

EVOLUCIÓN POSTPRANDIAL DE LA ACTIVIDAD FIBROLÍTICA EN LAS FASES SÓLIDA Y LÍQUIDA DEL RUMEN DE OVEJAS ALIMENTADAS CON DOS DIETAS FORRAJERAS

Saro, C., Ranilla, M.J., Tejido, M.L. y Carro, M.D.

Departamento de Producción Animal. Universidad de León. 24071, León. IGM (CSIC-ULE).
Finca Marzanas, s/n. 24348, Grulleros, León. (mdcart@unileon.es)

INTRODUCCIÓN

La fase sólida del rumen es conocida por ser la de mayor capacidad para degradar la pared celular de los alimentos (Briesacher *et al.*, 1992; B. Michalet-Doreau *et al.*, 2001). La actividad enzimática de esta fase está influida por la dieta administrada al animal, aumentando la actividad fibrolítica con el aumento de la proporción de forraje en la dieta (Martin *et al.*, 1999). Sin embargo, no existe información sobre la influencia del tipo de forraje en la dieta sobre la actividad enzimática. El objetivo de este trabajo fue investigar los efectos del tipo de forraje en la dieta y el tiempo de muestreo sobre la actividad fibrolítica de los microorganismos en las fases sólida y líquida del rumen.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 4 ovejas merinas ($58,3 \pm 3,27$ kg) canuladas en el rumen en un diseño cruzado. Se formularon 2 dietas experimentales con una relación forraje:concentrado de 70:30, siendo el forraje heno de alfalfa (AL) o heno de gramínea (GR). Las dietas fueron administradas a los animales, a nivel restringido (56 g materia seca (MS)/kg PV^{0,75}) para minimizar la selección del alimento, en dos tomas iguales diarias (8:00 y 20:00 h). Tras 15 días de adaptación a la dieta se tomaron muestras del contenido ruminal a las 0, 4 y 8 horas tras la administración de la primera toma de alimento en dos días no consecutivos. Una muestra del contenido ruminal (50 g) se secó en estufa a 60°C para determinar su contenido en MS. El resto de contenido ruminal se filtró a través de dos capas de gasa y se midió el pH del líquido. A continuación, se tomaron muestras del contenido sólido (10 g) y líquido (5 mL) y se congelaron inmediatamente a -80°C para el análisis de la actividad enzimática. Las muestras tomadas los dos días se mezclaron, por hora de muestreo, antes de los análisis. Las muestras de contenido sólido se descongelaron a 4°C, 2 g se utilizaron para determinar su contenido en MS, y el resto fue picado con tijeras. A continuación se pesaron 3 g en una bolsa Stomacher® y se añadieron 15 mL de buffer fosfato (pH=6,5) que contenía ditiotreitil (DTT; 1mM). La mezcla fue homogeneizada en un Stomacher (Stomacher 400 Circulator, Seward Ltd., Londres, Reino Unido) a 230 rpm durante 5 minutos para desligar los microorganismos asociados a las partículas de alimento. De la suspensión resultante se tomaron 1,5 mL que se trataron durante 3 minutos en un Mini-Beadbeater (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, EEUU) para lisar los microorganismos y liberar las enzimas intracelulares. Tras el tratamiento se centrifugaron las muestras (10', 10000g, 4°C) y en el sobrenadante se analizaron las actividades carboximetilcelulasa, xilanas y amilasa según el método propuesto por Giraldo *et al.* (2008), usando como sustrato carboximetilcelulosa, xilano de avena y almidón soluble, respectivamente. Las muestras de líquido ruminal se descongelaron a 4°C, y 1,5 mL se trataron en un Mini-Beadbeater y se analizaron siguiendo los procedimientos descritos anteriormente. La actividad enzimática se expresó como μ moles de glucosa o xilosa liberados del sustrato correspondiente por 1 g de MS de la digesta sólida o 1 mL de la digesta líquida en un minuto a pH=6,5 y 39°C. Los datos se sometieron a un análisis de varianza para medidas repetidas en el tiempo utilizando el PROC MIXED del SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Los efectos del tipo de forraje, tiempo y período se consideraron fijos y el efecto del animal se consideró aleatorio. El nivel de significación estadística se estableció en $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse en la Tabla 1, las actividades carboximetilcelulasa y xilanas en el contenido total, sólido y líquido del rumen fueron más elevadas ($P < 0,05$) a las 0 horas que a las 4 y 8 horas post-alimentación, lo cual podría ser debido a un descenso del pH en las primeras horas, ya que descendió por debajo de 6,5, para volver a estabilizarse al cabo de 10-12 horas post-alimentación (Figura 1). Además, estas actividades implican a enzimas encargadas de la digestión de la fibra, la cual necesita un tiempo para que los

microorganismos colonicen la misma antes de comenzar la digestión. Estos resultados están en línea con los obtenidos por Martin *et al.* (1993, 1999), quienes obtuvieron los resultados de actividad fibrolítica más elevados al final del periodo postprandial. Además, se observó una correlación significativa entre las actividades en la fase sólida y la líquida para las actividades carboximetilcelulasa ($P=0,015$; $r=0,487$; $n=24$) y xilanasa ($P=0,017$; $r=0,481$; $n=24$). Por el contrario, la actividad amilasa del contenido total y el líquido no varió ($P=0,347$ y $0,883$, respectivamente) con el tiempo de muestreo, pero la actividad amilasa en el sólido presentó una tendencia ($P=0,091$) a disminuir a las 4 horas post-alimentación. No se observó una correlación significativa ($P=0,566$) entre los valores de actividad amilasa en la fase sólida y líquida.

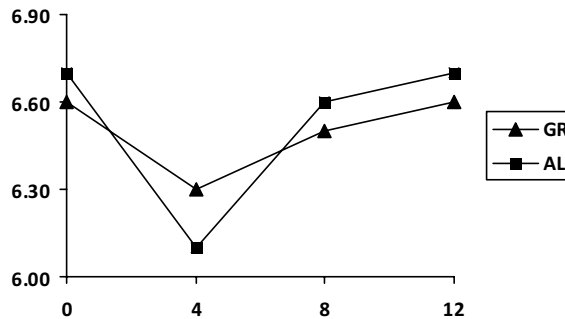


Figura 1. Evolución postprandial del pH del líquido ruminal de ovejas alimentadas con dietas con relación forraje:concentrado 70:30 y heno de gramíneas (GR) o heno de alfalfa (AL) como forraje.

Todas las actividades determinadas fueron mayores ($P<0,001$) en la fase sólida que en la líquida, pero las diferencias más marcadas se encontraron en la actividad xilanasa, en la que el porcentaje de actividad en el sólido representó entre el 76% y el 86% de la actividad en el contenido total, seguida de la amilasa (64-80%) y la carboximetilcelulasa (45-67%).

Con respecto a las diferencias entre dietas, únicamente se observaron diferencias en la actividad en el contenido total y sólido en el caso de la actividad xilanasa, que fue mayor ($P<0,05$) con la dieta GR que con la dieta AL, lo que podría ser debido al mayor contenido en fibra de la dieta GR (499 vs. 426 g fibra neutro detergente/kg MS). Martin *et al.* (1999) observaron actividades fibrolíticas más elevadas al administrar dietas con elevado contenido en forraje, mientras que la actividad amilolítica era mayor en las dietas con elevado contenido en concentrado. En nuestro estudio la cantidad de concentrado en la dieta no varió, lo que justificaría la ausencia de diferencias entre dietas en la actividad amilasa.

Se observaron importantes diferencias entre ovejas, ya que una de ellas presentó las tres actividades enzimáticas en la fase líquida más elevadas ($P<0,05$) que el resto. Por el contrario, otra de las ovejas presentó estas actividades en mayor ($P<0,05$) cantidad en el contenido total y en el contenido sólido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Briesacher, S. L., T. May, K. N. Grigsby, M. S. Kerley, R. V. Anthony, and J. A. Paterson. 1992. *J. Anim. Sci.* 70(1): 289-295. ● B. Michalet-Doreau, I. Fernandez, C. Peyron, L. Millet, and G. Fonty. 2001. *Reprod. Nutr. Dev.* 41(2): 187-194. ● Giraldo, L. A., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, and M. D. Carro. 2008. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141(3-4): 306-325. ● Martin, C., E. Devillard, and B. Michalet-Doreau. 1999. *J. Anim. Sci.* 77(4): 979-987. ● Martin, C., B. Michalet-Doreau, G. Fonty, and A. Williams. 1993. *Current Microbiology.* 27(4): 223-228.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la CICYT (Proyectos AGL-2004-04755-CO2-01 y AGL2008-04707-CO2-02). C. Saro disfruta de una beca FPU del MEC (AP2006-03049).

POSTPRANDIAL EVOLUTION OF FIBROLYTIC ACTIVITY IN THE RUMEN OF SHEEP FED TWO FORAGE DIETS

ABSTRACT: Four ruminally cannulated Merino sheep were used to evaluate the effects of two diets (AL: 70:30 alfalfa hay:concentrate; GR: 70:30 grass hay:concentrate) and three times of sampling (0, 4 and 8 hours post-feeding) on fibrolytic activity in the rumen. Carboxymethylcellulase, xylanase, and amylase activities were measured in solid and liquid rumen contents. Carboxymethylcellulase and xylanase activities were greater ($P<0.01$) at 0 compared with 4 and 8 h postfeeding, but sampling time did not affect ($P>0.05$) amylase activity. All activities were greater ($P<0.001$) in the solid than in the liquid phase of the ruminal digesta. Xylanase activity was greater for GR than for AL diet, but carboxymethylcellulase and amylase activities were not affected by the diet.

Keywords: rumen, fibrolytic activity, forage type, sheep

Tabla 1. Efecto del tipo de forraje (FOR) y tiempo de muestreo (T) en las actividades enzimáticas (AE) del contenido ruminal de ovejas alimentadas con dietas con relación forraje:concentrado 70:30 y heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) como forraje.

Parámetro ¹	Dieta	T (h) tras la alimentación			EEM ²	Valor de P		
		0	4	8		FOR	T	FOR x T
Carboximetilcelulasa								
AE total	AL	1,47 ^a	1,06 ^b	1,01 ^b	0,086	0,563	<0,001	0,991
	GR	1,41 ^a	1,02 ^b	0,98 ^b				
AE sólido	AL	3,68 ^a	2,31 ^b	2,05 ^b	0,290	0,618	<0,001	0,698
	GR	3,73 ^a	2,71 ^b	1,97 ^b				
AE líquido	AL	0,81 ^a	0,65 ^b	0,70 ^{ab}	0,042	0,012	<0,001	0,180
	GR	0,73 ^a	0,46 ^b	0,67 ^a				
% AE en sólido	AL	56,6 ^a	52,0 ^{ab}	45,5 ^b	2,57	0,007	<0,001	0,041
	GR	59,9 ^a	67,0 ^a	47,0 ^b				
Xilanasa								
AE total	AL	31,1 ^b	18,6 ^a	18,3 ^a	2,080	0,011	<0,001	0,646
	GR	33,9 ^b	25,4 ^a	23,7 ^a				
AE sólido	AL	112 ^b	62,6 ^a	60,7 ^a	8,43	0,012	<0,001	0,593
	GR	122 ^b	88,5 ^a	84,9 ^a				
AE líquido	AL	7,38 ^b	4,39 ^a	5,46 ^a	0,568	0,634	<0,001	0,994
	GR	7,10 ^b	4,14 ^a	5,30 ^a				
% AE en sólido	AL	81,4 ^b	82,1 ^a	76,0 ^a	2,07	0,045	0,036	0,776
	GR	83,4	86,4	80,8				
Amilasa								
AE total	AL	6,93	5,29	6,14	0,829	0,468	0,347	0,868
	GR	6,92	6,10	6,85				
AE sólido	AL	23,1	13,3	17,9	2,86	0,122	0,097	0,510
	GR	23,0	19,5	23,3				
AE líquido	AL	2,18	2,72	2,57	0,367	0,060	0,883	0,545
	GR	1,94	1,65	1,91				
% AE en sólido	AL	77,3	64,4	67,9	3,00	0,009	0,161	0,057
	GR	76,9	80,0	75,1				

¹Las actividades carboximetilcelulasa, xilanasa y amilasa en el sólido, líquido o en el total se expresan como μmol de glucosa o xilosa liberados de carboximetilcelulosa, xilano o almidón soluble por 1 gramo de MS de digesta total, 1 g de digesta sólida o 1 mL de digesta líquida en 1 minuto a 39°C y pH 6,5.

²EEM: error estándar de la media.

^{a, b} dentro de la misma fila, valores con diferente superíndice difieren ($P<0,05$).