MEDIDA DE LA ACTIVIDAD CELULÁSICA EN LA DIGESTA CECAL DE CONEJOS

Soler M.D. [1], Blas E. [2], Biglia C. [2], Cervera C. [2]
[1] Depto. Producción Animal y Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad Cardenal Herrera-CEU, Avda. del Seminario s/n, 46113-Moncada
[2] Depto. Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Cno. de Vera 14, 46071-Valencia. eblas@dca.upv.es

INTRODUCCIÓN

Los cambios en el ecosistema microbiano cecal del conejo durante el periodo peridestete son importantes tanto para la eficacia como para la salud digestiva (Gidenne y Fortun-Lamothe, 2002). El estudio de tales cambios se ha abordado describiendo la evolución de las distintas poblaciones bacterianas, monitorizado la concentración de AGV y amoniaco y el pH y, más recientemente, valorando la actividad enzimática microbiana (Marounek *et al*., 1995; Gidenne *et al*., 2000 y 2002; Pinheiro *et al*., 2001; Debray, 2002), con especial énfasis en los enzimas que degradan los constituyentes fibrosos.

Habitualmente, los métodos para valorar la actividad de las polisacaridasas se basan en hidrólisis de los respectivos substratos y cuantificación de los azúcares reductores liberados (normalmente mediante la reacción cromogénica de reducción del ácido 2-hidroxi 3,5-dinitrobenzoico). Para estudiar la influencia que ciertos factores puedan tener sobre tales actividades enzimáticas, es esencial que los ensayos se realicen en condiciones que aseguren que la velocidad de la reacción sea constante durante el tiempo de incubación y linealmente dependiente de la cantidad de enzima presente. En ninguno de los trabajos citados ni en otros realizados con contenido ruminal se hace referencia a tal garantía metodológica; quizá deba suponerse, pero la escueta descripción de las técnicas empleadas no permite descartar la hipótesis contraria.

El objetivo del presente trabajo es la puesta a punto de la técnica para valorar la actividad celulásica en el contenido cecal de los conejos. Secundariamente, se valoró dicha actividad enzimática en conejos de distinta edad y desarrollo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Extracción de la celulasa del contenido cecal. Se emplearon 24 gazapos de 12 camadas distintas, 3 de cada una de las edades consideradas (21, 28, 35 y 42 días de vida), tomando de cada camada 2 animales, el más ligero y el más pesado. Se pesó 1.2 g del contenido cecal en tubos de centrífuga con tapón y se añadió 3 ml de tampón anaeróbico MES (ácido 2-morfolino-etanosulfónico) 25 mM DTT *(*1,4-ditio-DL-treitol) 0.2 mg/l pH 6.5 enfriado a 4 ºC, manteniendo los tubos en baño de hielo hasta que se homogeneizaron a 8000 rpm durante 30 segundos bajo flujo de CO_2, tras lo cual se almacenaron a -80 ºC. Tras dos ciclos de descongelación-congelación consecutivos, las muestras se sometieron a un proceso de desintegración ultrasónica en 4 periodos de 30 segundos separados por intervalos de 30 segundos, en baño de hielo y bajo flujo de CO_2. Se centrifugó a 14000 x g durante 20 minutos y a 4 ºC. El sobrenadante se almacenó a -80 ºC hasta su valoración.

Verificación de la relación lineal entre el aumento de la concentración de azúcares reductores y el tiempo de incubación. Tras diversos ensayos preliminares, se dispuso 1.5 ml de un substrato de carboximetilcelulosa (10 mg/ml en tampón citrato 100 mM pH 6.0), en tubos de vidrio con rosca, atemperados en baño a 39 ºC. Se añadió 100 µl de una muestra promedio, constituida por un pool de 4 muestras (una por cada una de las edades consideradas) y se incubó durante 2.5, 5, 10, 15, 20, 30 ó 60 minutos, deteniendo la reacción con 1.5 ml del reactivo de ácido 2-hidroxi 3,5-dinitrobenzoico. Se calentó en baño a ebullición durante 5 minutos. Se enfrío y se leyó la densidad óptica (DO) a 540 nm. Para descontar los azúcares reductores no resultantes de la actividad enzimática de la muestra (los que pudieran estar presentes en el substrato o en la muestra, así como los que se hubieran originado durante la incubación por hidrólisis no imputable a la actividad enzimática de la muestra), se prepararon blancos de la forma descrita pero añadiendo la muestra después de agregar el reactivo de ácido 2-hidroxi 3,5-dinitrobenzoico.

Verificación de la relación lineal entre el aumento de la concentración de azúcares reductores y la cantidad de enzima presente. Se realizó un segundo ensayo, tal como se ha descrito en el apartado anterior pero utilizando en lugar de la muestra promedio un patrón con 0.2 µg/µl de celulasa de *Aspergillus niger*, del que se añadieron 25, 50, 75 ó 100 µl (completados hasta 100 µl con tampón citrato 100 mM pH 6.0) e incubando durante 5 ó 15 minutos.

Valoración de muestras procedentes del contenido cecal. A la luz de los ensayos anteriores, se estableció el protocolo para valorar la actividad enzimática de las muestras obtenidas del contenido cecal de gazapos de diferente edad (21, 28, 35 ó 42 días) y desarrollo (ligeros o pesados), utilizando 100 µl de muestra e incubando durante 5 ó 15 minutos. Para convertir los incrementos de DO en µmoles de glucosa formada, se obtuvo un recta de calibración con soluciones seriadas con 0 a 600 µg de glucosa por ml, puestas a reaccionar con el reactivo de ácido 2-hidroxi 3,5-dinitrobenzoico en las mismas condiciones que los incubados de substrato+muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La relación entre la DO y la duración de la incubación fue cuadrática, con un tramo lineal entre 2.5 y 20 minutos (Figura 1). Con ello puede concluirse que parece razonable medir el incremento de la DO que se produce desde los 5 a los 15 minutos de incubación, ya que: i) en ese tramo la respuesta observada es directamente proporcional al tiempo de incubación y ii) se optimiza el número de ensayos que pueden realizarse simultáneamente.

Como puede verse en la Figura 2, el incremento de DO es proporcional al volumen del patrón de celulasa hasta los ensayos realizados con 75 µl y menos que proporcional en los realizados con 100 µl (8.15, 16.05, 24.10 y 27.25 miliunidades/minuto para 25, 50, 75 y 100 µl). Ello permite concluir que el incremento de la DO desde los 5 a los 15 minutos de incubación no debe ser superior a 240 miliunidades: si la muestra ensayada originara incrementos mayores, el ensayo debe repetirse con una dilución de la muestra inicial.

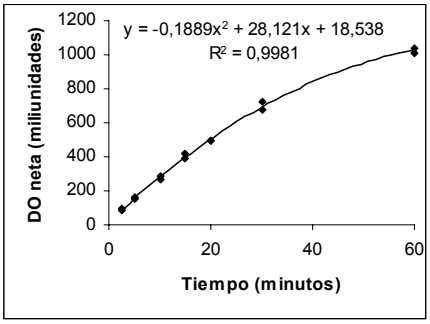


Figura 1. Densidad óptica a 540 nm obtenida al incubar el sustrato de carboximetilcelulosa y 100 µl de una muestra procedente de digesta cecal de gazapos de 21-42 días durante tiempo variable.

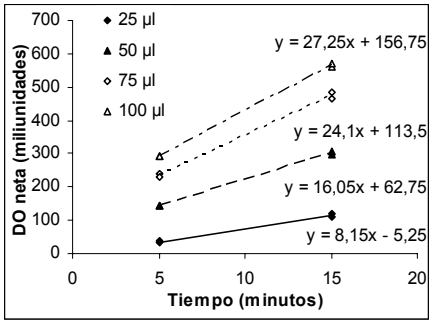


Figura 2. Densidad óptica a 540 nm obtenida al incubar el sustrato de carboximetilcelulosa y un volumen variable de celulasa patrón durante 5 y 15 minutos.

La variabilidad residual de la actividad celulásica de la digesta cecal fue muy alta (CV de 88%), de forma que el tamaño muestral resultó insuficiente para que las diferencias debidas a la edad o al desarrollo fueran estadísticamente significativas. Algunos trabajos muestran que la actividad celulásica está ampliamente establecida a los 25 días, aunque aún incrementa hasta la 7ª semana (Pinheiro *et al*., 2001; Gidenne *et al*., 2002), mientras Marounek *et al*. (1995) observan que desciende entre la 4ª semana y los 3 meses.

La actividad celúlasica media fue de 31 µmoles de glucosa/hora y g de digesta cecal, casi 2 veces la obtenida por Marounek *et al*. (1995) en animales de 4 semanas. No se determinó el contenido en MS en las muestras de digesta cecal; si le asignamos el valor de 21% propio de estas edades (Marounek *et al*., 1995; Gidenne *et al*., 2002; Soler *et al*, datos no publicados), para poder expresar la actividad enzimática por g de MS, los valores obtenidos en el presente trabajo son 7-8 veces superiores a los presentados por Pinheiro *et al.* (2001), Gidenne y Fortun-Lamothe (2002) y Gidenne *et al*. (2002). Gidenne y Fortun-Lamothe (2002) señalan que la actividad enzimática microbiana es objeto de amplias variaciones entre estudios. Probablemente, una de las principales fuentes de variación sean las diferentes condiciones de los ensayos para valorarla.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Debray L. 2002. *Doctoral thesis*, Institut National Polytechnique de Toulouse.
Gidenne T., Fortun-Lamothe L. 2002. *Anim. Sci.* 75, 169-184.
Gidenne T., Jehl N., Segura M., Michalet-Doreau B. 2002. *Anim. Feed Sci. Technol.* 99, 107-118.
Gidenne T., Pinheiro V., Falcao-Cunha L. 2000. *Livest. Prod. Sci.* 64, 225-237.
Marounek M., Vovk S.J., Skrivanova V. 1995. *Br. J. Nutr.* 73, 463-469.
Pinheiro V., Gidenne T., Falcao-Cunha L. 2001. *2nd Meeting of Workgroups 3 (Pathology and Prophylaxy) and 4 (Nutrition), COST Action 848*, Gödollo (Hungary), 50.