EFECTOS DE LA APLICACIÓN DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS SOBRE LA FERMENTACION RUMINAL *IN VITRO* DE UNA MEZCLA DE FORRAJE Y CONCENTRADO*

L.A. Giraldo, M.D. Carro, M.J. Ranilla y M.L. Tejido
Departamento de Producción Animal I, Universidad de León, 24071 León

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han realizado numerosos estudios para investigar la posibilidad de utilizar enzimas fibrolíticas como aditivos para mejorar el valor nutritivo de las dietas de los animales rumiantes, pero los resultados obtenidos han sido variables. Algunos de los factores que pueden condicionar la efectividad de estos preparados son la interacción substrato-enzima, la forma de aplicación de las enzimas y las dosis empleadas (Carro et al. 2004). Dado que las preparaciones enzimáticas son caras, la utilización de dosis superiores a las óptimas disminuiría las posibles ventajas económicas producidas por su uso. En este trabajo nos planteamos analizar el efecto de tres preparaciones enzimáticas, aplicadas a dos dosis diferentes, sobre la fermentación ruminal *in vitro* de un substrato con un alto contenido en forraje.

MATERIAL Y MÉTODOS

El substrato estuvo compuesto por una mezcla 70:30 de un heno de gramíneas y un concentrado de uso comercial, la cual contenía 470 g de fibra neutro-detergente (FND) y 141 g de proteína bruta por kg de materia seca (MS). El substrato se molió (1mm) antes de proceder a su fermentación *in vitro* con líquido ruminal. Para ello se pesaron 500 mg de MS de substrato en botellas de 120 ml a las que se añadieron 50 ml de una mezcla (1:4) de líquido ruminal y de un medio de cultivo para microorganismos anaerobios; dicha mezcla se mantuvo a 39ºC y gaseada con CO_2 durante todo el proceso. Como inóculo se utilizó líquido ruminal procedente de cuatro ovejas fistuladas en el rumen alimentadas con heno de buena calidad *ad libitum* y 300 g de concentrado al día.

En total se analizaron los efectos de siete tratamientos diferentes: substrato sin tratar (control; **CON**), tratamiento con una celulasa producida por *Aspergillus niger* aplicada a dosis de 15 (**CAS-15**) y 30 (**CAS-30**) UI/g de MS, tratamiento con una celulasa producida por *Trichoderma longibrachiatum* aplicada a dosis de 15 (**CTRI-15**) y 30 (**CTRI-30**) UI/g de MS y tratamiento con una xilanasa producida por *Trichoderma viride* aplicada a dosis de 15 (**XIL-15**) y 30 (**XIL-30**) UI/g de MS. Todas las enzimas son comercializadas por Fluka (Madrid, España). En todos los casos, las enzimas se disolvieron en una solución amortiguadora de fosfato sódico 1 mM (ph 6,5) y la disolución se dosificó directamente sobre el substrato dentro de las botellas (2 ml por botella). La dosificación de las soluciones enzimáticas se realizó 24 h antes de comenzar la incubación *in vitro* con líquido ruminal y durante este tiempo las botellas se mantuvieron en el laboratorio a temperatura ambiente (20-22ºC). Este pre-tratamiento del substrato se eligió porque en estudios previos se había comprobado que aumentaba la efectividad de los tratamientos enzimáticos (Giraldo et al. 2004a).

Las incubaciones duraron 8 y 24 horas, tras las cuales se midió la producción de

* Este trabajo ha sido financiado por el MCYT (Proyecto AGL2001-0130) y la Excma. Diputación Provincial de León.

gas en todas las botellas (en las botellas que se mantuvieron 24 horas se determinó también la producción de gas a las 8 horas). Transcurrido el tiempo de incubación correspondiente, las botellas se abrieron, se midió el pH de su contenido y se tomaron muestras para analizar la concentración en ácidos grasos volátiles (AGV). Posteriormente, el contenido de cada botella se filtró a través de crisoles provistos de una placa porosa, los cuales se secaron en estufa a 100ºC durante 48 horas y se determinó la degradabilidad de la MS; en el residuo de las incubaciones que duraron 24 horas se analizó su contenido en FND para determinar la degradabilidad de la misma (DFND). Se realizaron cuatro series de incubación, cada una con un inóculo ruminal diferente, de tal forma que se obtuvieron cuatro réplicas para cada tratamiento. Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de la varianza y las diferencias entre el tratamiento control y los diferentes tratamientos enzimáticos se analizaron mediante el test de Dunnett.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse en la Tabla 1, ninguno de los tratamientos enzimáticos provocó cambios (P>0,05) en el pH final o en la producción de gas a las 8 y 24 horas de incubación.

Tabla 1. Efecto de diferentes tratamientos enzimáticos sobre el pH, la producción de gas (ml) y de AGV (µmol) y la degradación de la materia seca (DMS; %) y de la fibra neutro-detergente (DFND; %) de un substrato compuesto por forraje y concentrado (70:30) tras su incubación *in vitro* con líquido ruminal durante 8 y 24 horas.

	Tratamiento							
8 horas	**CON**	**CAS-15**	**CAS-30**	**CTR-15**	**CTR-30**	**XIL-15**	**XIL-30**	e.e.d.[1]
pH	6,80	6,80	6,81	6,80	6,79	6,80	6,80	0,019
Gas	51,0	49,6	51,3	54,0	54,9	53,4	54,2	2,34
Total AGV	2535	2607	2727	2767	2849*	2390	2632	83,7
Acético	1588	1611	1685	1703	1727	1508	1674	51,4
Propiónico	563	611	648*	662*	705*	530	581	21,9
Butírico	270	269	275	281	285	247	265	9,5
Ac./Prop.	2,82	2,64*	2,60*	2,57*	2,45*	2,85	2,87	0,046
DMS	34,3	35,1	36,9	37,7	38,4*	36,1	38,6*	0,52
24 horas								
pH	6,71	6,70	6,67	6,69	6,69	6,69	6,68	0,023
Gas	101	102	100	110	104	107	98,9	5,76
Total AGV	3904	3885	4082	4075	4107	3883	3955	81,4
Acético	2387	2390	2486	2501	2488	2421	2461	49,9
Propiónico	835	830	907*	885	930*	801	821	21,3
Butírico	459	451	470	457	456	448	448	10,9
Ac./Prop.	2,85	2,88	2,77	2,82	2,68*	3,02*	2,99	0,051
DMS	58,5	57,3	56,6	61,0	60,0	57,8	60,6	1,40
DFND	36,0	36,2	36,7	39,6	41,6*	36,7	43,4*	2,12

[1] error estándar de la diferencia.

* para cada parámetro, los valores con asterisco difieren (P<0,05) del control.

Cuando se determinó la producción de AGV tras 8 horas de incubación, se observó que los tratamientos **CAS-30**, **CTR-15** y **CTR-30** provocaron un aumento (P<0,05) de la producción de ácido propiónico, pero ninguno de los tratamientos enzimáticos afectó (P>0,05) a la producción de los ácidos acético y butírico. Cuando el tiempo de incubación se prolongó hasta 24 horas, el aumento observado en la producción de propiónico se mantuvo para los tratamientos **CAS-30** y **CTR-30**, pero no se observaron diferencias (P>0,05) en la producción total de AGV entre el control y los diferentes tratamientos enzimáticos.

Los tratamientos **CTR-30** y **XIL-30** produjeron un aumento (P<0,05) de la DMS del substrato (4,1 y 4,6 unidades porcentuales, respectivamente) tras 8 horas de incubación, pero estas diferencias desaparecieron cuando la incubación con líquido ruminal duró 24 horas. Sin embargo, estos dos tratamientos enzimáticos provocaron un aumento (P<0,05) de la DFND del substrato a las 24 horas de incubación (36,0, 41,6 y 43,4% para los tratamientos **CON**, **CTR-30** y **XIL-30**, respectivamente), lo que indicaría que estas enzimas ejercieron un efecto positivo sobre la degradación de la fibra. En trabajos previos realizados por nuestro grupo (Giraldo et al. 2004b), se observó que el tratamiento de diferentes forrajes con enzimas fibrolíticas (celulasas y xilanasas) durante 24 horas producía una disminución de su contenido en FND, posiblemente debido a que las enzimas provocasen la ruptura de algunas de las uniones de los hidratos de carbono que forman la pared celular; este hecho facilitaría la colonización de los microorganismos ruminales y el inicio de la degradación de la pared celular por los mismos (Nsereko et al. 2000).

Nsereko et al. (2000) observaron que el tratamiento de heno de alfalfa con diferentes enzimas fibrolíticas producía una liberación de azúcares solubles. Este efecto podría justificar los aumentos observados en nuestro estudio en la producción de ácido propiónico con algunos de los tratamientos enzimáticos. El aumento observado en la producción de ácido propiónico tras 8 horas de incubación del substrato con líquido ruminal fue del 15 y 21% para los tratamientos **CAS-30** y **CTR-30**, respectivamente, pero se redujo al 8,6 y 11% (tratamientos **CAS-30** y **CTR-30**, respectivamente) a las 24 horas de incubación. Debido a estos cambios en la producción de ácido propiónico, los tratamientos **CAS-15**, **CAS-30**, **CTR-15** y **CTR-30** redujeron (P<0,05) la relación acético/propiónico a las 8 horas de incubación, pero este efecto se mantuvo únicamente para el tratamiento **CTR-30** a las 24 horas de incubación.

Los resultados de este trabajo indicarían que el tratamiento de substratos con un alto contenido en forraje con enzimas fibrolíticas puede facilitar la degradación inicial de los mismos en condiciones *in vitro*, pero a medida que avanza el tiempo de incubación, la actividad fibrolítica de los microorganismos ruminales puede hacer que los efectos de las enzimas sean menos marcados o incluso no se detecten.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Carro MD, Ranilla MJ y Tejido ML. 2004. Uso de aditivos enzimáticos para mejorar la digestión ruminal de los forrajes. Enzimas. *Albéitar*, (enero-febrero): 34-37.

Giraldo LA, Ranilla MJ, Tejido ML and Carro MD. 2004a. Effect of enzyme application method on *in vitro* rumen fermentation of tropical forages. *J. Anim. Feed Sci.* 13: 63-66.

Giraldo LA, Ranilla MJ, Tejido ML and Carro MD. 2004b. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* rumen fermentation of tropical forages. *J. Anim. Feed Sci.* 13: 67-70.

Nsereko VL, Morgavi DP, Rode LM, Beauchemin KA and McAllister TA. 2000. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 88: 153-170.