

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE PARA GALINHAS
POEDEIRAS PÓS PICO DE PRODUÇÃO**

**Felipe de Lima Junqueira Franco Fabbri
Zootecnista**

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE PARA GALINHAS
POEDEIRAS PÓS PICO DE PRODUÇÃO**

Discente: Felipe de Lima Junqueira Franco Fabbri

Orientadora: Profa. Dra. Nilva Kazue Sakomura

Coorientador: Dr. Matheus de Paula Reis

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

2020

F113s

Fabbri, Felipe de Lima Junqueira Franco

Suplementação de fitase para galinhas poedeiras pós pico de produção / Felipe de Lima Junqueira Franco Fabbri. -- Jaboticabal, 2020

67 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Nilva Kazue Sakomura

Coorientador: Matheus de Paula Reis

1. Nutrição animal. 2. Fósforo. 3. Fitase. 4. Galinhas poedeiras. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Esta ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE PARA GALINHAS POEDEIRAS PÓS PICO DE PRODUÇÃO


AUTOR: FELIPE DE LIMA JUNQUEIRA FRANCO FABBRI

ORIENTADORA: NILVA KAZUE SAKOMURA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dra. NILVA KAZUE SAKOMURA
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Dr. GABRIEL DA SILVA VIANA (VIDEOCONFERÊNCIA)
Natural Resources Institute Finland/LUKE / Finlândia


Prof. Dr. JOSÉ OTÁVIO BERTI SORBARA (VIDEOCONFERÊNCIA)
DSM Nutritional Products / São Paulo/SP

Jaboticabal, 31 de agosto de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FELIPE DE LIMA JUNQUEIRA FRANCO FABBRI, filho de Cássio Junqueira Franco Fabbri e Luciana de Lima Junqueira Franco Fabbri, nascido no dia 18 de outubro de 1993 em Bebedouro, São Paulo. Ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, em março de 2012. Em fevereiro de 2018 obteve o título de Zootecnista. Em março de 2018 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Nilva Kazue Sakomura, submetendo-se à defesa da dissertação em março de 2020.

Dedico

A minha família principalmente a minha querida avó, Carmem, por todo suporte e confiança em mim durante todos estes anos. A minha filha e a minha mulher, Manuela e Nicole, por estarem comigo em todos os momentos desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a vida por me proporcionar momentos de crescimento, de realização e principalmente de superação.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Nilva Kazue Sakomura, pela confiança, apoio e dedicação, mesmo nos momentos mais difíceis. Muito obrigado!

A minha avó, Carmem, por estar ao meu lado todos estes anos, mesmo nos seus momentos mais difíceis e sempre estender sua mão quando foi preciso. Aos meus padrinhos, Marcos e Silvia, por todo apoio nestes longos anos que permitiram a realização de um sonho. Ao meu tio, André, que mesmo distante sempre auxiliou como podia e acreditou em mim.

Aos meus pais, Cássio e Luciana, pelo suporte, carinho e por permitirem que eu esteja aqui hoje.

A Nicole, por todo o companheirismo nestes anos, mesmo nos piores momentos, e a nossa filha, Manuela, por encher meus dias de luz e me trazer forças para poder seguir em frente.

A Matheus, Carol e Gabriel, por toda a contribuição e ajuda, nessa jornada acadêmica e, principalmente, em meus momentos pessoais.

A todos os amigos, graduandos, pós-graduandos e funcionários do aviário, em especial Rony, Mirella, Freddy, Jefferson, Palloma, Gabriel (Macaé), Letícia (Pomba), Larissa (Pioia), Rafael (Kuki), Bernardo (Murango), Luis, Thaísa (Lorota), Laura (Buffy), Warley, Vinicius, Matheus (Distritor), Guilherme, Marllon e Heloísa pelo suporte em todas as atividades e paciência e aos funcionários Robson, Izildo e Vicente, pela experiência, amizade e conversas ao longo destes anos.

A DSM pelo apoio financeiro ao estudo e a Letícia Cardoso Bittencourt pelo apoio técnico durante a condução do experimento.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, pela estrutura e acolhimento, sendo minha segunda casa nos últimos oito anos.

A todos aqueles que contribuíram, de todas as formas possíveis e impossíveis, para a obtenção deste título.

SUMÁRIO

SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE PARA GALINHAS POEDEIRAS PÓS-PICO DE PRODUÇÃO.....	X
PHYTASE SUPPLEMENTATION TO LAYING HENS AFTER PRODUCTION PEAK	XI
CAPÍTULO 1. Considerações gerais	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. <i>Metabolismo mineral do fósforo</i>	3
2.2. <i>Impacto ambiental e econômico</i>	4
2.3. <i>Efeito antinutricional do ácido fítico</i>	7
2.4. <i>Enzimas na nutrição animal</i>	11
2.5. <i>Descrição e modo de atuação da fitase</i>	12
2.6. <i>Histidine acid phytase (HAPHy)</i>	13
2.7. <i>β-propeller phytase (BPPHy)</i>	13
2.8. <i>Purple acid phosphatases (PAPhy)</i>	14
2.9. <i>Fatores que afetam a atuação da fitase</i>	14
2.10. <i>Absorção de cálcio para galinhas poedeiras em idade avançada</i>	16
2.11. <i>“Superdose” de fitase na nutrição de aves</i>	17
3. <i>REFERÊNCIAS</i>	19
CAPÍTULO 2. Super dose of Phytase in diet of laying hens after 60 weeks of age	26
SUMMARY	27
DESCRIPTION OF PROBLEM.....	28
MATERIAL AND METHODS	29
<i>Housing and experimental design</i>	30
<i>Experimental diets and enzyme</i>	30
<i>Performance and egg quality</i>	31
<i>Excreta and plasma analysis</i>	33
<i>Statistical analysis</i>	33
RESULTS.....	34
<i>Cycle effects</i>	34
<i>Performance</i>	35
<i>Egg quality</i>	35
<i>Analysis of excreta, egg, and tibia</i>	35
<i>Body composition</i>	36

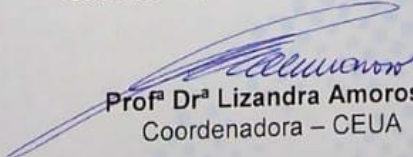
<i>Inositol content on blood</i>	36
DISCUSSION	37
CONCLUSION AND APPLICATIONS	42
REFERENCE	42

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Avaliação de superdose de fitase nos parâmetros produtivos, qualidade de ovos e composição corporal de postura na fase final de produção**", protocolo nº 015173/17, sob a responsabilidade da Profª. Drª. Nilva Kazue Sakomura, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 05 de outubro de 2017.

Vigência do Projeto	17/10/2017 a 16/07/2018
Espécie / Linhagem	<i>Gallus gallus</i> / Hy-line W36
Nº de animais	400
Peso / Idade	~ 1,5 Kg / 60 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	Incubatório Hy line – Rio Claro, SP

Jaboticabal, 05 de outubro de 2017.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE PARA GALINHAS POEDEIRAS PÓS-PICO DE PRODUÇÃO

RESUMO - O fósforo (P) é um mineral fundamental em várias funções metabólicas e fisiológicas. Aves de idade avançada reduzem a capacidade absorptiva de minerais, como cálcio e fósforo, comprometendo a formação da casca e, conseqüentemente, a qualidade dos ovos. A fitase é uma enzima digestiva com sítio ativo que permite a quebra de grupos ortofosfatos do anel de inositol do fitato (IP6), liberando fósforo inorgânico livre (P), ésteres fosfóricos menores e estruturas ligadas a molécula. O uso da enzima fitase em superdoses supostamente é capaz de realizar a quebra total desta molécula no organismo. Nesse contexto, esta dissertação foi realizada com o objetivo de avaliar os efeitos de doses superiores de fitase em galinhas poedeiras pós-pico de produção. Dessa forma, trezentos e sessenta galinhas poedeiras da linhagem Hy-Line W36 foram distribuídas aleatoriamente as 63 semanas de idade em quatro tratamentos. O ensaio teve a duração de dez ciclos de 28 dias. As dietas experimentais foram divididas em: Controle positivo (CP); Controle negativo (NC); CN + 600 FTU; CN + 1200 FTU. O controle negativo foi calculado para conter 0.15% e 0.17% a menos de fósforo disponível e cálcio, respectivamente, em relação ao controle positivo (0.46 e 4.60). Para avaliar os efeitos em diferentes parâmetros das aves foram realizadas análises de produção, qualidade de ovos, composição corporal, composição mineral de ovos, excretas e avaliação de mio-inositol livre em bulbo de pena e plasma sanguíneo. Durante o período analisado, não foram observadas interações entre tratamento e ciclo. A presença de fitase melhorou a conversão alimentar por massa de ovos e, quanto a qualidade dos ovos, os parâmetros de casca foram influenciados. A excreção de fósforo e a quantidade de mio-inositol no plasma mostram que a redução de fósforo no organismo ocorreu e destaca a presença e atuação da fitase. Os níveis de fósforo e cálcio presentes na dieta podem ter atendido aos requerimentos das aves de tal maneira que não foram observadas mais respostas ao efeito da fitase e, em alguns casos, há efeito negativo a presença de uma superdosagem. Atualmente discute-se que a relação cálcio: fósforo é um importante fator a ser levado em consideração para a atuação da fitase e, os níveis presentes neste trabalho poderiam ser inferiores aos apresentados sem causar danos aos animais e para obtenção de maiores efeitos.

Palavras chave: fitato, inositol, enzimas, superdosagem, fósforo, cálcio.

PHYTASE SUPPLEMENTATION TO LAYING HENS AFTER PRODUCTION PEAK

ABSTRACT - Phosphorus (P) plays an essential role in metabolic and physiologic functions. Older hens reduce the absorption of minerals (Al-Batshan, 1994), like calcium and phosphorus, compromising egg shell and egg quality. Mostly phosphorus in vegetal ingredients like corn and soybean meal are linked to the phytate molecule (Ravindran, 1995), an antinutritive component to monogastric diets. Phytase is a digestive enzyme with an active site that broke orthophosphate from the inositol ring of phytate (IP6), releasing inorganic phosphorus (P), lower phosphoric esters and components linked to the phytate molecule. At this point, this dissertation objective was to evaluate the effects of super doses of phytase on post-peak production hens. 360 Hy-line W36 laying hens with 63 weeks of age were randomly distributed in four experimental diets: Positive control (PC); Negative control (NC); NC + 600 FTU; NC + 1200 FTU. The assay was performed for 280 days divided into ten cycles of 28 days. Negative control was calculated to have a reduction of 0.15% and 0.17% of available phosphorus (avP) and calcium (Ca), respectively, compared to positive control (0.46% and 4.60% of avP and Ca, respectively). To evaluate the phytase effects on hen's performance analysis of egg production, egg quality, body composition, mineral composition of eggs and excreta's and evaluation of free myo-inositol on blood plasma and feather bulb were performed. No interactions between treatment and cycles were observed. Phytase addition improved feed conversion ratio by egg mass and, despite egg quality, egg shell parameters were influenced. Phosphorus excretion and plasma myo-inositol shows that phosphorus reduction in hen's organism occurred and highlight phytase presence and operation. Phosphorus and calcium levels on negative control should have attended hen's requirements such an away that there are no responses to phytase effects and, in some cases, there's a negative effect to phytase super doses. Currently discussions in respect that calcium: phosphorus is an important factor to be accounted for phytase acting and, the actual levels in this paper could be lesser than without causing harms to the animals and obtain more phytase effects.

Keywords: phytate, inositol, enzymes, super dose, phosphorus, calcium.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas o setor avícola passou por severas transformações que levaram a um aprimoramento tecnológico da nutrição, genética e manejo. A produção brasileira de ovos segue crescente ao longo da última década (ABPA, 2018; IBGE, 2019), com produção total de 3.596.887 dúzias de ovos contabilizadas no ano de 2018 segundo levantamento do IBGE, recorde histórico na produção de ovos nacional. Este efetivo torna o Brasil uma potência na produção de ovos, ocupando a sétima posição entre os países produtores ao redor do mundo.

Acompanhando as exigências do mercado, a evolução das empresas genéticas e aos melhores índices produtivos, a formulação de dietas balanceadas para atender às exigências nutricionais dos animais de produção é um objetivo comum entre os nutricionistas. Entretanto, o uso de um determinado ingrediente é acompanhado por vantagens e desvantagens, que devem ser conhecidas e exploradas com o intuito de aumentar a rentabilidade da atividade e reduzir o impacto ambiental. Neste contexto, o fósforo (P) é um mineral que participa de funções importantes no metabolismo animal. É constituinte da estrutura óssea, das membranas celulares e está presente no plasma sanguíneo como íon fosfato atuando como agente tamponante. O fósforo, no metabolismo energético, liga-se a molécula de adenosina para formar o trifosfato de adenosina, principal molécula relacionada à transferência de energia entre compostos químicos (Nelson e Cox, 2014).

Como nutriente, o fósforo está presente em ingredientes de origem vegetal, animal e fontes inorgânicas (e. g. farelo de milho; farinha de carne e ossos; fosfato bicálcico, respectivamente). Apesar de sua apresentação em diferentes ingredientes, a maior parte de sua inclusão nas dietas é realizada por fontes inorgânicas. Ingredientes de origem animal possuem altas concentrações de fósforo e cálcio, porém possuem grande variação nutricional (Rostagno *et al.*, 2017) e, atualmente, possuem uma série de restrições à sua utilização por parte

dos maiores importadores mundiais; fatos que limitam seu uso na avicultura moderna.

Aproximadamente 70% do fósforo presente em ingredientes de origem vegetal encontra-se na forma de ácido fítico e têm função na reserva energética e proteção à oxidação dos grãos. Praticamente todo ácido fítico encontra-se como fitato, forma salina do ácido fítico e monogástricos possuem baixa capacidade de absorção ao ácido fítico (Cowieson et al., 2006), tornando o fósforo de ingredientes de origem vegetal pouco disponível, sendo necessário o uso das fontes inorgânicas de fósforo que elevam os custos das rações e, conseqüentemente, da produção. Destaca-se, além da baixa capacidade de absorção do ácido fítico, sua atuação como fator antinutricional em dietas pela conformação de sua molécula e aparecimento de sítios iônicos dentro do trato gastrointestinal (Angel *et al.*, 2002) capazes de ligarem-se a minerais ou aminoácidos diminuindo a absorção destes nutrientes e aumentando as perdas endógenas de aminoácidos (Ravindran *et al.*, 2007; Cowieson *et al.*, 2008).

Em alternativa ao uso de fontes inorgânicas, a utilização da enzima exógena fitase vem sendo uma prática industrial recorrente desde os anos noventa. Seu foco está na hidrólise do fitato presente nas dietas para liberação de fosfato inorgânico, diminuindo os fatores antinutricionais da molécula de fitato e a utilização de fósforo inorgânico nas dietas (Bedford, 2010).

Inúmeros trabalhos confirmam a eficiência da superdose na melhora de diversos parâmetros em animais de produção (Cowieison et al., 2011; Walk et al., 2016). Porém, trabalhos com galinhas poedeiras possuem resultados controversos em respeito à atuação da fitase (Van der Klis, 1997; Leske & Coon, 1999; Liebert et al., 2005; Augspurger et al. 2007; Meyer & Parsons, 2011; Englmaierová et al., 2014; Englmaierová et al., 2017) e a avaliação de doses superiores de fitase em poedeiras é ainda mais escasso (Kim et al., 2017). Enquanto diversos trabalhos avaliaram o efeito da fitase em poedeiras em idade avançada (Boling, 2000; Keshavarz, 2000; Jamroz et al., 2003; Keshavarz, 2003; Lei et al., 2011; Bello & Korver, 2019) não são encontrados na literatura trabalhos com doses superiores em fase final de produção.

Soma-se aos desafios nutricionais decorrentes do fitato os desafios provenientes do manejo das aves por longos períodos produtivos na produção de ovos. Aves de postura atuais, em resultado ao avanço na genética, podem passar de 90 semanas em produção sem realização de muda forçada ou perdas drásticas na produtividade. Porém, manter os índices produtivos elevados e uma boa qualidade interna e externa dos ovos torna-se um desafio aos produtores e nutricionistas. Aves em idade avançada tornam-se menos eficazes na absorção de cálcio e fósforo da dieta (Al-Batshan *et al.*, 1994) e o aumento do tamanho dos ovos com a idade e consequente diminuição da espessura da casca (Hester, 2017) podem causar efeitos prejudiciais nos índices produtivos.

Desta maneira, ante a escassez de trabalhos na produção de ovos associada à enzima fitase e aves após o pico de produção de ovos são necessários mais estudos que ajudem a suprir a lacuna existente, auxiliando na redução dos impactos negativos provenientes da idade das aves na produção associado a presença do fitato nas dietas. Com isso o objetivo principal com este estudo foi identificar o efeito de doses superiores de fitase em aves após o pico de produção de ovos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Metabolismo mineral do fósforo*

O nutriente fósforo relaciona-se a diversas funções metabólicas e estruturais, participando da calcificação esquelética durante o crescimento e maturidade do animal. É parte fundamental na estrutura óssea, compondo até 80% do esqueleto, na forma de hidroxiapatita- $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ (Bertechini, 2013). Sua presença no metabolismo energético é essencial, compondo a estrutura de trifosfato de adenosina (ATP), trifosfato de guanosina (GTP), uridina difosfato glicose (UDGP); moléculas essenciais na glicogênese e em várias outras rotas metabólicas (Nelson e Cox, 2014).

O fósforo também pode ser encontrado no metabolismo como fosfocreatina; composto precursor da creatina, considerado um poupador energético nos organismos vertebrados, sendo importante componente na

atividade de contração muscular e favorecendo o crescimento e desenvolvimento animal (Bertechini, 2013). Sua atividade também compõe o metabolismo de carboidratos, aminoácidos e gorduras, através da participação em sistemas enzimáticos; auxilia o sistema tampão em diversos fluídos corporais em diferentes compartimentos extracelulares e intracelulares, colaborando para o equilíbrio ácido-base sanguíneo; transporte de gorduras (fosfolipídios) e na síntese de DNA-RNA (Bertechini, 2013; Nelson e Cox, 2014).

2.2. Impacto ambiental e econômico

Como nutriente o fósforo encontra-se presente em ingredientes de origem vegetal, animal ou fontes inorgânicas. Um terço do fósforo presente em ingredientes de origem vegetal encontra-se na forma de ácido fítico ou sua forma salina, o fitato, molécula responsável por fornecer aos grãos energia durante o desenvolvimento embrionário e diminuir sua oxidação, porém, pouco aproveitada pelos animais monogástricos. Além de sua baixa absorção, o fitato é capaz de agir como agente antinutricional quando exposto às diferentes condições do trato gastrointestinal (Woyengo e Nyachoti, 2013), através da geração de cargas em sua molécula que são capazes de ligarem-se a resíduos peptídicos, proteínas e minerais reduzindo a absorção destes nutrientes e elevando a secreção de enzimas endógenas, aumentando os gastos energéticos do animal (Cowieson et al., 2009).

A utilização de farinhas de origem animal é uma opção à presença do fitato em ingredientes de origem vegetal, porém, sua utilização encontra barreiras ligadas a questões sanitárias em diversos países e sua composição bromatológica variável torna a sua utilização inviável (Rostagno et al., 2017). Diversos países importadores de produtos de origem animal não permitem a utilização de farinhas de origem animal na formulação de dietas animais devido aos riscos de doenças, como o caso da Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) também chamada de doença da “vacca louca”. Segundo Rostagno et al. (2017), farinhas de origem animal possuem altos níveis de cálcio e fósforo, mas sua composição possui elevada variação, dificultando a inclusão em dietas

comerciais. Desta forma, o fornecimento de fósforo através de ingredientes na nutrição animal ocorre, em grande parte, pela utilização de fontes inorgânicas como o fosfato bicálcico ou monocálcico.

A extração do fósforo inorgânico ocorre através da exploração de rochas fosfáticas ao redor do mundo. Desta exploração, 95% destina-se à agricultura, como fertilizante, enquanto o restante é destinado a indústria farmacêutica e à utilização na nutrição animal, segundo dados do Departamento Nacional de Produção Mineral (2007). A presença de rochas fosfáticas ao redor do mundo é relativamente escassa e, segundo Daneshgar et al. (2018) o descobrimento de novas fontes é pouco provável, levando a uma possível crise fosfática mundial dentro de até 100 anos, em decorrência da sua exploração e do ciclo natural do fósforo na natureza (Figura 1).

O ciclo do fósforo é um dos mais lentos existentes na natureza, levando de centenas a milhares de anos para ocorrer. A formação de rochas fosfáticas na natureza ocorre via degradação das rochas fosfáticas já existentes, liberando íons fósforo utilizados pelas plantas que são consumidas pelos animais e, através do processo natural de decomposição destes, retorna ao solo e podem levar à sua deposição ao fundo de oceanos onde são sedimentados e, após séculos, acabam expostas novamente como rocha fosfática, processo que pode levar de 108-109 anos em uma escala natural (Daneshgar et al., 2018).

Com a exploração de rochas fosfáticas e o uso do fosfato na agricultura ou nutrição animal, seja como fertilizante ou ingrediente mineral, este processo é “acelerado” de maneira inversa. Segundo Daneshgar et al. (2018) a ação antrópica no fluxo de fósforo acelerou em três vezes sua retirada comparada à escala natural, enquanto apenas uma pequena porção é repostada anualmente. O fósforo, como citado, passa por um processo de mineralização lento e gradual, sendo descrito como o ciclo biogeoquímico mais lento dentre todos os elementos.

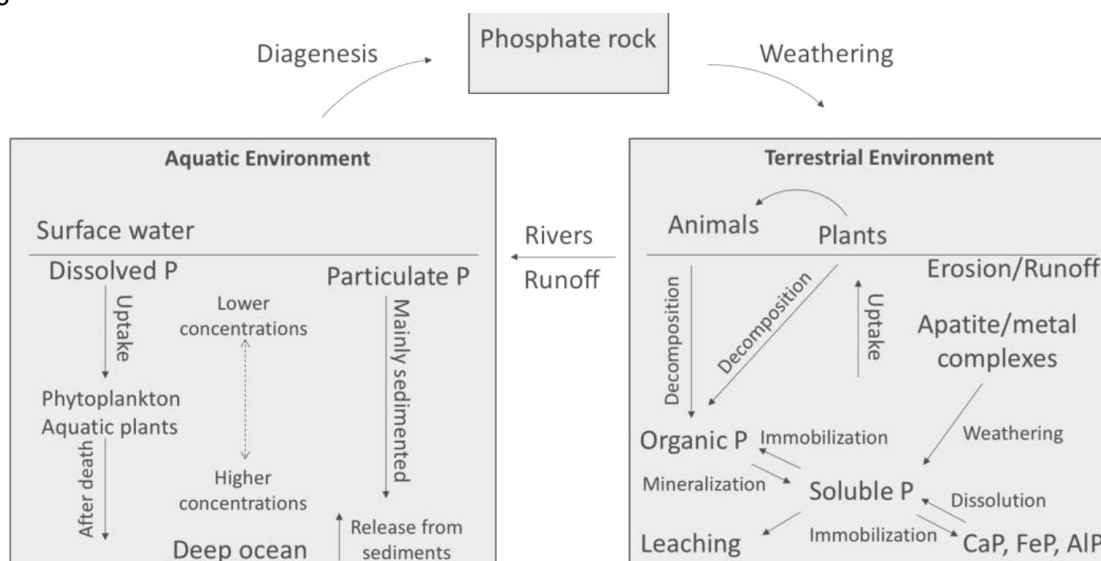


Figura 1. Ciclo do fósforo em ambiente aquático e terrestre (Adaptado de Daneshgar et al., 2018).

O uso de fósforo como fertilizante e ingrediente animal hoje é imprescindível para o cenário agropecuário. Porém, o impacto ambiental resultante da utilização em excesso do fósforo orgânico ou dissolvido, prontamente utilizável pelos organismos, resulta em eutrofização de rios e oceanos, levando a um efeito ao redor do mundo denominado como “zonas mortas” oceânicas (Altieri e Diaz, 2019).

Zonas mortas são regiões litorâneas sem oxigênio suficiente para manutenção de organismos vivos, levando a ausência vida naquela região (Altieri e Diaz, 2019). A eutrofização dos corpos d’água amplia e acelera o surgimento de tais zonas, causando aumento exponencial de micro-organismos e organismos aquáticos como fito plânctons e algas, pelo excesso de nutrientes que chegam através da má administração de nutrientes nas produções agropecuárias, principalmente o fósforo. O crescimento destes organismos em determinada região aumenta o consumo de oxigênio e leva a sua depleção aos demais organismos presentes, elevando a mortalidade por hipóxia e aumento de micro-organismos que acelerarão o processo de retirada de oxigênio da área pelo processo de decomposição.

Desta forma, o uso correto de fósforo em produções agropecuárias além de essencial para a economia e sustentabilidade da produção é vital na manutenção das reservas deste mineral ao redor do mundo e para a manutenção do bioma aquático e terrestre. Uma opção à redução do uso deste mineral na produção avícola tem sido a sua substituição por enzimas exógenas capazes de atuarem na disponibilidade do fósforo fítico dos alimentos aos animais.

2.3. Efeito antinutricional do ácido fítico

A molécula de ácido fítico (*myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate*, $C_6H_{18}P_6O_{24}$) possui seis grupos fosfato, que são esterificados com grupos hidroxilas do álcool cíclico mio-inositol (IUPAC-IUB,1978; Pallauf e Rimbach, 1997). A figura 2 representa a estrutura do ácido fítico proposta por Anderson (1914). Em sua forma livre o ácido fítico é instável, sendo encontrado principalmente complexado a cátions metálicos como cálcio (Ca^{2+}), ferro (Fe^{2+}), zinco (Zn^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), potássio (K^+) e manganês (Mn^{2+}), estes sais são denominados fitatos (Cheryan, 1980; Morris, 1986).

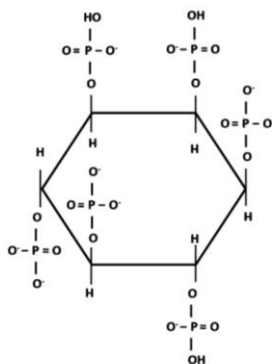


Figura 2. Estrutura química do ácido fítico (Anderson, 1914)

O pH possui função importante na solubilidade do fitato, quanto menor o pH, maior a solubilidade, tornando a complexação entre ácido fítico e minerais possível em condições ácidas; mas, conforme o pH do trato gastrointestinal é elevado ao passar do estômago ao intestino delgado, uma nova síntese –

denominada síntese "*de novo*" (complexação entre ácido fítico e minerais) ocorre, resultando em redução da absorção de minerais (Selle et al., 2009).

Grãos, em geral, possuem limitada quantidade de cálcio e, desta maneira, poucos complexos cálcio-fitato ocorrem naturalmente. Porém, o cálcio está abundantemente presente em dietas animais e, segundo Angel et al. (2002) a formação de complexos fitato-Ca via síntese "*de novo*" pelo pH gastrointestinal é importante fator relacionado a deficiência de cálcio. Wise (1983) demonstrou que o cálcio pode, progressivamente, precipitar o fitato em complexos insolúveis no intestino, diminuindo a atuação da fitase na degradação do fitato e que a formação destes complexos é influenciada pelo pH e taxa molar entre os constituintes.

O calcário, principal fonte de cálcio em dietas de aves, possui alta capacidade de realizar ligações ácidas e, segundo Shafey et al. (1991) o calcário pode elevar o pH da digesta no intestino. A formação dos complexos é favorecida em pH e taxas Ca/fitato elevadas, deste modo, altas concentrações de calcário podem potencializar a formação de complexos insolúveis de fitato de cálcio. Adicionalmente, a mudança de pH pode influenciar a atividade da fitase, dependendo dos valores ótimos de pH de atuação da enzima (Selle et al., 2009).

O ácido fítico também atua de maneira negativa nas perdas endógenas de minerais. Cowieson et al. (2004) observou aumento de 68, 32, 300 e 47% de cálcio, ferro, sódio e enxofre endógeno, respectivamente, usando a metodologia de alimentação precisa em frangos de corte com a adição de 1 g de ácido fítico à solução de 50 mL de glicose. Cowieson et al. (2006), através da mesma metodologia, mas com adição de 5 g de caseína com e sem 1 g de ácido fítico também observou aumento da excreção de cálcio, magnésio, manganês e sódio em 187, 39, 87 e 174%, respectivamente, em um período de 48h na dieta adicionada ao ácido fítico.

Woyengo e Nyachoti (2013) revisando a atuação do ácido fítico enfatizam alguns mecanismos que podem influenciar o aumento de perdas endógenas de minerais e nutrientes. A interação do ácido fítico com proteína dietética e

endógena no estômago, onde o pH é ácido, reduz a atividade de pepsina (Cowieson et al., 2006).

A presença de alimentos não digeridos ou inativação de enzimas digestivas no trato gastrointestinal resulta em um aumento da secreção de enzimas digestivas via *feedback* negativo (Ravindran et al., 2008). O aumento da secreção de enzimas digestivas leva a um aumento da secreção intestinal e pancreática de bicarbonato e mucina no intestino delgado para proteger a mucosa intestinal do pH ácido e da ação das enzimas digestivas estomacais, elevando a perda de minerais endógenos (Cowieson et al., 2009). A secreção pancreática é rica principalmente em sódio, mineral que é o mais afetado pela presença do ácido fítico.

Várias enzimas intestinais como alfa-amilase, fosfatases alcalinas, aminopeptidases e carboxipeptidases são metaloenzimas (Malmstrom e Neilands, 1964) – enzimas que necessitam da presença e ligação de íons metálicos - desta forma, um aumento em sua secreção automaticamente eleva a secreção de seu cofator. A elevada secreção de alfa-amilase pancreática resulta em aumento na secreção de cálcio (Argent et al., 1973). O ácido fítico pode se ligar aos cofatores enzimáticos, a enzimas proteolíticas ou a proteína dietética, aumentando via *feedback* negativo a secreção dos cofatores. Entre os minerais endógenos secretados, cálcio e zinco são os mais afetados, pois compõem os principais cofatores das metaloenzimas presentes no trato gastrointestinal (Malmstrom e Neilands, 1964).

Além da utilização de minerais, estudos mostram que o fitato é capaz de reduzir a utilização de proteínas e aminoácidos (AA) através da formação de complexos que alteram a estrutura da proteína e diminuem sua solubilidade, a atividade enzimática e a digestibilidade (Lillford e Wright, 1981; Deshpande e Damodaran, 1989; Urbano et al., 2000).

Em condições ácidas, onde o pH está abaixo do ponto isoelétrico das proteínas, a molécula polianiónica de fitato é carregada negativamente e possui capacidade de formar ligações eletrostáticas fortes com grupos básicos catiônicos da lisina, arginina e resíduos de histidina (Cheryan, 1980). Assim,

monogástricos nas condições ácidas do estômago formam complexos proteína-fitato. Estas interações podem causar modificações eletrostáticas e formar uma estrutura fechada entre moléculas de proteína e ânions de fitato, levando a formação de um complexo insolúvel (Deshpande e Damodaran, 1989).

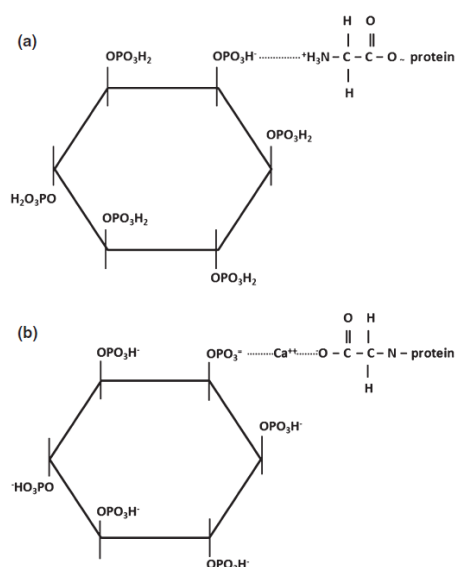


Figura 3. Complexo entre ácido fítico e proteína em pH baixo (a) e neutro (b) (Anderson, 1985).

Vários fatores podem afetar a formação do complexo entre fitato e proteína, como: o tipo de proteína (O'Dell e De Boland, 1976), pH (Hartman, 1979), conteúdo dietético e fonte de cálcio (Caldwell, 1992), taxa de solubilidade da proteína (Gifford e Clydesdale, 1990) assim como as interações entre enzimas proteolíticas, fitato e proteína (Caldwell, 1992). A propensão da proteína em ligar-se ao fitato difere e pode estar relacionada à acessibilidade de resíduos de aminoácidos básicos ao fitato.

Complexos fitato-proteína reduzem a digestão por enzimas proteolíticas (pepsina, tripsina e quimotripsina) e, outras enzimas digestivas pancreáticas, como a lipase e a alfa-amilase (Caldwell, 1992). Kumar et al. (2010) conclui que este efeito ocorre pela natureza não específica do complexo proteína-fitato e a quelatação entre íons Ca, essenciais para a atividade da tripsina e alfa-amilase. A tripsina é a mais importante das enzimas pancreáticas. Cervantes et al. (2011)

sugerem que a atividade de proteases pancreáticas é reduzida por fitatos. Além da tripsina, acredita-se que o fitato reduz a atividade de pepsina.

Como já citado, na presença de ácido fítico ou complexos fitato-proteína, há um efeito compensatório de hipersecreção gástrica de pepsina e ácido clorídrico (HCl). Ambos podem atuar de maneira negativa no TGI e, naturalmente devem ser inibidos no intestino delgado, onde ocorre um efeito adicional da liberação de muco e bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (Allen e Flesmetröm, 2005).

O fitato desencadeia uma hipersecreção gástrica de ambos e, por consequência, de mucina. Cowieson et al. (2004) e Selle et al. (2007) identificaram aumento significativo da secreção de sódio endógeno no intestino delgado na presença do fitato. A capacidade do fitato em "arrastar" sódio (Na) para o lúmen intestinal pode comprometer a absorção de aminoácidos endógenos e dietéticos impedindo os sistemas de transporte Na-dependente e a atividade do sistema Na^+/K^+ -ATPase.

2.4. Enzimas na nutrição animal

Enzimas são compostas por proteínas e arranjadas tridimensionalmente por ligações entre seus componentes, gerando diferentes estruturas e diferem de proteínas comuns no organismo animal por serem dotadas de propriedades que as fazem capazes de acelerar intensamente determinadas reações químicas, sejam para síntese ou degradação de uma determinada molécula. Sua presença no organismo é essencial para a aceleração de processos formadores de moléculas que, na ausência de enzimas, levariam até semanas para serem realizados. As enzimas são proteínas produzidas sob o controle do DNA e, é através delas que o DNA comanda todo metabolismo celular (NELSON; COX, 2014).

As enzimas atuam sobre determinado composto ou substrato por meio de centros ativos, zonas das quais o substrato se combina e ocorre a ação enzimática. A especificidade das enzimas é variável, podendo haver enzimas que atuam exclusivamente sobre um tipo de molécula, enquanto outras atuam em vários compostos com alguma característica estrutural comum. As enzimas

possuem papel essencial na digestão de alimentos e, manter uma boa relação enzima-substrato no organismo pode elevar o desempenho zootécnico.

Todos os animais possuem enzimas em seu organismo, porém, o processo digestivo não é totalmente eficiente. De acordo com Bedford (2010), monogástricos não conseguem digerir cerca de 15 a 25% do alimento ingerido. Essa ineficiência do sistema enzimático pode estar relacionada à presença de fatores antinutricionais na dieta, como o fitato, polissacarídeos não-amiláceos ou pela ausência/insuficiência de enzimas específicas no organismo que degradam certos componentes. A partir dos anos 80, a ineficiência das enzimas endógenas abriu espaço para a utilização de enzimas exógenas na formulação de dietas. A presença das enzimas na dieta favorece a utilização de determinados nutrientes, diminuindo o efeito de fatores antinutricionais e melhorando a disponibilidade do amido, proteína, aminoácidos e minerais, como fósforo e cálcio, além de contribuir para a redução dos custos de produção e não possuir barreiras sanitárias.

As enzimas são categorizadas de acordo com o substrato que atuam. No cenário atual, encontram-se disponíveis enzimas capazes de atuar na quebra da fibra, proteína, amido e fitato.

2.5. Descrição e modo de atuação da fitase

A fitase é caracterizada como uma enzima digestiva, ou seja, possui um sítio ativo que permite a quebra de determinadas ligações químicas, sob determinadas condições de pH, temperatura e umidade. Segundo a Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2000) uma unidade de fitase (FYT, FTU, PU ou U) é definida como a quantidade de enzima que libera um micromol (mmol) de fósforo inorgânico por minuto, proveniente de $0,0051 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ do fitato de sódio em pH 5,5 e temperatura de 37° C. A enzima é encontrada em plantas, micro-organismos e em alguns tecidos animais (Bedford, 2010). Fitases representam subgrupos de fosfomonoesterases capazes de desfosforilar sequencialmente o fitato (mio-inositol (1,2,3,4,5,6) hexaquiوسفato - IP6), o fosfato inositol mais abundante na natureza com a remoção de grupos ortofosfatos do IP6 e produção de fósforo inorgânico livre (P), gerando cadeia de éster fosfóricos menores (IP5 a IP1) como intermediários.

As fitases abrangem grupos de vários tamanhos, estruturas e mecanismos catalíticos que podem definir sua classificação. Baseado em seus mecanismos catalíticos elas podem ser descritas como: fitases ácidas histidinas (HAPhy), fitases β -hélice ou alcalinas (BPPHy), fitases cisteínas (PTPhy) ou fitases ácido purpúreo (PAPhy) e a maior parte das fitases comerciais atualmente pertencem ao grupo das HAPhy's (Lei *et al.*, 2013). As fitases podem ser classificadas com base no pH ótimo de atuação em ácidas ou alcalinas - pH 5.0 e 8.0, respectivamente (Bedford, 2010). A International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry (IUPAC-IUB) define as fitases em relação ao carbono do anel de mio-inositol do fitato onde a desfosforilação é iniciada, podendo ser classificadas como 5-fitases (E.C. 3.1.3.72), 3-fitases (E.C. 3.1.3.8) e 6-fitases (E.C. 3.1.3.26), sendo as duas últimas as principais enzimas utilizadas na produção animal.

2.6. Histidine acid phytase (HAPHy)

Boa parte das fitases desenvolvidas atualmente pertencem à subfamília das HAPhy's e não necessitam de cofatores para sua atividade ótima. São encontradas em micro-organismos, plantas e animais (Konietzny e Greiner, 2002; Lei e Porres, 2003). A estrutura das HAPhy's possui um domínio fixo alfa/beta e um domínio variável alfa (Lim *et al.*, 2000), com sítio ativo localizado em uma interface entre ambos os domínios. As HAPhy's possuem fatores inibidores de sua atuação, como Zn^{2+} , fluoreto, molibdato, volframita, vanadato e o próprio ortofosfato produzido pela hidrólise do fitato (Konietzny e Greiner, 2002). Além do ortofosfato, o próprio substrato fitato pode atuar como inibidor de muitas HAPhy's. Em altas concentrações de fitato, a carga dos grupos fosfatos pode afetar o ambiente do domínio catalítico da enzima, levando a uma redução da eficiência.

2.7. β -propeller phytase (BPPHy)

Estudos prévios relataram que a sequência de aminoácidos das BPPHy's não possui homologia com nenhuma sequência de outras fosfatases conhecidas e sua sequência proteica mostra uma ampla distribuição destas enzimas em ambientes aquáticos (Lim *et al.*, 2007).

As BPPHy's possuem estrutura em hélice com seis "lâminas" flexíveis, contendo seis sítios de ligação para cálcio em cada molécula de proteína (Shin *et al.*, 2001). A ligação de três cálcios aos sítios com alta afinidade resulta em um aumento elevado da estabilidade térmica pela combinação de segmentos entrelaçados em sua sequência de aminoácidos e a ligação de três íons cálcios aos sítios de baixa afinidade no topo da molécula inicia a atividade catalítica da enzima possibilitando a ligação do fitato.

2.8. Purple acid phosphatases (PAPhy)

As PAPhy possuem atividade ótima em meio ácido. Tais enzimas possuem um centro metálico bi nuclear, sendo descrita pela primeira vez por Hegeman e Grabau (2001) em mudas de soja (*Glycine max L. Merr*) em processo de germinação. Estas enzimas também podem ser denominadas como metaloenzimas.

Sua principal característica é a presença do centro binuclear $Fe^{3+}-Me^x$, podendo compor o centro Me^x íons de Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} ou Zn^{2+} . PAPhy com atividade de fitase também foram descritas em outras plantas e, até o momento, acredita-se que estas fosfatases possuem atividade restrita a plantas (Xiao *et al.*, 2005).

2.9. Fatores que afetam a atuação da fitase

A eficiência e atuação da fitase no trato gastrointestinal podem ser influenciadas por fatores relacionados: à própria enzima, como a amplitude de pH capaz de atuarem, o tipo e origem da fitase e a sua resistência a atuação de enzimas endógenas; ao próprio animal, como a espécie, idade e o tempo de retenção da enzima; e, por fim, a fatores dietéticos como o conteúdo de fitato, os níveis de cálcio e a composição dos ingredientes da dieta.

A unidade de fitase é definida, como já visto, pela quantidade de fitase que libera 1 mmol de fósforo orgânico por minuto de $0.0051 \text{ mol L}^{-1}$ do fitato de sódio a um pH de 5,5 a uma temperatura de 37°C . O pH estomacal é inferior a 5,5 e pode afetar a atividade enzimática significativamente, desta forma uma ótima amplitude de pH providencia um

indicador da efetividade da enzima em atuar no estômago e na parte superior do trato gastrointestinal.

A atividade relativa de diferentes fitases comerciais em diferentes valores de pH podem ser observadas na figura 4. Com base nestes estudos, pode-se concluir que a eficiência de diferentes fitases comerciais apresenta uma amplitude de pH entre 2,5-4,5, valor relativamente próximo a amplitude encontrado *in vivo*. A figura indica que fitases oriundas de *E. coli* são mais ativas em menor amplitude de pH (2,5 – 4,5) comparadas a fitases fúngicas. Além disto, a atuação de fitases oriundas de *E. coli* varia em diferentes valores de pH.

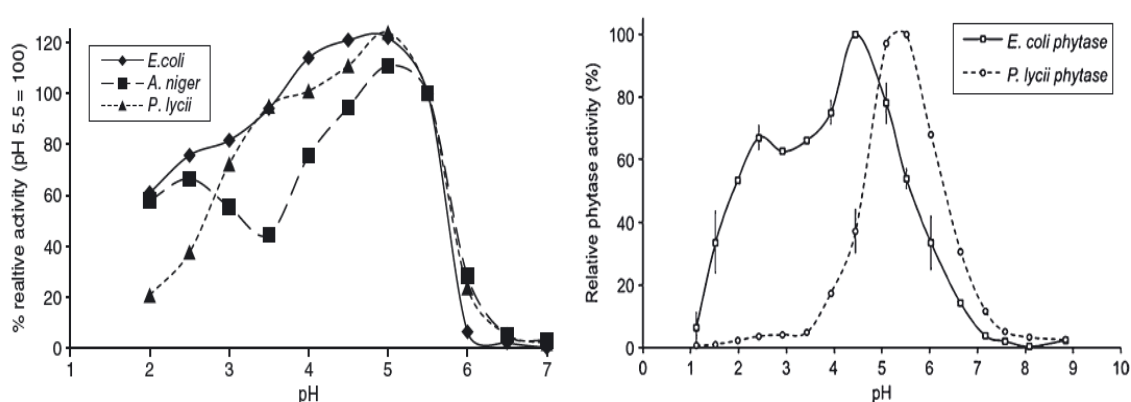


Figura 4. Atividade relativa de diferentes fitases comerciais. Esq. Comparação de três fitases comerciais (*A. niger*, *E. coli* e *P. lycii*). (Kumar et al., 2003) Dir. Comparação de duas fitases comerciais (*E. coli* e *P. lycii*). (Morales et al., 2011)

A relação cálcio: fósforo (Ca: P) e o conteúdo de fósforo inorgânico na dieta também podem influenciar a taxa de liberação de fósforo oriundo do fitato pela fitase. Como já citado, o fitato pode ligar-se a cátions Ca^{2+} e Fe^{3+} no intestino delgado, reduzindo sua solubilidade e a atuação da enzima. Dietas avícolas contêm grande conteúdo de cálcio e, este conteúdo é superior em dietas para galinhas poedeiras. O tamanho da partícula ao qual este se encontra (fino ou grosso) também impacta a utilização, pois pode influenciar na eficiência da fitase devido a alta solubilidade do cálcio do calcário fino (Bedford et al., 2017).

Em estudos anteriores foi revisada a relação entre cálcio e fósforo no uso de fitase. Os autores destacam que menores quantidades de cálcio na dieta e relações Ca: P menores são favoráveis a atuação da fitase (Selle et al., 2008; Walk, 2016; Bedford et al., 2017). Diversos estudos com suínos e aves (Lantzsch et al., 1995; Qian et al.,

1996b; Liu et al., 1998; Brady et al., 2002; Sebastian et al., 1996; Qian et al., 1997) destacam a relação negativa de altas relações Ca: P na eficiência da fitase.

Destaca-se a interação, já citada, entre fitato e cálcio. Na natureza estes complexos são pouco encontrados devido à baixa concentração de cálcio nos principais ingredientes de origem vegetal. Porém, o efeito negativo desta interação ocorre através da síntese "*de novo*" ao longo do trato gastrointestinal, assumindo a interação Ca: P grande importância no efeito antinutricional do fitato. A síntese "*de novo*" pode ser afetada, principalmente, pelo pH e pela taxa molar Ca: P presente no trato gastrointestinal. Segundo Luttrell (1993) a afinidade do Ca ao fitato é dependente do número de fosfatos presentes no anel de mio-inositol. Sendo assim, uma molécula de fitato completa (inositol hexaquifosfato, IP6), contendo seis fosfatos, possui maior capacidade de ligar-se ao cálcio comparado a ésteres menores de três (IP3) ou quatro (IP4) fosfatos. O autor destaca que uma molécula de IP6 possui capacidade de ligar-se de dois a três íons Ca^{2+} , enquanto moléculas de IP4 ou IP3 possuem capacidade de ligar-se a apenas um íon Ca^{2+} .

2.10. Absorção de cálcio para galinhas poedeiras em idade avançada

Mudanças fisiológicas severas coincidem com o término do primeiro período de postura. As aves produzem ovos maiores, sem alterações no peso da casca (Nys, 1999), porém, parâmetros envolvidos na qualidade da casca, como a porcentagem e a espessura decaem com a idade (Al-Batshan et al., 1994) e, paralelamente, o número de ovos com casca quebrada aumentam (Hester, 2007).

Poedeiras comerciais da linhagem Hy-Line W-36, possuem período de produção até 110 semanas, com início da fase de postura a partir de 17-18 semanas e pico entre 22 a 24 semanas. As aves iniciam a queda de produção entre a 36ª e 40ª semana de idade, entrando no período pós-pico. Durante este período, entre a 40ª semana até o final do período produtivo (110 semanas) as aves passam a diminuir gradativamente a produção de ovos e a qualidade de casca, aumentando as chances de sofrerem problemas ósseos, como a osteoporose, por exemplo, causada pelo desgaste das reservas de cálcio (Wilson et al., 1993).

A disponibilidade de cálcio depende da absorção intestinal do cálcio dietético, porém há diminuição na capacidade absorptiva intestinal com o avanço da idade (Al-Batshan et al., 1994). A vitamina D atua como hormônio regulador do transporte de cálcio para dentro do enterócito, por meio da proteína transportadora de cálcio -

calbindim (Combs, 2008). Entretanto, a vitamina D está presente, em sua maioria, na forma inativa no organismo animal, na forma de colecalciferol, ou vitamina D3.

Para a ativação dessa molécula é necessária a inclusão de duas hidroxilas nas posições dos carbonos 25 e 1. A primeira hidroxila é inserida à molécula de vitamina D3 no fígado, passando a se chamar 25-hidroxi-calciferol, ou 25(OH)D3. A segunda hidroxila é adicionada à molécula da vitamina D3 nos rins, com a atuação da enzima 1-hidroxilase.. Aves com baixa concentração de vitamina D ativa no plasma sanguíneo podem apresentar redução na absorção de cálcio e quando somados a redução da disponibilidade de cálcio devido a presença de fitato, pode provocar uma absorção desse mineral abaixo da exigência do animal e conseqüentemente redução da produção e qualidade dos ovos.

A presença de fatores antinutricionais, como o fitato, reduz a disponibilidade de cálcio, aumentando as perdas nos parâmetros produtivos em aves pós-pico de produção. A inclusão da enzima fitase eleva a disponibilidade de cálcio (Gordon R.W. e Roland D. A., 1998) e sua inclusão pós-pico pode melhorar os parâmetros produtivos por tempos mais longos, sem a necessidade de realização de muda forçada nas aves. A maior parte dos estudos com aves de postura ocorre durante o período de pico, deixando lacunas sobre a utilização de enzimas exógenas em aves em final de produção.

2.11. “Superdose” de fitase na nutrição de aves

O uso de enzimas exógenas na avicultura está bem estabelecido desde a década de noventa e seus efeitos positivos são conhecidos e demonstrados em inúmeros estudos e revisões disponíveis na literatura. Porém, em algumas áreas da utilização de enzimas ainda são necessários esclarecimentos. Estudos demonstraram que a presença de ésteres de inositol inferiores (IP5, IP4, IP3) também causam efeitos antinutricionais negativos ao desempenho animal e, assim, a máxima redução do anel dos ésteres de inositol é essencial na obtenção de melhores resultados (Luttrel, 1993; Cowienson et al., 2011; Bedford; Walk , 2016).

Buscando reduzir ao máximo os efeitos negativos do fitato, estudos com doses superiores às tradicionais utilizadas, denominadas superdoses têm sido realizados. Li et al. (2014) ao revisarem o assunto demonstram que doses inferiores a 500 FTU são capazes de hidrolizar menos de 50% do fitato na parte superior do trato gastrointestinal e sugerem que doses acima de 1000 FTU sejam capazes de elevar a hidrólise em mais

de 60%, melhorando a eficiência de utilização do fósforo orgânico e a eficiência da fitase.

Cowieson et al. (2010) ao estudar superdoses de fitase em monogástricos, apontou que os efeitos antinutricionais do fitato não ocorrem por falta de enzimas endógenas, mas sim pela baixa solubilidade do substrato no intestino delgado e as concentrações presentes de cátions minerais no lúmen, como o cálcio, principalmente. Person et al. (1998) demonstrou que ao aumentar a solubilidade de inosítois menores os complexos formados com minerais se tornam mais fracos e, desta forma, a diminuição do anel de inositol a IP3 ainda na porção gástrica do trato gastrointestinal é essencial para maior redução dos efeitos antinutricionais.

Uma vasta literatura (Simons et al., 1990; Zhang et al., 2000; Shirley e Edwards, 2003; Augspurger e Baker, 2004; Cowieson et al., 2006; Braña et al., 2006; Kies et al., 2006) demonstra a efetividade do uso de superdoses da fitase em suínos e em frangos de corte, com doses de 2500 FTU/kg a até 10000 FTU/kg. A efetividade e os efeitos positivos das doses superiores em frangos de corte estão bem estabelecidos, porém, se tratando em galinhas poedeiras mesmo os resultados com doses tradicionais (300 a 500 FTU) não são consistentes (Van der Klis, 1997; Leske & Coon, 1999; Liebert et al., 2005; Augspurger et al. 2007; Meyer & Parsons, 2011; Manobhavan et al. 2015, Englmaierová et al., 2014; Englmaierová et al., 2017) e expõem uma grande lacuna a ser explorada na avicultura de postura moderna.

Em geral, os trabalhos existentes com fitase em galinhas poedeiras são inconclusivas e, poucos são aqueles que trabalham com doses acima das utilizadas pela indústria de ovos (300 FTU). Ademais, tem sido considerado que os níveis de fósforo atuais podem ser superiores às necessidades das aves, o que pode atuar de forma negativa na ação da fitase devido ao antagonismo causado pela alta concentração de substrato (Bedford, 2017).

Diante da escassez de trabalhos em aves de idade avançada e superdose de fitase, o desenvolvimento de estudos que favoreçam a compreensão da atividade enzimática e do comportamento corporal ósseo em aves pós-pico produtivo é de extrema importância para avaliação dos índices produtivos, da redução de impactos ambientais e da composição e manutenção da densidade óssea para galinhas poedeiras.

3. REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). Relatório Anual ABPA - 2018. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf> Acesso em: 22 de Abril de 2019

AL-BATSHAN, H. A. et al. Duodenal calcium uptake, femur ash, and eggshell quality decline with age and increase following molt. **Poultry science**, v. 73, n. 10, p. 1590-1596, 1994.

ALLEN, Adrian; FLEMSTRÖM, Gunnar. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 288, n. 1, p. C1-C19, 2005.

ALTIERI, Andrew H.; DIAZ, Robert J. Dead zones: oxygen depletion in coastal ecosystems. In: **World Seas: An Environmental Evaluation**. Academic Press, 2019. p. 453-473.

ANDERSON, P. A. Interactions between proteins and constituents that affect protein quality. **Digestibility and Amino Acid Availability in Cereals and Oilseeds**, p. 31-45, 1985.

ANGEL, R. et al. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, n. 4, p. 471-480, 2002.

AOAC, AOAC. Method 2000.12: Phytase activity in feed: Colorimetric enzymatic method. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 2005.

ARGENT, B. Ei; CASE, R. M.; SCRATCHERD, T. Amylase secretion by the perfused cat pancreas in relation to the secretion of calcium and other electrolytes and as influenced by the extrarenal ionic environment. **The Journal of Physiology**, v. 230, n. 3, p. 575-593, 1973.

AUGSPURGER, N. R.; WEBEL, D. M.; BAKER, D. H. An Escherichia coli phytase expressed in yeast effectively replaces inorganic phosphorus for finishing pigs and laying hens. **Journal of animal science**, v. 85, n. 5, p. 1192-1198, 2007.

AUGSPURGER, N. R. et al. Efficacy of an E. coli phytase expressed in yeast for releasing phytate-bound phosphorus in young chicks and pigs. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 2, p. 474-483, 2003.

BEDFORD, M. R.; WALK, C. L. Chapter 3 Reduction of phytate to tetrakisphosphate (IP₄) to trisphosphate (IP₃), or perhaps even lower, does not remove its antinutritive properties. In: **Phytate destruction-consequences for precision animal nutrition**. Wageningen Academic Publishers, 2016. p. 237-246.

BEDFORD, M.; ROUSSEAU, X. Recent findings regarding calcium and phytase in poultry nutrition. **Animal Production Science**, v. 57, n. 11, p. 2311-2316, 2017.

BEDFORD, Michael Richard; PARTRIDGE, Gary G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. CABI, 2010.

BELLO, A.; KORVER, D. R. Long-term effects of *Buttiauxella sp.* phytase on performance, eggshell quality, apparent ileal Ca and P digestibility, and bone properties of white egg layers. **Poultry science**, v. 98, n. 10, p. 4848-4859, 2019.

BOLING, S. D. et al. The effects of various dietary levels of phytase and available phosphorus on performance of laying hens. **Poultry Science**, v. 79, n. 4, p. 535-538, 2000.

BRADY, S. M. et al. Effect of phytase inclusion and calcium/phosphorus ratio on the performance and nutrient retention of grower–finisher pigs fed barley/wheat/soya bean meal-based diets. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 15, p. 1780-1790, 2002.

BRAÑA, D. V. et al. Effect of a novel phytase on growth performance, bone ash, and mineral digestibility in nursery and grower-finisher pigs. **Journal of animal science**, v. 84, n. 7, p. 1839-1849, 2006.

CALDWELL, Robert A. Effect of calcium and phytic acid on the activation of trypsinogen and the stability of trypsin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 43-46, 1992.

CERVANTES, M. et al. Ileal digestibility of amino acids, phosphorus, phytate and energy in pigs fed sorghum-based diets supplemented with phytase and Pancreatin®. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 95, n. 2, p. 179-186, 2011.

CHERYAN, Munir; RACKIS, Joseph J. Phytic acid interactions in food systems. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 13, n. 4, p. 297-335, 1980.

COMBS, G. F. **The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health**. 2008.

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. **British poultry science**, v. 45, n. 1, p. 101-108, 2004.

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. Phytic acid and phytase: implications for protein utilization by poultry. **Poultry Science**, v. 85, n. 5, p. 878-885, 2006.

COWIESON, A. J.; RAVINDRAN, V. Effect of exogenous enzymes in maize-based diets varying in nutrient density for young broilers: growth performance and digestibility of energy, minerals and amino acids. **British poultry science**, v. 49, n. 1, p. 37-44, 2008.

COWIESON, A. J.; WILCOCK, P.; BEDFORD, M. R. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. **World's Poultry Science Journal**, v. 67, n. 2, p. 225-236, 2011.

DANESHGAR, Saba et al. The potential phosphorus crisis: resource conservation and possible escape technologies: a review. *Resources*, v. 7, n. 2, p. 37, 2018.

DESHPANDE, S. S.; DAMODARAN, SRINIVASAN. Effect of phytate on solubility, activity and conformation of trypsin and chymotrypsin. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 3, p. 695-699, 1989.

ENGLMAIEROVÁ, M. et al. Effects of laying hens housing system on laying performance, egg quality characteristics, and egg microbial contamination. *Yeast*, v. 15, n. 10, 2014.

ENGLMAIEROVÁ, Michaela et al. Limestone particle size and *Aspergillus niger* phytase in the diet of older hens. **Italian Journal of Animal Science**, v. 16, n. 4, p. 608-615, 2017.

GIFFORD, SANDRA R.; CLYDESDALE, FERGUS M. Interactions among calcium, zinc and phytate with three protein sources. **Journal of food science**, v. 55, n. 6, p. 1720-1724, 1990.

GORDON, R. W.; ROLAND SR, D. A. Influence of supplemental phytase on calcium and phosphorus utilization in laying hens. **Poultry Science**, v. 77, n. 2, p. 290-294, 1998.

HARTMAN, Grant H. Removal of phytate from soy protein. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 56, n. 8, p. 731-735, 1979.

HEGEMAN, Carla E.; GRABAU, Elizabeth A. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. **Plant Physiology**, v. 126, n. 4, p. 1598-1608, 2001.

HESTER, P. Y. **Egg Innovations and Strategies for Improvements**. 1st ed. Elsevier, 2018. 646 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Agricultura e Pecuária, Primeiros Resultados 2019 – Ovos. Disponível em:

<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21120-primeiros-resultados-1ovos.html?edicao=23770&t=o-que-e>. Acesso em: 22 de Abril de 2019.

JAMROZ, D. et al. Reaction of laying hens to low phosphorus diets and addition of different phytase preparations. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 12, n. 1, p. 95-110, 2003.

KESHAVARZ, K. Nonphytate phosphorus requirement of laying hens with and without phytase on a phase feeding program. **Poultry science**, v. 79, n. 5, p. 748-763, 2000.

KESHAVARZ, K. The effect of different levels of nonphytate phosphorus with and without phytase on the performance of four strains of laying hens. **Poultry Science**, v. 82, n. 1, p. 71-91, 2003.

KIES, A. K. et al. Effect of graded doses and a high dose of microbial phytase on the digestibility of various minerals in weaner pigs. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 5, p. 1169-1175, 2006.

BRAÑA, D. V. et al. Effect of a novel phytase on growth performance, bone ash, and mineral digestibility in nursery and grower-finisher pigs. **Journal of animal science**, v. 84, n. 7, p. 1839-1849, 2006.

LANTZSCH, H.-J.; WJST, S.; DROCHNER, W. The effect of dietary calcium on the efficacy of microbial phytase in rations for growing pigs 1. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 73, n. 1-5, p. 19-26, 1995.

LEI, Xin Gen; PORRES, Jesús M. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. **Biotechnology letters**, v. 25, n. 21, p. 1787-1794, 2003.

LEI, Xin Gen; PORRES, Jesus M. Phytase: an enzyme to improve soybean nutrition. *Soybean and nutrition*. InTech, Croatia, p. 67-80, 2011.

LEI, Xin Gen et al. Phytase, a new life for an "old" enzyme. **Annu. Rev. Anim. Biosci.**, v. 1, n. 1, p. 283-309, 2013.

LESKE, Korin L.; COON, Craig N. A bioassay to determine the effect of phytase on phytate phosphorus hydrolysis and total phosphorus retention of feed ingredients as determined with broilers and laying hens. **Poultry Science**, v. 78, n. 8, p. 1151-1157, 1999.

LIEBERT, F.; HTOO, J. K.; SÜNDER, A. Performance and nutrient utilization of laying hens fed low-phosphorus corn-soybean and wheat-soybean diets supplemented with microbial phytase. **Poultry Science**, v. 84, n. 10, p. 1576-1583, 2005.

LILLFORD, Peter J.; WRIGHT, David J. Influence of isoelectric precipitation on the solubility of soya bean proteins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 32, n. 4, p. 315-327, 1981.

LIM, Boon Leong et al. Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. **The ISME journal**, v. 1, n. 4, p. 321-330, 2007.

LIM, Daniel et al. Crystal structures of Escherichia coli phytase and its complex with phytate. **Nature structural biology**, v. 7, n. 2, p. 108-113, 2000.

LUTTREL, B. Biological relevance of the binding of calcium ions by inositol phosphates. **The Journal of Biological Chemistry**, 268, 1521–1524.1993

MALMSTROM, Bo G.; NEILANDS, J. B. Metalloproteins. **Annual review of biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 331-354, 1964.

MANOBHAVAN, M. et al. Efficacy of fungal phytase on growth performance and bone mineralization in broiler chicken. **Animal Nutrition and Feed Technology**, v. 15, n. 1, p. 129-136, 2015.

MEYER, E.; PARSONS, C. The efficacy of a phytase enzyme fed to Hy-Line W-36 laying hens from 32 to 62 weeks of age. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 20, n. 2, p. 136-142, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry** (WHF a. Company Ed. ed.). New York, 2014.

O'DELL, Boyd L.; DE BOLAND, Ana. Complexation of phytate with proteins and cations in corn germ and oil seed meals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 804-808, 1976.

QIAN, H.; KORNEGAY, E. T.; DENBOW, D. M. Phosphorus equivalence of microbial phytase in turkey diets as influenced by calcium to phosphorus ratios and phosphorus levels. **Poultry Science**, v. 75, n. 1, p. 69-81, 1996.

QIAN, H.; KORNEGAY, E. T.; DENBOW, D. M. Utilization of phytate phosphorus and calcium as influenced by microbial phytase, cholecalciferol, and the calcium: total phosphorus ratio in broiler diets. **Poultry Science**, v. 76, n. 1, p. 37-46, 1997.

RAVINDRAN, V.; COWIESON, A. J.; SELLE, P. H. Influence of dietary electrolyte balance and microbial phytase on growth performance, nutrient utilization, and excreta quality of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 87, n. 4, p. 677-688, 2008.

ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais** (488 p.). Departamento de Zootecnia-UFV, Viçosa, MG, BR, 2017.

SEBASTIAN, S. et al. Efficacy of supplemental microbial phytase at different dietary calcium levels on growth performance and mineral utilization of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 75, n. 12, p. 1516-1523, 1996.

- SELLE, Peter H.; RAVINDRAN, Velmurugu. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal feed science and technology**, v. 135, n. 1-2, p. 1-41, 2007.
- SELLE, Peter H.; COWIESON, Aaron J.; RAVINDRAN, V. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. **Livestock science**, v. 124, n. 1-3, p. 126-141, 2009.
- SHAFEY, T. M.; MCDONALD, M. W.; DINGLE, J. G. Effects of dietary calcium and available phosphorus concentration on digesta pH and on the availability of calcium, iron, magnesium and zinc from the intestinal contents of meat chickens. **British Poultry Science**, v. 32, n. 1, p. 185-194, 1991.
- SHIN, Sejeong et al. Enzyme mechanism and catalytic property of β propeller phytase. *Structure*, v. 9, n. 9, p. 851-858, 2001.
- SHIRLEY, R. B.; EDWARDS JR, H. M. Graded levels of phytase past industry standards improves broiler performance. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 671-680, 2003.
- SIMONS, P. C. M. et al. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. **British Journal of Nutrition**, v. 64, n. 2, p. 525-540, 1990.
- URBANO, G. et al. The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function?. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 56, n. 3, p. 283-294, 2000.
- VAN DER KLIS, J. D. et al. The efficacy of phytase in corn-soybean meal-based diets for laying hens. **Poultry Science**, v. 76, n. 11, p. 1535-1542, 1997.
- WALK, C. L. The influence of calcium on phytase efficacy in non-ruminant animals. **Animal Production Science**, v. 56, n. 8, p. 1345-1349, 2016.
- WILSON, S. et al. Effects of perches on trabecular bone volume in laying hens. **Research in Veterinary Science**, v. 54, n. 2, p. 207-211, 1993.
- WISE, Alan; GILBERT, David J. Accessibility of trace metals, co-precipitated with calcium phytate, to soluble chelating agents. **Nutrition Research**, v. 3, n. 3, p. 321-324, 1983.
- WOYENGO, T. A.; NYACHOTI, C. M. Anti-nutritional effects of phytic acid in diets for pigs and poultry—current knowledge and directions for future research. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 93, n. 1, p. 9-21, 2013.
- XIAO, Kai; HARRISON, Maria J.; WANG, Zeng-Yu. Transgenic expression of a novel *M. truncatula* phytase gene results in improved acquisition of organic phosphorus by *Arabidopsis*. *Planta*, v. 222, n. 1, p. 27-36, 2005.

25

ZHANG, Z. B. et al. Comparison of phytase from genetically engineered *Aspergillus* and canola in weanling pig diets. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 11, p. 2868-2878, 2000.

CAPÍTULO 2. Super dose of phytase in diet of laying hens after 60 weeks of age

Capítulo apresentado de acordo com as normas da Journal of Applied Poultry Research.

Super dose of phytase in diet of laying hens after 60 weeks of age

F. L. J. F. Fabbri*, M. P. Reis*, M. C. Melaré*, L. Bittencourt†, L. V. Teixeira, N. K.

Sakomura*¹

**São Paulo State University, Jaboticabal, Brazil; †DSM Brazil, Mairinque, Sao Paulo, Brazil*

Primary Audience: Nutritionists, Poultry Technicians, Veterinarians

SUMMARY

The present study aimed to evaluate the effects of a regular and high dose of phytase in feeds given to commercial laying hens from 63 to 103 w-old. The treatments were: positive control (PC); negative control (NC, reducing 0.17 and 0.15 percentual points of Ca and avP); and NC + 600 or 1,200 FTU of phytase / kg of feed. The study investigates the responses of performance, egg quality, minerals in excreta, egg, and tibia, strength of tibia, body composition, and free inositol in plasma. Feed conversion of hens consuming phytase was improved in comparison to the hens consuming the NC feed ($P < 0.05$), however, no distinction was found between the levels of phytase on performance responses. The shell thickness changes with phytase supplementation and hens consuming the feed treatment NC + 600 FTU, produced eggs with thicker shell in comparison with PC group. The supplementation of phytase reduces the excretion of Ca and increase the concentration of Ca in tibia, with no difference regard phytase level. The

myoinositol content in plasma increased for hens consuming diets supplemented with phytase, which indicates a higher hydrolyses of phytate. The supplementation of 600 units of phytase per kg of feed is recommended for laying hens after the age of 63 weeks old, since no relevant results was observed when two times of this dose was used.

Keywords: phytate; inositol; enzymes; super dose; phosphorus; calcium.

DESCRIPTION OF PROBLEM

Currently, there is a tendency to keep laying hens for longer periods in production, without a forced molting, aiming an increase on profitability and sustainability (Bain et al., 2016). Despite the benefits of doing so, maintain the bone density (Whitehead, 2004) and egg quality of a flock of older hens still a challenge. Evidences demonstrate that in a flock of older hens there are individuals more propense to osteoporosis (Sandilands, 2011) and also an increase of eggs with thinner shell, due to lower ability to uptake calcium and phosphorus in the intestinal lumen (Al-Batshan et al., 1994).

In this sense, phytase has been extensively used in poultry production, it catalyzes the hydrolysis of phosphate from the inositol hexa-phosphate (IP6) molecule (Zyła et al., 2004) and increase the availability of phosphorus and calcium from vegetable ingredients. Studies demonstrated that IP6, and the esters formed after hydrolysis of phytate, have a potential to attach with other molecules such as Ca^{2+} and precipitate, reducing the availability of calcium and avoiding further action of phytase (Bedford and Rousseau, 2017). The supplementation of high dose of phytase in broiler chicken diets increase the hydrolysis of IP6, resulting in better performance of broilers (Walk et al., 2014).

Furthermore, the supplementation of high dose of phytase is related with an increase of myo-inositol in plasma (Greene et al., 2020) and evidences demonstrate the positive effects of myo-inositol for broilers (Lee, Nagalakshmi, Raju, Rama Rao, & Bedford, 2017), which is related with lipid metabolism, bone formation, skeletal muscle metabolism, reproduction and nervous system development (Gonzalez-Uarquin et al., 2020).

Despite the benefits of phytase observed for broilers, the advantages of using high dose of phytase supplementation for broilers may not be extrapolated to laying hens, since many differences surround those productive systems such as the feed composition given to broilers and laying hens. The level of calcium in the diet reduce the action of phytase (Van Der Klis et al., 1997; Tamim et al., 2004), and this is particularly important for laying hens, since the feeds have five to seven times the regular dose of calcium used in broiler chicken's feed, evidencing the necessity to better elucidate how laying hens will respond to high levels of phytase supplementation. The correct supplementation of phytase is needed, diminishing the raising of a new antinutritional factor and compensate the complex that phytate may produce with dietary calcium and other cations.

The aim of the current study was to evaluate a regular and high level of phytase supplementation on performance, egg quality, body composition, tibia and excreta composition and the levels of inositol in blood plasma of laying hens from 63 to 103 w-old.

MATERIAL AND METHODS

Ethical considerations

All procedures described herein were in accordance with the Ethical Committee on the Use of Animals of the School of Agrarian and Veterinary Sciences, São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brazil (Process 015173/17; approved on 05 October 2017).

Housing and experimental design

Four treatments were randomly distributed in eighty experimental units (cages, 45 x 100 x 40 cm) with eight laying hens each, in an environmentally controlled house, totaling three hundred and twenty white laying hens (High Line W-36) with 63 wk of age. The initial body weight and egg production were recorded during the four previously weeks, to improve the homogeneous distribution of laying hens between experimental units. The trial lasted 40 weeks (from 63 to 103 weeks), divided in ten cycles of 28 days each.

Experimental diets and water were provided *ad libitum* in feeders and nipple drinkers. Photoperiod was set as 16L:8D, and temperature and humidity were daily recorded by thermohydrometers positioned in three different spots of the poultry house. The maximum, minimum, and average temperatures in the entire period were 15, 28, and 22.8 °C, respectively. The measurements of humidity were 96, 17, and 70.6%, respectively for maximum, minimum and mean during 40 weeks (63 to 103 w-old).

Experimental diets and enzyme

Two diets were formulated, a positive control diet (PC) to meet or exceed the recommendations (Rostagno et al., 2017) and a negative control diet (NC) with a

reduction of 0.15, 0.17, and 0.016 percentual points of available P, Ca and sodium, respectively, according to phytase supplier recommendation.

The NC diet was supplemented with two levels of phytase (600 and 1200 FTU / kg of feed), performing a total of four treatments (PC, NC, NC + 600 FTU, and NC + 1200 FTU). One FTU is defined as the amount of phytase that liberates 1mmol of inorganic phosphate per minute from 0.0051 mol/L sodium phytate at pH 5.5 and at a temperature of 37 °C (AOAC, 2005). The enzyme used was Ronozyme HiPhos[®], a 6-phytase originated from *Citrobacter Braakii* and expressed in *Aspergillus oryzae* (DSM, São Paulo, Brazil). The composition of PC and NC feeds are presented in Table 1.

Performance and egg quality

Birds were weighed at the beginning and the end of trial. Egg production was daily recorded, whereas feed intake and egg weight were measured once a week. Egg output (egg production x egg weight) and feed conversion per egg output (feed intake / egg output) were calculated. At the end of each cycle, three eggs per experimental unit were collected during three days and analyzed using the Nabel Digital Egg Tester 6000[®] (Kyoto, Japan) for resistance, yolk color, albumen height, Haugh unit and shell thickness. Albumen, shell and yolk percentages were calculated weighting shell and yolk separately.

Body composition and tibia analysis

At the first day of the trial, one hen per replicate was randomly selected and identified to perform body composition analysis into a Discovery Wi[™] DXA (Hologic-QDR[®] model 13.4.2., Marlborough, USA), previously calibrated by a spine Phantom

made by acrylic and aluminum (Kelly et al., 1998). At the end of each cycle, selected hens were fasted for two hours, anesthetized with isoflurane (2%) diluted in 100% of oxygen. After anesthetized, birds were placed into scan as in dorsal decubitus with the wings and legs flexed. The scan was performed in the cranial-caudal direction, scanning the entire area covered by the bird in high resolution mode. The module used was “infant whole body” and at each scan the device software was calibrated with the information of each animal to be scanned (body weight and bird length). The scans provided measures of body ash (%), fat mass (g), lean mass (water + protein content, g), bone mineral content (g) and bone mineral density (g/cm^2). From the measures were calculated protein (%), fat (%) and water (%) content, according to equations described by (Alves et al., 2019).

At the end of the trial two birds per cage were randomly selected and euthanized for tibia analysis. Both tibias were collected, frozen and kept at -20°C . The tibias were defrosted for 24 hours to measure bone strength by the three-point mechanical flexion test using a Universal Mechanical Testing Machine (EMIC model DL 10.000, Parana, Brazil). The test was performed at a speed of 5 mm/min and a preload of 5N with accommodation time of 30s with a distance between the points of 60mm. The data collected by a computer directly coupled to the machine were expressed in maximum load in Newton (N) and then transformed into kilogram-force per square centimeter (kgf/cm^2), following the recommendations of ANSI / ASAE S459 MAR98.

After the analysis of strength, the same samples were defatted in petroleum ether (method 920.39) and grounded in a ball mill machine with closed chamber (MA 350) to further analysis of ash (method 942.05) and mineral contents (calcium, phosphorus,

copper, iron, manganese and zinc) by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP OES).

Excreta and plasma analysis

In the last three days of cycles 3, 6 and 9, excreta samples were collected using trays under the cages. The three-day samples from each cycle were then pooled and conserved under -20°C for further analysis of dry matter (method 934.01). After dried, samples were analyzed for mineral content (calcium, phosphorus, copper, iron, manganese and zinc) by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP OES).

One bird per replicate was randomly identified for blood collection at the same periods aforementioned. The blood sampling (approximately 4 mL) was collected using a disposable needle (0.8 x 30 mm) inserted into the ulnar vein. The blood was transferred to vacuum tubes containing heparin and maintained refrigerated. After blood collection, samples were centrifuged (Eppendorf model 5804, Sao Paulo, Brazil) at 3,000 x G at 4 °C for 10 minutes and the plasma was transferred to a 1.5 mL microtubes and send to the laboratory for myo-inositol content analysis. The myo-inositol were quantified using UHPLC-MS/MS, following the methods proposed by (Frierler et al., 2009), (Leung et al., 2011) and (Greene et al., 2020).

Statistical analysis

Data were analyzed as repeated measures by the PROC MIXED procedure using SAS (Statistical Analysis System, 2011) student, online version. The statistic consists

analyze the effect of phytase at different periods, in addition is determined the structure of the covariance matrix.

For the selection of the covariance matrix, the following structure was tested: ante-dependence (ANTE(1)), anteregressive (AR(1)), heterogeneous autoregressive (AHR(1)), ARMA (1,1), compound symmetric (CS), no factor analytic (FAO), factor analytic (FA), Huynh-Feldt (HF), Toeplitz (TOEP), heterogeneous Toeplitz (TOEPH), unstructured (UN), banded (UNAR) and variance components (VC). The best structure was determined using the Akaike information criterion. After select covariance matrix, an analysis of variance was performed considering the cycle as a repeated factor, testing for the effect of treatment, cycle and the interaction. The Tukey's test was applied to test for the differences between treatments.

RESULTS

There was no interaction between phytase supplementation and cycles for any response variables evaluated ($P > 0.05$), suggesting that the effect of phytase is independent of the age of the laying hen. Therefore, data is presented as the average calculated from the measurements taken on each cycle.

Cycle effects

There is a cycle effect ($P < 0.05$) for most of variables analyzed herein, and for those variables that were not observed a cycle effect a tendency ($P < 0.09$) is observed. The cycle effects are natural with hen's aging, with a decline on the productive and quality parameters.

Performance

The performance of laying hens consuming feed supplemented or not with phytase are showed in table 2. Feed intake, egg weight, rate of lay, and egg output did not change ($P > 0.05$) between groups, demonstrating that the reduction on Ca, avP and Na in the feed (NC) was not enough to affect statistically those response variables. Whatsoever, laying hens consuming the NC feed, increased FCR ($P < 0.05$) and the phytase supplementation was efficient to recover this variable ($P < 0.05$). The increase of phytase dose from 600 to 1,200 FTU / kg of feed, did not produce any improvements on performance ($P > 0.05$) of laying hens.

Egg quality

Laying hens consuming feed supplemented with 600 FTU / kg of phytase produced eggs with a thicker and strengthened egg-shell compared to the control group ($P < 0.05$) (Table 3), but the increment of phytase dose to 1,200 FTU / kg of feed reduced the strength of shell.

Analysis of excreta, egg, and tibia

The results of copper, iron, manganese, zinc, Ca, and P in excreta are shown in table 4. There was no difference in the excretion of Cu, Fe, Mn, Zn of laying hens fed distinct treatment feeds ($P > 0.05$). On the other hand, the excretion of Ca and P, was influenced by the reduction of Ca and P in the NC feed ($P < 0.05$). The supplementation of phytase reduces the excretion of Ca only at the level of 600 FTU / kg of feed ($P < 0.05$).

Mineral content in the egg (albumen and yolk) (table 5), laying hens consuming the NC feed demonstrate a higher concentration of Zn and P in the egg content compared to the PC group; however, the addition of phytase seems to not affect this response variable ($P < 0.05$). The minerals concentration evaluated on eggshell does not change between groups of hens consuming the experimental feeds ($P > 0.05$).

The mineral content in tibia is presented in table 6. The concentration of copper in tibia was higher for laying hens consuming the NC feed compared to hens supplemented with 1,200 FTU / kg ($P < 0.05$). The concentration of P in tibia improved with the supplementation of 1,200 FTU ($P < 0.05$), yet the concentration of Ca was improved by 600 FTU while it was not affected by 1200 FTU. Furthermore, laying hens consuming feeds with or without phytase have similar ash and strength in tibia ($P > 0.05$).

Body composition

The dietary treatments and supplementation of phytase did not influenced body composition and BMD of laying hens ($P > 0.05$) (table 7).

Inositol content on blood

Laying hens fed diets supplemented with phytase demonstrate a significant increase of inositol in plasma ($P < 0.05$) (Table 8). The supplementation of a higher dose of phytase (1,200 FTU / kg of feed) did not change the results compared to the laying hens receiving 600 FTU of phytase per kg of feed ($P > 0.05$).

DISCUSSION

Definition of “super dose” of phytase in laying hens is not a common sense among researchers. For this reason, in this study a “super dose” of phytase was defined as the double level recommended by the industry, herein the recommendation was 600 FTU / kg of feed, hence, 1200 FTU / kg of feed was assumed as a “super dose”. It is notable that the most recent studies on phytase in poultry have focused on evaluating the effects of high levels of phytase on diets, seeking for a “phytate-free nutrition” (Cowieson et al., 2016; Walk, 2016). Phytate and the esters formed from hydrolysis are reported to have antinutritional factor (Yu et al., 2012; Beeson et al., 2017), because the cations present in the intestinal lumen , such as Ca^{2+} , Zn^{+} , Mn^{+} , Fe^{2+} , Cu^{+} , and Na^{+} are able to attach to the negative charge of phytate and esters (Dersjant-Li et al., 2014). As a result, both cation and phytate will be unavailable to the animal and to phytase hydrolysis. Thus, maximize the hydrolysis of phytate is a recent topic among researchers (Pirgozliev et al., 2014), and high doses of phytase has being successfully used for such purpose in broiler chickens (Walk et al., 2014; Zeller et al., 2015; Beeson et al., 2017). In addition, an extra phosphoric effect has been attributed to phytase, especially when supplemented in high doses, such as the increase of myo-inositol in the plasma. Myo-inositol was proven to positively affect the growth of broilers (Lee et al., 2017) and, more recently, Greene et al. (2020) demonstrate that phytase supplementation increase the level of myo-inositol in bloodstream of broilers, but the literature is lacking on such subject for laying hens.

In this study, laying hens consuming feed with lower P and Ca (NC) without phytase, did not demonstrate a statistically change on egg output ($P = 0.20$) or feed intake ($P = 0.74$), but compared with hens consuming the PC feed the reduction was 3% in egg

output and 0.4% in feed intake. The response on egg output seems to be more related to rate of lay than egg weight, since the reduction on the rate of lay was 2% and on egg weight the difference was 1% (NC vs PC group), but the higher dose of phytase did not influence those variables, suggesting that or laying hens are less susceptible to high doses of phytase supplementation or the reduction of Ca and avP in NC diet was not sufficient to promote an acute deficiency, which was expected to be reverted by phytase supplementation. The last reason seems to be more reasonable since Meyer and Parsons (2011) using 0.108% of avP in laying hens diet from 23 to 28 w-old, observed a reduction on egg production, which was recovered with the inclusion of 150 FTU/kg of feed, but the higher dose of phytase (15,000 FTU/kg of feed) did not demonstrate further improvement. On the other hand, Kim et al. (2017) evaluating the supplementation of 10.000, 20.000 and 30.000 FTU / kg of feed with 3.91% of Ca and 0.26 % of avP for hens from 42 to 47 w-old, found that 20.000 FTU positively affected the egg production.

As cited before, calcium can reduce the effect of phytase, because in specific conditions of pH, ions of Ca^{2+} may attach to the phytate molecule, reducing the phytase activity considerably (Bedford & Rousseau, 2017). Diets given to laying hens with higher calcium: phosphorus ratio can affect the efficacy of phytase. This may also explain why we did not observe any improvement on the rate of lay for groups of hens supplemented with phytase. Furthermore, the reduction of available phosphorus in feed, have been related with an increase of the digestibility of this mineral (Liu et al., 2013), due to mechanisms related with vitamin D and parathormone (Proszkowiec-Weglarz and Angel, 2013). But, when the restriction is severe, laying hens may reduce the rate of lay (Boling et al., 2000; Meyer and Parsons, 2011). Because of that, in diets with low level of

available phosphorus, one may expect a reduction on feed intake, as described for broilers (Ravindran et al., 1995), however, in this study feed intake did not change between hens consuming the different diets. This result indicates that the level of phosphorus in the negative control feed (0.31%) was not sufficient to elicit an acute deficiency in laying hens, limiting the response of phytase. Whatsoever, laying hens consuming a feed with reduced level of Ca and P demonstrate an increase on feed conversion ratio per g of egg mass; thus, more feed was necessary to produce one unit of egg mass. The supplementation of phytase recovered the feed conversion ratio but kept the excretion of phosphorus lower than the positive control group and affect only numerically the deposition of phosphorus in egg content.

In this study, the reduction of Ca and P was sufficient to reduce the excretion of phosphorus to the environment, without a negative effect on body retention and egg production. Whatsoever, laying hens consuming a feed supplemented with phytase demonstrate an increase on P in bone, at both levels used (600 and 1.200 FTU/kg of feed). Furthermore, the quantification of Ca in the excreta indicate that a supplementation of 600 FTU / kg of diet reduces significantly the concentration of Ca excreted when compared with laying hens consuming the PC feed. At the same time, the concentration of Ca in the tibia increased in hens consuming a diet with 600 FTU of phytase, indicating that phytase supplementation improved the utilization of this mineral. On the other hand, the supplementation of 1,200 FTU / kg of diet did not change the excretion and retention of Ca in laying hens.

Previous studies (Lim, Namkung, & Paik, 2003; Liu et al., 2007) showed that the increase of Ca and P availability by exogenous phytase improved egg quality, mainly

eggshell strength and thickness. Similar responses were observed herein, supplementing 600 FTU / kg, whilst the 1200 FTU / kg reduced the shell quality of the eggs. Liu et al. (2007) reported an increase on shell thickness but not in the shell strength, the authors explains that shell thickness is more dependent of calcium carbonate, whereas shell strength is also influenced by the presence of organic materials and trace minerals in the shell. The results of trace minerals Cu, Fe, Mn, and Zn in the eggshell observed in this study confirm the findings of Liu et al. (2007). In contrast, Englmaierová, Skřivanová, & Skřivan (2014) reported a reduction on shell thickness of laying hens fed a diet with 4.1% of Ca and 0.17, 0.21 or 0.3% of avP, even when 150 FTU / kg were supplemented in the diet. In addition, high levels of phosphorus in the feed may lead to an increase of phosphorus in the bloodstream (Liu et al., 2013), which may compromise the activity of the carbonic anhydrase, an enzyme related to the eggshell formation (Cowieson A J, Bedford M R, Selle P, 2011). High dose of phytase is related to the increase of phosphorus availability, which could explain the reduction on egg shell quality from hens consuming higher doses of phytase, but more studies are necessary to clarify this observation since distinct results is found in literature (Kim et al., 2017).

The body composition analysis (Table 7) demonstrate that all measures change with hen's age, but phytase supplementation did not affect those variables. Considering the age of the hens used in this trial, 63 to 103 w-old, a change on body protein would be less influenced by the treatment feeds, especially because these birds are not growing, and the protein consumed is used for maintenance and egg production. Fat mass would follow the same fate, with the exception that fat deposition will occur despite protein deposition, in theory, the metabolizable energy consumed above the requirements of

maintenance and egg production would be deposited as fat with an efficiency of utilization. Thus, feed composition, feed intake, egg production, and the current state of the hen may interfere on this measure, but no statistical difference was observed between groups of hens. In the context of this study, bone mineral density and bone mineral content was used as an indicative of Ca and P mobilization from bone, to maintain egg production. Since the NC feed was formulated with lower levels of Ca and avP, one may expect that those minerals would be below laying hens' requirements, at least they were below recommendation (Rostagno et al., 2017; Guide-W-36, 2020); however, the results indicate that BMD and BMC measurements did not change between groups of laying hens. On the other hand, the analysis observed in this study indicate that laying hens consuming the NC feed reduced the concentration of P in tibia, whereas the supplementation of high level of phytase (1,200 FTU / kg of feed) was efficient to recover this variable.

The affinity of phytate to attach to cations was described before (Menezes-Blackburn et al., 2015). The pH of the intestine content and the amount of Ca in the feed affects considerably the affinity between phytate and cations (Li et al., 2016). Also, it was reported a reduction of the affinity between phytate esters and cations when the phytate has less than 3 phosphate groups, indicating an advantage to pursue an alternative that leads to an increase of phytate hydrolysis toward formation of inositol-phosphate-2. Supplement a feed with an extra dose of phytase, was proven to reduce the phytate when compared with the regular dose (Walk et al., 2014). Furthermore, higher dose of phytase is also related with the reduction of phytate esters, specially the inositol-phosphate 4 and 3 (Walk et al., 2014; Zeller et al., 2015). The myo-inositol is a product from a complete

hydrolysis of phytate, which could be used as an indicative of phytase activity (Greene et al., 2020). Inositol is related with the increase of gain in growing poultry, probably because it can act similarly as insulin, increasing the protein synthesis, but to our knowledge there is no evidence in literature that the myo-inositol could may have a positive effect for laying hens. In this study, the supplementation of phytase increase the myo-inositol in plasma, which may be related with the observed improvement on feed conversion ratio observed in this study when laying hens was supplemented with phytase but the mechanisms that explains this result needs to be elucidated.

CONCLUSION AND APPLICATIONS

1. The regular supplementation of phytase in the feed recover the feed conversion and eggshell quality, reduced the excretion and increase the retention of calcium in the bone of laying hens after 63 weeks old.
2. Higher dose supplementation did not improve performance and egg-shell quality but increase the concentration of P in tibia from 63 to 103 weeks old.
3. The increment of inositol in the plasma of laying hens supplemented with phytase, indicate a complete hydrolysis of phytate elicited by phytase supplementation, regardless the level used.

REFERENCE

- Al-Batshan, H. A., S. E. Scheideler, B. L. Black, J. D. Garlich, and K. E. Anderson.
1994. Duodenal calcium uptake, femur ash, and eggshell quality decline with age and increase following molt. *Poult. Sci.* 73:1590–1596.

- Alves, W. J., E. B. Malheiros, N. K. Sakomura, E. P. da Silva, G. da Silva Viana, M. de Paula Reis, C. A. Gonçalves, and R. M. Suzuki. 2019. In vivo description of body growth and chemical components of egg-laying pullets. *Livest. Sci.* 220:221–229.
- AOAC. 2005. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18th ed. AOAC Int., Arlington, VA.
- Bain, M. M., Y. Nys, and I. C. Dunn. 2016. Increasing persistency in lay and stabilising egg quality in longer laying cycles. What are the challenges? *Br. Poult. Sci.* 57:330–338.
- Bedford, M. R. 2010. *Enzymes in farm animal nutrition* (Bedford, Michael R, Partridge, Gary G, Ed.). 2 nd. CAB International, London.
- Bedford, M., and X. Rousseau. 2017. Recent findings regarding calcium and phytase in poultry nutrition. *Anim. Prod. Sci.* 57:2311–2316.
- Beeson, L. A., C. L. Walk, M. R. Bedford, and O. A. Olukosi. 2017. Hydrolysis of phytate to its lower esters can influence the growth performance and nutrient utilization of broilers with regular or super doses of phytase. *Poult. Sci.* 96:2243–2253.
- Bertechini, A. G. 2013. *Nutrição de monogástricos*. 2nd ed. Editora UFLA, Lavras.
- Boling, S. D., M. W. Douglas, M. L. Johnson, X. Wang, C. M. Parsons, K. W. Koelkebeck, and R. A. Zimmerman. 2000. The Effects of Dietary Available Phosphorus Levels and Phytase on Performance of Young and Older Laying Hens. *Poult. Sci.* 79:224–230.
- Cowieson A J, Bedford M R, Selle P, R. V. 2011. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics.

COWIESON, A. J., M. R. BEDFORD, P. H. SELLE, and V. RAVINDRAN. 2009.

Phytate and microbial phytase: implications for endogenous nitrogen losses and nutrient availability. *Worlds. Poult. Sci. J.* 65:401–418.

Cowieson, A. J., J. P. Ruckebusch, I. Knap, P. Guggenbuhl, and F. Fru-Nji. 2016.

Phytate-free nutrition: A new paradigm in monogastric animal production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 222:180–189.

Cowieson, A., P. Wilcock, and M. Bedford. 2011. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *Worlds. Poult. Sci. J.* 67:225–236.

Dersjant-Li, Y., A. Awati, H. Schulze, and G. Partridge. 2014. Phytase in non-ruminant animal nutrition: A critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *J. Sci. Food Agric.* 95:878–896.

Englmaierová, M., V. Skřivanová, and M. Skřivan. 2014. The effect of non-phytate phosphorus and phytase levels on performance, egg and tibia quality, and pH of the digestive tract in hens fed higher-calcium-content diets. *Czech J. Anim. Sci.* 59:107–115.

Frieler, R. A., D. J. Mitteness, M. Y. Golovko, H. M. Gienger, and T. A. Rosenberger. 2009. Quantitative determination of free glycerol and myo-inositol from plasma and tissue by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877:3667–3672.

Gonzalez-Uarquin, F., M. Rodehutsord, and K. Huber. 2020. Myo-inositol: its metabolism and potential implications for poultry nutrition—a review. *Poult. Sci.* 99:893–905.

Greene, E., B. Mallmann, J. W. Wilson, A. J. Cowieson, and S. Dridi. 2020. Monitoring

- Phytate Hydrolysis Using Serial Blood Sampling and Feather Myo-Inositol Levels in Broilers. *Front. Physiol.* 11:736.
- Guide-W-36. 2020. Management Guide for Hy-Line W-36.
- Kelly, T. L., N. Berger, and T. L. Richardson. 1998. DXA body composition: Theory and practice. Pages 511–513 in *Applied Radiation and Isotopes*. Elsevier Sci Ltd.
- Kim, J. H., F. M. Pitargue, H. Jung, G. P. Han, H. S. Choi, and D. Y. Kil. 2017. Effect of superdosing phytase on productive performance and egg quality in laying hens. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 30:994–998.
- Van Der Klis, J. D., H. A. J. Versteegh, P. C. M. Simons, and A. K. Kies. 1997. The Efficacy of Phytase in Corn-Soybean Meal-Based Diets for Laying Hens. *Poult. Sci.* 76:1535–1542.
- Lee, S. A., D. Nagalakshmi, M. V. L. N. Raju, S. V. Rama Rao, and M. R. Bedford. 2017. Effect of phytase superdosing, myo-inositol and available phosphorus concentrations on performance and bone mineralisation in broilers. *Anim. Nutr.* 3:247–251.
- Leung, K. Y., K. Mills, K. A. Burren, A. J. Copp, and N. D. E. Greene. 2011. Quantitative analysis of myo-inositol in urine, blood and nutritional supplements by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879:2759–2763.
- Li, W., R. Angel, S. W. Kim, K. Brady, S. Yu, and P. W. Plumstead. 2016. Impacts of dietary calcium, phytate, and nonphytate phosphorus concentrations in the presence or absence of phytase on inositol hexakisphosphate (IP6) degradation in different segments of broilers digestive tract. *Poult. Sci.* 95:581–589.

- Lim, H. S., H. Namkung, and I. K. Paik. 2003. Effects of phytase supplementation on the performance, egg quality, and phosphorous excretion of laying hens fed different levels of dietary calcium and nonphytate phosphorous. *Poult. Sci.* 82:92–99.
- Liu, J. B., D. W. Chen, and O. Adeola. 2013. Phosphorus digestibility response of broiler chickens to dietary calcium-to-phosphorus ratios. *Poult. Sci.* 92:1572–1578.
- Liu, N., G. H. Liu, F. D. Li, J. S. Sands, S. Zhang, A. J. Zheng, and Y. J. Ru. 2007. Efficacy of Phytases on Egg Production and Nutrient Digestibility in Layers Fed Reduced Phosphorus Diets. *Poult. Sci.* 86:2337–2342.
- Menezes-Blackburn, D., S. Gabler, and R. Greiner. 2015. Performance of Seven Commercial Phytases in an in Vitro Simulation of Poultry Digestive Tract.
- Meyer, E., and C. Parsons. 2011. The efficacy of a phytase enzyme fed to Hy-Line W-36 laying hens from 32 to 62 weeks of age. *J. Appl. Poult. Res.* 20:136–142.
- Nelson, David L.; Cox, M.-A. 2014. *Princípios de bioquímica de Lehninger* (DL Nelson and M Cox, Eds.). 6 ed. Artmed.
- Pirgozliev, V., M. Bedford, and S. Rose. 2014. Interaction between supplementary myo-inositol and phytase in poultry diets: effect on dietary phosphorus digestibility. Pages 14–15 in *British Poultry Abstracts*.
- Proszkowiec-Weglarz, M., and R. Angel. 2013. Calcium and phosphorus metabolism in broilers: Effect of homeostatic mechanism on calcium and phosphorus digestibility. *J. Appl. Poult. Res.* 22:609–627.
- Ravindran, V., E. T. Kornegay, D. M. Denbow, and Z. Yi. 1995. Response of broilers to graded levels of microbial phytase added to maize–soyabean-meal-based diets

- containing three levels of non-phytate phosphorus. *Br. J. Nutr.* 75:839–852.
- Rostagno, H. S., L. F. T. Albino, J. L. Donzele, P. C. Gomes, R. T. Oliveira, D. C. Lopes, A. S. Ferreira, S. L. de T. Barreto, and R. F. Euclides. 2017. Brazilian tables for poultry and swine. *Compos. Feed. Nutr. Requir.* 4rd ed. Brazil UFV Viçosa:488.
- Sandilands, V. 2011. Editorial: The laying hen and bone fractures. *Vet. Rec.* 169:411–412.
- Tamim, N. M., R. Angel, and M. Christman. 2004. Influence of dietary calcium and phytase on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chickens. *Poult. Sci.* 83:1358–1367.
- Walk, C. L. 2016. The influence of calcium on phytase efficacy in non-ruminant animals. *Anim. Prod. Sci.* 56:1345.
- Walk, C. L., T. T. Santos, and M. R. Bedford. 2014. Influence of superdoses of a novel microbial phytase on growth performance, tibia ash, and gizzard phytate and inositol in young broilers. *Poult. Sci.* 93:1172–1177.
- Whitehead, C. C. 2004. Overview of bone biology in the egg-laying hen. *Poult. Sci.* 83:193–199.
- Woyengo, T. A., and C. M. Nyachoti. 2013. Review: Anti-nutritional effects of phytic acid in diets for pigs and poultry – current knowledge and directions for future research. *Can. J. Anim. Sci.* 93:9–21.
- Yu, S., A. Cowieson, C. Gilbert, P. Plumstead, and S. Dalgaard. 2012. Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters (IP1-5) including IP5 isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin1. *J. Anim. Sci.* 90:1824–1832.

Zeller, E., M. Schollenberger, M. Witzig, Y. Shastak, I. Kühn, L. E. Hoelzle, and M.

Rodehutscord. 2015. Interactions between supplemented mineral phosphorus and phytase on phytate hydrolysis and inositol phosphates in the small intestine of broilers. *Poult. Sci.* 94:1018–1029.

Zyła, K., M. Mika, B. Stodolak, A. Wikiera, J. Koreleski, and S. Świątkiewicz. 2004.

Towards complete dephosphorylation and total conversion of phytates in poultry feeds. *Poult. Sci.* 83:1175–1186.

Table 1. Calculated diet composition and feed formulation.

Ingredients (%)	Diets (%)	
	PC	NC
Corn (7.88%)	58.27	59.97
Soybean Meal (45%)	25.40	25.10
Soybean oil	2.70	2.10
Dicalcium phosphate	1.99	1.18
Gross limestone	6.94	6.99
Thick limestone	3.74	3.76
Salt	0.23	0.23
Sodium Bicarbonate	0.26	0.20
DL-Methionine 99%	0.14	0.14
Inert ¹	0.01	0.01
Vitaminic and Mineral premix ²	0.30	0.30
Choline chloride 60%	0.03	0.03
	Nutrient composition (%) ³	
Crude protein	16.16 (16.04)	16.16 (16.21)
Metabolizable energy (kcal/kg)	2,786	2,784
Phytic acid	(0.38)	(0.29)
Available phosphorus	0.46	0.31
Total phosphorus	0.66	0.51
Calcium	4.59	4.42
Sodium	0.18	0.16
Potassium	0.63	0.63
Chlorine	0.18	0.18
Lysine dig.	0.76	0.76
Methionine + Cysteine dig.	0.59	0.59
Threonine dig.	0.55	0.55
Valine dig.	0.69	0.69
Tryptophan dig.	0.17	0.17
Arginine dig.	1.00	1.00

¹ Sand was used as the inert. The phytase was supplemented in substitution of the inert in the concentration of 0.005 for 600 FTU and 0.01 for 1,200 FTU/kg of feed.

² Vitamin A 8,000,000 UI, Vitamin D3 2,000,000 UI, Vitamin E 10,000 mg, Vitamin K3 1,600 mg, Vitamin B1 1,000 mg, Vitamin B2 3,000 mg, Pantothenic acid 8,000 mg, Vitamin B6 2,000 mg, Vitamin B12 10 mg, Niacin 18,000 mg, Folic acid 400 mg, Biotin 60 mg, Choline chloride 260 g, Iron sulfate 50 g, Copper sulfate 8,000 mg, Manganese sulfate 65 g, Zinc sulfate 60 g, Calcium iodate 1,200 mg, Sodium selenite 300 mg, BHT 20 g.

³ Values in parentheses represent the analyzed composition.

Table 2. Average performance of laying hens consuming feed supplemented or not with phytase from 63 to 103 weeks of age¹.

		Feed intake (g/bird/day)	Egg weight (g)	Rate of lay (%)	Egg output (g)	Feed conversion ratio (g/g) ¹
Treatments ²	Positive Control	103.9	68.1	82.5	55.9	1.86 a
	Negative Control	103.6	67.4	80.7	54.3	1.91b
	NC + 600 FTU	102.9	67.7	82.3	55.2	1.86 a
	NC + 1200 FTU	103.8	67.9	82.3	55.7	1.86 a
SEM ³		0.19	0.09	0.34	0.23	< 0.01
P-Value	Treatment	0.74	0.80	0.25	0.20	0.03
	Cycle	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
	Treatment x Cycle	0.57	0.35	0.90	0.58	0.16

¹ Mean of 10 cycles ²Distinct letter in the same column is significantly different by

Tukey's test.

² NC is negative control, FTU is phytase units.

³ Pooled standard error of the mean.

Table 3. Average egg traits of laying hens consuming feed supplemented or not with phytase from 63 to 103 weeks of age.

		Albumen height (mm)	Haugh Unit	Strength (kgf) ¹	Thickness (mm)	Yolk (%)	Shell (%)	Albumen (%)
	Positive Control	7.73	85.17	2.90 ab	0.333 b	25.79	8.72	65.58
Treatments ²	Negative Control	7.59	84.73	2.88 ab	0.336 ab	26.20	8.88	64.90
	NC + 600 FTU	7.55	84.30	3.09 a	0.343 a	25.63	8.94	65.38
	NC + 1200 FTU	7.65	84.99	2.86 b	0.334 ab	25.92	8.83	65.25
SEM ³		0.03	0.15	0.02	< 0.01	0.05	0.03	0.05
	Treatment	0.38	0.52	< 0.05	< 0.05	0.14	0.16	0.14
P-Value	Cycle	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.09
	Treatment x Cycle	0.31	0.09	0.92	0.38	0.67	0.55	0.99

¹ Distinct letter in the same column is significantly different by Tukey's test.

² NC is negative control, FTU is phytase units.

³ Pooled standard error of the mean.

1 Table 4. Main effects of mineral content of excreta of hens with 75, 87 and 99 weeks of age.

		Copper (mg/kg)	Iron (mg/kg)	Manganese (mg/kg)	Zinc (mg/kg)	Calcium (g/kg) ¹	Phosphorus (g/kg)
Treatments ²	Positive Control	46.1	831.9	251.6	326.0	116.2 a	20.4 a
	Negative Control	45.9	816.0	241.1	307.3	113.4 ab	15.7 b
	NC + 600 FTU	45.9	838.6	249.7	328.1	106.1 b	16.3 b
	NC + 1200 FTU	46.1	895.5	248.8	318.9	115.4 a	15.8 b
<i>SEM</i> ³		0.52	23.04	3.70	4.85	1.13	0.24
	Treatment	0.99	0.28	0.48	0.15	< 0.01	< 0.01
<i>p-value</i>	Cycle	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
	Treatment x Cycle	0.51	0.65	0.73	0.78	0.21	0.11

¹ Distinct letter in the same column is significantly different by Tukey's test.

² NC is negative control, FTU is phytase units.

³ Pooled standard error of the mean.

Table 5. Egg content (albumen + yolk) and eggshell mineral content measured at 75, 87 and 99 weeks of age.

		Copper (mg/kg)	Iron (mg/kg)	Manganese (mg/kg)	Zinc (mg/kg) ¹	Calcium (g/kg)	Phosphorus (mg/kg)
		Egg content (albumen + yolk)					
Treatment ²	Positive Control	3.97	60.0	2.50	47.6 b	2.57	7.78 b
	Negative Control	4.09	60.9	2.70	50.8 a	2.66	8.50 a
	NC + 600 FTU	3.74	63.0	2.50	48.9 ab	2.59	8.11 ab
	NC + 1200 FTU	3.88	64.1	2.70	49.8 ab	2.63	8.12 ab
SEM ³		0.05	0.64	0.09	0.56	0.02	0.11
<i>p</i> -value	Treatment	0.21	0.07	0.88	0.04	0.19	0.02
	Cycle	< 0.01	< 0.01	0.08	< 0.01	< 0.01	< 0.01
	Interaction	0.19	0.21	0.84	0.7	0.42	0.13
		Eggshell					
Treatment	Positive Control	2.26	3.73	1.03	3.32	353.8	0.694
	Negative Control	2.24	3.82	0.99	3.13	358.7	0.700
	NC + 600 FTU	2.27	4.04	1.20	3.42	360.8	0.713
	NC + 1200 FTU	2.16	3.73	1.05	3.51	357.9	0.701
SEM		0.05	0.08	0.09	0.13	1.09	0.008
<i>p</i> value	Treatment	0.62	0.55	0.76	0.48	0.52	0.82
	Cycle	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
	Interaction	0.59	0.62	0.86	0.86	0.98	0.86

¹ Distinct letter in the same column is significantly different by Tukey's test.

² NC is negative control, FTU is phytase units.

³ Pooled standard error of the mean.

Table 6. Strength and mineral content in tibia bone from 103 week-old laying hens.

Treatments ²	Strength (kgF/cm ²)	Copper (mg/kg)	Iron (mg/kg)	Manganese (mg/kg)	Zinc (mg/kg)	Calcium (g/kg) ¹	Phosphorus (g/kg)
Positive Control	14.09	1,79 ab	23.35	4.12	105.9	219.7 ab	106.9 b
Negative Control	13.95	2,03 a	25.08	4.32	103.5	216.3 b	106.6 b
NC + 600 FTU	14.53	1,82 ab	24.52	4.38	109.2	225.8 a	105.5 b
NC + 1200 FTU	14.28	1,66 b	24.18	4.13	106.1	218.3 b	113.3 a
SEM ³	0.12	0.05	0.62	0.08	1.08	0.68	1.77
<i>p-value</i>	0.81	< 0.05	0.79	0.66	0.32	< 0.05	<0.001

¹ Distinct letter in the same column is significantly different by Tukey's test.

² NC is negative control, FTU is phytase units.

³ Pooled standard error of the mean.

1

Table 7. Body composition of laying hens consuming feed supplemented or not with phytase from 63 to 103 weeks of age¹.

		Ash (%)	Fat (%)	Protein (%)	Water (%)	Fat mass (g)	Lean mass (g)	BMD (g/cm ²)	BMC (g)
Treatments ¹	Positive Control	3.66	15.59	17.57	62.44	284.9	1182	0.161	32.74
	Negative Control	3.60	16.28	17.44	62.10	317.9	1225	0.161	34.45
	NC + 600 FTU	3.62	16.19	17.47	62.23	307.0	1218	0.160	33.91
	NC + 1200 FTU	3.64	15.91	17.52	62.41	294.4	1185	0.158	32.91
SEM ²		< 0.01	0.13	0.05	0.05	4.34	5.12	< 0.01	0.23
	Treatment	0.86	0.88	0.98	0.84	0.76	0.57	0.95	0.75
P-Value	Cycle	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
	Treatment x Cycle	0.88	0.49	0.19	0.37	0.35	0.42	0.62	0.67

¹ NC is negative control, FTU is phytase units.

² Pooled standard error of the mean.

Table 8. Myo-inositol content in plasma of laying hens collected at 75, 87 and, 99 weeks of age.

		Plasma [$\mu\text{mol/L}$]¹
Treatments ²	Positive Control	113.3 b
	Negative Control	115.8 b
	NC + 600 FTU	159.1 a
	NC + 1200 FTU	168.0 a
SEM ³		3.51
<i>p value</i>	Treatment	< 0.01
	Cycle	0.0726
	Interaction	0.0544

¹ Distinct letter in the same column is significantly different by Tukey's test.

² NC is negative control, FTU is phytase units.

³ Pooled standard error of the mean.