

B. Alimentación y Nutrición I, II, III

**USO DE MODELOS *IN VITRO* DE DIGESTIÓN DE PECES PARA LA EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES FITASAS SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD DE FÓSFORO PRESENTE EN INGREDIENTES VEGETALES**

Francisca P. Martínez-Antequera<sup>1</sup>, Anaïs Bonnel<sup>2</sup>, Sophie Reys<sup>2</sup>, Pierre Fortin<sup>2</sup> y Francisco Javier Moyano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Biología y Geología. Fac. Ciencias Experimentales. Univ. de Almería. 04120. Almería

<sup>2</sup> Techna France Nutrition. 41 route de St-Etienne-de-Montluc. 44220 Couëron. France

**Resumen**

Una forma útil de evaluar la potencial funcionalidad de las fitasas comerciales bajo las condiciones del digestivo de especies acuáticas es utilizar modelos de simulación digestiva adaptados a la fisiología de especies concretas. El presente estudio ha utilizado un modelo *in vitro* de digestión de lubina para testar la efectividad de 4 fitasas evaluando los cambios en la liberación de fósforo total y fitato solubles a partir de una matriz de ingredientes vegetales. Los resultados evidenciaron diferencias muy significativas en la capacidad de las enzimas para hidrolizar el fitato, con valores que variaban entre el 9% y el 90% de la cantidad inicialmente presente en la muestra, lo que incrementaba la cantidad de fósforo soluble potencialmente biodisponible hasta en un 50% en el mejor de los casos. Se demostró por tanto la utilidad de este enfoque como herramienta analítica aplicable a la selección de la enzima más adecuada según la especie y los ingredientes vegetales a emplear.

**Introducción**

Más del 50% de las reservas de fósforo en las semillas de leguminosas y cereales está presente como fitato, una forma no biodisponible para animales monogástricos, tanto terrestres como acuáticos y altamente reactiva con otros compuestos. El uso creciente de ingredientes vegetales en piensos para acuicultura conlleva una ingesta elevada de fitato que se traduce directa o indirectamente en efectos negativos sobre la utilización de minerales, proteínas y energía por parte de los mismos. El uso de fitasas para hidrolizar el fitato es una práctica rutinaria en la elaboración de piensos para monogástricos terrestres. De esta forma no sólo se incrementa la biodisponibilidad de dicho elemento, sino que se reducen las cantidades necesarias para suplementación y las descargas al medio de fósforo, así como los efectos antinutritivos generados por el fitato a nivel digestivo. Aunque esta práctica se está extendiendo cada vez más en el ámbito de la acuicultura, la evaluación de su potencial aplicación precisa considerar los rasgos peculiares de la fisiología digestiva entre peces. En este sentido, los ensayos de simulación digestiva *in vitro* pueden ser una valiosa herramienta dado que permiten establecer condiciones experimentales estándar que permiten estimar tanto el efecto del proceso digestivo sobre diferentes fitasas como la efectividad de las mismas. En el presente estudio se ha aplicado un modelo de simulación del digestivo de lubina (*Dicentrarchus labrax*) para evaluar la efectividad comparada de 4 fitasas comerciales en la hidrólisis del fitato presente en una matriz vegetal. Los resultados pueden ser utilizados tanto para seleccionar la enzima más adecuada como para optimizar las dosis que maximicen el rendimiento a partir de ingredientes concretos.

**Material y Métodos**

Se preparó una matriz modelo de 2 ingredientes vegetales formada por un 60% de harina de soja y 40% gluten de maíz. Sobre la misma se aplicaron 4 fitasas comerciales, procedentes de distintos fabricantes, las cuales se prepararon en forma líquida para facilitar su dosificación y mezcla con las harinas. Las cantidades utilizadas se calcularon tomando en consideración las indicaciones del proveedor y para garantizar el aporte de una actividad equivalente por kg de dieta.

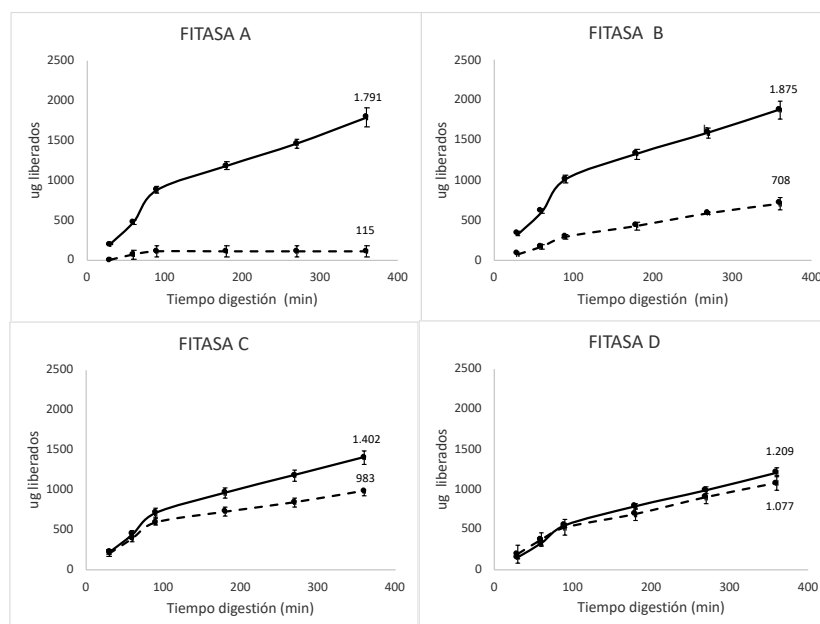
**Tabla 1.** Condiciones utilizadas en el ensayo *in vitro* para las dos etapas de digestión

Temperatura (°C)	25
Cantidad pienso (mg)	700
Etapa ácida	
Extracto enzimático (U proteasa/g pez)	39
pH	4.5
Tiempo (h)	3
Etapa alcalina	
Extracto enzimático (U proteasa/g pez)	27.5
pH	8.2
Tiempo (h)	3

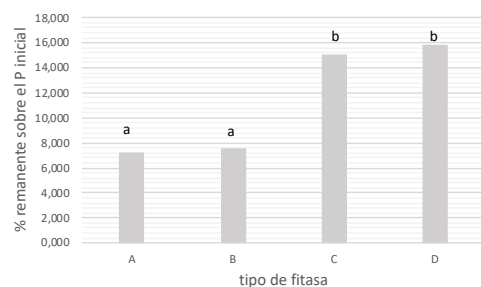
Una vez hechas las mezclas, se almacenaron a -20 °C hasta su empleo en los ensayos de digestión simulada. Estos se llevaron a cabo usando biorreactores de membrana semipermeable los cuales permiten la retirada constante de los productos de hidrólisis generados durante la hidrólisis de los sustratos minimizando las interferencias entre sí. Las condiciones empleadas se basaron en los rasgos de la fisiología digestiva de la lubina (tipo y cantidad de enzimas, pH, duración de la digestión, etc) adaptadas para un individuo de 50 g (Tabla 1). Se midieron tanto las cantidades de fósforo total y fitato solubles liberadas como resultado de la hidrólisis como las remanentes en el residuo final. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

## Resultados y Discusión

La liberación de P total y P fítico a partir de la matriz vegetal resultante de los tratamientos con las diferentes fitasas se detalla en la Figura 1. Se pudo observar que en los casos de las fitasas A y B se obtuvieron elevadas cantidades de P soluble durante la hidrólisis, mientras que las de fitato soluble fueron bajas, lo que sugiere que la hidrólisis de esta molécula fue eficiente y produjo cantidades significativas de P disponible. En cambio, los resultados obtenidos con las fitasas C y D evidenciaron una menor liberación de P soluble que se correspondieron con mayores cantidades de fitato soluble que no fue hidrolizado adecuadamente. Estas diferencias entre ambos grupos de fitasas se correlacionaron claramente con los valores de P total remanentes en la matriz vegetal tras la digestión (Figura 2). Los resultados obtenidos demuestran que las fitasas evaluadas presentaban una efectividad claramente diferente en su capacidad de hidrolizar fitato cuando operaban en las condiciones simuladas del digestivo de lubina, de manera que dos de ellas produjeron cantidades significativamente mayores de P potencialmente biodisponible para absorción intestinal y menor cantidad en el residuo no digerido en comparación con las restantes. Se pone de manifiesto por tanto la idoneidad de los ensayos *in vitro* de simulación digestiva como herramienta para ayudar a la selección de la enzima más adecuada para su potencial inclusión en un pienso comercial de la especie seleccionada.



**Figura 1.** Variaciones en las cantidades de fósforo soluble total (línea sólida) y fitato soluble (línea de puntos) liberadas durante la hidrólisis de la matriz vegetal bajo condiciones simuladas *in vitro* de la digestión de lubina. Las cifras indican las cantidades promedio totales de ambos productos recuperadas al final de la hidrólisis.



**Figura 2.** Cantidades de fósforo total presentes en el residuo no digerido tras la hidrólisis enzimática en las muestras tratadas con las diferentes fitasas.