

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**NÍVEIS DE SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE PARA GALINHAS
POEDEIRAS**

**Thaila Fernanda de Moura
Zootecnista**

2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**NÍVEIS DE SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE PARA GALINHAS
POEDEIRAS**

Discente: Thaila Fernanda de Moura

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.

2022

M929n Moura, Thaila Fernanda
Níveis De Suplementação De Fitase Para Galinhas Poedeiras /
Thaila Fernanda Moura. -- Jaboticabal, 2022
65 p.

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

Orientadora: Nilva Kazue Sakomura

Coorientadora: Matheus de Paula Reis

1. Nutrição Animal. 2. Alimentação e rações. 3. Ovos Produção. 4.
Aves domésticas. 5. Alimentos aditivos. 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).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: NÍVEIS DE SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE PARA GALINHAS POEDEIRAS

AUTORA: THAILA FERNANDA DE MOURA

ORIENTADORA: NILVA KAZUE SAKOMURA

COORIENTADOR: MATHEUS DE PAULA REIS

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

Profa. Dra. NILVA KAZUE SAKOMURA (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV UNESP Jaboticabal

Prof. Dr. LUCIANO HAUSCHILD (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Pesquisadora Dra. DANIELLA CAROLINA ZANARDO DONATO (Participação Virtual)
Dupont Brasil / Paulínia/SP

Jaboticabal, 15 de agosto de 2022

DADOS CURRICULARES

THAILA FERNANDA DE MOURA, filha de Antonio Airton de Moura Junior e Noemia Maria da Silva Moura, nascida no dia 11 de junho de 1989 em São Paulo, São Paulo. Ingressou no curso de Zootecnia na Universidade de São Paulo – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Campus de Pirassununga, em março de 2009. Em julho de 2014 obteve o título de Zootecnista. Trabalhou 3 anos em uma empresa de nutrição animal e em março de 2020 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 agosto de 2022.

Dedico

Ao meu pai Junior, pela força e compreensão desde o início dessa caminhada e por sempre acreditar em mim. Aos meus irmãos Lucas, Daniel e Leticia pelo amor e carinho e à minha Madrinha Lena, por ser a pessoa que sempre me ensinou a ver alegria nas coisas mais difíceis. A minha amiga Lis (Faísca) pela paciência e por estar sempre ao meu lado me apoiando.

AGRADECIMENTOS

Um trabalho de mestrado é uma curta viagem, mas é um projeto para a vida. Essa trajetória inclui inúmeros desafios, tristezas, incertezas e algumas alegrias. Trilhar este caminho só foi possível com o apoio, energia e força de algumas pessoas, a quem agradeço do fundo do coração.

À minha amiga de sempre, Lis Chacon Xavier (Faísca), agradeço todo o apoio e motivação incondicional que me ajudou a enxergar esse período como uma experiência com muito aprendizado. Sou muito sortuda por tê-la como amiga.

Ao Vinicius Bruzeguez, pelos conselhos, total disponibilidade e encorajamento naqueles momentos cruciais desta difícil jornada, bem como pelas críticas construtivas contribuindo para o aperfeiçoamento do trabalho.

A meu Pai Junior, por estar ao meu lado todos estes anos, mesmo em seus momentos mais difíceis. Ao Lucas, meu eterno neném, que tentou me fazer rir, para não me deixar chorar. A minha madrinha, tia Lena, por todo apoio que me permitiu a realização de um sonho.

Ao meu coorientador, Doutor Matheus de Paula Reis por toda a ajuda e compreensão. E nessa trajetória construímos uma amizade que espero levar para sempre. Sua contribuição foi essencial para a concretização dessa pesquisa. Muito obrigada!

A minha orientadora, Professora Doutora Nilva Kazue Sakomura, que agradeço a orientação pautada por um elevado e rigoroso nível científico, os quais contribuíram para enriquecer, com grande dedicação, passo por passo, todas as etapas subjacentes ao trabalho realizado.

Aos amigos que fiz durante essa caminhada: Palloma, Guilherme, Raully, Freddy, Thais e Marcio que sempre estiveram do meu lado e que espero levar para a vida toda.

Aos colegas do aviário que participaram incondicionalmente na realização desse experimento: Luis, Bruno, Rosiane, Rony, Amanda, Gabriela, Leticia, Robson e seus filhos, estagiários e ao pessoal de iniciação científica. Enfim, muito obrigada pela inestimável ajuda.

A Danisco Animal Nutrition & Health pelo apoio financeiro ao estudo, ao Bello e Daniella pelo apoio técnico durante a condução do experimento.

Aos membros da minha banca de qualificação e defesa, Professor Luciano e Dani muito obrigada pela contribuição, com certeza ajudaram a enriquecer minha tese.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, pela estrutura e acolhimento, sendo minha segunda casa nesses dois anos.

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

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.1. Introdução à revisão da literatura	1
1.2. Absorção e metabolismo do fósforo	2
1.3. Qualidade óssea em galinhas poedeiras	4
1.4. Fitato para aves	6
1.5. Fitase	8
1.6. Tipos de fitase	10
1.7. Doses de fitase em dietas de poedeiras	11
1.8. Referências	12
CAPÍTULO 2 – A bacterial 6-phytase recovered the responses of laying hens given an inorganic phosphorus-free diet	21
ABSTRACT	23
INTRODUCTION	24
MATERIAL AND METHODS	25
<i>Animals, housing and experimental design</i>	26
<i>Experimental feeds</i>	26
<i>Performance and egg quality</i>	28
<i>Body composition and tibia analysis</i>	29
<i>Statistical analysis</i>	30
RESULTS	31
<i>Hen performance and egg quality</i>	31
<i>Body composition and tibia analysis</i>	33
DISCUSSION	34
CONCLUSION	38
ACKNOWLEDGMENTS	38
REFERENCES	39
CAPÍTULO 3 – IMPLICAÇÕES	52

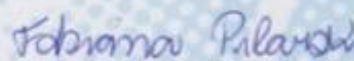
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Efeito da suplementação da fitase sobre a Digestibilidade dos nutrientes e o desempenho de poedeiras", protocolo nº 5396/20, 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 11 de fevereiro de 2021.

Vigência do Projeto	30/12/2020 a 10/08/2021
Espécie / Linhagem	<i>Gallus gallus domesticus</i> / Hy-line W80
Nº de animais	560
Peso / Idade	1,3 kg / 17 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	Granja Mayra, Pedralva – Minas Gerais

Jaboticabal, 16 de fevereiro de 2021.



Profa. Dra. Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

NÍVEIS DE SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE PARA GALINHAS POEDEIRAS

RESUMO

Uma estratégia nutricional para suprir as necessidades de fósforo (P) em monogástricos é alcançada pelo fornecimento de fontes inorgânicas como o fosfato bicálcico, porém as fontes de fósforo inorgânicas são finitas. Outra estratégia nutricional trata da liberação do fósforo ligado à molécula de fitato, que, além de ter baixa digestibilidade, leva à formação de complexos com outros nutrientes. Dessa forma, os nutricionistas utilizam a enzima fitase para liberar parte do P limitando a influência negativa do fitato. Atualmente, o uso de doses de fitase acima do recomendado, além de permitir reduzir o uso de fontes minerais de fósforo, hidrolisa de forma mais eficiente o P da molécula de fitato em alimentos vegetais. Devido à preocupação com o esgotamento das fontes minerais de fósforo, a retirada total dessa fonte mineral juntamente com o aumento da dose de fitase acima do seu nível recomendado se tornará uma estratégia nutricional futura. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da fitase sobre a produtividade de ovos, qualidade da casca e composição corporal de poedeiras alimentadas com dietas isentas de fósforo inorgânico e com níveis reduzidos de energia e nutrientes de 23 a 72 semanas de idade. Um total de 560 Hy-Line W80 (4 galinhas/gaiola × 28 réplicas de gaiola por tratamento) foram distribuídos aleatoriamente em cinco tratamentos experimentais. Uma dieta controle positivo (PC) foi formulada para conter os níveis recomendados de energia e nutrientes. Uma dieta basal (controle negativo, NC) foi formulada para conter 0,12% de fósforo disponível (avP) e com níveis reduzidos de energia e nutrientes em comparação com a ração PC. A fitase foi suplementada na dieta NC a 300, 600 e 900 FTU/kg de ração. As respostas avaliadas foram desempenho, qualidade dos ovos, composição corporal e composição da tíbia. Os dados foram analisados em medidas repetidas no tempo, contendo dois fatores (suplementação de fitase e tempo). Contrastes ortogonais e polinomiais foram aplicados para investigar as respostas das galinhas poedeiras com 5% de probabilidade. No geral, o consumo de ração, a taxa de postura e a massa de ovos foram afetados pela redução do avP da dieta ($P < 0,05$), e os níveis crescentes de suplementação de fitase recuperaram essas respostas. As poedeiras que consumiram a ração NC com 900 FTU de fitase produziram mais ovos por ave alojada e ovos comercializáveis. A composição corporal não foi afetada pela redução do avP ($P > 0,05$). Durante as primeiras 12 semanas de experimento, o desempenho das galinhas consumindo a dieta NC foi severamente afetado e a suplementação com fitase foi eficiente em minimizar esses efeitos. Recomenda-se a suplementação de 900 FTU de fitase para melhorar o número de ovos produzidos por ave e o número de ovos comercializáveis para galinhas poedeiras de 23 a 72 semanas de idade.

Palavras-chave: doses, digestibilidade, fósforo, mineralização óssea.

PHYTASE SUPPLEMENTATION LEVELS FOR LAYING HENS

ABSTRACT

A nutritional strategy to meet the phosphorus requirements in monogastric is achieved by the supply of inorganic phosphorus sources such as dicalcium phosphate, but the global sources of dicalcium phosphate are finite. Another nutritional strategy deal with the releasing of the phosphorous bound to the phytate molecule, which, in addition to having low digestibility, leads to the formation of complexes with other nutrients. In this way, nutritionists use the enzyme phytase to release part of the phytate P, limiting the negative influence of phytate. Nowadays, the use of phytase doses above recommended levels, besides allowing reduce the use of phosphorous mineral sources, hydrolyzes more efficiently the P from the phytate molecule in vegetal feedstuffs. Due to the concern about inorganic phosphorous sources, the total withdrawal of this mineral source together with an increase in phytase dose above their recommended level, will become a future nutritional strategy. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of phytase over egg productivity, eggshell quality, and body composition of laying hens fed with an inorganic phosphorus-free diet reduced in energy and nutrients from 23 to 72 weeks of age. A total of 560 Hy-Line W80 (4 hens/cage × 28 cage replicates per treatment) were randomly assigned to five experimental treatments. A positive control feed (PC) was formulated to contain the recommended levels of energy and nutrients. A basal negative control feed (NC) was formulated to contain 0.12% of available phosphorus (avP) and reduced energy and nutrients in comparison with PC feed. Phytase was supplemented in the NC feed at 300, 600, and 900 FTU/kg of feed. The responses evaluated were performance, egg quality, body composition, and tibia composition. Data were analyzed by a two-factor repeated measure analysis and orthogonal and polynomial contrasts were applied to investigate the responses of laying hens with 5% probability. Overall, the feed intake, rate of lay, and egg mass were affected by the reduction in dietary avP ($P < 0.05$), and the crescent levels of phytase supplementation recovered those responses. Laying hens consuming the NC feed with 900 FTU of phytase produced more eggs per hen-housed and marketable eggs. The body composition was not affected by dietary avP reduction ($P > 0.05$). During the first 12 weeks of trial, the performance of hens in the negative control treatment was severely affected and phytase supplementation was efficient in minimizing those effects. The supplementation of 900 FTU of phytase is recommended to improve the number of eggs produced per hen-housed and the number of marketable eggs produced through 23 to 72 weeks of age.

Keywords : Digestibility, phosphorus, calcium, phytase, bone mineralization.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. Introdução à revisão da literatura

O fósforo (P) é um mineral essencial na produção de galinhas poedeiras devido à sua participação expressiva na formação do ovo, além de estar envolvido em muitas funções no desenvolvimento animal, incluindo metabolismo energético e mineralização óssea (Raina et al., 2012, Nie et. al 2018). Cerca de 80% do P é armazenado no complexo mineral hidroxiapatita $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (Neuman e Neuman, 1953; Veum et al., 2010), fazendo parte da estrutura da matriz óssea, o que permite ser disponibilizado quando necessário. No metabolismo, esse mineral forma parte do ATP para o fornecimento de energia, manutenção do pH e fluidos corporais, promovendo controle da acidose sanguínea, mantendo estável as concentrações de bicarbonato e, por consequência, na formação da casca do ovo (Pelicia et al., 2009).

Tanto as exigências de P da ave, quanto à valorização de P nos ingredientes são apresentados como P disponível (Pd), desse modo, definir valores de exigência de Pd das aves através do aporte Pd dos ingredientes é prioridade para formular dietas que atendam os parâmetros produtivos sem prejuízos econômicos e ambientais. De acordo com Rostagno et al. (2017) a exigência dietética de Pd é de 368 mg/d por galinha. No entanto, ao longo dos anos, grande parte das pesquisas mostraram reduções nas necessidades de Pd, que não afetam parâmetros de desempenho, podendo variar entre 168 e 225 mg Pd/galinha/dia (Keshavarz e Nakajima, 1993; Meyer e Parsons, 2011; Jing et al., 2018; Fernandez et al., 2019). Paralelamente a isso, cerca de 70% do P nos ingredientes utilizados na alimentação de aves está na forma de P fítico (Boling al., 2000), que é pouco disponível devido à sua baixa digestibilidade, principalmente pela formação de complexos cátion-fitato (Wise e Gilbert, 1981), além dos seus efeitos antinutricionais (Woyengo e Nyachoti, 2013).

A baixa disponibilidade do fósforo fítico (PP), assume importância quando fontes minerais de P precisam ser adicionadas à dieta para atender às exigências de P das aves, porém, as reservas mundiais de fosfato rochoso não são renováveis, o que poderia

levar a uma crise de suprimento de P no futuro (Boling et al., 2000; Ahmadi & Rodehutschord, 2012; Jing et al., 2018). Portanto, estratégias nutricionais como o uso de fitase, para hidrolisar o PP, reduziram a suplementação mineral de P inorgânico, e, conseqüentemente, a preservação das reservas globais de P, além de neutralizar a influência negativa do fitato (Van Der Klis et al., 1997; Maenz, 2001; Péron e Partridge, 2009).

O nível padrão de inclusão de fitase exógena adicionada à maioria das dietas de poedeiras é de 300 FTU/kg (Dersjant-Li et al. 2015); paralelamente a isso, doses superiores (5 a 20 vezes o nível padrão) de fitase em dietas de frango de corte sob condições experimentais tem demonstrado consistentemente aumentar a liberação de fosfatos e nutrientes (Walk e Olukosi, 2019). No entanto, em poedeiras o uso de doses acima do comumente utilizado sob condições experimentais mostraram resultados inconsistentes (Skřivan et. al., 2018; Javadi et al., 2021). Visto que há uma preocupação ambiental pela excreção de P nas excretas somado á constante redução das reservas de fosfatos, retirar o P de fontes minerais e aproveitar a maior quantidade de PP nos ingredientes é uma necessidade atual, portanto o objetivo do presente estudo foi avaliar a suplementação de doses crescentes de fitase em dietas livre de fontes de P inorgânico em galinhas de 23 a 72 semanas no desempenho, qualidade de ovo, digestibilidade de nutrientes e composição corporal.

1.2. Absorção e metabolismo do fósforo

Os mecanismos de absorção, excreção e deposição do P, estão diretamente ligados aos de Ca, são complexos e não estão completamente elucidados. A absorção de P e Ca ocorrem no intestino delgado por vias paracelulares e transcelulares (Bronner, 1987; Sabbagh et al., 2011; Christakos et al., 2014). Paracelular é uma via de absorção passiva para o Ca e P, e é caracterizada pela junção estreita intercelular (Gloux et al., 2019) ocorrendo em todo o intestino delgado (Bronner, 1987; Proszkowiec-Weglarczyk e Angel, 2014). Na via transcelular, a absorção do Ca é um processo de transporte mediado por calbindina, dependente de vitamina D, requer energia metabólica, e ocorre principalmente no duodeno e jejuno (Bronner, 1987; Bronner e Pansu, 1999; Gloux et al.,

2019); enquanto, a absorção de P é mediada predominantemente por um sistema de co-transporte de sódio (transportador NaPi IIb) (Murer et al., 2001; Yan et al. al., 2007; Jing et al., 2018). Alguns estudos codificaram transportadores de fósforo sódio-dependente (NaPi) e estes foram identificados e classificados em Tipo I, II e III (Takeda et al., 1999). O co-transportador NaPi Tipo I foi encontrado no cérebro e no rim e o NaPi tipo III, no intestino e no rim, no entanto esses tipos de transportadores não apresentam clareza no mecanismo de atuação, já o tipo II está diretamente envolvido tanto da absorção intestinal como na reabsorção a nível renal. (Takeda, et al., 1999). Porém, o co-transportador tipo II é subdividido em tipo IIa e IIb (Werner and Kinne, 2001). O tipo IIa é expresso nos rins e o IIb é expresso predominantemente no intestino delgado, sendo mais elevada sua expressão no duodeno, seguido pelo jejuno e mais baixo no íleo (Murer et al., 2001; Sabbagh et al., 2009; Hu et al., 2018; Proszkowiec-Weglarz et al., 2019). O NaPi-IIb é responsável por 90% do transporte transcelular dependente de sódio (Sabbagh et al., 2009). A inibição da expressão intestinal de NaPi-IIb levaria a um aumento da excreção de fósforo. A figura 1 mostra quando há deficiência dietética de P e ocorre regulação positiva de NaPi-IIb no intestino delgado e no rim (Proszkowiec-Weglarz e Angel, 2014). Em galinhas consumindo ração com nível adequado de P, o transporte paracelular é o principal mecanismo de absorção de P, enquanto o processo transcelular é predominante em galinhas submetidas a baixo consumo de P (Sabbagh et al., 2009; Hu et. al., 2018).

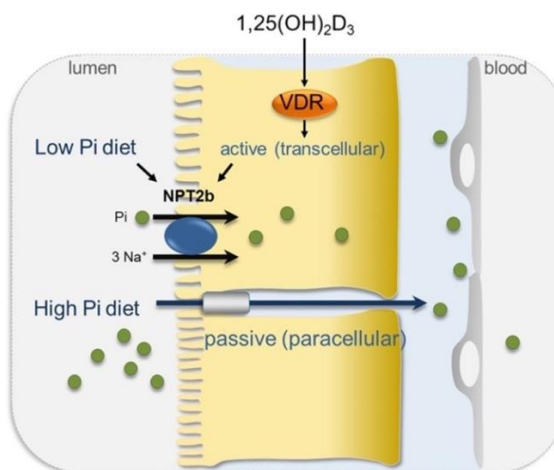


Figura 1. Absorção intestinal de fosfato. Considera-se que uma grande fração da ingestão de fosfato dietético é transportada por uma via passiva (paracelular). A via ativa (transcelular) consiste no NaPi II localizado na membrana da borda em escova apical intestinal. A expressão deste transportador é aumentada em $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e quando a ingestão dietética de fosfato é baixa. VDR = receptor de vitamina D (Christakos et al., 2014).

As variações no equilíbrio de Ca e P são dependentes dos níveis plasmáticos de Ca^{2+} e fosfato, que são modulados por hormônios, como o paratormônio (PTH), metabólitos da vitamina D e calcitonina. Quando os níveis plasmáticos de Ca^{2+} ou fosfato diminuem (hipocalcemia ou hipofosfatemia, respectivamente), o hormônio PTH é secretado no sangue pelas glândulas paratireoides, o que aumentará a ativação da vitamina D no rim (Elaroussi et al., 1994). Tanto o PTH quanto a vitamina D ativa aumentarão a reabsorção óssea, e a vitamina D reduz a excreção de Ca no rim e aumenta a absorção no intestino (Pelicia et al., 2009). Essas ações em conjunto comprovadamente aumentam os níveis sanguíneos de Ca e aumentam a excreção de P (Proszkowiec-Weglarz e Angel, 2014). Tanto a vitamina D quanto o baixo teor de P na dieta aumentam a atividade de NaPi no intestino delgado (Yan et al., 2007; Sabbagh et al., 2009; Omara et al., 2020).

1.3. Qualidade óssea em galinhas poedeiras

O osso é essencial para fornecer suporte estrutural ao corpo e auxiliar na locomoção (Kerschnitzki et al., 2014). Além de desempenhar um papel essencial na regulação dos níveis sanguíneos de Ca e P através do mecanismo de remodelação óssea (Shahnazari et al., 2006). As células responsáveis pela formação, modelagem e remodelação óssea são chamadas de osteoblastos e os osteoclastos. Os osteoblastos, são as células formadoras de osso, pois produzem uma matriz orgânica composta por colágeno tipo I, proteínas não-colágenas e lipídios, além de acumular íons Ca^{2+} e $\text{PO}_4(3-)$, resultando na formação de cristal de hidroxiapatita (Kerschnitzki et al., 2014). Já os osteoclastos, são células de reabsorção óssea e reabsorção óssea osteoclástica acoplada à formação óssea osteoblástica resulta no desenvolvimento da rede irregular de tecidos ósseos trabeculares (Pines e Hurwitz, 1991; Whitehead, 2004).

Existem três tipos diferentes de tecidos ósseos, incluindo osso cortical, trabecular e medular nos ossos longos, esterno, costela, púbis e escápula (Taylor e Moore, 1953). O osso cortical é a casca externa dos ossos e possui uma alta concentração mineral e são altamente organizados (Kerschnitzki et al., 2014). O osso trabecular é o componente estrutural interno com menos densidade do que o osso cortical (Casey-Trott et al., 2017;

Bello, 2018). Quando os tecidos ósseos estruturais atingem sua extensão máxima, os osteoblastos começam a produzir um tecido chamado osso medular, geralmente entre 10 e 14 dias antes do início da maturidade sexual (Taylor e Dacke, 1984; Fleming et al., 1998; Whitehead, 2004). O osso medular aparece como espículas nas superfícies ósseas estruturais e dentro das cavidades medulares de ossos longos, como úmero, fêmur e tíbia (Whitehead, 2004; Kerschnitzki et al., 2014), mas também no esterno, costela, púbis e escápula (Taylor e Moore, 1953). O osso medular tem partículas minerais menos organizadas do que o osso cortical (Kerschnitzki et al., 2014). É uma forma única de osso lábil que atua como um reservatório de Ca para as demandas de formação da casca do ovo durante o período de postura (Dacke et al., 1993; Kerschnitzki et al., 2014).

De acordo com Kim et al. (2017) a tíbia de uma galinha com consumo de nutrientes adequado contém osso medular denso, enquanto o osso medular de uma galinha com deficiência apresenta-se mais escasso, indicando que o osso medular é um componente lábil e suscetível à reabsorção óssea em galinhas poedeiras. O Ca e P ósseo podem apoiar a formação da casca do ovo quando alimentadas com baixo teor de Ca e Pd, o que significa que a qualidade da casca do ovo pode não ser um bom preditor da qualidade óssea. Muitos estudos indicam que as galinhas mantiveram uma boa qualidade da casca do ovo em detrimento da qualidade óssea quando alimentadas com dietas reduzidas em Ca e Pd (Hughes et al., 2009; Cufadar et al., 2011; Bello et al., 2020; Pongmanee et al., 2020). Portanto, a avaliação da qualidade óssea, juntamente com o monitoramento da produção de ovos e a medição da qualidade da casca dos ovos em galinhas poedeiras são úteis a longo prazo.

As avaliações da mineralização óssea podem envolver métodos invasivos e não invasivos. Métodos invasivos, como medições de cinzas óssea ou abate comparativo (Sakomura e Rostagno, 2016), são simples, rápidas e menos dispendiosas, enquanto método não invasivo, como o a absorciometria de raio-X de dupla energia (DXA – Dual Energy X-Ray Absorptiometry) permite que as aves sejam mantidas vivas ao longo do todo o ciclo de produção. Cada método seja ele invasivo ou não apresenta vantagens e limitações, portanto, a avaliação da qualidade óssea usando métodos invasivos em conjunto com técnicas não invasivas é útil para fornecer uma imagem mais abrangente

do metabolismo e mineralização óssea ao longo do ciclo de produção. Dentre os métodos invasivos, pode-se destacar o uso do teor de cinzas de osso, avaliando o conteúdo mineral específico de um osso (como P e Ca), análise química amplamente utilizadas para determinar a qualidade do osso em poedeiras (Hughes et al., 2009; Lei et al., 2011; Bello e Korver, 2019). No caso dos métodos não invasivos, DXA é uma técnica para estudo de densitometria óssea e é comumente usada para avaliar a composição corporal e alterações na composição corporal. O DXA fornece a massa gorda, massa magra e teor mineral ósseo, além das medidas de densidade mineral óssea (Schreiweis et al., 2005). E através das equações descritas por Alves et al., (2019) é possível calcular os teores de proteína (%), gordura (%) e água (%) no corpo do animal. Em geral, essas medidas são cruciais para interpretar os efeitos dos tratamentos sobre esses parâmetros ósseos em galinhas poedeiras ao longo do período.

1.4. Fitato para aves

As terminologias fitato ou ácido fítico são usadas na literatura para descrever o substrato das enzimas fitase. Na figura 2, o fitato, segundo Selle e Ravindran (2007), refere-se ao sal misto de ácido fítico, enquanto o ácido fítico é a forma livre do IP6 (*mio*-inositol hexafosfato). Esta molécula é a principal forma de armazenamento de fósforo nos ingredientes vegetais usados nas rações de aves contendo 2,5 a 4,0 g kg⁻¹ de P fítico (PP, Ravindran, 1995). O ácido fítico, composto altamente ionizado, complexa com uma variedade de cátions como o cálcio (Ca), cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e magnésio (Mg) e a fração protéica do alimento, formando complexos insolúveis, diminuindo a energia metabolizável da ração devido a influência negativa na digestão dos nutrientes (Scottá et al., 2014; Bertechini, 2006), portanto é considerado um fator antinutricional.

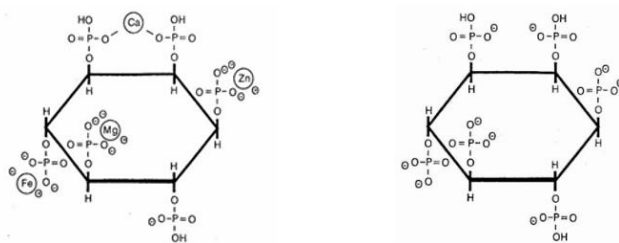


Figura 2. Estrutura do fitato (esquerda) e ácido fítico (direita).

O fitato em pH abaixo de 1,0 será carregado de maneira neutra e, portanto, relativamente não reativo, contudo, entre pH 1 e 2 o fitato passa a perder prótons, ficando com carga negativa e capaz de reagir com resíduos básicos de aminoácidos (Dayyani et al., 2013). Em pH baixo no proventrículo e moela (pH < 5), observou-se fraca ligação entre minerais ou outras moléculas (Reddy et al., 1982). O ácido fítico pode se ligar às proteínas em uma ampla faixa de pH. Em pH ácido, como no estômago, o ácido fítico se liga a aminoácidos básicos, formando complexos proteína-fitato (Singh e Krikorian, 1982; Deshpande e Cheryan, 1984). Quando o pH aumenta, no intestino delgado (pH > 6), ocorre uma forte ligação, resultando em baixa solubilidade das moléculas de fitato (Reddy et al., 1982). De acordo com Maddaiah et al. (1964), em dietas com alta concentração de fitato, o zinco se torna um mineral limitante, pois forma um complexo altamente insolúvel em pH 6, presente no intestino delgado, local onde ocorre a maior absorção de minerais. A classificação de afinidade para cátions divalentes ou trivalentes que se ligam ao fitato foi descrita como $Zn^{2+} > Fe^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{3+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$ em pH 7 (Maenz et al., 1999). E mesmo altas concentrações de cálcio, ocorre maior precipitação do zinco (cálcio-zinco-fitato) do que ocorreria somente com o zinco-fitato a pH 6, devido a uma interação mais estável entre esses elementos (Maenz et al. 1999).

Os níveis de Ca na dieta de poedeiras são muito elevados tornando mais fácil a formação do complexo Ca-fitato ao longo do trato gastrointestinal inferior (Tamim et al., 2004; Hamdi et al., 2015; Sommerfeld et al., 2018). É importante ressaltar que o pH é crucial para a solubilidade dos complexos Ca-fitato e o pH na digesta varia de altamente

ácido no estômago e proventrículo até se aproximar da neutralidade no intestino delgado. Sob condições *in vitro*, Wise e Gilbert (1981) descobriram que o fitato de Ca era solúvel abaixo de pH 4, mas a precipitação foi observada em pH 5. Vários estudos (Evans e Pierce, 1981; Grynszpan e Cheryan, 1983; Oberleas e Chan, 1997) apoiam esta conclusão de que o pH 5 é fundamental para a formação do complexo Ca-fitato. O calcário fino apresenta alta solubilidade e eleva o pH intestinal rapidamente, isso também diminui a digestibilidade do Ca devido a formação de complexos (Kim et al., 2018). O fitato também tem a capacidade de se quelar ao Na, prejudicando a atividade da bomba sódio potássio (Na-K-ATPase) reduzindo a absorção de nutrientes em galinhas (Cowieson et al., 2004; Liu et al., 2008). A presença do fitato tem uma série de prejuízos extra-fosfóricos, portanto, os benefícios da hidrólise da molécula com o uso da fitase permite melhorar o uso do P dos ingredientes reduzindo seus efeitos negativos sobre nutrientes.

1.5. Fitase

A fitase (mio-inositol hexafosfato fosfohidrolase) é o nome dado a uma enzima que quebra o fitato (Singh, 2008). A hidrólise inicia-se com a molécula totalmente fosforilada (IP6), seguido por penta-(IP5), tetra-(IP4), tri-(IP3), di e monoésteres de inositol em ordem decrescente de preferência (Wyss et al., 1999; Yu et al., 2012; Lei et al., 2013). Em uma situação ideal, a hidrólise do fitato resultará em um mio-inositol e fosfato mais aminoácidos, minerais e outros nutrientes que estão ligados ao ácido fítico (Selle & Ravindran, 2007). Entretanto, a remoção *in vivo* dos grupos fosfato das moléculas de fitato pelas fitases comerciais não é completa (Yu et al., 2012), porque o fosfato no segundo carbono do anel inositol é resistente à hidrólise por fitase exógena (Wodzinski & Ullah, 1996).

A atividade da fitase na ração é expressa em unidades de fitase (FTU); uma FTU é a atividade enzimática que libera 1 μmol de ortofosfato inorgânico por minuto a partir de fitato de sódio em pH 5,5 e 37 °C (Engelen et al., 1994), e geralmente é expressa por kg de dieta. A atuação da fitase pode ser influenciada por inúmeros fatores, tais como: faixa de pH ideal, tipo de fitase, idade dos animais, tempo de retenção no trato digestório, teor de fitato na dieta, níveis de cálcio entre outros fatores (Dersjant-Li et al., 2015). Em

galinhas poedeiras sabe-se que a quantidade de Ca recomendada na dieta é quatro vezes maior quando comparada a frangos de corte (Rostagno et al., 2017). O alto teor de Ca na dieta promove elevação do pH no trato gastrointestinal (Nelson e Kirby, 1987), o que reduz a atividade da fitase pela formação de sais insolúveis de cálcio (Tamim et al., 2004; Hamdi et al., 2015; Sommerfeld et al., 2018).

Van der Klis et al. (1997) relataram que o aumento de Ca dietético de 30 para 40 g/kg reduziu a degradação de fitato na dieta, de cerca de 30% para 9%, respectivamente, e quando suplementada com 500 FTU/kg de fitase, a redução na degradação do fitato foi de 76% a 65%. Beutler (2009) mostrou que o aumento do Ca dietético de 2,5% para 5,5% aumentou a formação do complexo Ca-fitato no trato gastrointestinal de galinhas poedeiras. Isso prejudicou a disponibilidade de P e Ca nas rações de galinhas poedeiras (Bello e Korver, 2019). Adeola e Cowieson (2011) observaram que a ligação do fitato ao Ca também está relacionada à composição do éster de fitato, de forma que o IP3 apresenta 11% de afinidade ao fitato quando comparado com o IP6. Assim, a rápida remoção de IP6 e IP5 no estômago reduzirá significativamente a ligação de Ca no intestino delgado.

Evidências dos benefícios da inclusão de fitase podem ser evidenciadas na redução da excreção de P. Wu et al. (2006) mostraram uma diminuição de cerca de 56% da excreção de P quando galinhas alimentadas com dietas com 0,11% P não fitico (NPP) são suplementadas com fitase e Boling et al. (2000) descobriram que a excreção é reduzida em 50% sem ter efeitos depressivos no desempenho ao mudar de uma dieta de 0,45% de P para uma dieta de 0,1% + fitase. O conteúdo de P não-fitico (NPP) refere-se ao P total menos P fitico enquanto Pd refere-se ao P que é absorvido da dieta para o corpo, que é um P biologicamente disponível (Applegate e Angel, 2014). Embora Pd não seja equivalente a NPP, geralmente se assume que os valores de Pd e NPP são muito próximos entre si para fazer a comparação entre as pesquisas. A nutrição adequada de P é importante para manter um lote de poedeiras saudável e produtivo, sustentar um pico alto e manter a persistência da produção de ovos durante todo o ciclo de postura. Para avaliar a eficácia da fitase, é necessário que a dieta experimental contenha fitato suficiente como substrato para que a fitase degrade, e que o Ca e P liberado pela fitase

seja a quantidade necessária para a ave. Para atingir esta última condição, são sugeridas reduções de Pd e Ca bem abaixo das recomendações comerciais atuais para poedeiras nas dietas experimentais (Bello e Korver, 2019; Pongmanee et al., 2020). Além da liberação de Pd e Ca, a inclusão de fitase na dieta pode reduzir o impacto negativo do fitato na digestão de aminoácidos e amido, melhorando a digestibilidade dos aminoácidos da energia da dieta (Scott et al., 2001; Ponnuvel et al., 2014).

1.6. Tipos de fitase

O primeiro produto comercial exógeno de fitase disponível foi derivado de *Aspergillus niger* e foi introduzido no mercado em 1991 (Selle e Ravindran, 2007). Atualmente, três classes de fitases são reconhecidas pela União Internacional de Química Pura e Aplicada e pela União Internacional de Bioquímica (IUPAC-IUB): 3-fitase (EC 3.1.3.8) remove inicialmente o fosfato da posição 3 do fitato, enquanto a 6-fitase (EC 3.1.3.26) inicia preferencialmente a desfosforilação na posição 6 e a 5-fitase (EC 3.1.3.72) na posição 5 no anel mio-inositol (Figura 3).

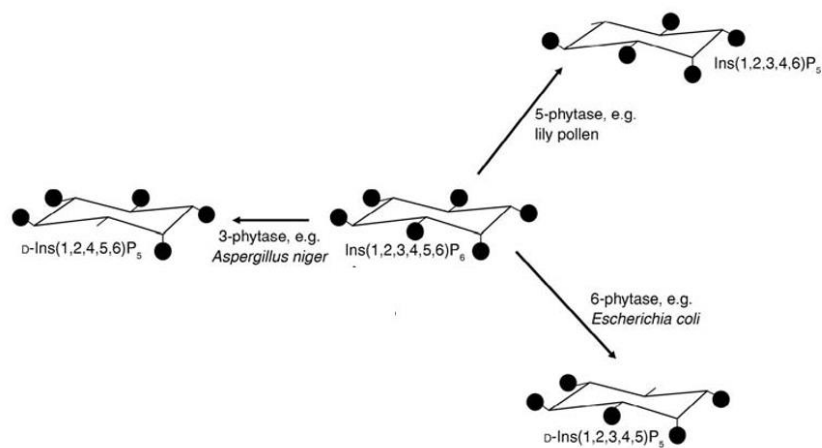


Fig. 3. Classificação das fitases com base no carbono no anel mio-inositol do fitato no qual a desfosforilação é iniciada (•, grupos fosfato).

Atualmente dois tipos de fitase exógena são mais utilizadas; em primeiro lugar, 3-fitases fúngicas (EC 3.1.3.8; primeira geração) derivadas de *A. niger*. Em segundo lugar, 6-fitases (EC 3.1.3.26) - fitases bacterianas (introduzido a partir de 1999) derivado de *Escherichia coli*, *Peniophora lycii*, *Citrobacter braakii* ou *Buttiauxella spp.* (Lei et al., 2013). Os produtos de 6-fitases tendem a ser mais eficazes e possuem afinidade específica para IP6 e IP5, que são menos solúveis devido à forte capacidade quelante com zinco e cobre (Persson et al., 1998). Além disso, as 6-fitases são mais resistentes às enzimas proteolíticas no trato digestivo do que as 3-fitases (Adeola e Cowieson, 2011).

1.7. Doses de fitase em dietas de poedeiras

O nível padrão de inclusão de fitase exógena adicionada à maioria das dietas de suínos e aves é de 500 FTU/kg, com exceção de dietas de poedeiras onde o nível padrão de inclusão de fitase exógena é de 300 FTU/kg (Dersjant-Li et al. 2015). O maior tempo de retenção no trato digestório nas poedeiras pode permitir o uso de uma dose menor de fitase do que nas dietas de frangos de corte (Selle e Ravindran, 2007). Zeller et al (2015) sugere que há uma maior probabilidade que o papo seja o local de maior degradação do IP6, seguida do proventrículo e moela; paralelo a isso, as poedeiras apresentam menor pH da moela do que os frangos de corte (Mtei et al., 2019), o que também pode ajudar a promover a maior hidrólise do fitato. A suplementação de fitase a 300 FTU/kg em uma dieta de poedeiras com NPP e Ca reduzidos (0,15% e 3,0%, respectivamente) de 21 a 41 semanas de idade diminuiu ovos quebrados e cascas moles (Lim et al., 2003). Em outros estudos, a inclusão de 300 FTU/kg em dietas contendo 0,10 a 0,14% NPP e 2,5 a 3,3% Ca aumentou Ca e P ósseo (Gordon e Roland, 1998; Lei et al., 2011). Hughes et al. (2009) relataram que galinhas alimentadas com baixo teor de NPP (0,15%) de 21 a 61 semanas de idade recuperaram a produção total de ovos, peso corporal e viabilidade quando as dietas foram suplementadas com 600 FTU/kg.

Recentemente, aumentou o interesse em “superdosagem”, termo que se refere ao uso da enzima em concentrações duas a três vezes acima daquelas normalmente recomendadas pelos fornecedores (Dersjant-Li et al., 2015), com o objetivo de hidrolisar

todo o ácido fítico no intestino anterior até os ésteres menores (IP4 e IP3) e dessa forma diminuindo os efeitos antinutricionais, liberando mais nutrientes em relação a doses mais baixas de fitase (Fernandez et al., 2019).

A superdosagem de fitase na dieta de aves tem mostrado efeitos benéficos no desempenho e nas características ósseas de frangos (Manobhavan et al., 2016). A hidrólise do ácido fítico nos ésteres inferiores antes de entrar no duodeno reduz a formação de complexos de fitato, pois os ésteres inferiores têm menor capacidade de se ligar a cátions (Persson et al., 1998). Cowieson et al.(2011) em um experimento com frangos de corte utilizando doses acima de 2500FTU relataram uma grande liberação de fósforo e cálcio dos alimentos entre os efeitos da superdosagem de fitase e, conseqüentemente, maior disponibilidade desses nutrientes para absorção . Assim a adição de 900 FTU/kg de ração sem adição de fosforo inorgânico, sera capaz de atender as demandas das aves de 23 e 72 semanas de idade.

1.8. Referências

- Adeola, O., & Cowieson, A. J. 2011. Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *Journal of animal science*, 89(10), 3189-3218.
- Ahmadi, H., and M. Rodehutschord. 2012. A meta-analysis of responses to dietary nonphytate phosphorus and phytase in laying hens. *Poult. Sci.* 91:2072-2078.
- Alves, WJ, Malheiros, EB, Sakomura, NK, Da Silva, EP, Gabriel, DSV, Matheus, DPR, Camila, AG and Rafael, MS 2019. In vivo description of body growth and Chemical componentes of egg-laying pullets. *Livestock Science* 220, 221 – 229
- Applegate, T. J., & Angel, R. 2014. Nutrient requirements of poultry publication: History and need for an update. *Journal of Applied Poultry Research*, 23(3), 567-575.
- Bello, A. (2018). Effects of dietary phosphorus and calcium levels and phytase supplementation on bone metabolism of egg-laying hens.
- Bello, A., and D. R. Korver. 2019. Long-term effects of *Buttiauxella* sp. phytase on performance, eggshell quality, apparent ileal Ca and P digestibility, and bone properties of white egg layers. *Poult. Sci.* 98:4848-4859.

Bello, A., Dersjant-Li, Y., & Korver, D. R. 2020. Effects of dietary calcium and available phosphorus levels and phytase supplementation on performance, bone mineral density, and serum biochemical bone markers in aged white egg-laying hens. *Poultry science*, 99(11), 5792-5801.

Bertechini, A.G. *Nutrição de monogástricos*. Lavras: Ed. UFLA, 2006. 301p.

Beutler, A. L. 2009. The efficacy of Quantum™ phytase in laying hens diet corn-soybean meal based diets. MSc Thesis. University of Saskatchewan, Saskatoon, SK.

Boling, S.D., Douglas, M.W. Johnson, M.L., Wang, X., Parsons, C.M., Koelkebeck, K.W Zimmerman, R.A. 2000. The effects of dietary available phosphorus levels and phytase on performance of young and older laying hens *Poult. Sci.*, 79 pp. 224-230 <https://doi.org/10.1093/ps/79.2.224>

Bronner, F. 1987. Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications. *J. Nutr.* 117:1347-1352.

Bronner, F., and D. Pansu. 1999. Nutritional aspects of calcium absorption. *J. Nutr.* 129:9-12

Casey-Trott, T. M., Guerin, M. T., Sandilands, V., Torrey, S., & Widowski, T. M. (2017). Rearing system affects prevalence of keel-bone damage in laying hens: a longitudinal study of four consecutive flocks. *Poultry science*, 96(7), 2029-2039.

Christakos, S., L. Lieben, R. Masuyama, and G. Carmeliet. 2014. Vitamin D endocrine system and the intestine. *Bonekey Rep.* 3:496-496.

Cowieson, A. J., T. Acamovic, and M. R. Bedford. 2004. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 45:101-108.

Cowieson, A. J., Wilcock, P., & Bedford, M. R. (2011). Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World's Poultry Science Journal*, 67(2), 225-236.

Cufadar, Y., O. Olgun, and A. O. Yildiz. 2011. The effect of dietary calcium concentration and particle size on performance, eggshell quality, bone mechanical properties and tibia mineral contents in moulted laying hens. *Br. Poult. Sci.* 52:761-768.

Dacke, C. G., S. Arkle, D. J. Cook, I. M. Wormstone, S. Jones, M. Zaidi, and Z. A. Bascal. 1993. Medullary bone and avian calcium regulation. *J. Exp. Biol.* 184:63-88.

- Dayyani, N., Abadi, M. B. B., & Farhani, A. A. A. (2013). Phytate and phytase in poultry nutrition. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 1(11), 1403-1408.
- Dersjant-Li, Y.; Awati, A.; Schulze, H. et al. 2015. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 95, n. 5, p. 878-896,.
- Deshpande, S. S., & CHERYAN, M. 1984. Effects of phytic acid, divalent cations, and their interactions on α -amylase activity. *Journal of Food Science*, 49(2), 516-519.
- Elaroussi, M. A., L. R. Forte, S. L. Eber, and H. V. Biellier. 1994. Calcium homeostasis in the laying hen.: 1. Age and dietary calcium effects. *Poult. Sci.* 73:1581-1589.
- Engelen, A. J., F. C. van der Heeft, P. H. Randsdorp, and E. L. Smit. 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.* 77:760-764.
- Evans, W. J., & Pierce, A. G. 1981. Calcium-phytate complex formation studies. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(9), 850-851.
- Fernandez, S. R., S. Charraga, and E. Avila-Gonzalez. 2019. Evaluation of a new generation phytase on phytate phosphorus release for egg production and tibia strength in hens diet a corn-soybean meal diet. *Poult. Sci.* 98:2087-2093.
- Fleming, R. H., McCormack, H. A., McTeir, L., & Whitehead, C. C. (1998). Medullary bone and humeral breaking strength in laying hens. *Research in veterinary science*, 64(1), 63-67.
- Gloux, A., N. Le Roy, A. Brionne, E. Bonin, A. Juanchich, G. Benzoni, M.-L. Piketty, D. Prié, Y. Nys, J. Gautron, A. Narcy, and M. J. Duclos. 2019. Candidate genes of the transcellular and paracellular calcium absorption pathways in the small intestine of laying hens. *Poult. Sci.* 98:6005-6018.
- Gordon, R. W., and D. A. Roland, Sr. 1998. Influence of supplemental phytase on calcium and phosphorus utilization in laying hens. *Poult. Sci.* 77:290-294.
- Greiner, R. and U. Konietzny. 2011. Phytase: biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use. Pages 96–128 in *Enzymes in Farm Animal Nutrition*, 2nd edition. M. R. Bedford and G. G. Partridge, ed. CAB International, London, UK.
- Grynspan, F., & Cheryan, M. 1983. Calcium phytate: effect of pH and molar ratio on in vitro solubility. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60(10), 1761-1764.

- Hamdi, M., S. Lopez-Verge, E. G. Manzanilla, A. C. Barroeta, and J. F. Perez. 2015. Effect of different levels of calcium and phosphorus and their interaction on the performance of young broilers. *Poult. Sci.* 94:2144-2151.
- Hu, Y., X. Liao, Q. Wen, L. Lu, L. Zhang, and X. Luo. 2018. Phosphorus absorption and gene expression levels of related transporters in the small intestine of broilers. *Br. J. Nutr.* 119:1346-1354.
- Hughes, A. L., J. P. Dahiya, C. L. Wyatt, and H. L. Classen. 2009. Effect of Quantum phytase on nutrient digestibility and bone ash in White Leghorn laying hens diet corn-soybean meal- based diets. *Poult. Sci.* 88:1191-1198.
- Javadi, M., Pascual, J. J., Cambra-López, M., Macías-Vidal, J., Donadeu, A., Dupuy, J., ... & Cerisuelo, A. (2021). Effect of Dietary Mineral Content and Phytase Dose on Nutrient Utilization, Performance, Egg Traits and Bone Mineralization in Laying Hens from 22 to 31 Weeks of Age. *Animals*, 11(6), 1495.
- Jing, M., S. Zhao, A. Rogiewicz, B. A. Slominski, and J. D. House. 2018. Assessment of the minimal available phosphorus needs of laying hens: Implications for phosphorus management strategies. *Poult. Sci.* 97:2400-2410.
- Kerschnitzki, M., T. Zander, P. Zaslansky, P. Fratzl, R. Shahar, and W. Wagermaier. 2014. Rapid alterations of avian medullary bone material during the daily egg-laying cycle. *Bone* 69:109-117.
- Keshavarz, K., and S. Nakajima. 1993. Re-evaluation of calcium and phosphorus requirements of laying hens for optimum performance and eggshell quality. *Poult. Sci.* 72:144-153.
- Kim, J. H., Pitargue, F. M., Jung, H., Han, G. P., Choi, H. S., & Kil, D. Y. (2017). Effect of superdosing phytase on productive performance and egg quality in laying hens. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 30(7), 994–998. <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0149>
- Kim, S. W., Li, W., Angel, R., & Proszkowiec-Weglarz, M. (2018). Effects of limestone particle size and dietary Ca concentration on apparent P and Ca digestibility in the presence or absence of phytase. *Poultry Science*, 97(12), 4306-4314.
- Lei, Q. B., L. X. Shi, K. Y. Zhang, X. M. Ding, S. P. Bai, and Y. G. Liu. 2011. Effect of reduced energy, protein and entire substitution of inorganic phosphorus by phytase on performance and bone mineralisation of laying hens. *Br. Poult. Sci.* 52:202-213.
- Lei, X. G., J. D. Weaver, E. Mullaney, A. H. Ullah, and M. J. Azain. 2013. Phytase, a new life for an “old” enzyme. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 1:283-309.

- Lim, H. S., Namkung, H., & Paik, I. K. (2003). Effects of phytase supplementation on the performance, egg quality, and phosphorous excretion of laying hens diet different levels of dietary calcium and nonphytate phosphorous. *Poultry Science*, 82(1), 92-99.
- Liu, N., Y. J. Ru, A. J. Cowieson, F. D. Li, and X. Cheng. 2008. Effects of phytate and phytase on the performance and immune function of broilers diet nutritionally marginal diets. *Poult. Sci.* 87:1105-1111.
- Maddaiah, V. T., Kurnick, A. A., & Reid, B. L. 1964. Phytic acid studies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 115(2), 391-393.
- Maenz, D. D. 2001. Enzymatic characteristics of phytases as they relate to their use in animal feeds. *Enzymes in farm animal nutrition*, 61-84.
- Maenz, D. D., C. M. Engele-Schaan, R. W. Newkirk, and H. L. Classen. 1999. The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. *Anim. Feed Sci. Technol.* 81:177–192.
- Manobhavan, M., Elangovan, A. V., Sridhar, M., Shet, D., Ajith, S., Pal, D. T., & Gowda, N. K. S. 2016. Effect of super dosing of phytase on growth performance, ileal digestibility and bone characteristics in broilers diet corn-soya-based diets. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 100(1), 93-100.
- Meyer, E., and C. Parsons. 2011. The efficacy of a phytase enzyme diet to Hy-Line W-36 laying hens from 32 to 62 weeks of age. *J. Appl. Poult. Res.* 20:136-142.
- Mtei, A. W., M. R. Abdollahi, N. M. Schreurs, and V. Ravindran. 2019. Impact of corn particle size on nutrient digestibility varies depending on bird type. *Poult. Sci.* 98:5504-5513.
- Murer, H., N. Hernando, L. Forster, and J. Biber. 2001. Molecular mechanisms in proximal tubular and small intestinal phosphate reabsorption (plenary lecture). *Mol. Membr. Biol.* 18:3-11.
- Nelson, T. S., and L. K. Kirby. 1987. The calcium-binding properties of natural phytate in chick diets. *Nutr. Rep. Int.* 35:949-956.
- Neuman, W. F., & Neuman, M. W. (1953). The nature of the mineral phase of bone. *Chemical Reviews*, 53(1), 1-45.
- Nie, W., Wang, B., Gao, J. et al. 2018. Effects of dietary phosphorous supplementation on laying performance, egg quality, bone health and immune responses of laying hens challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Animal Sci Biotechnol* 9, 53.

Oberleas, D., & Chan, H. C. 1997. Cation complexation by phytate. *Trace elements and Electrolytes*, 14(4), 173-176.

Omara, I. I., C. T. Mou, M. E. Persia, and E. A. Wong. 2020. Effects of available phosphorus source and concentration on performance and expression of sodium phosphate type IIb cotransporter, vitamin D-1 α -hydroxylase, and vitamin D-24-hydroxylase mRNA in broiler chicks. *Poult. Sci.* 99:1822-1831.

Pelicia, K., E. A. Garcia, A. B. G. Faitarone, A. P. Silva, D. A. Berto, A. B. Molino, and F. Vercese. 2009. Calcium and available phosphorus levels for laying hens in second production cycle. *Braz. J. Poultry Sci.* 11:39-49.

Péron, A., & Partridge, G. G. (2009). Contribution of exogenous enzymes to the preservation of limited feed resources. *Recent Advances in Animal Nutrition–Australia*, 17, 9-17.

Persson, H., M. Türk, M. Nyman, and A.-S. Sandberg. 1998. Binding of Cu²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ to inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates. *J. Agric. Food Chem.* 46:3194-3200.

Pines, M., & Hurwitz, S. (1991). The role of the growth plate in longitudinal bone growth. *Poultry science*, 70(8), 1806-1814.

Pongmanee, K., Kühn, I., & Korver, D. R. (2020). Effects of phytase supplementation on eggshell and bone quality, and phosphorus and calcium digestibility in laying hens from 25 to 37 wk of age. *Poultry science*, 99(5), 2595-2607.

Ponnuvel, P., K. Narayanankutty, A. Jalaludeen, and P. Anitha. 2014. Economics of phytase enzyme supplementation in low energy-protein layer chicken diet. *Int. J. Livest. Prod.* 5:113-116.

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.

Proszkowiec-Weglarz, M., Schreier, L. L., Miska, K. B., Angel, R., Kahl, S., & Russell, B. (2019). Effect of early neonatal development and delayed feeding post-hatch on jejunal and ileal calcium and phosphorus transporter genes expression in broiler chickens. *Poultry Science*, 98(4), 1861-1871.

Raina, R., G. Garg, S. K. Sethi, M. J. Schreiber, J. F. Simon, and G. Thomas. 2012. Phosphorus metabolism. *J. Nephrol. Therapeutic.* S3:1-7

- Ravindran, V., W. L. Bryden, and E. T. Kornegay. 1995. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Biol. Rev.* 6:125-143.
- Reddy, N. R., S. K. Sathe, and D. K. Salunkhe. 1982. Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.* 28:1-92.
- Rostagno, H.S.; Albino, L.F.T.; Hannas, M.I. Et Al. 2017. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 4.ed. Viçosa: UFV, 488p.
- Sabbagh, Y., O'Brien, S. P., Song, W., Boulanger, J. H., Stockmann, A., Arbeeny, C., & Schiavi, S. C. (2009). Intestinal npt2b plays a major role in phosphate absorption and homeostasis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(11), 2348-2358.
- Sabbagh, Y., H. Giral, Y. Caldas, M. Levi, and S. C. Schiavi. 2011. Intestinal phosphate transport. *Adv. Chronic Kidney Dis.* 18:85-90.
- Sakomura, N.K.; Rostagno, H.S., 2016: Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos. 2ed. FUNEP: Jaboticabal.
- Schreiweis, M. A., J. I. Orban, M. C. Ledur, D. E. Moody, and P. Y. Hester. 2005. Validation of dual-energy X-ray absorptiometry in live White Leghorns. *Poult. Sci.* 84:91-99.
- Scott, T. A., R. Kampen, and F. G. Silversides. 2001. The effect of adding exogenous phytase to nutrient-reduced corn- and wheat-based diets on performance and egg quality of two strains of laying hens. *Can. J. Anim. Sci.* 81:393-401.
- Scottá, B. A., Gomide, A. P. C., Campos, P. F., Barroca, C. C., da Silva Formigoni, A., & Ferreira, S. V. 2014. Utilização de fitase na alimentação de aves e suínos. *Pubvet*, 8, 0084-0229.
- Selle, P. H., and V. Ravindran. 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 135:1-41.
- Singh, P. K. 2008. Significance of phytic acid and supplemental phytase in chicken nutrition: a review. *World's Poultry Science Journal*, 64(4), 553-580.
- Singh, M., & Krikorian, A. D. 1982. Inhibition of trypsin activity in vitro by phytate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(4), 799-800.
- Shahnazari, M., N. A. Sharkey, G. J. Fosmire, and R. M. Leach. 2006. Effects of strontium on bone strength, density, volume, and microarchitecture in laying hens. *J. Bone Miner. Res.* 21:1696-1703.

- Skřivan, M., Englmaierová, M., & Skřivanová, V. 2018. Negative effect of phytase superdosing in laying hens. *Czech Journal of Animal Science*, 63(5), 182-187.
- Sommerfeld, V., M. Schollenberger, I. Kühn, and M. Rodehutsord. 2018. Interactive effects of phosphorus, calcium, and phytase supplements on products of phytate degradation in the digestive tract of broiler chickens. *Poult. Sci.* 97:1177-1188.
- 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.
- Taylor, T. G., & Moore, J. H. 1953. Avian medullary bone. *Nature*, 172(4376), 504-505.
- Taylor, T. G. And Dacke, C. G. 1984. Calcium metabolism and its regulation. In *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*, vol. 5 (ed. F. M. Freeman), pp. 125–170. London
- Takeda, E., Taketani, Y., Morita, K., & Miyamoto, K. I. 1999. Sodium-dependent phosphate co-transporters. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 31(3-4), 377-381.
- Van der Klis JD, Versteegh HAJ, Simons PCM, Kies AK. The Efficacy of Phytase in Corn-Soybean Meal-Based Diets for Laying Hens. *Poult Sci.* 1997;76:1535–1542.
- Veum, T. L. (2010). Phosphorus and calcium nutrition and metabolism. *Phosphorus and calcium utilization and requirements in farm animals*, 94-111.
- Walk, C. L., & Olukosi, O. A. 2019. Influence of graded concentrations of phytase in high-phytate diets on growth performance, apparent ileal amino acid digestibility, and phytate concentration in broilers from hatch to 28 D post-hatch. *Poultry Science*, 98(9), 3884-3893.
- Werner, A., & Kinne, R. K. 2001. Evolution of the Na-Pi cotransport systems. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280(2), R301-R312.
- Wise, A., & Gilbert, D. J. 1981. Binding of cadmium and lead to the calcium-phytate complex in vitro. *Toxicology letters*, 9(1), 45-50.
- Whitehead, C. C. 2004. Overview of bone biology in the egg-laying hen. *Poultry science*, 83(2), 193-199.
- Wodzinski, R. J., & Ullah, A. H. J. 1996. Phytase. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 42, pp. 263-302). Academic Press.

- Woyengo, T. A., & Nyachoti, C. M. 2013. Anti-nutritional effects of phytic acid in diets for pigs and poultry—current knowledge and directions for future research. *Canadian Journal of Animal Science*, 93(1), 9-21.
- Wu, G., Liu, Z., Bryant, M. M., & Roland Sr, D. A. 2006. Comparison of Natuphos and Phyzyme as phytase sources for commercial layers diet corn-soy diet. *Poultry science*, 85(1), 64-69.
- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Remy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehmann, M. And Van Loon, A.P.G.M. 1999. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-Inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Applied Environmental Microbiology* 65: 367-373.
- Yan, F., Angel, R., & Ashwell, C. M. 2007. Characterization of the chicken small intestine type IIb sodium phosphate cotransporter. *Poultry science*, 86(1), 67-76.
- Yu, S., Cowieson, A., Gilbert, C., Plumstead, P., & Dalsgaard, S. 2012. Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters (IP1-5) including IP5 isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin. *Journal of Animal Science*, 90(6), 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.

CAPÍTULO 2 – A bacterial 6-phytase recovered the responses of laying hens given an inorganic phosphorus-free diet

Este capítulo é apresentado segundo as normas da revista Poultry Science

PHYTASE IN INORGANIC PHOSPHORUS-FREE DIET FOR LAYING HENS

A bacterial 6-phytase improves the responses of laying hens diet an inorganic phosphorus-free diet

Thaila F. Moura^{*}, Matheus P. Reis^{*}, Freddy A. Horna^{*}, Ingryd Palloma T. Nóbrega^{*}, Abiodun Bello[†], Daniella Z. Donato[‡], Emma White[†], Yueming Desjant-Li[†], Nilva K. Sakomura^{*.1}

^{*} *Department of Animal Science, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita, Filho”, FCAV/UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brazil*

[†] *Danisco Animal Nutrition & Health, IFF, 2342 BH Oegstgeest, The Netherlands.*

[‡] *Danisco Animal Nutrition & Health, IFF, São Paulo, Brazil,*

¹*Corresponding author: Abiodun Bello E-mail: Abiodun.Bello@iff.com; Tel: +1.30.23.33.63.60*

The appropriate scientific sections for the paper are Metabolism and Nutrition

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of phytase over egg productivity, eggshell quality, and body composition of laying hens diet inorganic phosphorus-free diets reduced in energy and nutrients from 23 to 72 weeks of age. A total of 560 Hy-Line W80 (4 hens/cage × 28 cage replicates per treatment) were randomly assigned to five experimental treatments. A positive control feed (PC) was formulated to contain the recommended levels of energy and nutrients. A basal negative control feed (NC) was formulated to contain 0.12% of available phosphorus (avP) and reduced energy and nutrients in comparison with PC feed. Phytase was supplemented in the NC feed at 300, 600, and 900 FTU/kg of feed. The responses evaluated were performance, egg quality, body composition, and tibia composition. Data were analyzed by a two-factor repeated measure analysis and orthogonal and polynomial contrasts were applied to investigate the responses of laying hens with 5% probability. Overall, the feed intake, rate of lay, and egg mass were affected by the reduction in dietary avP ($P < 0.05$), and the crescent levels of phytase supplementation recovered those responses. Laying hens consuming the NC feed with 900 FTU of phytase produced more eggs per hen-housed and marketable eggs. The body composition was not affected by dietary avP reduction ($P > 0.05$). During the first 12 weeks of trial, the performance of hens in the negative control treatment was severely affected and phytase supplementation was efficient in minimizing those effects. The supplementation of 900 FTU of phytase is recommended to improve the number of eggs produced per hen-housed and the number of marketable eggs produced through 23 to 72 weeks of age.

Keywords: egg production, available phosphorus, phytic acid, egg quality, phytate

INTRODUCTION

The cereal grains used to feed the animals contains phytic acid, or 1,2,3,4,5,6-hexakis (di-hydrogen phosphate) myo-inositol phosphate (Maga, 1982), which is the primary storage source for phosphorus in plants (Reddy et. al, 1982). The phytic phosphorus, is a terminology used to name the phosphorus attached to a phytic acid (Angel et al., 2002). For poultry, phytic phosphorus has low availability due to a lack of endogenous enzyme to release the phosphorus from phytic acid (Maenz and Classen, 1998). To avoid a phosphorus deficiency in growing birds and laying hens, inorganic phosphorus (e.g., mono and dicalcium phosphate) is usually added to the feed formula. However, feed ingredients abundant in inorganic phosphorus are finite and concerns arose about the use of non-renewable sources of phosphorus, which may lead to a lack of phosphorus supply in the future (Abelson, 1999, Mullaney et al., 2000; Kisinyo e Opala, 2020). Furthermore, strategies that allow proper use of phosphorus from feed needs to account for the real necessity of phosphorus by the animal. The recommendation of available phosphorus (avP) for laying hens is somewhere between 0.24 and 0.35% (NRC, 1994; Rostagno et al., 2017), depending on factors such as the current body state, feed intake, and egg production.

To minimize the inorganic phosphorus usage as a primary source for phosphorus in poultry production, it is quite common to supply poultry feeds with exogenous phytase, which releases the phosphate groups from phytic acid by hydrolyzing the phospho-ester bounds (Adeola and Cowienson 2011). The supplementation of exogenous phytase for poultry is well documented in the literature (Selle e Ravidtran 2007) and the benefits of doing so might go beyond the simple increase in phosphorus availability (Nelson et al 1971) because the phytic acid and its low-esters have antinutritional properties that can be minimized or avoided with the use of exogenous phytase (Beeson et al., 2017). While the effects of phytase supplementation are well documented for

broilers (Bedford et al. 2017; Sommerfeld et al 2018), there is still room for investigation regarding laying hens. The supplementation of 300 FTU/kg of feed for laying hens is a common practice among nutritionists (Dersjant-Li et al., 2015). However, recent studies demonstrate that higher doses of phytase could increase the release of phosphorus from phytic acid and, consequently, reduce the phosphorus excretion to the environment (White et al., 2016), an important feature that might be attributed to phytase and used in countries where the soil has phosphorus in excess.

In the context aforementioned, the supplementation of phytase in poultry feeds is recommended, but more investigation is necessary to better elucidate the extra-phosphoric effects of phytase. Inside the intestinal tract, the phytic acid molecule can complex with Ca and produce insoluble salts, reducing the availability of both Ca and P (Hamdi et al., 2015). This is particularly important for laying hens since their feeds contain around four times the amount of Ca compared with a broiler feed (Rostagno et. al, 2017). Furthermore, because of the physical properties of phytic acid and its lower-esters, it can attach to amino acids and ions, reducing nutrient digestibility (Kornegay,1996). The supplementation of phytase minimizes the use of inorganic phosphorus and reduces the antinutritional factors of phytic acid, but the literature about high doses of phytase supplementation for laying hens are still inconclusive (Skřivan et. al., 2018; Javadi et al 2021). The objective of this study was to evaluate the performance, egg quality, and body composition of laying hens submitted to an inorganic phosphorus-free diet, supplemented with crescent levels of phytase from 23 to 72 weeks of age.

MATERIAL AND METHODS

Ethics Approval

All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Sao Paulo State University (CEUA) under the protocol n° 5356/20.

Animals, housing and experimental design

The trial was performed in the Poultry Science Laboratory at São Paulo State University, UNESP-Jaboticabal, Sao Paulo, Brazil. Five hundred and sixty Hy-Line W80 pullets at 17 w-old were obtained from a breeding company (Granja Mayra). The pullets were allotted in laying cages located in an environmentally controlled facility and diet with a corn-soybean meal diet formulated to meet or exceed the nutritional recommendations of Hy-Line W80 management guide (2019). At 23 w-old, hens were individually weighed (1.47 ± 0.066 kg of body weight) and allotted to 140 stainless-steel laying cages (L x W, 50 x 50 cm; 46.5 cm high at the front and 40 cm high at the back), four layers per cage (experimental unit). Five treatments were randomly assigned to each experimental unit, performing 28 replicates per treatment. The cage was equipped with individual trough feeders (L x W x D, 50 x 15 x 9.0 cm), two nipple drinkers, and external egg tray receiver (L x W x H, 50 x 20 x 6.5 cm). Hens had free access to feed and water *ad libitum*. The lighting program was set at 16L:8D and the health status of the birds was daily checked. The average temperature and humidity recorded throughout the study were 22.2 °C and 79%, respectively. The trial duration was 50 weeks, with hens starting at 23 w-old and ending at 72 w-old.

Experimental feeds

A positive control feed (PC) was formulated to meet or exceed the nutritional recommendations of Hy-Line W80 management guide (2019). To include the phytase, a basal feed named negative control (NC) was formulated without inorganic phosphorus ingredients and with reduced energy

and nutrients in comparison to PC feed. The reductions included 75 Kcal/kg for metabolizable energy and 0.23, 0.20, 0.02, and 0.81 percentual points of available phosphorus (avP), calcium, sodium, and crude protein, respectively; and the essential amino acids by up to 0.04 percentual points (Table 1). Crescent levels of a *Buttiauxella sp* 6-phytase expressed in *Trichoderma reesei* (Aextra[®] PHY GOLD, Danisco Animal Nutrition & Health, IFF, Leiden, The Netherlands) were supplemented in the NC feed (0, 300, 600, and 900 FTU/kg of feed). One phytase unit (FTU) is defined as the amount of enzyme which releases one μmol of inorganic phosphate per minute from sodium phytate at pH 5.5 and 37 °C (Engelen et al., 1994). All experimental feeds were offered to hens as mash.

<Insert Table 1 here>

Experimental feeds were chemically analyzed for dry matter, gross energy, protein, total phosphorus, calcium, phytic acid, and phytase activity. For dry matter content, samples were dried for 16 h in a conventional oven at 105 °C (AOC method 920.39). The energy content was determined using an adiabatic bomb calorimeter (IKA[®] Werke, C7000, GMBH and CO., Staufen, Germany). The Kjeldahl procedure (Foss Kjeltex 8400. AOAC method 2001.11) was used to quantify the nitrogen content, which was multiplied by 6.25 to obtain the crude protein content. Calcium was measured using the flame atomic absorption method in the Perkin Elmer 5000 atomic absorption spectroscope (method no. 968.08D). Total phosphorus was determined by a vanadate-molybdate method after ashing dry samples at 550 °C (Gomori, 1942). The phytic acid in the experimental feeds was determined according to Analytical Biochemistry (1977). Briefly, sample aliquot was extracted with Na₂SO₄ solution overnight and then phytic acid was precipitated with

FeCl₃. The precipitant was ashed, and the phosphorus content in the precipitate was determined by ICP-OES method. The phytase activity was determined by a molybdate/vanadate colorimetric method (Danisco Animal Nutrition, Leiden, The Netherlands).

Performance and egg quality

The mortality and the total number of eggs were daily recorded, including unusual eggs: abnormal, crack, soft-shell, no-shell, no-yolk, and double yolk eggs. Every four weeks, feed waste and eggs were weighed, whereas body weight was measured every eight weeks. The rate of lay (%), feed intake (g/bird/day), egg mass (rate of lay x egg weight, g), and feed conversion rate (g of feed / g of egg mass) were corrected by mortality and calculated on a four weekly basis. In addition, the hen-housed egg production (%) was obtained as the rate of lay without mortality correction and the hen-day marketable egg production (%) was calculated from the rate of lay by subtracting the unusual eggs cited above.

Prior to the beginning of the experiment, twelve experimental units per treatment were selected to assess egg quality. From those replicates, three eggs were randomly collected, every four weeks, and analyzed using the Nabel Digital Egg Tester 6000[®] (Kyoto, Japan) for resistance (kgf), yolk color (16 yolk fan scale), albumen height (mm), Haugh unit and shell thickness (mm). Albumen, shell, and yolk percentages were calculated by weighing shell and yolk separately. Before measurement, eggshell was washed with tap water and dried using a forced oven at 55 °C for 24 hours. The measurements from performance and egg quality variables were averaged in three phases, 23 to 38, 39 to 54, and 55 to 72 w-old.

Body composition and tibia analysis

Fourteen hens per treatment were selected to be scanned on a Discovery Wi™ DXA (Hologic-QDR® model 13.4.2., Marlborough, USA), previously calibrated by a Phantom made of acrylic and aluminum spine (Kelly et al., 1998). At 55 and 72 w-old, selected hens have fasted for six hours, and measurements were taken in the afternoon to avoid the feed effect and reduce the chance of scanning a hen with shelled egg in the oviduct. After the fasting period, the hens were anesthetized with a dilution of isoflurane (2%) in 100% oxygen. After anesthetized, birds were examined in horizontal dorsal decubitus, with wings and paws open. The scan was carried out in the craniocaudal direction, examining the entire area of the bird in high-resolution mode. At each scan, the device's software was calibrated with information about each animal to be scanned (body weight and bird length). The exams provided measurements of fat mass (g), lean mass (water + protein, g), bone mineral content (g), and bone mineral density (g / cm²). From the measurements, the protein (%) and fat (%) contents were calculated, according to the equations described by Alves et al. (2019).

At the end of the trial (72 w-old), the same hens once scanned in DXA were euthanized to collect the right tibia and determine ash, calcium, and phosphorus contents. Before the analysis, fat was extract from tibia using petroleum ether for four hours in a Soxhlet apparatus (method 930.15 - AOAC, 1995). Then, fat-free tibia samples were kept in a muffle furnace at 600 °C for eight hours to determine ash content. Calcium was measured using the flame atomic absorption method in the Perkin Elmer 5000 atomic absorption spectroscope (method no. 968.08D). Total phosphorus was determined by vanadate-molybdate method after ashing dry samples at 550 °C (Gomori, 1942).

Statistical analysis

Collected data was verified for normality of errors and homoscedasticity by UNIVARIATE and TRANSREG procedures, respectively, using SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). All response variables were analyzed as Two-factor repeated measure design to evaluate the effects of dietary treatment over time, using a mixed model in the MIXED procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). One factor is represented by the five dietary treatments and the other factor is the age of hens. Each experimental unit was the repeated measures factor. When the treatment effect was different between phases, LSMEANS statement was used to estimate the means, and orthogonal contrasts were elaborated to compare PC vs. NC and PC vs. phytase supplementation (NC300 + NC600 +NC900) within each phase using the CONTRAST statement. The effect of phytase was evaluated using polynomial contrasts for linear and quadratic effects by CONTRAST statement. The linear adjustment indicates a constant response rate due to phytase supplementation, while the quadratic adjustment indicate a reducing/increasing response rate according to increasing levels of phytase supplementation in the feed. Furthermore, the performance and egg quality responses were averaged to represent the whole experimental period (23 to 72 w-old). The performance and egg quality for the whole period and tibia variables were analyzed with One-Way ANOVA in the GLM procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). For tibia variables, the laying hens body weight was used as a covariable. Means were estimated with LSMEANS statement and compared by Tukey's range test. Differences were considered to be significant at $P \leq 0.05$, and trends were reported at $0.05 < P \leq 0.10$. All response variables given in the tables are least-squares means.

RESULTS

The phytase activity measured in each feed were 290, 313, 569, 770, and 1038 FTU/kg of feed, respectively for PC, NC, NC300, NC600, and NC900. Those results indicate a presence of endogenous phytase on PC and NC feeds, which is an intrinsic trait of feed ingredients used, and the inclusion of exogenous phytase was about the calculated levels for this study. In this study, the higher mortality was observed inside the NC group and the cumulative mortality was approximately 1.79, 2.68, and 8.93% respectively at 38, 54, and 72 w-old.

Hen performance and egg quality

There was interaction ($P < 0.05$) between dietary treatments and the age of hens for all performance variables (Table 2).

<Insert Table 2 here>

For feed intake, differences ($P < 0.05$) between groups were observed in the first (23 to 38 w-old) and second (39 to 54 w-old) periods evaluated; however, no differences ($P > 0.05$) were observed between PC and NC groups. The supplementation of phytase linearly increased feed intake for the first and second periods ($P < 0.05$) and no difference was observed for the third period ($P = 0.157$). The rate of lay was different ($P < 0.05$) between groups for the first and second periods, while the difference between PC and NC groups was observed only in the second period ($P < 0.05$). On average, the inclusion of phytase tended ($P = 0.064$) to increase the rate of lay in the second period. The hen-housed egg production was affected in the second and third periods ($P < 0.05$), while marketable eggs was affected in all periods evaluated ($P < 0.05$). The contrasts demonstrate

that these variables were mainly affected in the second and third period and phytase supplementation was efficient to recover these responses. The supplementation of phytase showed a linear tendency so that for marketable eggs in the first period the contrast (PC vs Phytase) showed that the phytase group exceeded the production of marketable eggs compared to the control group. In the other periods there was no significant difference. Egg weight was not affected by feed treatment ($P>0.05$). The egg mass and feed conversion were affected ($P<0.05$) in the second period and the contrasts indicate a difference between PC and NC feed at the same age. The supplementation of phytase was efficient to recover egg mass ($P>0.05$). For egg quality and egg components (Table 3), there was interaction ($P<0.05$) for yolk color and eggshell weight. The hens consuming the NC feed produced eggs with higher values of yolk color ($P<0.05$), in contrast with PC feed, for the first and second periods. There was a tendency ($P=0.089$) to reduce the eggshell weight of laying hens consuming the NC feed.

<Insert Table 3 here>

For the whole period (Table 4), egg weight and feed conversion rate were the only variables not affected by dietary treatments ($P>0.05$). Overall, the differences observed were between hens consuming the PC and NC feeds and the supplementation of phytase recovered the responses. The inclusion of 300 FTU/kg of phytase seems to slightly improve the marketable eggs, whereas the inclusion of 600 and 900 FTU recovered those responses in such a way that hens in those groups were statistically different from hens in the NC feed without phytase supplementation. However, for egg mass the inclusion of 300 and 600 FTU/kg of phytase seems to slightly improve, whereas

the inclusion of 900 FTU recovered those responses and hens in those groups were statistically different from hens in the NC feed without phytase supplementation.

<Insert Table 4 here>

Body composition and tibia analysis

There were interactions ($P < 0.05$) for bone mineral density and for body ash content between treatments and age (Table 5). However, there was no difference between treatments inside each period evaluated ($P > 0.05$); thus, the variation observed seems to be related with the response behavior of each group over the time. For example, the Bone Mineral Density of hens in the NC and NC600 groups reduced with time, whereas hens in the other groups demonstrate a numerical increase of these variable, which may be responsible for the interaction observed. The body ash between treatments had a tendency ($P = 0.090$) for a difference in the first period evaluated (33 w-old).

<Insert Table 5 here>

There was no difference in tibia ash content between treatments, but a tendency ($P = 0.072$) is observed (Table 6). The value of ash was lower for hens consuming the NC feed, and phytase supplementation seem to recover this response variable.

<Insert Table 6 here>

DISCUSSION

In this discussion, there will be no distinction between avP and non-phytic phosphorus (nPP); therefore, the values obtained in this study is argued against literature, even though the scale might change from avP to nPP. This paper deals with phytic phosphorus utilization and the benefits of increasing levels of a phytase supplementation for laying hens given an inorganic phosphorus-free diet. To our knowledge, this is the first study to demonstrate the responses of modern laying hens consuming a low avP feed (0.12%) during 50 weeks, covering the peak and post-peak of egg production. The constant search to improve nutrient usage has led to the development of new feed technologies, such as the production of exogenous enzymes, of which phytase is the most successful one. Partially because non-ruminant animals have a reduced capacity for phytase production (Wodzinski and Ullah, 1996), but also because exogenous phytase, generally produced by transgenic microorganisms, successfully catalyzes the hydrolyses of phytic acid in the animal's gastrointestinal tract, increasing phosphorus availability and reducing the antinutritional factor of phytate, producing the extra-phosphoric effects of phytase (Cowieson et. al., 2011).

The recommendations of avP for a white laying hen consuming 105 g of feed per day are cited to be around 0.35% by Rostagno et a. (2017) and 0.24% by the NRC (1994). In this study, laying hens diet with NC feed containing 0.12% of avP were clearly affected. Gordon and Roland (1998) demonstrated that eggshell weight and egg production were negatively affected when Hy-line W36 hens were diet a diet containing 0.10% of nPP for 6 weeks; they also reported that phytase supplementation recovered those responses. A similar result was observed herein, where the hens consuming a feed with 0.12% of avP with phytase recovered their performance in comparison to hens consuming a feed with 0.35% of avP. However, the performance and egg quality responses of laying hens consuming the NC feed improved with age, which raises a question about the real

requirement of those hens and the adaptability to a deficient feed. In this study, the supplementation of 900 FTU/kg of feed elicited the best results for hen-housed egg production and marketable eggs. Those results might be associated with the low mortality observed in the group of hens consuming the feed supplemented with 900 FTU of phytase (0.00, 0.00, 2.68% at the cumulated ages of 23-38, 23-54, and 23-72 w-old). The hen-housed egg production is not corrected by mortality, thus, a reduction in the mortality affected those two response variables. For marketable eggs, unusual eggs were removed as cited before, affecting the differences between treatment.

Punna and Roland (1999) reported high mortality (55%) for the group of 38 w-old Hy-line W36 consuming a feed with 0.10% of nPP without phytase. The inclusion of phytase reduced mortality to 5%. Similarly, Jalal and Scheideler (2001) using the same strain of hens reported a mortality of 22% when the hens were diet with 0.10% of nPP, and the supplementation of 250 and 300 FTU/kg of feed improved the feed intake, egg mass, and mortality. The increase in mortality is clearly related to the low level of available phosphorus, however, the inclusion of phytase in a phosphorus-deficient feed minimizes or even stopped the mortality in the majority of the studies reported in the literature. On the other hand, in this study, the mortality observed in the NC group was lower or slightly higher than those reported in the manual-guide (Hy-line W80) for the ages of 38 (1.79 vs 3.2%), 54 (2.68 vs 5.2%), and 72 w-old (8.93 vs 7.4%); therefore, the negative control group was maintained in the experiment until the end of the trial.

The literature suggests that a feed with 0.10 to 0.15% of avP supplemented with 300 FTU/kg of feed is sufficient to maintain performance during the egg production cycle. Boling et al. (2000), demonstrated that laying hens consuming a feed with 0.10% of nPP supplemented with phytase from 20 to 70 w-old had a comparable performance with hens consuming a regular level of nPP. The same authors also observed that phytase did not improve the response of hens if

supplemented in feeds with more than 0.15% of nPP. Wu et al. (2006) demonstrate the benefits of including phytase in the feed of a Hy-line W36 from 21 to 33 weeks. The authors reported an increase in egg production and egg mass in laying hens consuming a feed with 0.11% of nPP and supplemented with phytase which was similar to the hens consuming a feed with 0.38% of nPP. In our study, the body weight observed for laying hens consuming the NC feed without phytase supplementation was around 1.58 kg, which is below the target body weight recommended in the management guide, between 1.59 to 1.71 kg (Hy-line W80, 2019). However, laying hens from NC feed managed to maintain egg production until the end of the study, at 72 w-old. Keshavarz (2000), observed a drastic reduction in body weight, egg production, and viability when Babcock B300 hens diet low nPP (0.15, 0.10, and 0.10%) during 30 to 42, 42 to 54, and 54 to 66 w-old, respectively; however, the inclusion of phytase recovered those variables compared with the control group. Hughes et al. (2009) reported that white leghorn diet a low nPP feed (0.15%) from 21 to 61 w-old demonstrated a reduction in total egg production, body weight, viability, and an increase in cracked and broken eggs compared to groups of hens consuming a feed with 0.35% of nPP, however, the inclusion of 600FTU in the diet recovered those variables compared with the control group.

A well-documented effect of phosphorus deficiency for birds is the reduction in feed intake (Adeola, 2010; Rousseau et al., 2016). Phosphorus deficiency is reported to reduce the appetite in broiler chickens through a complex mechanism involving the gut and hypothalamus hormones (Aderibigbe et al., 2022). In the present study, feed intake was not affected by low dietary avP; however, in the first period (23 to 38 w-old), laying hens from NC group consumed 104 g of feed per day, whereas hens from PC group consumed around 106 g of feed. Even with similar feed intake, the avP intake for hens in the NC group was around 3-fold lower than hens in the PC group.

With low phosphorus intake, the plasma phosphate level is expected to reduce, triggering a metabolic response mostly driven by hormones such as vitamin D. A series of events includes an increase of phosphorus uptake in the intestine, reduction of phosphorus excretion by kidney and increase of bone resorption (Tsuchiya and Akihisa 2021). An increase of sodium-phosphate cotransporter in small intestine was observed in broilers consuming a deficient phosphorus diet (Aderibigbe et al., 2022). In the present study, similar mechanism would explain why laying hens from NC group managed to keep producing eggs. The tendency of tibia ash reduction content observed in this study suggests that hens consuming the NC feed mobilized minerals from bone, probably to increase the phosphate levels in plasma.

In our study, the dietary treatments did not affect the egg quality but hens consuming the NC feed produced eggs with a higher value for yolk color. The same result was observed for hens consuming the feed supplemented with phytase, suggesting that differences were between PC and NC feeds and not due to phytase supplementation, corroborating with other studies found in the literature (Jalal et al. Scheideler, 2001, Park et al., 2009, Lucky et al., 2014). In this study, the NC feed was formulated with 2% more corn compared to PC feed, which may explain the differences in egg color between these treatments. The pigments in egg yolk occur because of carotenoids found in the feed, since laying hens do not synthesize those compounds (Stadelman & Cotterill, 1995; Garcia et al., 2002). In the egg yolk, lutein and zeaxanthin are carotenoid pigments, a subclass of xanthophyll, both considered as the main carotenoids in the egg yolk (Krinsky, 1993; Meléndez-Martínez, 2022). Those pigments are found in corn, explaining why a corn inclusion of 2% in the feed formula affected the yolk color.

CONCLUSION

The phytase used in this study was efficient to recover the performance responses of laying hens consuming an inorganic phosphorus-free diet with low dietary available phosphorus. The group of hens consuming a feed supplemented with 900 FTU of phytase produced the best results for hen-housed egg production and hen-day marketable egg production inside each period evaluated. The laying hens consuming an inorganic phosphorus-free diet without phytase supplementation partially overcome the reduction in dietary available phosphorus, recovering feed intake and performance traits; nevertheless, such recovering takes time (more than 90 days in this study) which may affect the revenue from an egg production farm.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 88887.489168/2020-00.

DECLARATION OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

SOFTWARE AND DATA REPOSITORY RESOURCES

None of the data was deposited in an official repository. The data can be obtained from the authors upon request.

REFERENCES

- Abelson, P. H. (1999). A potential phosphate crisis. *Science*, 283(5410), 2015-2015. <https://doi.org/10.1126/science.283.5410.2015>
- Adeola, O. 2010. Phosphorus equivalency value of an *Escherichia coli* phytase in the diets of White Pekin ducks. *Poultry science*, 89(6), 1199-1206. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00682>
- Adeola, O., & Cowieson, A. J. 2011. Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *Journal of animal science*, 89(10), 3189-3218. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3715>
- Aderibigbe, A. S., Ajuwon, K. M., & Adeola, O. 2022. Dietary phosphorus level regulates appetite through modulation of gut and hypothalamic expression of anorexigenic genes in broiler chickens. *Poultry Science*, 101(2), 101591. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101591>
- Alves, WJ, Malheiros, EB, Sakomura, NK, Da Silva, EP, Gabriel, DSV, Matheus, DPR, Camila, AG and Rafael, MS 2019. *In vivo* description of body growth and Chemical componentes of egg-laying pullets. *Livestock Science* 220, 221 – 229 <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.12.023>
- Angel, R., Tamim, N. M., Applegate, T. J., Dhandu, A. S., & Ellestad, L. E. 2002. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. *Journal of Applied Poultry Research*, 11(4), 471-480. <https://doi.org/10.1093/japr/11.4.471>
- Bedford, M., and X. Rousseau. 2017. Recent findings regarding calcium and phytase in poultry nutrition. *Anim. Prod. Sci.* 57:2311-2316. <https://doi.org/10.3382/japr/pfv073>
- Beeson, L. A., Walk, C. L., Bedford, M. R., & Olukosi, O. A. 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. *Poultry Science*, 96(7), 2243-2253.
<https://doi.org/10.3382/ps/pex012>
- Boling, S.D., Douglas, M.W. Johnson, M.L., Wang, X., Parsons, C.M., Koelkebeck, K.W Zimmerman, R.A. 2000. The effects of dietary available phosphorus levels and phytase on performance of young and older laying hens *Poult. Sci.*, 79 pp. 224-230
<https://doi.org/10.1093/ps/79.2.224>
- Cowieson, A. J., Wilcock, P., & Bedford, M. R. 2011. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World's Poultry Science Journal*, 67(2), 225-236.
<https://doi.org/10.1017/S0043933911000250>
- Dersjant-Li, Y., Awati, A., Schulze, H., & Partridge, G. 2015. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(5), 878-896..
<https://doi.org/10.1002/jsfa.6998>
- Engelen A. J. , Van der Heeft F. C., Randsdorp P. H. , Smit E. L. 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J AOAC* ;77(3):760-4. PMID: 8012231.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/77.3.760>
- Garcia, E. A., Mendes, A. A., Pizzolante, C. C., Gonçalves, H. C., Oliveira, R. P., & Silva, M. A. 2002. Efeito dos níveis de cantaxantina na dieta sobre o desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 4(1), 00-00.
<https://doi.org/10.1590/S1516-635X2002000100007>
- Gomori, G. 1942, Modification of the colorimetric phosphorus determination for use with photometric colorimeter. *J. Lab. Clin. Med.*, 27 p. 955-966.

- Gordon, R. W., Roland, D. A. 1998. Influence of supplemental phytase on calcium and phosphorus utilization in laying hens. *Poult. Sci.* 77:290-294. <https://doi.org/10.1093/ps/77.2.290>
- Hamdi, M., S. Lopez-Verge, E. G. Manzanilla, A. C. Barroeta, and J. F. Perez. 2015. Effect of different levels of calcium and phosphorus and their interaction on the performance of young broilers. *Poult. Sci.* 94:2144-2151. <https://doi.org/10.3382/ps/pev177>
- Hughes, A. L., Dahiya, J. P., Wyatt, C. L., & Classen, H. L. 2009. Effect of Quantum phytase on nutrient digestibility and bone ash in White Leghorn laying hens diet corn-soybean meal-based diets. *Poultry Science*, 88(6), 1191-1198.
- Jalal, M. A., & Scheideler, S. E. 2001. Effect of supplementation of two different sources of phytase on egg production parameters in laying hens and nutrient digestibility. *Poultry Science*, 80(10), 1463-1471. <https://doi.org/10.1093/ps/80.10.1463>
- Javadi, M., Pascual, J. J., Cambra-López, M., Macías-Vidal, J., Donadeu, A., Dupuy, J., ... & Cerisuelo, A. 2021. Effect of Dietary Mineral Content and Phytase Dose on Nutrient Utilization, Performance, Egg Traits and Bone Mineralization in Laying Hens from 22 to 31 Weeks of Age. *Animals*, 11(6), 1495. <https://doi.org/10.3390/ani11061495>
- Kelly, T. L., Berger, N., & Richardson, T. L. 1998. DXA body composition: theory and practice. *Applied radiation and isotopes*, 49(5-6), 511-513. [https://doi.org/10.1016/S0969-8043\(97\)00226-1](https://doi.org/10.1016/S0969-8043(97)00226-1)
- Keshavarz, K. 2000. Nonphytate phosphorus requirement of laying hens with and without phytase on a phase feeding program. *Poultry science*, 79(5), 748-763. <https://doi.org/10.1093/ps/79.5.748>
- Kisinyo, P., & Opala, P. 2020. Depletion of phosphate rock reserves and world food crisis: Reality or hoax?. <https://doi.org/10.5897/AJAR2020.14892>

- Kornegay, E.T., Quian, H. 1996. Replacement of inorganic phosphorus by microbial phytase for young pigs diet on a maize-soybean-meal diet. *Br. J. Nutr.*, 76(4):563-578. <https://doi.org/10.1079/BJN19960063>
- Krinsky, N. I. 1993. Actions of carotenoids in biological systems. *Annual review of nutrition*, 13(1), 561-587. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.13.070193.003021>
- Lucky, N. J., Howlider, M. A. R., Alam, M. A., & Ahmed, M. F. (2014). Effect of dietary exogenous phytase on laying performance of chicken at older ages. *Bangladesh Journal of Animal Science*, 43(1), 52-55. <https://doi.org/10.3329/bjas.v43i1.19385>
- Maenz, D. D., & Classen, H. L. 1998. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poultry Science*, 77(4), 557-563. <https://doi.org/10.1093/ps/77.4.557>
- Maga, J. A. 1982, Phytate: Its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(1), 1-9. <https://doi.org/10.1021/jf00109a001>
- Meléndez-Martínez, A. J., Mandić, A. I., Bantis, F., Böhm, V., Borge, G. I. A., Brnčić, M., ... & O'Brien, N. (2022). A comprehensive review on carotenoids in foods and feeds: Status quo, applications, patents, and research needs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(8), 1999-2049..
- Mullaney, E. J., Daly, C. B., & Ullah, A. H. (2000). *Advances in phytase research*.
- National Research Council, 1994. National Research Council. *Nutrient Requirements of Poultry (9th Rev.)*, National Academy Press, Washington, DC.

- Nelson, T. S., Shieh, T. R., Wodzinski, R. J., & Ware, J. H. 1971. Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus by chicks. *The Journal of nutrition*, 101(10), 1289-1293. <https://doi.org/10.1093/jn/101.10.1289>
- Park, K. W., Rhee, A. R., Um, J. S., & Paik, I. K. 2009. Effect of dietary available phosphorus and organic acids on the performance and egg quality of laying hens. *Journal of Applied Poultry Research*, 18(3), 598-604. <https://doi.org/10.3382/japr.2009-00043>
- Punna, S., & Roland Sr, D. A. 1999. Influence of supplemental microbial phytase on first cycle laying hens diet phosphorus-deficient diets from day one of age. *Poultry science*, 78(10), 1407-1411. <https://doi.org/10.1093/ps/78.10.1407>
- Reddy, N. R., S. K. Sathe, and D. K. Salunkhe. 1982. Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.* 28:1-92. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60110-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60110-X)
- Rostagno, H.S.; Albino, L.F.T.; Hannas, M.I. Et Al. 2017. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 4.ed. 488p. Viçosa: UFV.
- Rousseau, X., A. S. Valable, M. P. Letourneau-Montminy, N. M^eme, E. Godet, M. Magnin, Y. Nys, M. J. Duclos, and A. Narcy. 2016. Adaptive response of broilers to dietary phosphorus and calcium restrictions. *Poult. Sci.* 95:2849–2860. <https://doi.org/10.3382/ps/pew172>
- Selle, P. H., and V. Ravindran. 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 135:1-41. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.010>
- Skřivan, M., Englmaierová, M., & Skřivanová, V. 2018. Negative effect of phytase superdosing in laying hens. *Czech Journal of Animal Science*, 63(5), 182-187. <https://doi.org/10.17221/113/2017-CJAS>
- Sommerfeld, V., Schollenberger, M., Kühn, I., & Rodehutscord, M. 2018. Interactive effects of phosphorus, calcium, and phytase supplements on products of phytate degradation in the

- digestive tract of broiler chickens. *Poultry Science*, 97(4), 1177-1188.
<https://doi.org/10.3382/ps/pex404>
- Stadelman, W.J. and O.J. Cotterill, 1995. *Egg Science and Technology*. 4th ed. Food Products Press
 . An Imprint of the Haworth Press. INC. New York. London, UK.
- Tsuchiya, K., & Akihisa, T. 2021. The importance of phosphate control in chronic kidney disease.
Nutrients, 13(5), 1670. <https://doi.org/10.3390/nu13051670>
- White, E., Bold, R., Wealleans, A.L., Dersjant-Li, Y. and Kwakernaak, S. 2016. Effect of a
 Buttiauxella phytase on nutrient digestibility and performance in laying hens diet a diet
 without supplemental inorganic phosphorus. *Proceeding of WPSA*, Chester, UK
<https://doi.org/10.3382/ps/pez220>
- Wodzinski, R. J., & Ullah, A. H. J. 1996. Phytase. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 42,
 pp. 263-302). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70375-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70375-7)
- Wu, G., Liu, Z., Bryant, M. M., & Roland Sr, D. A. 2006. Comparison of Natuphos and Phyzyme
 as phytase sources for commercial layers diet corn-soy diet. *Poultry science*, 85(1), 64-69.
<https://doi.org/10.1093/ps/85.1.64>

Table 1. Ingredient composition and nutrient content of positive and negative control experimental feeds offered to layers from 23 to 72 weeks of age.

Ingredients (%)	Positive Control	Negative Control
Corn (7.86%)	49.26	51.36
Soybean Meal (45%)	25.45	21.92
Wheat bran	8.00	9.00
Rice bran	1.50	4.85
Soybean oil	5.39	3.42

Dicalcium phosphate	1.30	0.00
Sodium Bicarbonate	0.10	0.10
Limestone ¹	8.15	8.48
Salt	0.35	0.30
Premix Vit + Min ²	0.20	0.20
DL-Methionine 99%	0.20	0.18
L-Lysine HCl 78%	0.00	0.04
Choline chloride 60%	0.10	0.10
Inert ³	0.00	0.05
	Calculated Composition (%) ⁴	
Crude Protein	17.0 (17.4)	16.2 (16.2)
ME (Kcal/kg) ⁵	2900	2825
Calcium	3.50 (3.91)	3.30 (3.57)
Available Phosphorus	0.35	0.12
Total Phosphorus	0.60 (0.65)	0.41 (0.47)
Phytic phosphorus	0.25	0.30
Phytic acid	(0.96)	(1.07)
Sodium	0.18 (0.18)	0.16 (0.17)
Digestible Lysine	0.78	0.75
Digestible Met+Cys	0.67	0.64
Digestible Threonine	0.57	0.54
Digestible Tryptophane	0.19	0.18
Digestible Valine	0.70	0.66
Digestible Arginine	0.97	0.90
Digestible Isoleucine	0.63	0.59
Digestible Histidine	0.40	0.38

¹ 40% fine limestone (FL<1 mm) and 60% coarse limestone (CL>3mm).

²Content/kg of premix: 6.34 mcg retinol activity equivalent; cholecalciferol = 63.86 mcg; α -tocopherol = 14.87 mg; menadione = 1.8 mg; thiamine = 2.00 mg; riboflavin = 4.50 mg; pyridoxine = 2.50 mg; folate = 2.00 mg; niacin = 30.00 mg; calcium pantothenate = 11.74 mg; folic acid = 0.75 mg; biotin = 0.01 mg; iron = 43.44 mg; copper = 8.56 mg; manganese = 56.0 mg; zinc = 43.45 mg; iodine = 0.56 mg; selenium = 0.34 mg.

³Sand was used as the inert. Phytase was supplemented in substitution of the inert in the concentration of 36 g/ton for 300 FTU, 72 g/ton for 600 FTU, and 108 g/ton for 900 FTU per kg of feed.

⁴Values between parenthesis are analyzed.

⁵Gross energy analyzed were 3882 and 3829 kcal/kg of feed for positive and negative controls, respectively

Table 2. Feed intake, egg production traits, and feed conversion of white laying hens consuming a feed with recommended (positive control, PC) or reduced in nutrients (negative control, NC) supplemented with 300 (NC300), 600 (NC600), or 900 (NC900) FTU of phytase in three sequential periods.

Age, weeks	Treatments					SEM ¹	P-value						
	PC	NC	NC300	NC600	NC900		Period	Treatment	Period x Treatment	Treatment (Period) ²	Contrast ³		
			0								PCvsNC	PCvsPhy	Polynomial
Feed Intake, g/day													
23 to 38	106	104	107	107	107	0.055				0.009	0.109	0.104	Linear**
39 to 54	108	109	110	111	111	0.059	<0.0001	0.014	0.006	0.001	0.628	0.001	Linear**
55 to 72	108	109	109	110	110	0.039				0.157	-	-	-
Hen-Housed Egg Production, %													
23 to 38	96.2	95.3	97.7	97.2	98.3	0.053				0.319	-	-	-
39 to 54	96.4	92.8	97.0	96.1	98.7	0.096				0.004	0.021	0.491	Linear**
55 to 72	93.0	90.5	92.8	94.8	95.6	0.089	<0.0001	0.031	0.002	0.011	0.095	0.276	Linear**
Hen-Day Egg Production, %													
23 to 38	97.8	97.4	98.4	98.3	98.3	0.020				0.040	0.219	0.119	Quadratic*
39 to 54	98.9	96.2	98.1	98.1	98.8	0.049	<0.0001	0.000	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.064	Quadratic*
55 to 72	95.7	95.4	95.6	97.0	96.2	0.029				0.203	-	-	-
Hen-Day Marketable Egg Production, %													
23 to 38	95.0	94.9	96.6	96.5	96.5	0.040				0.005	0.910	0.003	Linear*
39 to 54	98.4	94.7	97.7	97.4	98.3	0.069	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.237	Linear***
55 to 72	95.1	93.6	93.4	95.2	95.5	0.043				0.003	0.038	0.539	Linear***
Egg Weight, g													
23 to 38	59.9	59.5	59.9	60.2	60.4	0.015				0.382	-	-	-
39 to 54	63.5	63.5	63.0	63.6	64.1	0.017	<0.0001	0.324	0.006	0.168	-	-	-
55 to 72	65.5	65.5	64.7	65.0	65.8	0.020				0.131	-	-	-
Egg Mass, g													
23 to 38	58.3	57.8	59.0	59.2	59.4	0.029				0.104	-	-	-
39 to 54	62.2	60.8	61.8	62.3	63.2	0.040	<0.0001	0.035	0.001	0.001	0.016	0.563	Linear***
55 to 72	62.7	62.4	62.2	63.4	63.7	0.029				0.103	-	-	-
Feed Conversion, g / egg mass													
23 to 38	1.82	1.80	1.82	1.82	1.81	<0.0001				0.922	-	-	-
39 to 54	1.74	1.79	1.77	1.79	1.76	0.001	<0.0001	0.5742	<0.0001	0.015	0.005	0.011	-
55 to 72	1.76	1.77	1.78	1.78	1.75	0.001				0.421	-	-	-

¹SEM is pooled standard errors of the mean.

²P-value for the effect of treatment inside the period evaluated.

³Orthogonal contrast between positive control and negative control (PCvsNC), and positive control and phytase (PCvsPhy) groups. Polynomial contrast considering the crescent levels of phytase supplementation: NC, NC300, NC600, and NC900, where, *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, and ***P ≤ 0.001

Table 3. Egg quality¹ data of white laying hens consuming a feed with recommended (positive control, PC) or reduced in nutrients (negative control, NC) supplemented with 300 (NC300), 600 (NC600), or 900 (NC900) FTU of phytase in three sequential periods.

Age, weeks	Treatments					SEM ¹	P-value						
	PC	NC	NC300	NC600	NC900		Period	Treatment	Period x Treatment	Treatment (Period) ²	Contrast ³		
											PCvsNC	PCvsPhy	Polynomial
Albumen height, mm													
23 to 38	8.85	8.83	8.87	8.92	9.10	0.005				-	-	-	-
39 to 54	8.99	8.98	8.86	8.85	8.97	0.003	<0.0001	0.535	0.136	-	-	-	-
55 to 72	8.51	8.36	8.24	8.41	8.54	0.005				-	-	-	-
Yolk Color													
23 to 38	2.04	2.72	3.15	3.05	3.22	0.022				<0.0001	<0.0001	<0.0001	Linear*
39 to 54	2.43	2.82	2.55	2.79	2.57	0.008	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.004	-
55 to 72	4.17	4.13	4.12	4.14	4.08	0.001				0.783	-	-	-
Haugh unit													
23 to 38	94.4	94.8	94.5	94.2	94.8	0.011				-	-	-	-
39 to 54	93.7	93.7	93.2	93.1	93.6	0.013	<0.0001	0.786	0.114	-	-	-	-
55 to 72	90.8	89.9	89.4	90.5	90.9	0.028				-	-	-	-
Breaking strength, kgf													
23 to 38	5.06	4.87	5.10	5.10	5.02	0.004				-	-	-	-
39 to 54	4.91	4.46	4.76	4.82	4.92	0.008	<0.0001	0.123	0.102	-	-	-	-
55 to 72	4.34	4.26	4.27	4.39	4.36	0.002				-	-	-	-
Eggshell thickness, mm													
23 to 38	0.379	0.374	0.384	0.384	0.374	<0.0001				-	-	-	-
39 to 54	0.361	0.354	0.357	0.362	0.360	<0.0001	<0.0001	0.433	0.052	-	-	-	-
55 to 72	0.356	0.361	0.359	0.361	0.356	0.000				-	-	-	-
Yolk Weight, g													
23 to 38	14.7	15.1	15.1	15.2	15.2	0.009				-	-	-	-
39 to 54	17.2	17.6	17.4	17.4	17.4	0.006	<0.0001	0.425	0.123	-	-	-	-
55 to 72	18.1	18.3	18.0	18.0	18.1	0.005				-	-	-	-
Shell Weight, g													
23 to 38	5.78	5.82	5.89	5.95	5.83	0.003				0.238	-	-	-
39 to 54	6.06	5.87	6.01	6.07	6.03	0.004	<0.0001	0.864	0.001	0.089	-	-	-
55 to 72	6.08	6.16	6.09	6.04	6.08	0.002				0.669	-	-	-
Albumen Weight, g													
23 to 38	39.1	39.3	39.5	39.5	39.7	0.010				-	-	-	-
39 to 54	40.4	39.9	39.9	40.0	40.7	0.016	<0.0001	0.680	0.060	-	-	-	-
55 to 72	41.4	41.1	41.1	40.4	41.7	0.022				-	-	-	-

¹SEM is pooled standard errors of the mean.

²P-value for the effect of treatment inside the period evaluated.

³Orthogonal contrast between positive control and negative control (PCvsNC), and positive control and phytase (PCvsPhy) groups. Polynomial contrast considering the crescent levels of phytase supplementation: NC, NC300, NC600, and NC900, where, *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, and ***P ≤ 0.001.

Table 4. Performance and egg quality responses¹ of white laying hens consuming a feed with recommended (positive control, PC) and reduced in nutrients (negative control, NC) supplemented with 300 (NC300), 600 (NC600), or 900 (NC900) FTU of phytase from 23 to 72 weeks of age.

Response Variables	PC	NC	NC300	NC600	NC900	SEM ²	p-value
Body Weight, g	1652 ^a	1589 ^b	1627 ^a	1639 ^a	1642 ^a	1.095	<0.0001
Feed Intake, g/day	107 ^a	107 ^a	108 ^a	109 ^a	110 ^a	0.045	0.016
HHEP, %	97.9 ^a	96.5 ^b	97.5 ^a	98.0 ^a	97.5 ^a	0.026	<0.0001
HDEP, %	98.0 ^a	96.8 ^b	97.6 ^a	98.0 ^a	97.8 ^a	0.023	<0.0001
HDEP, Marketable %	96.9 ^a	94.9 ^b	95.8 ^{ab}	96.3 ^a	96.8 ^a	0.037	<0.0001
Egg Weight, g	63.0	62.9	62.6	63.0	63.5	0.014	0.289
Egg Mass, g	61.4 ^{ab}	60.6 ^b	61.0 ^{ab}	61.6 ^{ab}	62.2 ^a	0.027	0.021
Feed Conversion, g/g	1.76	1.78	1.78	1.78	1.77	0.001	0.375
Albumen height, mm	8.73	8.72	8.66	8.73	8.87	0.003	0.487
Yolk Color	2.95 ^b	3.24 ^a	3.28 ^a	3.34 ^a	3.29 ^a	0.007	<0.0001
Haugh unit	92.8	92.8	92.2	92.6	93.0	0.015	0.559
Breaking strength, kgf	4.76	4.59	4.70	4.76	4.83	0.004	0.132
Eggshell thickness, mm	0.364	0.363	0.366	0.366	0.363	0.001	0.721
Yolk Weight, g	16.7	17.0	16.9	16.9	16.9	0.005	0.408
Shell Weight, g	5.98	5.95	5.99	6.02	5.98	0.001	0.879
Albumen Weight, g	40.3	40.1	40.2	40.0	40.7	0.013	0.686

¹Means with no common letters in the same row differ by Tukey's test at 5% probability.

²SEM is pooled standard error of the mean.

Table 5. Body weight¹, body composition, and bone mineral density of white laying hens consuming a feed with recommended (positive control, PC) or reduced in nutrients (negative control, NC) supplemented with 300 (NC300), 600 (NC600), or 900 (NC900) FTU of phytase at 33 and 53 weeks of age.

Age, weeks	Treatments					SEM ²	P-value						
	PC	NC	NC300	NC600	NC900		Age	Treatment	Age x Treatment	Treatment (Age) ³	Contrast ⁴		
											PCvsNC	PCvsPhy	Polynomial
Body Weight, g													
33	1660	1611	1663	1655	1675	1.091	0.323	0.014	0.926	0.009	-	-	-
53	1671	1606	1643	1652	1653	1.219					0.259	-	-
Body Protein, %													
33	17.0	17.5	16.7	16.8	16.6	0.015	0.239	0.274	0.777	0.223	-	-	-
53	17.1	17.4	16.8	17.2	16.8	0.011					0.551	-	-
Body Water, %													
33	61.8	62.4	61.6	61.7	61.5	0.016	0.287	0.189	0.918	0.173	-	-	-
53	61.9	62.3	61.7	62.0	61.7	0.012					0.465	-	-
Body Fat, %													
33	17.6	16.3	18.3	17.7	18.7	0.041	0.121	0.184	0.821	0.140	-	-	-
53	16.8	16.5	17.9	17.1	17.9	0.028					0.536	-	-
Body Ash, %													
33	3.38	3.42	3.35	3.44	3.28	0.003	0.042	0.656	0.002	0.090	-	-	-
53	3.47	3.37	3.44	3.37	3.41	0.002					0.381	-	-
Bone Mineral Density, g/cm ²													
33	0.147	0.143	0.146	0.153	0.141	<0.0001	0.602	0.400	0.004	0.169	-	-	-
53	0.149	0.138	0.148	0.144	0.147	<0.0001					0.223	-	-

¹Body weight was collected from the same hens and in the same day of DXA scanning.

²SEM is pooled standard errors of the mean.

³P-value for the effect of treatment inside the age evaluated.

⁴Orthogonal contrast between positive control and negative control (PCvsNC), and positive control and phytase (PCvsPhy) groups. Polynomial contrast considering the crescent levels of phytase supplementation: NC, NC300, NC600, and NC900, where, *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, and ***P ≤ 0.001

Table 6. Content of ash, calcium, and phosphorus in the tibia of white laying hens consuming a feed with recommended (positive control, PC) and reduced in nutrients (negative control, NC) supplemented with 300 (NC300), 600 (NC600), or 900 (NC900) FTU of phytase at 72 weeks of age.

	Treatments					SEM ¹	P-Value
	PC	NC	NC300	NC600	NC900		
Ash, %	59.0	56.9	58.4	58.6	58.7	0.174	0.072
Ca, %	37.3	37.7	37.4	36.5	37.2	0.017	0.355
P, %	16.7	16.8	16.8	16.8	16.9	0.003	0.790

¹SEM is pooled standard errors of the mean.

CAPÍTULO 3 – IMPLICAÇÕES

A enzima fitase hidrolisa o fitato dos grãos de cereais usados nas dietas de aves liberando o fósforo complexado nessa molécula. Apesar do uso de enzimas exógenas, existe uma grande parte do fósforo que não consegue ser aproveitado pelos monogástricos o que reforça a necessidade de desenvolver estratégias nutricionais para aumentar a eficiência do uso desse mineral e, conseqüentemente, dietas com menores níveis de fósforo disponível poderiam ser formuladas atendendo a necessidade da ave.

Os níveis de fósforo disponível para galinhas poedeiras recomendado nos guias nutricionais apresentam margens de segurança consideráveis. Nesse sentido, foi observado que as galinhas alimentadas com um nível abaixo das margens de segurança (0,12% de fósforo disponível) e suplementadas com altas doses de fitase são capazes de manter a produção de ovos permitindo reduzir o custo da ração quando comparada com dosagens comerciais da enzima.

De acordo com um estudo econômico realizado, foi possível observar que no período de 23 a 72 semanas as aves que receberam a dieta com 900FTU obteve o melhor retorno sobre o custo de alimentação por ave alojada evidenciando que a utilização de altas doses de fitase proporciona maior número de ovos e de melhor qualidade. Quando analisamos cada período (23 a 38, 39 a 54 e 55 a 72 semana de idade) o retorno econômico é observado após o segundo período. Estes resultados são esperados pois as reservas corporais são capazes de auxiliar nas necessidades destes minerais durante as primeiras fases de postura, no entanto, em períodos longos de postura, se faz necessário um melhor aproveitamento dos minerais da ração permitindo um impacto somatório na utilização da fitase em períodos longo do tempo levando a uma melhora nos resultados de desempenho.

Há um interesse da fitase em melhorar o desempenho produtivo suplementada em níveis mais altos dos preconizados. O nível de fósforo total da ração e o limite de liberação de fósforo pelas enzimas deverá ser compatível com os limites de absorção intestinal. Conhecer estas informações é importante para correlacionar os tipos de ingredientes nas dietas e o nível de fitase com a real exigência de fósforo para explicar a

resposta da ave. No presente estudo, uma dieta milho-soja-arroz-trigo sem fonte de fósforo inorgânico diminuiu a produtividade, e a inclusão de 900 FTU/kg melhorou ou manteve a produtividade de ovos comercializáveis. Dessa forma, a suplementação de 900 FTU/kg de ração demonstrou ser uma alternativa ao uso de P inorgânico na dieta de poedeiras para a manutenção da produção de ovos no período de 23 a 72 semana de idade.

Identificou-se a necessidade de pesquisas adicionais para melhor elucidar a interação entre absorção de fósforo, tipo de dieta e níveis de fitase. Além disso, sabe-se que o complexo cálcio-fitato pode interferir na ação da fitase, portanto sugere-se o desenvolvimento de novas pesquisas em relação a suplementação de fitase para galinhas poedeiras, utilizando dietas com níveis reduzidos de cálcio.