UTILIZACIÓN DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS PARA MEJORAR LA DIGESTIÓN DE FORRAJES TROPICALES. I. INFLUENCIA DEL MÉTODO DE APLICACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO* Y LA COMPOSICIÓN QUÍMICA

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

En muchos países tropicales los sistemas productivos de animales rumiantes se basan en una amplia utilización de recursos forrajeros. Sin embargo, estos recursos suelen tener una baja calidad, por lo que cualquier mejora de su valor nutritivo tendrá una repercusión positiva en la productividad de los animales. En los últimos años se han realizado numerosos estudios para evaluar diferentes enzimas fibrolíticas como aditivos para mejorar el valor nutritivo de forrajes, pero la mayoría de ellos han utilizado forrajes de elevada calidad y apenas existen estudios con forrajes de baja calidad. Por otra parte, los resultados han sido muy variables, ya que la efectividad de las enzimas se ve afectada por numerosos factores, siendo el tipo de forraje y el método de aplicación de las enzimas dos de los más importantes (Giraldo *et al*., 2008). El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de tres enzimas fibrolíticas exógenas en la fermentación ruminal *in vitro* de tres forrajes tropicales cuando las enzimas se aplicaron 24 h antes o en el momento de la incubación.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo utilizando un sistema de cultivos discontinuos de microorganismos ruminales y muestras de tres forrajes tropicales: *Pennisetum clandestinum*, *Dichantium aristatum Benth* y *Acacia mangium.* El contenido (g/kg materia seca (MS)) en proteína bruta, fibra neutro-detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y lignina en los forrajes fue 186, 630, 264 y 5,8 en *P. clandestinum*, 39, 736, 400 y 34 en *D. aristatum Benth*, y 106, 488, 318 y 157 en *A. mangium*. Se pesaron 500 mg de MS de los forrajes en botellas de 120 mL a las que se añadieron 50 mL de una mezcla (1:4) de líquido ruminal y medio de cultivo para microorganismos anaerobios. Como inóculo se utilizó líquido ruminal procedente de cuatro ovejas fistuladas en el rumen alimentadas con heno de alfalfa de calidad media *ad libitum*. Se analizaron los efectos de siete tratamientos enzimáticos: forrajes sin tratar (control; **CON**), tratamiento con una celulasa producida por *Trichoderma longibrachiatum* aplicada inmediatamente antes de la incubación *in vitro* (**CEL0**) o 24 antes (**CEL24**), tratamiento con xilanasa de microorganismos ruminales aplicada de las dos formas descritas (**XIL0** y **XIL24**) y una mezcla a partes iguales de los dos tratamientos anteriores (**MEZ0** y **MEZ24**). 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 internacionales por g de forraje. Las botellas se incubaron a 39ºC y se midió el gas a las 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96 y 120 h, dejando salir el gas después de cada medición. Tras 120 h de incubación, el contenido de las botellas se filtró a través de crisoles provistos de una placa porosa y se determinó la desaparición de materia orgánica (MO). Los datos de producción de gas se ajustaron al modelo exponencial: $y = A\ (1 - e^{-c\ (t-lag)})$, en el que A representa la producción potencial de gas y c es el ritmo de producción de gas. A partir de estos datos se calculó el ritmo medio de producción de gas como $RMPG = A\ c / [2\ (\ln 2 + c\ lag)]$ y la degradabilidad efectiva de la MO (DEMO) para un ritmo de paso a través del retículo-rumen de 0,035 h^{-1}.

Para estudiar el efecto del pre-tratamiento con enzimas sobre la composición química de los forrajes se pesaron 250 mg de muestra en bolsas de poliéster (Ankom Corp #57; 50 x 40 mm; 25 ± 10 µm poro) previamente pesadas, a las que se añadió 1 mL de buffer sin enzima (**CON**) o con 5 unidades enzimáticas de las enzimas evaluadas. Las bolsas se sellaron, se dejaron a temperatura ambiente (21-23ºC) durante 24 h y a continuación se analizó el

contenido en FND y FAD. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza y cuando se detectó un efecto significativo ($P<0,05$) del tratamiento experimental las diferencias entre las medias se analizaron mediante el test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para realizar este estudio se eligió la técnica de la producción de gas porque se ha demostrado que la cantidad de gas producida en las incubaciones *in vitro* es una medida indirecta de la degradación de los sustratos (Menke y Steingass, 1998). Como se puede observar en la Tabla 1, ninguno de los tratamientos enzimáticos afectó (P>0,05) a la producción potencial de gas de *P. clandestinum*, pero todos, excepto **XIL0**, aumentaron (P<0,05) los valores de *c* y RMPG. Los valores de estos parámetros fueron mayores (P<0,05) para **CEL24** y **MEZ24** que para los tratamientos **CEL0** y **MEZ0**, indicando una mayor eficacia de las enzimas cuando se permite un período de contacto con el forraje antes de que se inicie la degradación por los microorganismos ruminales. De acuerdo con estos resultados, **CEL24** y **MEZ24** aumentaron (P<0,05) la DEMO de *P. clandestinum* comparados con **CEL0** y **MEZ0**, respectivamente.

Tabla 1. *Efecto de diferentes tratamientos enzimáticos en la producción potencial de gas (A; mL/500 mg materia seca), ritmo de producción de gas (c;%/h), ritmo medio de producción de gas (RMPG; mL/h) y degradabilidad efectiva de la materia orgánica (DEMO; %) de forrajes tropicales incubados* in vitro *con líquido ruminal*

Forraje y parámetro	Tratamiento enzimático[1]								
	CON	**CEL0**	**CEL24**	**XIL0**	**XIL24**	**MEZ0**	**MEZ24**	eem[2]	P =
P. clandestinum									
A	149^{ab}	155^{b}	155^{b}	146^{a}	150^{ab}	152^{b}	155^{b}	1,8	0,027
c	0,028^{a}	0,030^{b}	0,034^{c}	0,028^{a}	0,029^{b}	0,030^{b}	0,033^{c}	0,0005	<0,001
RMPG	2,06^{a}	2,36^{b}	2,62^{c}	2,02^{a}	2,22^{b}	2,26^{b}	2,54^{c}	0,05	<0,001
DEMO	33,1^{a}	34,7^{ab}	37,4^{c}	33,0^{a}	34,7^{ab}	33,7^{a}	36,2^{bc}	0,55	<0,001
D. aristatum Benth									
A	138^{b}	144^{c}	133^{a}	139^{b}	130^{a}	140^{b}	132^{a}	1,4	<0,001
c	0,025^{b}	0,029^{c}	0,034^{d}	0,023^{a}	0,025^{ab}	0,027^{c}	0,033^{d}	0,0006	<0,001
RMPG	1,75^{a}	2,09^{c}	2,28^{d}	1,63^{a}	1,59^{a}	1,90^{b}	2,17^{cd}	0,05	<0,001
DEMO	24,5^{ab}	26,1^{b}	28,5^{c}	23,3^{a}	23,6^{a}	25,5^{b}	28,7^{c}	0,50	<0,001
A. mangium									
A	42,8^{ab}	50,2^{cd}	52,7^{d}	40,8^{a}	44,4^{b}	47,3^{c}	49,2^{c}	0,91	<0,001
c	0,048^{a}	0,052^{bc}	0,060^{d}	0,047^{a}	0,054^{c}	0,049^{ab}	0,058^{d}	0,0009	<0,001
RMPG	1,03^{a}	1,31^{bc}	1,61^{d}	0,97^{a}	1,21^{b}	1,18^{b}	1,44^{c}	0,05	<0,001
DEMO	18,2	18,9	20,4	17,9	19,4	18,1	20,4	0,69	0,108

[1] **CON**: control (sin tratamiento); **CEL**: celulasa de *Trichoderma longibrachiatum*: **XIL**: xilanasa de microorganismos ruminales; **MEZ**: mezcla 1:1 de CEL y XIL. Las enzimas se aplicaron inmediatamente antes de la incubación (**0**) o 24 horas antes de la misma (**24**).

[2] error estándar de la media

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

Cuando se utilizó *D. aristatum Benth* como sustrato, no se observó ningún efecto positivo de **XIL0** y **XIL24**, pero **CEL0**, **CEL24** y **MEZ24** aumentaron (P<0,05) los valores de *c*, RMPG y DEMO. De nuevo se observó que los efectos positivos de CEL y MEZ sobre *c*, RMPG y la DEMO eran mayores (P<0,05) cuando las enzimas se aplicaban a los forrajes 24 horas antes de la incubación que cuando se administraban inmediatamente antes de la misma. El tratamiento de *A. mangium* con **CEL0**, **CEL24** y **MEZ24** aumentó (P<0,05) la producción potencial y los ritmos de producción de gas (*c* y RMPG), pero no se observaron efectos en la DEMO. El tratamiento **XIL0** no ejerció efecto (P>0,05) sobre la degradación de *A. mangium*,

pero **XIL24** y **MEZ0** aumentaron (P<0,05) los valores de *c* y RMPG, siendo en general más acusados los efectos de **MEZ24**.

El hecho de que los efectos de las enzimas CEL y MEZ fuesen más acusados cuando se aplicaron a los forrajes 24 h antes de la incubación podría deberse parcialmente a su acción hidrolítica sobre los componentes de la pared celular de los mismos. Como se observa en la Tabla 2, **CEL24** y **MEZ24** produjeron una reducción del contenido en FND de *P. clandestinum* y *D. aristatum Benth*, pero no afectaron (P<0,05) a la composición de *A. mangium*, lo que estaría de acuerdo con los menores efectos de las enzimas observados para este forraje.

Tabla 2. *Efecto del tratamiento de forrajes tropicales con diferentes enzimas durante 24 horas en su contenido (g/kg materia seca) en fibra neutro-detergente (FND) y fibra ácido-detergente (FAD)*

		Tratamiento enzimático[1]					
Forraje		**CON**	**CEL24**	**XIL24**	**MEZ24**	eem[2]	*P* =
P. clandestinum	FND	630^{c}	613^{a}	625^{bc}	619^{ab}	3,3	0.012
	FAD	264^{b}	258^{a}	263^{b}	260^{ab}	1,3	0.024
D. aristatum Benth	FND	736^{b}	710^{a}	738^{b}	712^{a}	6,0	0.010
	FAD	400	394	398	390	3,7	0.250
A. mangium	FND	489	493	491	494	3,1	0.731
	FAD	318	314	319	320	4,0	0.768

[1] CON: control (sin tratamiento); **CEL24**: celulasa de *Trichoderma longibrachiatum*: **XIL24**: xilanasa de microorganismos ruminales; **MEZ24**: mezcla 1:1 de CEL24 y XIL24.
[2] error estándar de la media
[a, b, c] en la misma fila, los valores con diferente letra difieren (P<0,05)

En las condiciones del presente estudio el pre-tratamiento con enzimas 24 h antes de la incubación estimuló la degradación *in vitro* de los forrajes en mayor medida que la aplicación de las enzimas en el momento de la incubación. Este efecto podría deberse en parte a la reducción del contenido en FND observado en dos de los tres forrajes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Menke, K.H., H. Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Anim. Res. Dev. 28: 7-55.
• Giraldo, L.A., M.L. Tejido, M.J. Ranilla, M.D. Carro. 2008. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on in vitro ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratios. Anim. Feed Sci. Technol. 141: 306-325

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

USE OF FIBROLYTIC ENZYMES TO IMPROVE DIGESTION OF TROPICAL FORAGES: INFLUENCE OF APPLICATION METHOD ON CHEMICAL COMPOSITION AND *IN VITRO* GAS PRODUCTION

ABSTRACT: The objective of this study was to investigate the effects of three enzymes (cellulase, xylanase and a 1:1 mixture of both enzymes), applied either immediately before incubation or 24 h before, on the *in vitro* gas production of three tropical forages. In general, xylanase showed little or no effects (P>0.05) on in vitro gas production for the three forages. Both cellulase and the mixture increased (P<0.05) the gas production rate and effective degradability of organic matter when they were applied to forages 24 h before incubation, but the effects were less marked or even disappeared when were applied immediately before incubation. Neutral detergent fiber content of two forages decreased (P<0.05) after 24 h pre-treatment with cellulase. The results indicate that 24 h pre-treatment of forages with cellulase and the mixture increased their efficacy, but results were affected by the incubated forage.

Keywords: cellulase, xylanase, fibre, in vitro gas production