EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON UNA ENZIMA FIBROLÍTICA SOBRE LA FERMENTACIÓN RUMINAL Y EL CRECIMIENTO MICROBIANO EN FERMENTADORES *

Giraldo, L.A.[1,2], Tejido, M.L.[1], Ranilla, M.J.[1] y Carro, M.D.[1]
[1]Departamento de Producción Animal I, Universidad de León, 24071 León
[2] Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Calle 64 Nº 59-20, Medellín. Correo electrónico: mdcart@unileon.es

INTRODUCCIÓN

Un número considerable de estudios sobre el uso de enzimas fibrolíticas exógenas se han llevado a cabo en los últimos años. Sin embargo, los mecanismos por los cuales estos aditivos mejoran la digestión de la fibra en el rumen no han sido dilucidados claramente, y la respuesta observada parece estar afectada por muchos factores (Wang *et al.*, 2001). El objetivo de este trabajo fue analizar los efectos de la aplicación de un preparado enzimático de origen fúngico sobre la fermentación y el crecimiento microbiano de un substrato con alto contenido de forraje en fermentadores de flujo semicontinuo (Rusitec).

MATERIAL Y METODOS

El estudio se llevó a cabo utilizando ocho fermentadores de flujo semicontinuo (RUSITEC). El substrato estuvo compuesto por una mezcla 60:40 de heno de gramíneas y un concentrado de uso comercial. El sustrato contenía 939 g de materia orgánica, 159 g de proteína bruta, 496 g de fibra neutro detergente (FND) y 271 g de fibra ácido detergente por kg de materia seca (MS). Los tratamientos experimentales fueron: substrato sin tratar (control) y tratamiento con una celulasa producida por *Trichoderma longibrachiatum* (**ENZ**) y comercializada por Fluka Chemicals (Seelze, Alemania). La preparación enzimática se seleccionó a partir de los resultados obtenidos en estudios previos (Giraldo *et al.*, 2007) y se aplicó a una dosis de 65 unidades enzimáticas (UE) por g de MS del substrato. Una UE se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un µmol de azúcar (glucosa o xilosa) de diferentes sustratos por minuto a 39ºC y pH=6,5; de esta forma, cada fermentador recibió diariamente 286 mg de enzima. La enzima se disolvió en una solución amortiguadora de fosfato sódico 1 mM (pH 6,5) y fue pulverizada sobre el substrato (1 ml/g MS de substrato) utilizando un pulverizador manual. El substrato administrado a los fermentadores del tratamiento control fue tratado con una cantidad idéntica de la solución amortiguadora. La aplicación de la solución amortiguadora (con y sin enzima) se realizó 24 h antes de que el substrato fuera administrado a los fermentadores, y durante este tiempo el substrato se mantuvo en el laboratorio a temperatura ambiente (21-23ºC).

Se realizó una serie de incubación de 18 días de duración y se asignó cada tratamiento a cuatro fermentadores. El día 1 se inoculó el sistema con contenido ruminal (líquido y sólido) procedente de cuatro ovejas fistuladas en el rumen y alimentadas diariamente con 700 g heno de gramíneas y 300 g de concentrado. Cada fermentador recibió diariamente 20 g de MS de substrato, el cual se administró dentro de bolsas de nylon (100 µm de tamaño de poro) y se mantuvo dentro del fermentador durante 48 h. Durante los días 11, 12, 13 y 14 se determinaron los siguientes parámetros: pH, desaparición del substrato (MS y FND) y producción de ácidos grasos volátiles (AGV), amoníaco y metano. Durante los días 15 y 16 se determinó el crecimiento de los microorganismos asociados a la fase sólida (MAS) y a la fase líquida (MAL), para lo que se utilizó ^{15}N como marcador microbiano.

Durante los días 17 y 18 el substrato que se introdujo en los fermentadores fue repartido en tres bolsas: una que contenía 18 g y dos que contenían 4 g cada una de ellas. Las bolsas que contenían 4 g se extrajeron de los fermentadores tras 6 h de incubación, mientras que la bolsa que contenía 18 g se extrajo a las 48 h de incubación. Una de las bolsas con 4 g se lavó en lavadora automática (programa en frío, 20 minutos) y se secó en una estufa de aire

* Este trabajo ha sido financiado por el MCYT (Proyecto AGL2001-0130) y la Junta de Castilla y León (LE040A05).

forzado a 60ºC durante 48 h para determinar la desaparición de MS (DMS) y FND (DFND). La otra bolsa con 4 g fue liofilizada para determinar su contenido en N no amoniacal y el enriquecimiento en ^{15}N. Asimismo, el día 17 se tomaron muestras del fluido de los fermentadores inmediatamente antes de la administración del sustrato y se congelaron a -80ºC. En estas muestras se determinó su actividad endoglucanasa, xilanasa y amilasa de acuerdo a los métodos analíticos descritos por Colombatto y Beauchemin (2003). Finalmente, tras 6 h de fermentación se tomó una muestra del fluido de los fermentadores y se utilizó para inocular tubos de cultivo para el recuento de bacterias totales y celulolíticas siguiendo el procedimiento descrito por Dehority *et al.* (1989).

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de la varianza utilizando un modelo split-plot en el que se incluyeron los siguientes efectos: tratamiento enzimático, día de muestreo y unidad experimental (fermentador). El efecto debido al tratamiento enzimático se contrastó con la varianza residual entre fermentadores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tratamiento experimental no afectó (P>0,05) al pH del contenido de los fermentadores (6,56 y 6,58 para los tratamientos control y **ENZ**, respectivamente) ni a la cantidad de diaria efluente (586 y 581 ml). Los efectos del tratamiento sobre el resto de las variables determinadas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Efecto del tratamiento del sustrato con un aditivo enzimático (**ENZ**) sobre la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), metano y NH_3, la desaparición de materia seca (DMS) y fibra neutro detergente (DFND), el enriquecimiento en ^{15}N del residuo de incubación (6 h), el crecimiento microbiano y la actividad enzimática del fluido ruminal en fermentadores Rusitec.

	Control	**ENZ**	e.e.d.[1]	P =
Total AGV (mmol/d)	56,8	60,4	2,21	0,091
Acético (mmol/d)	30,1	32,8	1,10	0,021
Propiónico (mmol/d)	10,3	8,05	0,44	<0,001
Butírico (mmol/d)	11,3	13,4	0,65	0,004
Acético/Propiónico	2,92	4,07	0,101	<0,001
Metano (mmol/d)	14,3	16,0	0,70	0,014
NH_3 (mg/d)	102	150	4,85	<0,001
Desaparición (%) de:				
DMS-6h	39,8	48,2	1,36	<0,001
DMS-48h	58,6	62,3	0,54	<0,001
DFND-6h	28,8	35,1	2,16	0,012
DFND-48h	36,6	40,9	0,71	<0,001
^{15}N en el residuo de incubación (%)	4,55	5,28	0,330	0,080
N microbiano (mg/d)	140	160	7,85	0,049
MAS	67,7	69,5	4,64	0,713
MAL	72,0	90,5	6,35	0,034
Bacterias totales ($x10^9$/ml)	2,38	7,00	1,97	0,067
Bacterias celulolíticas ($x10^6$/ml)	2,40	8,05	1,24	0,006
Actividad endoglucanasa[2]	128	503	33,7	<0,001
Actividad xilanasa[2]	471	3722	917	0,017
Actividad amilasa[2]	397	1180	248	0,025

[1]error estándar de la diferencia

[2] nmol de glucosa (xilosa para la actividad xilanasa) liberados por ml y min a 39ºC y pH 6,5.

El tratamiento del substrato con **ENZ** tendió a aumentar (P=0,091) la producción diaria de AGV, y aumentó la producción de acético (P=0,021), propiónico (P<0,001) y butírico (P=0,004), y la relación acético:propiónico (P<0,001). Asimismo, se observó un aumento (P<0,001) en la producción de amoníaco en los fermentadores que recibieron sustrato tratado con **ENZ**. En coincidencia con resultados obtenidos en estudios previos (Giraldo *et al.*, 2005), la desaparición de MS y FDN del sustrato fue mayor (P<0,05) para el substrato tratado con **ENZ**, tanto a las 6 como a las 48 h de fermentación. Sin embargo, las diferencias observadas en la desaparición del substrato fueron más marcadas a las 6 h (21 y 22% para la MS y la FND, respectivamente) que a las 48 h (6,3 y 12%). El tratamiento del substrato con **ENZ** produjo un aumento (P=0,014) de la producción diaria de metano, pero no afectó (P=0,236) a la relación metano/total AGV (mol/mol; 0,252 y 0,265 para los tratamientos control y **ENZ**, respectivamente).

Algunos autores han señalado que las enzimas fibrolíticas pueden provocar la hidrólisis de algunos enlaces de la pared celular, liberando azúcares solubles que favorecen la colonización de la fibra por los microorganismos ruminales (Wang *et al.*, 2001). En este trabajo, el tratamiento con **ENZ** tendió (P=0,080) a aumentar el enriquecimiento en ^{15}N del sustrato tras 6 h de incubación, lo que indicaría que favoreció la colonización microbiana. Asimismo, el tratamiento con **ENZ** produjo una estimulación del crecimiento microbiano (P=0,049), que se debió al aumento de los MAL (P=0,034), ya que no se detectaron efectos sobre los MAS. Adicionalmente, en el fluido de los fermentadores que recibieron el sustrato tratado con **ENZ** se observó una mayor actividad endoglucanasa (P<0,001), xilanasa (P=0,017) y amilasa (P=0,025) que en los fermentadores control, lo que coincide con una mayor concentración de MAL y de bacterias celulolíticas (P=0,006) en el mismo. Wang *et al.* (2001) observaron resultados similares tras utilizar una enzima con actividad xilanasa en fermentadores Rusitec.

Los resultados de este estudio indican que la utilización de una enzima producida por *T. longibrachiatum* produjo un aumento de la actividad fermentativa de los microorganismos ruminales. El tratamiento del sustrato con **ENZ** estimuló la colonización microbiana y aumentó el crecimiento de los microorganismos y la actividad enzimática del fluido ruminal. Los resultados obtenidos sugieren que estos mecanismos de acción podrían explicar los efectos de las enzimas fibrolíticas sobre la fermentación ruminal observados previamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Colombatto, D, Beauchemin ,K.A. 2003. A proposed methodology to standarize the determination of enzymatic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. Canadian Journal of Animal Science, 83, 559-568.

Dehority, B.A., Tirabasso, P.A., Grifo Jr., A.P. 1989. Most probable-number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total bacteria and cellulolytic numbers in one medium. Applied and Environmental Microbiology, 55, 2789-2792.

Giraldo, L.A., Tejido M., Ranilla M.J., M.D. Carro. 2005. Degradación ruminal de un substrato con alto contenido de forraje en fermentdores de flujo semicontinuo: efecto del tratamiento con enzimas fobrolíticas. ITEA, 26, 584-586.

Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Carro, M.D. 2007. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on in vitro ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratios. Animal Feed Science and Technology (En evaluación).

Wang, Y., McAllister, T., Rode, L., Beauchemin, K., Morgavi, D., Nsereko, V., Iwaasa, A., Yang, W. 2001. Effects of an exogenous enzyme preparation on microbial protein synthesis, enzyme activity and attachment to feed in the Rumen Simulation Technique (Rusitec). British Journal of Nutrition, 85, 325-332.