

Ácido cítrico y fitasa microbiana en el comportamiento productivo y excreción de fósforo, calcio y nitrógeno en gallinas de postura

Citric acid and microbial phytase relative to productive performance and phosphorus, calcium and nitrogen excretion in laying hens

Lily Vargas Rodríguez^a, José Herrera Haro^a, Eduardo Morales Barrera^b, Maria Elena Suárez Oporta^a, Mariano González Alcorta^c, Carlos García Bojalil^a

RESUMEN

Con el objeto de estudiar el efecto del ácido cítrico (AC) y la fitasa en el comportamiento productivo, contenido de fósforo (P) y nitrógeno (N) en excretas, así como P y calcio (Ca) en huevo y cascarón, se realizó un experimento con gallinas de postura de 80 semanas de edad, recién pelechadas, alimentadas con dietas a base de sorgo y pasta de soya con 2.7 Mcal de EM Kg⁻¹, 13 % de PC, 4 % de Ca y 0.4 % de fósforo disponible (PD). La fitasa fue adicionada como ingrediente de las dietas, aportando 0.1 % de P y 0.3 % de Ca; los niveles de AC y fitasa fueron 0, 0.6 y 2 % y 0 y 600 unidades de fitasa (UF) respectivamente. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x 2 y cinco repeticiones de cuatro gallinas por tratamiento. Los resultados indicaron que la combinación 600 UF + 2 % de AC incrementó el peso del huevo y redujo el P en excretas en más de 50 %. El N en las excretas disminuyó con la adición de AC ($P < 0.01$). La adición de fitasa incrementó el Ca en yema y clara y lo disminuyó en el cascarón ($P < 0.05$); mientras que la adición de AC incrementó el Ca en el cascarón ($P = 0.01$). Se concluye que la adición de ácido cítrico y fitasa en dietas de aves al final del ciclo de postura, incrementa el peso del huevo y reduce la excreción de P y N.

PALABRAS CLAVE: Acido cítrico, Fitasa, Excreción, Fósforo, Nitrógeno, Calcio.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effect of Citric Acid (AC) and Phytase on productive behavior of laying hens, phosphorous (P) and nitrogen (N) content in excreta, as well as P and calcium (Ca) content in whole egg and eggshell. This experiment was carried out on 80 week old hens after molting, and fed on a sorghum and soy paste diet (2.7 Mcal EM kg⁻¹, 13 % PC, 4 % Ca and 0.4 % available P). Phytase was added as an ingredient, contributing 0.1 % of P and 0.3 % of Ca. AC levels were 0 %, 0.6 % and 2 %, while those for phytase were 0 and 600 units (UF). A completely randomized experimental design with a factorial 3 x 2 array and 5 replications of four hens per treatment was used. Results showed that a combination of 600 UF and 2 % AC increased egg weight and reduced P content in excreta by more than 50 %. N in excreta decreased when AC was added ($P < 0.01$). The use of phytase increased Ca content in yolk and albumin while decreasing that of shell ($P < 0.05$). AC increased Ca in shell ($P = 0.01$). When AC and phytase were added to diets provided to hens at the end of the laying cycle, egg weight increased and N and P excretion decreased.

KEY WORDS: Citric acid, Phytase, Excretion, Phosphorus, Nitrogen, Calcium.

Recibido el 7 de noviembre de 2001 y aceptado para su publicación el 30 de enero de 2002.

a Especialidad de Postgrado en Ganadería. IREGEP, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México. Correspondencia y solicitud de separatas al segundo autor.

b Campo Experimental Valle de México, INIFAP.

c Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

Los ingredientes más utilizados en la formulación de dietas para aves son de origen vegetal, los cuales presentan una baja disponibilidad (aproximadamente 30 %) de fósforo (P), por encontrarse unido al ácido fítico⁽¹⁾, excretándose cantidades considerables al ambiente. Algunos estudios muestran que la fitasa microbiana, enzima que carecen las aves⁽¹⁾ hidroliza el fitato^(2,3), lo que mejora la disponibilidad de P en los ingredientes vegetales y permite reducir la inclusión de P inorgánico en las dietas⁽⁴⁾. Al suplementar las dietas con fitasa, la excreción de calcio (Ca), magnesio (Mg)⁽⁵⁾ y nitrógeno (N)⁽⁶⁾ también se reducen y la digestibilidad de aminoácidos de los ingredientes se mejora^(6,7). Estudios *in vitro* muestran que el ácido cítrico produce la hidrólisis del ácido fítico⁽⁸⁾, lo que incrementa la retención de nutrientes como la proteína, Ca y P⁽⁹⁾ reduciendo la excreción de éstos.

La respuesta en el comportamiento productivo de las aves agregando fitasa a las dietas, dependerá del nivel de inclusión de ésta⁽¹⁰⁾. Estudios *in vitro* muestran que la mayor actividad de la fitasa microbiana ocurre a un pH de 2.5 y 5.0⁽¹⁰⁾. Considerando que el principal sitio de acción de la fitasa microbiana es el proventrículo⁽¹¹⁾, con un pH de 4.4⁽¹²⁾, el agregar ácido a las dietas reducirá el pH gástrico⁽¹³⁾, mejorando la utilización de la fitasa y por consiguiente la digestibilidad del fitato. Asimismo, acidificando el tracto gastrointestinal disminuye la potencialidad del ácido fítico a unirse a ciertos minerales⁽¹⁴⁾, haciendo más disponible la acción de la fitasa.

Por lo anterior, se planteó una investigación cuyos objetivos fueron: estimar el efecto de tres niveles de ácido en la dieta, como una medida para mejorar la disponibilidad de P, Ca y N y la actividad de la fitasa; estimar la excreción de P, Ca y N en dietas sorgo + soya suplementadas con ácido cítrico y fitasa microbiana.

La investigación se realizó en las instalaciones avícolas del Campo Experimental "Valle de México", del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias de la SAGARPA, en Chapingo, Estado de México; los análisis

The most common ingredients to formulate poultry diets are of vegetable origin, which show low P availability (some 30 %) because it is commonly linked to phytic acid⁽¹⁾, and also excreted in considerable amounts. Some studies show that microbial phytase, an enzyme not present in birds⁽¹⁾, hydrolyzes phytates^(2,3), and improves the P availability from vegetable ingredients and therefore allowing to reduce inorganic P content in diets⁽⁴⁾. When phytase is added as a supplement, Ca, Mg and N excretion is reduced and amino-acid digestibility is improved.

In vitro studies show that citric acid hydrolyzes phytic acid⁽⁸⁾, thus increasing retention of certain nutrients, such as proteins, Ca and P⁽⁹⁾, reducing their excretion.

The answer reflected on poultry productive performance when phytase is added to diverse diets will depend on the amount by which it is added⁽¹⁰⁾. *In vitro* studies show that the highest activity of microbial phytase takes place between pH 2.5 and 5.0⁽¹²⁾. Taking into account that the main site of phytase's action is the proventricle⁽¹¹⁾, whose pH is 4.4, when acid is added to diets, gastric pH will be lower and therefore phytase's activity will be stronger and in consequence phytate digestibility. Besides, if the gastrointestinal tract is acidified, the capacity of phytic acid to bond itself to certain minerals is diminished⁽¹⁴⁾, increasing the possibility of phytase's activity.

A study based on these facts was set out with the following objectives: i) to estimate the effect of three acid levels in diets so as to increase P, Ca and N availability and phytase activity; and ii) to estimate P, Ca and N excretion in sorghum + soybeans diets supplemented with Citric acid and microbial phytase.

This research was carried out at INIFAP's "Valle de Mexico" Experimental Station in Chapingo, State of Mexico. The corresponding chemical tests pertaining to diet components, excreta and eggs were carried out at the Livestock Program Laboratory belonging to the Genetic Resources and Productivity Institute of the Colegio de Postgraduados, also in Chapingo, State of Mexico.

químicos de las muestras de ingredientes, dietas, excretas y huevos se realizaron en el laboratorio del Programa de Ganadería del Instituto de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados. Se utilizaron 120 gallinas (Isa Babcock B-300) de 80 semanas de edad, recién pelechadas, las cuales fueron alojadas en jaulas de rejilla individual con comedero y bebederos automáticos y evaluadas durante 10 semanas, con un calendario de luz natural de 12 horas y 4 horas de luz artificial.

Las dietas fueron a base de sorgo + pasta de soya⁽¹⁵⁾, con 13 % de proteína y 2.7 Mcal EM kg⁻¹ con 0.4 % de PD y 4.0 % de Ca (Cuadro 1). Previo a la formulación, se analizaron los ingredientes utilizados en la dieta y se determinó el contenido de N por el método Kjeldahl⁽¹⁶⁾, P por el método colorimétrico⁽¹⁶⁾ y Ca por absorción atómica⁽¹⁶⁾. Las dietas se prepararon al inicio del experimento, almacenándose en un lugar ventilado y a temperatura ambiente.

A la dieta se agregaron 120 g de fitasa TM⁻¹ y se consideró a la fitasa como un ingrediente de la dieta, basados en la dosis a utilizar de la misma (600 UF) y el producto potencial de ésta (Natuphos 5000). La tasa de inclusión de la fitasa determinó los valores de Ca y P asignados. Los valores de Ca y P, liberados por la fitasa en g kg⁻¹ fueron aproximadamente 0.1 % de P y 0.3 % de Ca⁽¹⁷⁾. El pH de la dieta fue determinado en una muestra de 20 g de la dieta con un potenciómetro, al inicio, mitad y final de experimento.

El consumo de alimento, la conversión alimenticia y la masa del huevo fueron registrados cada dos semanas, y la producción y peso del huevo diariamente. La calidad del huevo, se determinó cada dos semanas en unidades Haugh; para medir la altura de la albúmina se utilizó un micrómetro y se estimó con la siguiente ecuación⁽¹⁸⁾:

$$UH = 100 \log H$$

donde: H = h + (7.685 - 1.7 w^{0.37}), h= altura observada de la albúmina (mm) y w= peso observado del huevo.

One hundred and twenty (Isa-Babcock B-300) 80 weeks old, recently molted hens took part in this experiment, which were placed in individual cages provided with automatic water and feed troughs. The hens were evaluated for 10 weeks and provided with 12 hours of natural and 4 hours of artificial light.

Cuadro 1. Composición de la dieta testigo

Table 1. Control diet composition

	%
Ingredients:	
Sorghum	73.5700
Soy paste	14.5600
Calcium carbonate	9.1300
Orthophosphate	1.8000
Salt	0.3500
DL-Methionine	0.1500
Vitamins (pre-mixture) ^a	0.1000
Minerals (pre-mixture)	0.1000
Oil	0.1000
L-Lysine	0.1400
Pigment	0.0015
Phytase ^b (Natuphos,5000)	-----
Anhydrous citric acid ^c	-----
Estimated values:	
Protein	13.000
Metabolic energy (MC/kg)	2.760
Lysine	0.690
Methionine+cystine	0.580
Treonine	0.478
Calcium	4.000
Phosphorous (available) (PD) ^d	0.400
Analyzed values:	
Protein	13.100
Calcium	4.200
Phosphorous (total) (PT) ^e	0.650

a Vitamin pre-mixture per kg/diet: A (Retinol),12,000 UI; D (Colecalciferol), 2,400 UI; E (DL-alpha tocoferol), 20 UI; K (menadione),1.2 mg; thiamine,1.6 mg; riboflavin,8.0 mg; niacin,32 mg; pyridoxine 3 mg; pantotenic acid,11.2 mg; cianocobalamine, 16 ug; folic acid,1.6 mg; choline,250 mg.

b Phytase was added as an ingredient in certain treatments.

bc Added to diets at the expense of sorghum.

de For diets containing phytase, Ca and P content in orthophosphate was reduced: PD 0.3 %, PT 0.540 % and Ca 3.7 %.

Para la excreción de P, Ca y N, a los 40 (primer muestreo) y 60 días (segundo muestreo) de experimentación se colocaron bandejas forradas con plástico debajo de cada jaula. Las excretas fueron colectadas durante tres días, almacenadas en bolsas de plástico a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, posteriormente se secaron a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, se pesaron y fueron cernidas utilizando una criba de 1 mm para realizar el análisis correspondiente. Los mismos días que se colectaron las excretas se tomaron muestras del cascarón y el contenido del huevo para la determinación de Ca y P. El contenido de P fue determinado colorimétricamente⁽¹⁶⁾, el Ca por absorción atómica⁽¹⁶⁾ y el N por el método Kjeldahl⁽¹⁶⁾.

Las dietas experimentales fueron las siguientes: 1) Testigo; 2) 0 % de AC, 600 UF; 3) 0.6 % de AC, 0 UF ; 4) 0.6 % de AC, 600 UF; 5) 2.0 % de AC, 0 UF; 6) 2.0 % de AC, 600 UF.

Los tratamientos fueron asignados en forma aleatoria a las unidades experimentales, según un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de 3×2 con tres niveles de AC (0, 0.6 y 2 %) y 2 niveles de fitasa (0 y 600 UF), constituyendo cada tratamiento de cinco repeticiones por tratamiento con cuatro aves cada una. Las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey⁽¹⁹⁾.

La adición de fitasa como un ingrediente en la dieta, aportó aproximadamente 0.3 % de Ca y 0.1 % de P (Cuadro 2), lo que indica que las aves consumiendo 3.7 % de Ca y 0.3 % de fósforo disponible (PD), conteniendo fitasa, respondieron en forma similar a aquéllos con 4 % de Ca y 0.4 % de PD, no alterándose las variables productivas, lo que es congruente con otros investigadores^(20,21,22), quienes no encontraron diferencias en dietas con bajos niveles de P suplementadas con fitasa *vs* dietas suplementadas con niveles óptimos de PD. Esto confirma la acción de la fitasa de hidrolizar el fitato e incrementar la disponibilidad de P y Ca.

La interacción fitasa x ácido cítrico se manifestó en el peso del huevo ($P < 0.05$) siendo mayor a los niveles más altos de ambos factores (Cuadro 2). En ausencia de AC en la dieta, el peso del huevo

Diets were based on sorghum + soy paste⁽¹⁵⁾, with a 13% protein content and 2.7 Mcal EM kg^{-1} , 0.4% PD and 4% Ca (Table 1). Diet components were analyzed and N was determined through Kjeldahl's method⁽¹⁶⁾, P by colorimetry⁽¹⁶⁾ and Ca through atomic absorption⁽¹⁶⁾. All diets were prepared at the beginning of the experiment, and kept in a well ventilated shed at room temperature.

One hundred and twenty grams TM^{-1} of phytase were added to the diet and phytase was considered as a diet ingredient, based on the dose to be used (600 UF) and on its potential product (Natuphos 5000). Phytase's inclusion rate determined allocated Ca and P values. P and Ca values freed through phytase's action were approximately 0.1 and 0.3 %⁽¹⁷⁾. The diet's pH was determined on a 20 g sample by means of a potentiometer at the beginning, at the halfway point and at the end of the experiment.

Feed intake, conversion rate and egg mass were recorded every two weeks and egg production and weight on a daily basis. Egg quality was determined every two weeks in Haugh units (UH), and for measuring albumen height a micrometer was used and quality was estimated by means of the following equation:

$$\text{UH} = 100 \log H$$

In which: $H = h + (7.685 - 1.7 w^{0.37})$. Where h = observed albumen height in mm and w = egg weight

To determine P, Ca and N in excreta, collection trays lined with plastic were placed below the cages on day 40 (first sample) and on day 60 (second sample). Excreta was collected for three days and kept in plastic bags at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Subsequently, they were dried at $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, weighted and sifted through a 1 mm sieve. On the same days that excreta was collected, egg shell and egg contents samples were taken to determine Ca and P. P content was determined through colorimetry⁽¹⁷⁾, Ca by means of atomic absorption⁽¹⁶⁾ and N through Kjeldahl⁽¹⁶⁾.

Experimental diets were as follows: 1) Control; 2) AC 0 %, 600 UF; 3) AC 0.6 %, 0 UF; 4) AC 0.6 %, 600 UF; 5) AC 2 %, 0 UF; 6) 2.0 % AC, 600 UF.

Cuadro 2. Variables productivas en gallinas de 80 semanas de edad, pelechadas y suplementadas con ácido cítrico y fitasa

Table 2. Productive variables for 80 weeks old hens, fully fledged and supplemented with citric acid (CA) and phytase

Variable	Egg Weight (g)	Egg production (%)	Feed intake (g/hen/day)	Feed efficiency (kg)	Egg mass (g)	Haugh Units (UH)	
CA (%)							
0	58.1 a	73.4	100.4 a	2.5	44.0	90.7	
0.6	60.4 b	73.5	97.3 ab	2.3	44.7	91.2	
2.0	61.3 b	71.7	86.7 b	2.3	43.8	90.9	
Phytase (U/kg)							
0	59.2 a	73.9	93.0	2.4	43.9	91.4	
600	60.7 b	72.5	96.6	2.3	44.5	90.5	
CA x phytase							
0	0.0	58.5 bc	74.8	99.0	2.3	43.9	90.1
0.0	600	57.7 c	74.0	101.8	2.6	44.1	91.9
0.6	0.0	59.5 bc	72.6	98.2	2.3	43.5	91.9
0.6	600	61.4 ab	74.4	96.4	2.4	45.9	90.5
2.0	0.0	59.6 bc	74.4	81.8	2.3	44.3	92.1
2.0	600	63.1 a	69.0	91.6	2.3	43.4	89.7
SE	0.73	2.59	5.17	0.17	1.67	1.18	

abc Means showing different literals in columns indicate differences ($P < 0.05$).

SE= Standard error.

disminuyó. El efecto de la fitasa en la dieta fue similar a lo indicado en otro estudio⁽²¹⁾ con gallinas de 30 a 66 semanas de edad, situación que no ocurrió con gallinas más jóvenes de 30 a 54 semanas de edad. Así mismo, otros investigadores⁽²⁰⁾ encontraron que aves alimentadas con fitasa y 0.1 % de PD incrementaron 2.2 g el peso del huevo comparados con incrementos de 1 g en aves alimentadas sin fitasa; este incremento en el peso del huevo se asocia a la suplementación de fitasa en dietas deficientes en PD.

Otros investigadores⁽²³⁾ encontraron que con dietas con 2.8 Mcal Kg⁻¹ de energía metabolizable y niveles de proteína de 11 %, el peso del huevo disminuyó, sin embargo, con el mismo nivel de proteína y 3.3 Mcal Kg⁻¹ de energía metabolizable el peso del huevo se incrementó. Al respecto, diversos estudios han mostrado que la fitasa^(7,24) y el AC^(8,9) aumentan la utilización de la energía, mejoran la digestibilidad del almidón e incrementan

Treatments were allocated at random to the experimental units, according to a completely randomized design, consisting of a 3x2 factorial array having three AC levels (0 %, 0.6 % and 2 %) and two phytase levels (0 and 600 UF). Each treatment was made up by five replications of four hens each. Averages were tested through Tukey's method⁽¹⁹⁾.

Phytase, when added as a diet ingredient, contributed approximately 0.3 % of Ca and 0.1 % of P (Table 2), which indicates that hens which eat 3.7 % of Ca and 0.3 % of available P (PD) and phytase, showed a similar response than those which were fed with a diet containing 4 % Ca and 0.4 % PD, showing no differences in productive variables, which is consistent with what is expressed by other researchers^(20,21,22), who didn't observe any difference between diets with low level P content supplemented with phytase and diets having an optimum PD content. This helps to confirm phytase's

el metabolismo del N y la utilización de la proteína. El ácido fítico tiende a unirse a la amilasa o al ión Ca, que es necesario para la actividad de la amilasa; al hidrolizarse el ácido fítico, se libera el Ca y junto con éste la amilasa o el almidón que puedan estar ligados al P fítico, lo que incrementaría el metabolismo de los nutrientes energéticos. Por otro lado, al mejorar la utilización de la proteína, se mejora su digestibilidad, lo que se asocia con un incremento en la secreción de la albúmina^(23,26). Este incremento en la secreción de albúmina parece estar asociado a un incremento en el peso del huevo⁽²³⁾; y un incremento en la secreción de la albúmina tiende a ser el resultado de mejorar la digestibilidad de la proteína, y por consiguiente la disponibilidad de aminoácidos⁽²⁶⁾. El AC probablemente mejoró la utilización de la proteína y esta correlación alta entre el peso del huevo y la secreción de la albúmina debe ser considerado en estudios futuros.

Una mejor utilización de la proteína con la adición de AC, se debe a que se genera una mayor conversión de pepsinógeno a pepsina, promoviendo una mayor actividad de la pepsina⁽²⁷⁾. Asimismo, el AC mejora la utilización de la proteína al mejorar la actividad de ciertas enzimas, incrementando la digestibilidad de ésta^(9,13).

Para el consumo de alimento, el efecto del AC al 2 % fue significativo (Cuadro 2) y se manifestó en una disminución en el consumo ($P < 0.05$), lo cual no ocurrió en las aves alimentadas con 0 % de AC, consecuencia de una menor gustocidad de las dietas suplementadas con 2 % de AC, coincidiendo con otros estudios⁽¹³⁾, donde al suplementar dietas para cerdos con 2 % de AC, el consumo se redujo, sin embargo la tasa de crecimiento y la conversión alimenticia se mejoró. La conversión, calidad del huevo y masa de huevo no fueron significativas con la adición de fitasa y AC. En la calidad del huevo otros estudios⁽²⁸⁾ encontraron un incremento en la altura de la albúmina en aves suplementadas con 0.20 % de P disponible y fitasa, aunque el efecto de la dieta parece no estar asociada a una mejora en la calidad del huevo⁽²⁹⁾.

Los resultados en la excreción de N muestran el efecto del AC en el primer muestreo de reducir

hydrolysis of phytates, thereby increasing P and Ca availability.

Phytase and citric acid interaction was reflected in egg weight ($P < 0.05$), being highest at the highest levels for both factors (Table 2). When AC was absent in the diet, egg weight decreased. Phytase's effect on the diet was similar to what is shown in another study⁽²¹⁾, in which 30 to 66 week old hens were used, and different to what happened with younger hens (32 to 54 weeks). Other researchers⁽²⁰⁾ have found that hens fed with phytase and 0.1 % PD showed a 2.2 g egg weight increase against a 1 g increase for those which weren't given phytase. This increase in egg weight is related to phytase supplementation in diets showing a PD deficiency.

Other researchers⁽²³⁾ have found that for 2.8 Mcal kg^{-1} of metabolic energy and 11 % protein content diets, egg weight decreased. However, for diets with the same protein level and 3.3 Mcal kg^{-1} EM, egg weight showed an increase. Several studies have shown that phytase^(7,24) and citric acid^(8,9) increase energy use, improve starch digestibility and increase N metabolism and protein use. Phytic acid has a tendency to link to amylase or to Ca, which is necessary for its activity. When phytic acid is hydrolyzed, Ca is freed as well as amylase or starch which can be linked to phytic P, resulting in an increase of the metabolism of energy nutrients. On the other hand, when protein use shows an improvement, its digestibility also is increased, which can be associated to an increase of albumin secretion^(23,26). This increase can be related to an increase in egg weight⁽²³⁾, and an increase in albumin secretion can be a result of improved protein digestibility, and in consequence of amino-acid availability⁽²⁶⁾. Most probably, AC improved protein use and this high correlation between egg weight and albumin secretion should be taken into account in future studies.

The reason why protein is better used when citric acid is added is due to the fact that more pepsinogen is converted to pepsin, promoting a higher pepsin activity⁽²⁷⁾. Besides, AC improves protein use because it improves the activity of certain enzymes which result in an increase of protein digestibility^(9,13).

($P < 0.05$) el porcentaje de N en las excretas (Cuadro 3). La adición de 0.6 % y 2 % de AC disminuyó el pH de las dietas de 5.3 a 4.6 y 4.0 respectivamente; por lo que se puede suponer que el pH gástrico haya mantenido un nivel de acidez bajo en las dietas suplementadas con AC; al haber una mayor acidez se generó una mayor conversión de pepsinógeno a pepsina, lo que incrementó la actividad de la pepsina y mejoró la digestibilidad de la proteína⁽²⁷⁾.

La suplementación de la fitasa en la dieta no tuvo efectos en la excreción de N ($P > 0.05$); resultados similares fueron encontrados por otros autores^(21,29); sin embargo en otros estudios suplementando fitasa se mejora la digestibilidad del N y aminoácidos, al producir la hidrólisis del fitato unido a la proteína, aminoácido y/o enzimas proteolíticas^(5,7,24).

En la excreción de P, en el primer muestreo el efecto de la fitasa y AC fue significativo (Cuadro 3), debido a una reducción, que se vio aún más

For feed intake, the effect of 2% AC was significant (Table 2) which showed a decrease in intake ($P < 0.05$), which was not the case with hens fed with 0 % AC, as a consequence of less flavor in 2 % AC diets, in coincidence with other studies related to hogs⁽¹³⁾, in which diets which were supplemented with 2 % AC showed a decrease in intake, but also an increase in growth rate and in feed conversion. Changes in egg mass, feed conversion and egg quality were not significant when phytase and AC were added. In other studies⁽²⁸⁾, egg quality and albumin height increase were found for hens supplemented with 0.20 % available P and phytase, although there seems to be no linkage between diet and egg quality improvement⁽²⁹⁾.

Results for N excretion show the effect of AC (a reduction) in the first sampling ($P < 0.05$) (Table 3). Addition of 0.6 and 2.0 % AC reduced diet pH from 5.3 to 4.6 and 4.0 respectively, which leads us to suppose that gastric pH must have stayed in a low acidity level for diets supplemented with AC.

Cuadro 3. Contenido de nitrógeno y fósforo en las excretas de gallinas suplementadas con ácido cítrico y fitasa (g/ave/día)

Table 3. Nitrogen and phosphorous contents in excreta of hens supplemented with citric acid (CA) and phytase (g/hen/day)

Variable	Sampling			
	First		Second	
	N	P	N	P
CA (%)				
0.0	0.92 a	0.29 a	0.83	0.32
0.6	0.76 b	0.24 ab	0.80	0.24
2.0	0.78 b	0.19 b	0.74	0.29
Phytase (U/kg)				
0	0.80	0.28 a	0.82	0.29
600	0.85	0.20 b	0.76	0.27
CA x Phytase				
0 0.0	0.91 ab	0.34 b	0.88	0.34
0.0 600	0.93 a	0.23 ab	0.77	0.30
0.6 0.0	0.74 ab	0.25 ab	0.76	0.24
0.6 600	0.79 ab	0.24 ab	0.84	0.25
2.0 0.0	0.74 b	0.25 ab	0.82	0.36
2.0 600	0.82 ab	0.13 a	0.65	0.22
SE	0.044	0.034	0.059	0.034

a,b Means showing different literals in columns indicate differences ($P < 0.05$).

SE= Standard error.

marcada al suplementar el nivel más alto de AC (2 %). Estos resultados confirman otros reportes^(20,29,30) en cuanto a una disminución de P en las excretas. El AC redujo la excreción de P ($P < 0.05$), así otros estudios⁽²⁵⁾ sustentan que el AC es capaz de lograr la desfosforilación de las dietas; esta acidificación de las dietas incrementa la solubilidad del fitato, haciendo disponible una mayor cantidad de nutrientes. Es importante señalar que el Ca juega un rol importante en la disponibilidad de P y en la actividad de la fitasa. El ácido fítico, tiene afinidad por algunos cationes como el Ca; un mol de ácido fítico puede unirse a 3 ó 6 moles de Ca, formando sales de fitatos de Ca que son insolubles bajo el pH intestinal, haciendo indisponibles el Ca y el P a la acción de la fitasa⁽³¹⁾. Es posible que al añadir AC en las dietas, el pH intestinal haya disminuido, lo que favorece la solubilidad de estas sales, incrementando la acción de la fitasa. Asimismo, el Ca excedente presente en la dieta puede formar complejos insolubles con el ácido fítico, escapando a la acción de la fitasa. El AC puede haber favorecido la absorción de Ca, debido a la formación de un complejo cálcico soluble en el intestino⁽³²⁾, favoreciendo la absorción de Ca, así las sales de fitato de calcio no se pudieron haber formado.

En el segundo muestreo, no existieron diferencias significativas en la excreción de N y P con los niveles de AC y fitasa, aunque su tendencia es similar a la del primer muestreo. Esta diferencia en los resultados de ambos muestreos, resalta la necesidad de utilizar un mayor número de repeticiones por tratamiento, haciendo más sensible la prueba de comparación de medias para detectar diferencias y concluir claramente sobre la bondad de los tratamientos empleados.

En el contenido del huevo, el P no fue influenciado por la fitasa ni por el AC durante el primer muestreo (Cuadro 4). En el segundo muestreo el efecto del AC fue significativo, debido a un mayor contenido de P en el huevo ($P < 0.05$), lo que indica un mejor aprovechamiento de este elemento en el organismo del ave; la excreción de P para el nivel de 2 % fue la más baja, lo que ocasiona una mayor retención y disponibilidad por parte del ave. Para el contenido

In the presence of more acidity, a higher conversion from pepsinogen to pepsin takes place, which increases pepsin activity and improves protein digestibility⁽²⁷⁾.

Supplementation with phytase had no effect on N excretion ($P > 0.05$), which coincides with other authors^(21,29). However, other studies^(5,7,24) show that phytase supplementation improves N and amino-acid digestibility, because phytates linked to proteins, amino-acids and/or proteolytic enzymes are hydrolyzed.

Relative to P excretion, phytase effect in the first sampling was significant (Table 3). This is due to a decrease, which was sharper with the highest levels of AC (2 %). These results confirm other reports^(20,29,30) relative to P decrease in excreta. AC decreased P excretion ($P < 0.05$), and other studies⁽²⁵⁾ affirm that AC is capable of diet dephosphorilization. This acidification increases phytate solubility, therefore increasing nutrient availability. It is important to note that Ca plays an important role in P availability and in Phytase activity⁽³¹⁾. Phytic acid shows affinity for certain cations like Ca, a phytic acid mol can fix itself to 3 or 6 Ca mols, to form Ca phytates which are insoluble at intestinal pH, therefore making Ca and P unavailable to phytase activity⁽³¹⁾. It is possible that when AC is added to food intake, pH in the intestine decreases, which favors solubility. Moreover, an excess of Ca can form insoluble complexes with phytic acid, thus escaping phytase activity. AC can help Ca absorption, owing to the creation of a soluble calcium complex in the intestine⁽³²⁾, thus helping Ca absorption, as Ca phytates were unable to develop.

In the second sampling, no significant differences in N and P excretion arose, in diverse AC and phytase levels, although the trend is similar to that of the first sampling. These differences in results between both samplings, reinforces the need to use more replications per treatment, to achieve a higher sensitivity in average comparison tests to detect differences and reach conclusions on the advantages of the treatments being applied.

Cuadro 4. Contenido de fósforo y calcio en el huevo deshidratado, de gallinas suplementadas con ácido cítrico y fitasa (g/ave/día)

Table 4. Phosphorous and calcium content in dehydrated eggs produced by hens supplemented with citric acid (CA) and phytase (g/hen/day)

Variable	Sampling			
	First		Second	
	P	Ca	P	Ca
CA (%)				
0.0	0.108	0.045	0.102 ^a	0.046
0.6	0.112	0.052	0.107 ^{ab}	0.048
2.0	0.111	0.049	0.115 ^b	0.050
Phytase (U/kg)				
0	0.108	0.045 ^a	0.109	0.050
600	0.112	0.052 ^b	0.108	0.046
CA x phytase				
0 0.0	0.104	0.043	0.101	0.048
0.0 600	0.113	0.049	0.102	0.043
0.6 0.0	0.114	0.050	0.113	0.051
0.6 600	0.110	0.056	0.103	0.046
2.0 0.0	0.109	0.047	0.114	0.052
2.0 600	0.113	0.052	0.118	0.050
SE	0.0061	0.0028	0.0043	0.0022

ab Means showing different literals in columns indicate differences ($P < 0.05$).

SE= Standard error.

de Ca, el efecto principal de la fitasa y AC fue significativo, debido a un incremento en el contenido de Ca en el huevo, lo que hace suponer que tanto la fitasa como el AC, mejoran la disponibilidad de Ca e incrementan el metabolismo de éste^(25,30,33).

El efecto de la fitasa en el primer muestreo (Cuadro 5), ocasionó una reducción en el contenido de P en el cascarón del huevo ($P < 0.05$), y el Ca se redujo significativamente; estos datos son similares a los de otros autores^(21,29), quienes encontraron una baja calidad en el cascarón del huevo en aves alimentadas con dietas conteniendo fitasa. En un estudio con diferentes niveles de Ca y P sobre la calidad del cascarón del huevo⁽³⁴⁾ se observó que su calidad disminuía al incrementarse la disponibilidad de P. En el presente estudio el porcentaje de P en las excretas se vio disminuido, lo que indica una mayor retención de éste, y una mayor disponibilidad de P, lo que posiblemente esté

Relative to egg contents, P wasn't influenced neither by phytase nor by AC in the first sampling (Table 4). In the second sampling, AC effect was significant, owing to a higher P content in egg ($P < 0.05$), which indicates a better use of this element in a hen's body, P excretion at the 2% level was the lowest, which originates a higher retention and availability. Relative to Ca content, the main effect for phytase and AC was significant due to an increase in Ca content in eggs, which leads us to infer that AC and phytase, improve Ca availability and increase its metabolism^(25,30,33).

Phytase action in the first sampling (Table 5) produced a decrease of P in eggshells ($P < 0.05$), and Ca decreased significantly also. These data agree with those of other authors^(21,29), who found low quality in eggshells produced by hens which were fed with diets which included phytase. In a study on eggshell quality relative to P and Ca

Cuadro 5. Contenido de fósforo y calcio en el cascarón del huevo, de gallinas suplementadas con ácido cítrico y fitasa (g/ave/día)

Table 5. Phosphorous and calcium content in eggshell, by hens supplemented with citric acid (CA) and phytase (g/hen/day)

Variable	Sampling			
	First		Second	
	P	Ca	P	Ca
CA (%)				
0.0	0.0055	1.93	0.0057	1.70 ^a
0.6	0.0052	1.93	0.0057	2.02 ^b
2.0	0.0061	1.98	0.0052	2.10 ^b
Phytase (U/kg)				
0	0.0060 ^a	2.10 ^a	0.0054	1.93
600	0.0053 ^b	1.81 ^b	0.0056	1.97
CA x phytase				
0.0 0.0	0.0062	2.09	0.0040	1.68
0.0 600	0.0051	1.82	0.0054	1.69
0.6 0.0	0.0057	2.09	0.0059	2.13
0.6 600	0.0047	1.75	0.0056	1.93
2.0 0.0	0.0062	2.11	0.0054	1.94
2.0 600	0.0060	1.85	0.0060	2.22
SE	0.00037	0.084	0.00075	0.116

a,b Averages showing different literals in columns indicate differences ($P < 0.05$).

SE= Standard error.

interfiriendo con el metabolismo de Ca, así altos niveles de P en el suero sanguíneo están asociados con cascarones de poca calidad; las causas no son del todo claras, pero pueden atribuirse a que el ión P en el suero inhibe la precipitación del ión Ca, y en niveles altos el ión fosfato compite con el ión carbonato por el Ca, inhibiendo la formación y crecimiento de los cristales de calcita⁽³⁵⁾, que es lo que provocaría bajos niveles de Ca y por consiguiente una baja calidad en la cáscara del huevo.

En el segundo muestreo el efecto del AC fue significativo debido a un incremento en el contenido de Ca, esto confirma lo mencionado por otros autores^(9,25,32), quienes encontraron una mejor absorción de Ca en dietas suplementadas con AC.

Se puede concluir que el comportamiento productivo de las aves no se afecta negativamente en dietas con reducción de fuentes de P inorgánico suple-

ments⁽³⁴⁾, quality decreased when available P increased. In the current study P in excreta decreased, which indicates higher retention and P availability, which possibly interferes with Ca metabolism. Like this, high P levels in blood serum are linked to low quality eggshells, and the cause for this is not well known yet, but can be attributed to ion P inhibiting Ca precipitation and at high levels a competition between phosphates and carbonates for Ca can take place, inhibiting calcite crystal creation and growth⁽³⁵⁾, which in turn could be the cause for a low Ca level and therefore for low eggshell quality.

In the second sampling, AC effect was significant owing to a Ca content increase. This confirms what was mentioned by other authors^(9,25,32), who found a higher Ca absorption in diets supplemented with AC.

It can be concluded that productive behavior is not affected with diets containing low levels of inorganic

mentadas con fitasa; la adición de AC reduce la excreción de N y en conjunto con la fitasa reduce la excreción de P, logrando sobrepasar al testigo en más del 50 % (0.34 vs 0.13 g.gallina⁻¹.día⁻¹); el AC incrementa el P en el contenido del huevo y el Ca en el cascarón y la adición de fitasa reduce el Ca en el cascarón.

P when supplemented with phytase, and that when AC is added, N excretion is reduced and when added in conjunction with phytase, P excretion is reduced, exceeding control's values by more than 50 % (0.34 g.hen⁻¹.day⁻¹ against 0.13 g.hen⁻¹.day⁻¹). AC increases P content in eggs and that of Ca in eggshells while phytase decreases Ca content in eggshells.

End of english version

LITERATURA CITADA

- Nelson TS. The hydrolisis of phytate phosphorus by chicks and laying hens. *Poul Sci* 1976;55:2262-2264.
- Denbow DM, Ranvindram V, Kornegay ET, Hulet RM. Improving phosphorus availability in soybean meal for broilers by supplemental phytase. *Poul Sci* 1995;74:1831-1837.
- Van Der Klis JD, Versteegh HA, Simons PC, Kies KA. The efficacy of phytase in corn-soybean meal-based diets for laying hens. *Poul Sci* 1997;76:1535-1542.
- Nampkung H, Leeson S. Effect of phytase enzyme on dietary nitrogen-corrected apparent metabolizable energy and the ileal digestibility of nitrogen and amino acids in broiler chicks. *Poul Sci* 1999;78:1317-1319.
- Biehl RR, Baker DH. Microbial phytase improve amino acids utilization in young chicks fed diets based on soybean meal but not diets based on peanut meal. *Poul Sci* 1997;76:355-360.
- Zhang H, Roland DA, McDaniel GR, Rao SK. Effect of Natuphos phytase supplementation to feed on performance and ileal digestibility of protein and Amino Acids of broiler. *Poul Sci* 1999;78:1567-1572.
- Ranvindram V, Cabahug S, Ranvindram G, Bryden LW. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. *Poul Sci* 1999;78:699-706.
- Zyla K, Ledoux DR, Veum TL. Complete enzymic dephosphorylation of corn-soybean meal feed under simulated intestinal conditions of the turkey. *J Agric Food Chem* 1995;43:288-294.
- Gentesse N, Bernier JF, Lefrancois MR. Effect of dietary citric acid on diet metabolizability, blood acid-base balance and abdominal fat deposition in broilers. *Poul Sci* 1994;73(Suppl 1):34.
- Simmons PC, Versteegh HAJ, Jongbloed AW, Kemme PA, Slump P, Bos, KB, Wolters MGE, Beudeker RF, Verschoor GJ. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broiler and pigs. *Br J Nutr* 1990;64:525-540.
- Yi Z, Kornegay E, Ranvindram V, Denbow DM. Improving phytate phosphorus availability in corn and soybean meal for broiler using microbial phytase and calculation of phosphorus equivalency values for phytase. *Poul Sci* 1996;75:240-249.
- Farner D. The Hydrogen ion concentration in avian digestive tracts. *Poul Sci* 1942;21:445-450.
- Falkowski JF, Aherne FX. Fumaric and citric acid as feed additives in starter pig nutrition. *J Anim Sci* 1984;58:935.
- Pileggi VJ, De Luca HF, Cramer W, Steenbock H. Citrate in the prevention of rickets in rats. *Arch Biochem Biophys* 1956;60:52-57.
- NRC. Nutrient requeriments of poultry. 9^{na} Rev ed. Washington, DC: National Academy Press; 1994.
- AOAC. Association of official analytical chemist. Official methods of analysis. 15th ed. Arllington. V.A. Association of analytical chemist. 1990.
- Parr J. Formulating layer diets with Natuphos phytase. Phosphorus and calcium management in layers. BASF technical Symposium. 1996
- Elsen EJ, Bohren BB, McKean HE. The haugh unit as a measure of egg albumen quality. *Poul Sci* 1992;41:1462-1468.
- Steel RG, Torrie JH. Bioestadística, principios y procedimientos. México: McGraw Hill; 1988.
- Gordon RW, Roland DA. Perfomance of comercial laying hens fed various phosphorus levels, with and without supplemental phytase. *Poul Sci* 1997;76:1172-1177.
- Keshavarz K. Nonphytate phosphorus requirement of laying hens with and without phytase on a phase feeding program. *Poul Sci* 2000;79:748-763.
- Boling SD, Douglas MW, Jhonson ML, Wang X, Parsons CM, Koelkebeck KW, Zimmermant RA. The effects of dietary available phosphorus levels and phytase on performance of young and older laying hens. *Poul Sci* 2000;79:224-230.
- Roland DA. Eggs shell quality.1. Effect of dietary manipulations of protein, amino acids, energy, and calcium in aged hens on egg weight, shell weight, shell quality, and egg production. *Poul Sci* 1980;59:2038-2046.
- Yi Z, Kornegay ET, Denbow DM. Effect of microbial phytase on nitrogen and amino acid digestibility and nitrogen retention of Turkey Poult fed corn-soybean meal diets. *Poul Sci* 1996;75:979-990.
- Zyla K, Koreleski J, Swiat K, Wikiera A, Kujawski M, Pironen J, Ledoux DR. Effects of phospholytic and cell wall- degrading enzymes on the performance of growing broilers fed wheat based diets containing different calcium levels. *Poul Sci* 2000;79:66-76.
- Jaroni D, Scheideler S, Beck M, Wyatt C. The effect of dietarywheat middlings and enzyme supplementation. 1. Late egg production efficiency, egg yields, and egg composition in two strains of leghorn hens. *Poul Sci* 1999;78:841-847.
- Chapman DJ. Probiotics, acidifiers an yeast culture. A place for natural additives in pig and poultry production. Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's Fourth Annual Symposium. 1988.

28. Scott TA, Kampen R, Silversides FG. The effect of phosphorus, phytase enzyme, and calcium on the performance of layers fed corn-based diets. *Poul Sci* 1999;78:1742-1749.
29. Um JS, Paik IK. Effects of microbial phytase supplementation on egg production, egg shell quality and mineral retention of laying hens fed different levels of phosphorus. *Poul Sci* 1999;78:75-79.
30. Biehl RR, Baker DM, De Luca MF. 1 α - hidroxilated cholecalciferol compound act additively with microbial phytase to improve phosphorus, zinc and manganese. Utilization in chicks fed soy-based diets. *J Nutr* 1995;125:2407-2411.
31. Kornegay ET, Denbow DM, Yi Z, Ranvindram V. Response of broiler to graded levels of microbial phytase added to maize-soybean meal-based diets containing three levels of nonphytate phosphorus. *Br J Nutr* 1996;75:839-852.
32. Stevenson DE, Wilson AA. *Alteraciones metabólicas de los animales domésticos*. 1^a ed. Zaragoza: Acribia; 1966.
33. Perney KM, Cantor AH, Straw LM, Herkelman KL. The effect of dietary phytase on growth performance and phosphorus utilization of broiler chicks. *Poul Sci* 1993;72:2106-2114.
34. Ousterhout LE. Effects of calcium and phosphorus levels on egg weight and egg shell quality in laying hens. *Poul Sci* 1980;59:1480-1484.
35. De Blas C, Mateos GG. *Nutrición y alimentación de gallinas ponedoras*. 1^a ed. España: Aedos; 1991.