

EFFECTOS DE pH, TEMPERATURA Y DOSIS DE INCLUSIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DE PRODUCTOS COMERCIALES CON ENZIMAS FIBROLÍTICOS

E. González, E. Albanell, G. Caja y R. Casals

Grup de Recerca en Remugants, Departament de Ciència Animal i dels Aliments.
Facultat Veterinària, Univ. Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra 08193, Barcelona

INTRODUCCIÓN

Existe poca información sobre los mecanismos de acción y las condiciones productivas en las que pueden ser efectivas la adición de enzimas fibrolíticas exógenas en la alimentación de rumiantes, siendo por tanto necesarias investigaciones básicas que abunden sobre las condiciones más favorables en las cuales su uso resulte más efectivo en la mejora de los indicadores de digestibilidad y respuesta animal.

Cada enzima requiere de valores específicos de pH y temperatura (o sus rangos) para expresar su óptima actividad. Estos factores son de importancia primordial cuando se selecciona para un determinado proceso industrial (Uhlir, 1998) con el objetivo de lograr operar con el máximo de eficiencia enzimática. Desde que Michaelis y Menten (1913), pusieran de manifiesto que el factor que controla la actividad catalítica es el número y distribución de las cargas sobre la molécula enzimática, ningún trabajo sobre las propiedades de un nuevo enzima está completo si no contiene el perfil de actividad en función del pH.

Por otra parte, fuera del rango de las temperaturas óptimas, las enzimas pueden ser desnaturalizadas. La temperatura a la cual la inactivación comienza es característica para cada enzima. Los rangos óptimos de temperatura para una enzima son aquellos en los cuales la enzima se mantiene lo suficientemente estable. Los procesos de aplicación de los productos enzimáticos al alimento en la industria, así como el ambiente propio del rumen, llevan implícitos fases en las cuales la temperatura puede ser un factor limitante de la actividad enzimática.

El presente trabajo pretende realizar una aproximación al estudio del pH, la temperatura y la dosis de inclusión como factores abióticos que pudieran estar determinando la actividad enzimática esperada de productos fibrolíticos comerciales para su uso en ganadería.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron las actividades enzimáticas de los productos Promote® y Cellupract® ante:

3 Dosis de inclusión de cada producto enzimático (1, 2 y 3 g/kg de materia seca, MS)

3 Niveles de pH del medio (4.0, 5.5 y 6.5)

4 Temperaturas de incubación (30, 40, 50 y 70°C)

Las concentraciones de azúcares reductores se determinaron por el método de Nelson-Somogyi (Somogyi, 1952) con la glucosa como patrón.

Los productos enzimáticos usados son aditivos de alimentos registrados para su uso en las raciones para el ganado y disponibles comercialmente: Promote® (Agribands International Inc., St. Louis, MO) y Cellupract®AL 100 (BIOPRACT GMBH,

Berlín, Alemania); ambos con actividad celulasa y xilanasas y con actividades amilasas despreciables.

La unidad de actividad enzimática (AE) fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 μmol de azúcar reductor equivalente por minuto, bajo las condiciones de incubación estandarizadas y de estimación descritas. El cálculo de dicha unidad se efectuó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad (AE/mg)} = \text{M} \times \text{FD} / \text{t} \times \text{m}$$

Donde: M = μmol glucosa liberados, determinados de la curva patrón; FD = Factor de dilución; T = tiempo de incubación en minutos; m = mg enzima usados en el ensayo

Los datos fueron analizados mediante el procedimiento GLM de SAS (1996) teniendo en cuenta el efecto de cada una de las variables en estudio y sus interacciones sobre la variación de la actividad enzimática de cada producto comercial evaluado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se observaron diferencias entre los 2 productos para las diferentes condiciones estudiadas ($P > 0.05$), registrándose tendencias similares en todos los casos (Figura 1).

La dosis de inclusión no mostró diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0.494$) aunque la tendencia gráfica fue a incrementar la AE de forma lineal con la cantidad de producto aplicado.

El comportamiento de los 2 productos enzimáticos al ser incubados a diferentes temperaturas (30, 40, 50 y 70°C) mostró diferencias ($P < 0.0001$) observándose una estimulación de la actividad catalítica a 50°C con posterior inhibición a 70°C.

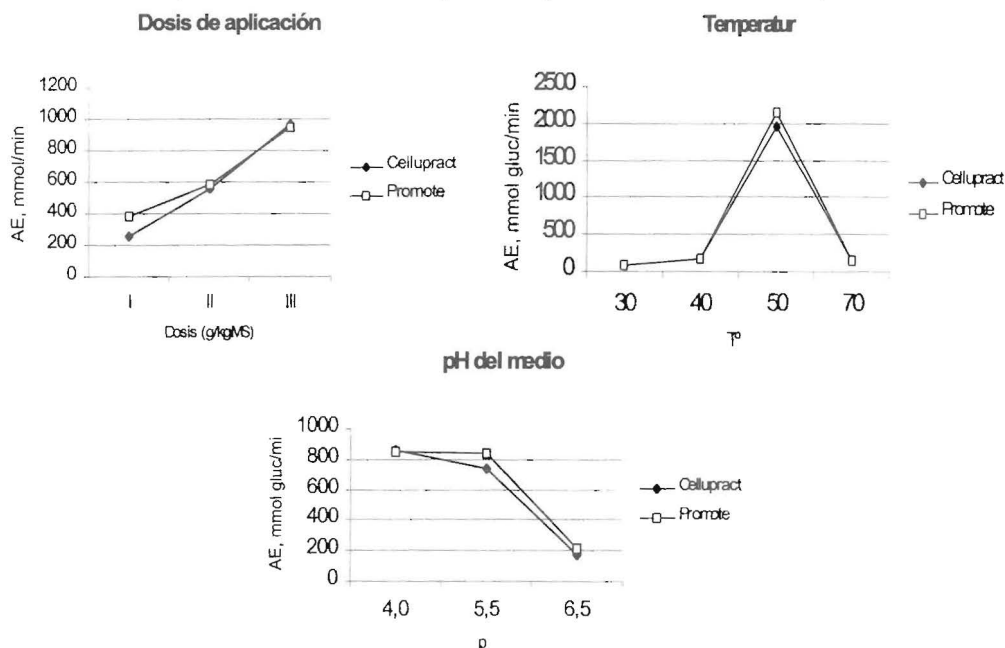
En cuanto al pH, las diferencias observadas ($P < 0.043$) mostraron mejores valores de AE a pH 4.0 y una disminución al aumentar la basicidad del medio (Figura 1). Una explicación a este fenómeno pudiera venir de la comparación del pH óptimo de las enzimas fibrolíticas exógenas producidas por los microorganismos ruminales con el pH óptimo de enzimas fibrolíticas exógenas producidas por hongos aeróbicos (productos). Está bien documentado que el crecimiento de bacterias fibrolíticas es inhibido (Russell y Dombrowski, 1980), y que la digestión de la fibra es severamente comprometida (Hoover *et al.*, 1984) cuando el pH cae por debajo de 6.2. La mayoría de las enzimas fibrolíticas producidas por los microorganismos ruminales funcionan óptimamente a valores de pH por encima de 6.2 (Matte y Forsberg, 1992). Por el contrario, el pH óptimo de las enzimas fibrolíticas producidas por hongos aeróbicos típicamente se comporta en el rango de 4.0 a 6.0 (Gashe, 1992). El pH ruminal puede estar por debajo de 6.0 en un período significativo del transcurso del día en el ganado vacuno lechero (Yang *et al.*, 1999) y de carne (Krause *et al.*, 1998). Bajo estas condiciones, las enzimas exógenas pudieran contribuir significativamente a la digestión ruminal de la fibra.

De las interacciones evaluadas, temp:pH ($P < 0.027$) evidenció diferencias significativas entre sus diversas combinaciones, lógicamente explicado por los efectos individuales de ambos parámetros por separado; por otra parte, dosis:temp mostró una

tendencia estadística a afectar la AE ($P > 0.131$) mientras que las combinaciones de dosis:pH no resultaron relevantes ($P > 0.98$).

En conclusión, la temperatura de incubación y el pH del medio demostraron ser factores determinantes en las actividades celulolíticas de los productos evaluados. Resulta interesante además, las diferencias entre los mejores comportamientos en las condiciones del estudio y los parámetros óptimos normales del rumen para la digestión de la fibra.

Figura 1. Efectos de la dosis de aplicación, temperatura, pH sobre la actividad enzimática de productos comerciales (μmol de glucosa liberados/minuto)



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto AGL2001-2617 financiado por la CICYT.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gashe BA. 1992. J. Appl. Bacteriology 73, 79-82.
 Hoover WH, Kincaid CR, Varga GA, Thayne WV, Junkins LL. 1984. J. Anim. Sci. 58, 692.
 Krause OG, Richardson RY, Cobb CO. 1998. J. Anim. Sci. 67, Suppl. 1, 280.
 Matte A, Forsberg CW. 1992. Appl. Environ. Microb. 58, 157-168.
 Michaelis L, Menten ML. 1913. Biochem Z. 49, 333-369.
 Russell JB, Dombrowski DB. 1980. Appl. Environ. Microb. 39, 606-610.
 SAS, 1996. SAS User's Guide. SAS Institute, Cary, NC, USA.
 Somogyi M. 1952. J. Biol. Chem. 195, 19-23.
 Uhlig H. 1998. Industrial enzymes and their applications. John Wiley & Sons, Inc.
 Yang WZ, Beauchemin, KA, Rode LM 1999. J. Dairy Sci. 82, 391-403.