UTILIZACIÓN DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS PARA MEJORAR LA DIGESTIÓN DE FORRAJES TROPICALES. II. EFECTOS EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO* Y LA DEGRADABILIDAD

Díaz, A.[1], M.J. Ranilla[1,2], C. Saro[1], L.A. Giraldo[3] y M.D. Carro[4*]

[1] Departamento de Producción Animal. Universidad de León. 24071 León, España
[2] IGM (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León, España
[3] Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Calle 59A No 63-20, Autopista Norte. Medellín, Colombia
[4] Departamento de Producción Animal, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria. 28040 Madrid, España
**mariadolores.carro@upm.es*

INTRODUCCIÓN

Los forrajes tropicales presentan, en general, un menor valor nutritivo que los forrajes de zonas templadas. Sin embargo, su disponibilidad suele ser elevada y en numerosas ocasiones son el único recurso alimenticio disponible para los animales rumiantes. Esta situación limita la productividad de estos animales y por ello se han investigado diferentes estrategias para aumentar el valor nutritivo de los forrajes tropicales. Una de las metodologías propuestas para incrementar la utilización digestiva de los forrajes es el tratamiento de los mismos con enzimas fibrolíticas (Carro y Ranilla, 2001), pero todavía son escasos los estudios realizados con forrajes tropicales. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de tres preparados enzimáticos en la fermentación ruminal *in vitro* y la degradabilidad de tres forrajes tropicales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron los efectos de tres enzimas: celulasa de *Trichoderma longibrachiatum* (**CEL**), xilanasa de microorganismos ruminales (**XIL**) y una mezcla a partes iguales de ambas (**MEZ**). A pH 6,5 y 39ºC, 1 mg de **CEL** liberó por minuto 2,40 y 0,385 µmol de glucosa y 1,72 µmol de xilosa a partir de carboximetilcelulosa, almidón soluble y xilano de avena, respectivamente. En las mismas condiciones, **XIL** liberó por minuto 30,2 µmol of xilosa a partir de xilano de avena, pero no se detectaron actividades carboximetilcelulasa ni amilasa. Como sustratos se utilizaron muestras de tres forrajes tropicales: *Pennisetum clandestinum*, *Dichanthium aristatum Benth* y *Acacia mangium*, cuya composición química se muestra en un trabajo anterior (Díaz *et al*., 2013). Los forrajes se molieron (1mm) y se pesaron 500 mg de materia seca (MS) en botellas de 120 mL para su fermentación *in vitro*.

Las enzimas se disolvieron en una solución tampón de fosfato sódico 1 mM (pH=6,5) y se dosificaron directamente sobre los forrajes dentro de las botellas a una dosis de 20 unidades enzimáticas por g de forraje. La unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de glucosa o xilosa por minuto a partir del sustrato correspondiente a pH 6,5 y 39ºC. Las soluciones enzimáticas se aplicaron a los forrajes 24 horas antes de la incubación, ya que previamente se comprobó que este pre-tratamiento aumentaba la efectividad de las mismas (Díaz *et al*., 2013), y las botellas control (**CON**) recibieron solución tampón de fosfato sódico sin enzima. Las botellas se llenaron con 50 mL de una mezcla (1:4) de líquido ruminal procedente de cuatro ovejas fistuladas en el rumen alimentadas con heno de alfalfa de calidad media *ad libitum* y de medio de cultivo para microorganismos anaerobios. Tras su llenado, las botellas se cerraron y se incubaron a 39ºC. Transcurridas 24 horas, las botellas se abrieron, se midió el pH de su contenido y se tomaron muestras para analizar la concentración en ácidos grasos volátiles (AGV) y amoníaco. Finalmente, el contenido de cada botella se filtró a través de crisoles provistos de una placa porosa, los cuales se secaron en estufa (100ºC; 48 h) y se pesaron para calcular la degradabilidad de la MS (DMS). Posteriormente, se analizó el contenido en fibra neutro detergente (FND) del residuo para determinar la degradabilidad de la fibra (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 tratamientos se analizaron mediante el test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse en la Tabla 1, el tratamiento de *P. clandestinum* y *D. aristatum Benth* con **CEL** aumentó (P<0,05) la producción de propiónico y butírico, la DMS (6 y 9%, respectivamente) y la DFND (12 y 8%, respectivamente). En el caso de *D. aristatum Benth* se observó también un aumento (P<0,05) en la producción de acético (22%) y del total de AGV (20%). Estos resultados indicarían que esta enzima favoreció la degradación de los dos forrajes, lo que resultó en una mayor producción de AGV. El tratamiento de *A. mangium* con **CEL** aumentó (P<0,05) la producción de todos los AGV, pero no afectó (P>0,05) a la DMS y DFND.

Tabla 1. *Efecto del tratamiento de forrajes tropicales con diferentes enzimas durante 24 horas sobre el pH, la concentración de NH_3-N (mg/L), la producción (*µmol*) total de ácidos grasos volátiles (AGV), de acético, propiónico y butírico, la relación acético:propiónico (Ac:Pr; mol/mol) y la degradabilidad de la materia seca (DMS; %) y de la fibra neutro detergente (DFND, %) en fermentaciones* in vitro.

		Tratamiento enzimático[1]					
Forraje	Item	**CON**	**CEL**	**XIL**	**MEZ**	eem[2]	*P* =
P. clandestinum	pH	6,70	6,67	6,68	6,66	0,010	0.074
	NH_3-N	262^{a}	289^{b}	269^{a}	286^{ab}	6,5	0,049
	Total AGV	2018	2214	1909	2137	75,9	0,080
	Acético	1428	1531	1334	1490	58,0	0,160
	Propiónico	403^{ab}	457^{c}	388^{a}	436^{bc}	13,7	0,023
	Butírico	119^{a}	146^{b}	118^{a}	139^{b}	4,0	0,002
	Ac/Pr	3,57	3,39	3,46	3,44	0,054	0,214
	DMS	48,7^{a}	51,5^{b}	48,7^{a}	50,7^{b}	0,45	0,003
	DFND	41,3^{a}	46,1^{b}	41,9^{a}	44,4^{b}	0,47	<0,001
D. aristatum Benth	pH	6,65	6,62	6,63	6,63	0,009	0.943
	NH_3-N	157	171	167	163	5,6	0,353
	Total AGV	1887^{a}	2301^{b}	1756^{a}	2018^{ab}	101,4	0,023
	Acético	1366^{a}	1643^{b}	1268^{a}	1456^{ab}	74,8	0,034
	Propiónico	347^{a}	442^{b}	325^{a}	379^{a}	19,5	0,010
	Butírico	134^{a}	159^{b}	124^{a}	139^{ab}	6,8	0,033
	Ac/Pr	3,97^{b}	3,73^{a}	3,95^{b}	3,88^{ab}	0,048	0,028
	DMS	37,6^{a}	40,9^{b}	37,5^{a}	39,6^{b}	0,55	0,005
	DFND	35,2^{a}	38,0^{c}	34,3^{a}	37,4^{b}	0,72	0,002
A. mangium	pH	6,73	6,73	6,75	6,73	0,008	0.496
	NH_3-N	192	209	196	199	6,6	0,371
	Total AGV	1220^{a}	1497^{c}	1261^{ab}	1427^{bc}	56,8	0,021
	Acético	872^{a}	1059^{bc}	905^{ab}	1019^{bc}	42,0	0,034
	Propiónico	347^{a}	442^{b}	325^{a}	379^{a}	19,5	0,020
	Butírico	79,8^{a}	100^{c}	83,0^{ab}	91,3^{bc}	2,9	0,003
	Ac/Pr	3,78	3,64	3,83	3,75	0,078	0,112
	DMS	26,0	27,0	26,2	26,1	0,33	0,198
	DFND	22,7	23,4	22,3	22,1	0,40	0,179

[1] **CON**: control (sin tratamiento); **CEL**: celulasa de *Trichoderma longibrachiatum*: **XIL**: xilanasa de microorganismos ruminales; **MEZ**: mezcla 1:1 de **CEL** y **XIL**.

[2] error estándar de la media

[a, b, c] en la misma fila, los valores con diferente letra difieren (P<0,05)

No se observaron efectos (P>0,05) de **XIL** sobre la fermentación de ningún forraje, lo que pudo deberse a que esta enzima es producida por microorganismos ruminales, por lo que podría bloquear los lugares de unión de las enzimas producidas por los microorganismos presentes en el inóculo e impedir su acción durante la incubación. Los efectos de **MEZ** sobre la fermentación de los forrajes fueron menores que los observados para **CEL**, ya que aumentó (P<0,05) la DMS y DFND de *P. clandestinum* (4 y 8%, respectivamente) y *D. aristatum Benth* (5 y 6%, respectivamente), sin que se observaran cambios (P>0,05) en la producción de AGV, con la excepción de un aumento de la producción de butírico con *P. clandestinum*. El tratamiento de *A. mangium* con **MEZ** provocó un incremento (P<0,05) de la producción de acético, butírico y del total de AGV, sin que se observaran efectos en la degradabilidad.

En trabajos previos se observó que la celulasa utilizada en este trabajo (**CEL**) estimuló la fermentación in vitro de dietas con diferente relación forraje:concentrado (Giraldo *et al*., 2007, 2008a) y aumentó la degradabilidad *in situ* de forrajes de calidad media y la actividad fibrolítica ruminal (Giraldo *et al*., 2008b). Los resultados del presente estudio confirmarían la eficacia de esta enzima para estimular la fermentación ruminal *in vitro* de forrajes tropicales, aunque la magnitud de los efectos dependió del forraje utilizado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Carro, M.D., M.J. Ranilla. 2001. Las enzimas como aditivos en la alimentación de los animales rumiantes. *Mundo Ganadero* 134: 62-67. • Díaz, A., M.J. Ranilla, C. Saro, L.A. Giraldo, M.D. Carro. 2013. Utilización de enzimas fibrolíticas para mejorar la digestión de forrajes tropicales: influencia del método de aplicación en la producción de gas *in vitro* y la composición química. ITEA (En prensa). • Giraldo, L.A., M.L. Tejido, M.J. Ranilla, M.D. Carro. 2007. Effects of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in Rusitec fermenters. J. Anim. Sci. 85, 1962-1970. • Giraldo, L.A., M.L. Tejido, M.J. Ranilla, M.D. Carro. 2008a. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratios. Anim. Feed Sci. Technol. 141, 306-325. • Giraldo, L.A., M.L. Tejido, M.J. Ranilla, S. Ramos, M.D. Carro. 2008b. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay based diet. J. Anim. Sci. 86,1617-1623.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte de los Proyectos AGL2008-04707-C02-02 (financiado por el MICINN) y PCI-Iberoamérica A/4951/06 (financiado por MAE-AECID).

USE OF FIBROLYTIC ENZYMES TO IMPROVE DIGESTION OF TROPICAL FORAGES: EFFECTS ON *IN VITRO* RUMINAL FERMENTATION AND DEGRADABILITY

ABSTRACT: This study was conducted to evaluate the effects of three exogenous fibrolytic enzymes (cellulase from *Trichoderma longibrachiatum* (CEL), xylanase from ruminal microorganisms (XYL) and a 1:1 mixture of both enzymes (MIX)) on the *in vitro* ruminal fermentation of three tropical forages (*Pennisetum clandestinum*, *Dichanthium aristatum Benth* and *Acacia mangium*). Forages were treated with enzymes for 24 h before in vitro incubation with ruminal fluid for 24 h. Both CEL and MIX treatments increased (P<0.05) dry matter and fiber disappearance for *P. clandestinum* and *D. aristatum Benth*, but had no effects (P>0.05) with *A. mangium*. In addition, CEL increased (P<0.05) propionate and butyrate production for all forages. In contrast, no effects (P>0.05) of XYL were detected for any forage. The results indicate that the treatment of tropical forages with CEL and MIX can stimulate their *in vitro* ruminal fermentation, but the xylanase used in this study did not produce any positive effect.

Keywords: cellulase, xylanase, in vitro ruminal fermentation, degradability