

# Efecto de la suplementación con fitasa sobre la hidrólisis in vitro de la proteína en trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)

A. Barros, F. J. Alarcón, F. J. Moyano y T. F. Martínez

Departamento de Biología Aplicada. Área de Biología Animal. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Almería. Edificio Científico Técnico II-B. E-04120 La Cañada (Almería), España. Correo electrónico: faltarcon@ual.es

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

## RESUMEN

En este trabajo se evaluó el efecto de la suplementación con 4 niveles de fitasa (0, 2 000, 4 000 y 6 000 FTU/kg) en un pienso experimental y sobre una harina vegetal, evaluando la hidrólisis in vitro de la proteína por pH-stat con extractos enzimáticos de trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Además, se evaluó el efecto que ejerce la adición de ácido fítico sobre la digestibilidad de una harina de pescado. Se observó que, para el pienso experimental, el mayor grado de hidrólisis se obtiene cuando la inclusión de fitasa es de 4 000 FTU/kg, disminuyendo ligeramente cuando la inclusión es de 6 000 FTU/kg. En cambio, se observó una disminución de la hidrólisis proteica a medida que se incrementaba el porcentaje de ácido fítico en la mezcla de reacción in vitro.

**Palabras clave:** Ácido fítico, digestibilidad in vitro, eutrofización, proteína vegetal.

## ABSTRACT

**Effect of phytase supplements on in vitro hydrolysis of proteins by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)**

*The present paper evaluates the impact on plant meal and on an experimental feed product of supplementing them with four levels of phytase (0, 2 000, 4 000 and 6 000 FTU/kg), by assessing in vitro hydrolysis of protein in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) using a pH-stat system. The effect on fish meal's digestibility of adding phytic acid was also evaluated. The highest degree of hydrolysis (DH) was obtained when phytase was added at 4 000 FTU/kg. The experimental diet's DH diminished when phytase was added at 6 000 FTU/kg. However, protein hydrolysis dropped as the percentage of phytic acid in the in vitro reaction mixture increased.*

**Keywords:** Phytic acid, in vitro digestibility, eutrophization, plant protein.

## INTRODUCCIÓN

Debido a las limitaciones en el suministro de harinas de pescado, en los últimos años se están dedicando importantes esfuerzos de investigación para sustituir este ingrediente proteico por proteínas al-

ternativas de origen vegetal. A pesar de su disponibilidad y buen precio, la inclusión de proteínas vegetales en piensos para acuicultura tiene ciertas limitaciones, entre ellas, la presencia de factores antinutricionales. Las semillas de leguminosas y cereales ampliamente empleadas como fuente protei-

ca alternativa contienen altas concentraciones de fósforo en forma de fitato (no aprovechado por animales monogástricos) llegando a constituir hasta 2/3 del fósforo total en las semillas (Pointillart, 1994). La presencia de esta forma biológicamente inasequible de fósforo determina una importante eliminación al medio de dicho elemento por las heces, lo que contribuye a la eutrofización (Persson, 1991).

Además del problema medioambiental derivado de ello, el ácido fítico ejerce efectos antinutricionales reduciendo la disponibilidad de algunos minerales esenciales (Ca, Zn) y también de proteínas, con las que forma complejos proteína-metal-fitatos que resultan insolubles y reducen la digestibilidad de este nutriente (Ravindran *et al.*, 1994; Maenz, Engle-Schann y Classen, 1999). Se ha demostrado que la adición de fitasas a piensos para peces que incluyen harinas vegetales aumenta el aprovechamiento del P-fítico, reduce la complementación de los piensos con fosfato mineral y disminuye la eutrofización del agua de cultivo, pero no se ha comprobado su efecto sobre la digestibilidad de la proteína. El objetivo del presente trabajo es determinar si la presencia de ácido fítico afecta a la hidrólisis in vitro de una proteína y, por otra parte, si es posible modificar la digestibilidad de las proteínas bajo tales condiciones al emplear una fitasa comercial.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Preparación de los extractos enzimáticos

Los estómagos e intestinos de trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) fueron homogeneizados en agua destilada a 4°C. Los extractos obtenidos se centrifugaron durante 15 min a 12 000 rpm y 4°C; el sobrenadante se guardó a -20°C hasta su posterior utilización. La actividad proteasa ácida y alcalina de dichos extractos se evaluó por el método descrito por Anson (1983) y Walter (1984), respectivamente.

### Ensayos de digestibilidad in vitro

Los ensayos se llevaron a cabo utilizando un dispositivo para evaluar la digestibilidad in vitro de proteínas por enzimas de peces, cuya utilidad ya ha

sido ampliamente contrastada. El dispositivo se basa en una titración controlada y automática (736 STAT TITRINO; Metrohm, Herisau, Suiza) realizada en dos etapas (ácida y alcalina) y basada en el principio de pH-stat (Perdersen y Eggum, 1983), respectivamente. El grado de hidrólisis (GH) de las proteínas del ensayo se determinó siguiendo una modificación de la metodología descrita por Alarcón, Díaz y Moyano (2001). La suspensión de la proteína (8 mg/ml) se ajustó a pH 3,5 y 37°C antes de adicionar 1 000 unidades de extracto estomacal. Después de la etapa ácida la mezcla se ajustó a pH 8,0 y se añadieron 200 unidades de extracto intestinal.

### Efecto de la adición de ácido fítico sobre el grado de hidrólisis de la proteína de harina de pescado

Utilizando el dispositivo anterior, se evaluó el efecto de la adición de ácido fítico comercial en proporciones del 5 o del 10 % sobre la hidrólisis de la proteína de una harina de pescado.

### Efecto de la adición de fitasa sobre el grado de hidrólisis de proteínas

Utilizando el dispositivo anterior, se evaluó el efecto sobre la digestibilidad in vitro de la proteína de un pienso y una harina de soja, a las que se les incluyó enzima fitasa (Natuphos, 47 000 FTU/kg) a cuatro

Tabla I. Composición del pienso experimental (g/kg).

Ingredientes	
Harina de pescado	45,0
Harina de soja	415,0
Harina de gluten de maíz	250,0
Harina de trigo	157,5
Harina de canola	75,0
Aceite de pescado	97,5
Alginato	5,0
Celulosa	5,0
Metionina	2,0
Lisina	1,0
Vitaminas/minerales	40,0
Proteína	415,5
Grasa	124,0
Fósforo total	6,7
Fósforo fítico	3,8
Fósforo no fítico	2,9

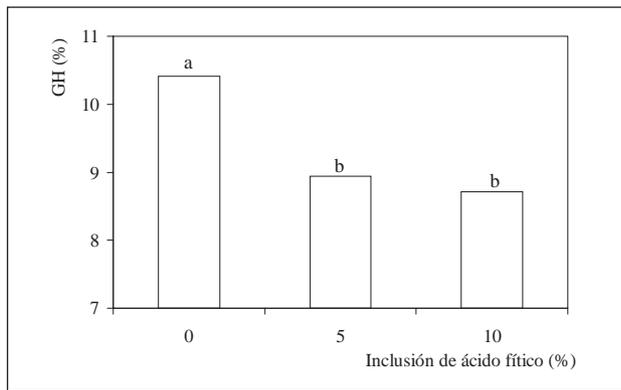


Figura 1: Efecto de la adición de ácido fítico sobre la hidrólisis *in vitro* de la proteína de la harina de pescado. (a, b): los tratamientos que tienen la misma letra no son significativamente diferentes.

concentraciones: 0, 2000, 4000 y 6000 unidades de fitasa (FTU) por kg de pienso. En la tabla I se ilustra la composición base del pienso. La concentración de P-total fue óptima y alrededor del 57 % del P-total está bajo la forma de P-fítico.

### Estadística

La comparación de medias se realizó mediante el paquete estadístico CSS-Statistica (Statsoft Co. Tulsa OK), previo Anova seguido de un test de Tukey.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra el efecto del ácido fítico sobre la hidrólisis de la proteína de la harina de pes-

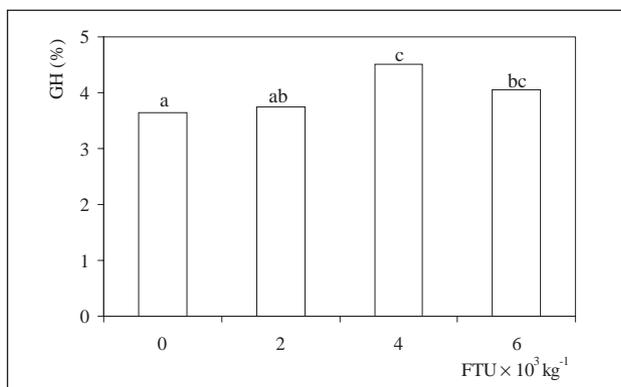


Figura 2: Efecto de la suplementación con fitasa sobre la hidrólisis *in vitro* de la proteína del pienso experimental. (a, b, c): los tratamientos que tienen la misma letra no son significativamente diferentes.

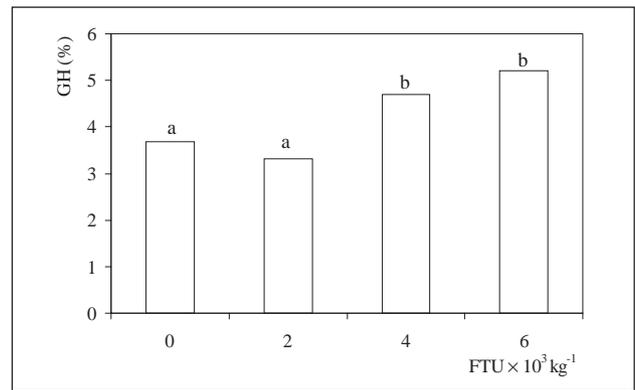


Figura 3: Efecto de la suplementación con fitasa sobre la hidrólisis *in vitro* de la proteína de la harina de soja. (a, b): los tratamientos que tienen la misma letra no son significativamente diferentes.

cado. Se observó una clara disminución de la hidrólisis proteica, que se vio reducida en un 15 % respecto al control. Por otra parte, los resultados mostrados en la figura 2 confirman que la hidrólisis enzimática (expresada como porcentaje GH) de las proteínas contenidas en el pienso ensayado se incrementa por la adición de la enzima fitasa. De los distintos niveles de inclusión de fitasa para una misma fórmula, el mejor resultado se encontró cuando ésta se añadió a razón de 4000 FTU por kg de dieta (un incremento de GH del 24 % respecto al control, sin fitasa). El mismo resultado se encontró cuando se evaluó una harina de soja (figura 3). Se ha demostrado la influencia del ácido fítico en la pérdida de solubilidad de las proteínas, ya que por debajo del punto isoelectrico de muchas proteínas se forman complejos insolubles fitato-metal-proteína, que reducen su digestibilidad y la absorción de minerales (Ca, Mg, Fe y Zn) en el tracto intestinal de animales y humanos (Reddy *et al.*, 1989). El ácido fítico, a niveles que representan tan sólo un 0,5 % del alimento, puede influir en la eficiencia de la digestión de la proteína y, por tanto, en la utilización global del alimento por la trucha arcoiris (Maga, 1982). Los resultados de este autor se confirmaron *in vitro*, y se demostró que los complejos entre el ácido fítico y la caseína sólo eran parcialmente hidrolizados por pepsina. También se ha demostrado que el ácido fítico afecta la activación de tripsinógenos y la estabilidad de tripsina (Caldwell, 1992). Teniendo en cuenta todo lo anterior, así como trabajos que han demostrado que el tratamiento con fitasa aumenta tanto la digestibilidad de la proteína como la retención de nitrógeno en piensos a base de concentrado de soja

(Storebakken, Shearer y Roem, 1998), cabe pensar que la adición de la enzima fitasa puede favorecer un aumento de la biodisponibilidad de la proteína, haciéndola más accesible a la acción de las enzimas digestivas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, F. J., M. Díaz y F. J. Moyano. 2001. Optimización del sistema de pH-stat para la evaluación in vitro de la digestibilidad de la proteína en piensos para peces. *Ser. Inst. Canario Cienc. Mar.* 4: 346-351.
- Anson, M. L. 1983. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology* 22: 79-89.
- Caldwell, R. A. 1992. Effect of calcium and phytic acid on the activation of trypsinogen and the stability of trypsin. *J. Agric. Food Chem.* 40: 43-47.
- Maenz, D. D., C. M. Engele-Schaan y H. L. Classen. 1999. The effects of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 81: 177-192.
- Maga, J. A., 1982. Phytate: Its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and method of analysis. *J. Agric. Food Chem.* 30 (1): 9-14.
- Pedersen, B. y B. O. Eggum. 1983. Prediction of protein digestibility by an in vitro enzymatic pH-stat procedure. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 49: 265-277.
- Persson, G. 1991. Eutrophication resulting from salmonid fish culture in fresh and salt waters: Scandinavian experience. En: *Nutritional Strategies and Aquaculture Waste: Proceedings of the 1st International Symposium on Nutritional Strategies in Management of Aquaculture Waste Nutritional Strategies and Aquaculture Waste*. C. B. Cowey y C. Y. Cho (eds.): 163-185. Guelph. Ontario, Canadá.
- Pointillart, A. 1994. Phytates, Phytases: leur importance dans l'alimentation des monogastriques. *INRA Prod. Anim.* 7 (1): 29-39.
- Ravindran, V., G. Ravindran y S. Sivalogan. 1994. Total and phytate phosphorus contents of various foods and feedstuffs of plant origin. *Food Chemistry* 50: 133-136.
- Reddy, N. R., M. D. Pierson, S. K. Sathe y D. K. Salunkhe. 1989. *Phytates in cereals and legumes*. CRC Press. Boca Raton, EE UU: 152 pp.
- Storobakken, T., K. D. Shearer y A. J. Roem. 1998. Availability of protein, phosphorus and other elements in fish meal, soy-protein concentrate and phytase-treated soy-protein-concentrate-based diets to Atlantic salmon, (*Salmo salar*). *Aquaculture* 161: 365-379.
- Walter, H. E. 1984. Proteinases: methods with haemoglobin, casein and azocoll as substrates. En: *Methods of Enzymatic Analysis*. H. J. Bergmeyer (ed.): 270-277. Verlag Chemie. Weinham, Alemania.