79-111 México D.F. 1993.
81. Selle PH, Ravindran V. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. *LivestSci*. 2008; 113: 99–122.
82. Selle, P.H. and Ravindran, V. 2009. Previous exposure to dietary phytase reduces the endogenous energy losses from precision-fed chickens. *British Poultry Science*. 5: 598 – 605.
83. Simons, P., Jongbloed, W., Versteegh, H. and Kemme, P. 1992. Improvement of phosphorus available by microbial phytase in poultry and pigs. Pages 100 -109 in: *Proceeding Georgia Nutrition Conference, Atlanta, GA*.
84. Schutte, J.B. and J. De Jong, "Effect of dietary protease enzyme preparation (Vegpro) supplementation on broiler chick performance." 12 the Annual meeting, Alltech. 2000.
85. Serna Saldívar S.O. 1998. Manual de prácticas de laboratorio de industrialización de cereales. ITESM. Departamento de tecnología de alimentos. Monterrey, N.L. México. 242 p.
86. Stahl, C.H., Roneker, K.R., Pond, W.G. and Lei, X.G. 2004. Effects of combining three fungal phytases with a bacterial phytase on plasma phosphorus status of weanling pigs fed a corn- soy diet. *J. Anim. Sci*. 82: 1725 –1731.
87. Stryer, L. *Bioquímica Aplicada Primera Ed. Venezuela*, p, 125 - 129 Reverte, 1998.
88. Summer, P. G.; "Enzimas una nueva Herramienta para la Nutrición" *Apligen Vol. IV* 50 - 68. México D. F. Noviembre 1992.

89. Taylor, L. C.; Headon, D.R. "Introducción a las enzimas." *Biotecnología en la industria de alimentación animal*" Apligen, SETIC Vol. III 119-133 México. D.F. Octubre 1992.
90. Thacker, P.A.; Rossnagel, B.G. y Raboy, V. 2003. Phosphorus digestibility in low-phytate barley fed to finishing pigs. *Can. J. Anim. Sci.*, 83: 101-104.
91. Thacker, P.A.; Rossnagel, B.G. y Raboy, V. 2004. Effect of phytase supplementation on phosphorus digestibility in low-phytate barley fed to finishing pigs. *Archives on Animal Nutrition*, 58 (1): 61-68. Cromwell, G.L. and Coffey, R.D. 1991. Phosphorus-a key essential nutrient, yet a possible major pollutant-its central role in animal nutrition. In: T. P. Lyons (ed.). *Biotechnology in the Feed Industry*. Alltech Technical Publications. Nicholasville, KY, pp. 133-145. Wyss, M., Pasamontes, L., Friedlein, A., Rémy, R., Tessier, M. and Kronenberger, A. 1999. Bio-physical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakis phosphate phosphohydrolases): molecular sizes, glycosylation patterns, and engineering of proteolytic resistance. *Appl Environ Microbiol* 65: 359-366.
92. Tscheuschner, H.D. (2001). *Fundamentos de la tecnología de los alimentos*. Pp 14. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
93. Vanbelle, M., Teller, E. and Focand, M. 1990. Probiotics in animal nutrition: a review. *Arch. Anim. Nutr.*; 40: 543-567.
94. Verstegen, M.W.A., Williams, B.A., 2002. Alternatives to antibiotics as growth promoters for monogastric animals. *Anim. Biotechnol.* 13, 113–127
95. Volpi, B. F. Utilização de complexo enzimático na dieta de suínos. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Dissertação de Mestrado, 2011. 61 p.
96. Williams, B.A., Verstegen, M.W.A., Tamminga, S., 2001. Fermentation in the monogastric large intestine: its relation to animal health. *Nutr. Res. Rev.*14, 207–227.
97. Wiseman & Monari, 1996; Desrosier, 1997. INTA: Actualización Técnica Nº 54. Maíz Cadena de Valor Agregado .Alternativas de transformación e industrialización. Fuente: Ing. Agrónomo Rodolfo Oscar Braun, Facultad de Agronomía UNPLam "Técnicas de procesamiento de granos que mejoran la

eficiencia alimentaria en la producción animal”. INTA PRECOP II, Agregado de valor en origen - Pág. 29. Monari, S., Mateos, G.G., García, P. y Medel, P. (1996) Utilización de la soja integral en alimentación animal. 3ª ed. American Soybean Association. Bruselas. 44 pp.