# DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE FORRAJES: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ENZIMAS FIBROLÍTICAS

M.D. Carro[1], M.J. Ranilla[1], A.H. Mohamed[2] y M.L. Tejido[1]

[1] Dpto. de Producción Animal I, Universidad de León, 24071 León

[2] Animal Production Research Institute (APRI), Agricultural Research Center, Nady El-Said st., Dokki, Giza, P.O. Box 443, Egipto

## INTRODUCCIÓN

Los complejos enzimáticos se utilizan con mucha frecuencia como aditivos en los piensos de los animales monogástricos, pero no se usan en la alimentación de los animales rumiantes. En estos animales, la actividad fibrolítica del medio ruminal es normalmente muy alta, y por ello tradicionalmente se ha asumido que no puede ser aumentada de forma significativa. Sin embargo, en los últimos años se han realizado numerosos estudios para investigar la posibilidad de utilizar enzimas fibrolíticas para mejorar el valor nutritivo de los forrajes, aunque los resultados obtenidos han sido contradictorios (Carro y Ranilla, 2001). Algunos de estos resultados (Morgavi *et al.*, 2000) parecen indicar que las enzimas fibrolíticas pueden aumentar la degradación del alimento y su utilización cuando las condiciones ruminales son desfavorables para la degradación de la fibra, como es el caso de los animales que reciben raciones con un elevado porcentaje de concentrados. En estos animales el pH ruminal desciende hasta valores inferiores a los óptimos para la actividad de las bacterias celulolíticas, de tal forma que se produce una disminución de la degradación de la fibra de los alimentos. Debido a que en algunos estudios (Yang *et al.*, 1999) se ha observado que el tratamiento de los forrajes con enzimas fibrolíticas puede favorecer la colonización microbiana de los mismos y aumentar así su degradación en las fases iniciales de la misma, en este trabajo nos planteamos analizar el efecto de tres preparaciones enzimáticas sobre la digestibilidad *in vitro* de tres forrajes.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se utilizaron como sustratos heno de alfalfa, heno de gramíneas y ensilado de maíz, y su composición química figura en la Tabla 1. Las muestras de cada forraje se molieron (1 mm) antes de determinar su digestibilidad *in vitro* tras la incubación con líquido ruminal. Las muestras (250 mg de materia seca (MS)) se pesaron en bolsitas de material sintético poroso, que se introdujeron en recipientes de vidrio de 4 l de volumen, a los que se añadieron 2 l de una mezcla 1:4 (v:v) del líquido ruminal y del medio de cultivo descrito por Goering y Van Soest (1979). Dicho medio fue modificado mediante la adición de ácido transaconítico para reducir su pH a 6,0, e intentar así provocar condiciones no óptimas para la acción de la flora celulolítica ruminal. Como inóculo se utilizó líquido ruminal procedente de 4 ovejas fistuladas en el rumen que recibían heno de alfalfa *ad libitum*. El incubador utilizado (Daisy II; Ankom Technology Corporation) disponía de 4 recipientes, y cada uno de ellos fue asignado a uno de los siguientes cuatro tratamientos: forrajes sin tratar (control; **CON**), tratamiento con una celulasa procedente de *Aspergillus niger* (Fluka; **CEL**),

Este trabajo ha sido financiado por el MCYT (Proyecto AGL2001-0130) y la Junta de Castilla y León (Proyecto LE38/01). M. J. Ranilla disfruta de un contrato de investigación del MCYT (Programa Ramón y Cajal).

tratamiento con una xilanasa aislada de microorganismos ruminales (Megazyme International Ireland Ltd.; **XIL**) y tratamiento con una mezcla 1:1 de las dos enzimas anteriores (**MEZ**). En todos los casos, las enzimas se disolvieron en un buffer fosfato sódico 1 mM (ph 6,5) y se aplicaron directamente sobre los forrajes a una concentración de 10 UI por g de MS de forraje. La aplicación de las soluciones enzimáticas se realizó 24 h antes de comenzar la incubación *in vitro* con líquido ruminal, y durante este tiempo los forrajes se mantuvieron en el laboratorio a temperatura ambiente (20-22ºC). En cada uno de los 4 recipientes del incubador se introdujeron 6 bolsitas de cada forraje; dos de estas bolsitas se extrajeron tras 6 h de incubación, otras dos tras 12 h, y las dos restantes a las 24 h tras el inicio de la incubación. Las bolsitas se lavaron con agua fría para detener la fermentación y en el residuo se analizó su contenido en FND para estimar la digestibilidad *in vitro* verdadera de los forrajes (DIV). Además, en cada una de las extracciones se tomó una muestra del medio de cultivo y se midió inmediatamente su pH. En total se realizaron cuatro incubaciones en días diferentes, para obtener ocho réplicas por tratamiento. Para cada forraje, el efecto del tratamiento con enzimas sobre su DIV se determinó mediante análisis de varianza, y se analizaron los siguientes contrastes: C1: **CON** *vs* **CEL**, **MEZ** y **XIL**; C2: **CEL** *vs* **MEZ** y **XIL**; C3: **MEZ** *vs* **XIL**.

Tabla 1. Composición química (g/kg MS) de los forrajes

| Forraje | Materia orgánica | Proteína bruta | Fibra neutro detergente | Fibra ácido detergente |
|---|---|---|---|---|
| Heno de alfalfa | 926 | 207 | 427 | 313 |
| Ensilado de maíz | 954 | 90 | 465 | 256 |
| Heno de gramíneas | 922 | 106 | 564 | 313 |

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los efectos de las preparaciones enzimáticas sobre la DIV de los forrajes y el pH del medio de cultivo se muestran en la Tabla 2. En el caso del heno de alfalfa se observó que el tratamiento con enzimas mostró una tendencia ($P<0,10$) a aumentar su DIV tras 24 h de incubación, pero no se observaron diferencias a las 6 y 12 h de incubación. Por el contrario, el tratamiento con enzimas tendió ($P<0,10$) a aumentar la DIV del ensilado de maíz tras 6 h de incubación, pero estas diferencias desaparecieron en tiempos de incubación más largos. En cuanto al heno de gramíneas, su tratamiento con celulasa aumentó de forma significativa ($P<0,05$) su DIV tras 6 y 12 h de incubación respecto a los valores observados con los tratamientos **MEZ** y **XIL**, pero estas diferencias desaparecieron tras 24 h de incubación en líquido ruminal. Estos resultados podrían indicar que el tratamiento con enzimas, especialmente con celulasa, favoreció la degradación inicial del heno de gramíneas, pero no ejerció un efecto significativo sobre la degradación del heno de alfalfa y del ensilado de maíz.

Morgavi *et al.* (2000) analizaron el efecto de enzimas fúngicos procedentes de *Trichodema longibrachiatum* sobre la degradabilidad *in vitro* del ensilado de maíz a valores de pH de 6,5, 6,0 y 5,5. La adición de estas enzimas no tuvo efecto sobre la degradabilidad del ensilado a valores de pH óptimos para el normal funcionamiento de la flora ruminal celulolítica (pH 6,5), pero aumentó significativamente la degradabilidad de la materia seca del ensilado a pH 5,5 y 6,0 (en un 35 % y un 40 %, respectivamente). En nuestro experimento el pH del medio de incubación en el momento de su inicio fue de 6,0 en todas las pruebas, pero la fuerte capacidad amortiguadora del medio de Goering y Van Soest (1970) hizo que

transcurridas 6 horas de incubación el pH se elevara a valores adecuados para esta actividad fibrolítica y que se mantuviera en ellos durante el resto de la incubación (ver Tabla 2). Es posible que este hecho contribuyera a que no se detectase un efecto claro del tratamiento con enzimas fibrolíticas sobre la DIV de los forrajes. Sin embargo, también es posible que las enzimas y/o la dosis elegidas para este estudio no fuesen las más adecuadas para el tratamiento de los forrajes seleccionados. En resumen, el tratamiento de forrajes con enzimas fibrolíticos en las condiciones (tipo de enzimas, dosis, pH ruminal) en que se realizaron estas pruebas no parece ser un método útil para aumentar su digestibilidad.

Table 2. Efecto del tratamiento enzimático sobre la digestibilidad *in vitro* (%) de varios forrajes tras 6 (DIV6), 12 (DIV12) y 24 (DIV24) h de incubación en líquido ruminal, así como sobre el pH d el medio de incubación

| | Tratamiento[1] | | | | | Signif. estadística (P= )[1] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **CON** | **CEL** | **MEZ** | **XIL** | e.e.d. | C1 | C2 | C3 |
| **Heno de alfalfa** | | | | | | | | |
| DIV6 | 59,3 | 59,5 | 59,3 | 59,5 | 0,88 | NS | NS | NS |
| DIV12 | 62,9 | 62,8 | 63,0 | 62,9 | 0,75 | NS | NS | NS |
| DIV24 | 71,5 | 73,0 | 71,7 | 73,0 | 1,01 | NS† | NS | NS† |
| **Heno de gramíneas** | | | | | | | | |
| DIV6 | 48,4 | 49,8 | 48,7 | 49,0 | 0,51 | 0,007 | 0,024 | NS |
| DIV12 | 52,8 | 53,6 | 52,8 | 52,1 | 0,67 | NS | 0,009 | NS |
| DIV24 | 69,2 | 71,3 | 69,9 | 70,0 | 1,81 | NS | NS | NS |
| **Silo de maíz** | | | | | | | | |
| DIV6 | 61,9 | 62,7 | 62,7 | 62,5 | 0,67 | NS† | NS | NS |
| DIV12 | 62,4 | 63,1 | 63,0 | 62,5 | 0,60 | NS | NS | NS |
| DIV24 | 72,4 | 73,0 | 72,1 | 72,8 | 1,09 | NS | NS | NS |
| **pH** | | | | | | | | |
| 6 h | 6,46 | 6,46 | 6,44 | 6,47 | 0,028 | NS | NS | NS |
| 12 h | 6,58 | 6,58 | 6,59 | 6,60 | 0,009 | NS | NS | NS |
| 24 h | 6,69 | 6,70 | 6,71 | 6,70 | 0,014 | NS | NS | NS |

[1] Tratamientos: **CON**: control; **CEL**: celulasa; **MEZ**: mezcla 1:1 celulasa:xilanasa; **XIL**: xilanasa

[2] Contrastes, C1: **CON** *vs* tratamientos enzimáticos; C2: **CEL** *vs* **MEZ** y **XIL**; C3: **MEZ** *vs* **XIL**

e.e.d.: error estándar de la diferencia; NS: P>0,05; NS†: P<0,10

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Carro MD y Ranilla MJ. 2001. Las enzimas como aditivos en la alimentación de los animales rumiantes. *Mundo Ganadero*, 134 (junio): 62-67.

Goering MK y Van Soest PJ. 1970. *Agric. Handb. n 379. Agric. Res. Serv.*, USDA. Washington DC.

Morgavi DP, Nsereko VL, Rode LM, Beauchemin KA, McAllister TA, Wang Y, Iwaasa AD y Yang WZ. 2000. Feed enzymes increase the potential of rumen microorganisms to degrade fibrous feeds at low pH. 3rd European Symposium on Feed Enzymes - Noordwijkerhout, Holanda. 8-10 mayo.

Yang WZ., Beauchemin KA y Rode LM. 1999. Effects of enzyme feed additives on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76 (Suppl. 1): 320.