

ACTIVIDAD FITÁSICA *IN VITRO* DE LAS BACTERIAS DEL RUMEN DE CABRAS ALIMENTADAS CON DIFERENTES TIPOS DE DIETAS

In Vitro Phytase Activity of Rumen Goats Bacterial Fed with Different Types of Diets

Susmira Godoy¹ y Francois Meschy²

¹Instituto de Investigaciones Zootécnicas. CENIAP. FONAIAP. Maracay, Venezuela.

²INRA, Laboratoire de Nutrition et Alimentation. 16, rue Claude Bernard F-75231. Paris, Francia

RESUMEN

Se midió la actividad fitásica *in vitro* de las bacterias del rumen de cabras alimentadas con diferentes tipos de dietas. Se utilizaron seis cabras de la raza Alpino, con peso promedio de 70 kg, distribuidas aleatoriamente, tres por tratamiento, a dos tipos de dietas, alta (F, 80% de MS) o baja (C, 40% de MS) en forrajes. Se tomó líquido ruminal, de cada animal, para separar las bacterias por centrifugación. El inóculo bacteriano fue incubado con el sustrato, fitato de sodio, durante 2 y 4 horas y, durante 4, 10, 16 y 22 horas para la dieta alta en forrajes. El material incubado fue centrifugado y el sobrenadante fue utilizado para medir el fósforo inorgánico liberado. Los valores fueron ajustados por la cantidad de fósforo inorgánico presente en el inóculo bacteriano. La cantidad de fósforo liberado por las fitasas microbianas del rumen, expresada como g P mL⁻¹, fue de 128,7 y 126,8 para F y C, respectivamente, sin diferencias entre dietas, durante 2 horas de incubación. A 4 horas de incubación la actividad fitásica incrementó (P<0,008) con valores de 156,1 y 158,1 para F y C, respectivamente, sin diferencias significativas entre dietas. La actividad fitásica de las bacterias (nmol P min⁻¹) fue similar entre dietas, con valores de 28,0 y 28,7 para F y C a las 2 horas de incubación. La actividad fitásica disminuyó (P<0,02) siendo los valores a las 4 horas de incubación de 18,0 y 19,5 para F y C, respectivamente. La proporción de fósforo liberado (g P mL⁻¹) del fitato de sodio incrementó (P<0,001) con el tiempo de incubación siendo los valores de 174,4; 208,6; 235,8 y 264,0 para 4, 10, 16 y 22 horas, respectivamente. El fósforo liberado (%) incrementó con el tiempo de incubación siendo los valores de 43,54; 52,07; 58,87 y 65,91, respectivamente para 4, 10, 16 y 22 horas. La actividad fitásica (nmol Pi min⁻¹) disminuyó (P<0,001) con el tiempo de incubación siendo los valores de 23,4; 11,2; 7,9 y 6,5 para 4, 10, 16 y 22 horas, respectivamente.

Palabras clave: Fitasas, fitatos, rumen, bacterias, fósforo.

ABSTRACT

To evaluate the phytase activity of the rumen bacteria *in vitro*, six Alpine goats, averaging 70 kg body weight were distributed, three for treatment, to two types of diets, high (F, 80% DM) or low (C, 40% DM) forage level. From each goat, ruminal liquid were taken to separate bacteria by centrifugation. Approximately one gram of bacterial material was incubated with sodium phytate, during 2 and 4 hours, and, during 4, 10, 16 and 22 hours in the forage diet. The incubated material was centrifuged and the supernatant was used to measure the released inorganic phosphorus. The values were adjusted according to the quantity of inorganic phosphorus present in the rumen inoculum. The quantity of released phosphorus by the microbial phytase of the rumen, expressed as g P mL⁻¹, was 128,7 and 126,8 for F and C, respectively, with no differences between diets, during 2 hours of incubation. At 4 hours of incubation the phytase activity increased (P<0,008) with values of 156,1 and 158,1 for F and C, respectively, without significant differences between diets. The phytase activity of the bacteria (nmol P min⁻¹) was similar between diets, with values of 28,0 and 28,7 for F and C at 2 hours of incubation. The phytase activity decreased (P<0.02) at 4 hours of incubation to 18,0 and 19,5 for F and C, respectively. The proportion of released phosphorus (g P mL⁻¹) from sodium phytate increased (P<0.001) with the time of incubation, being the values of 174,4; 208,6; 235,8 and 264,0 for 4, 10, 16 and 22 hours, respectively. The released phosphorus increased with the time of incubation being the values of 43.54, 52.07, 58.87 and 65.91%, respectively for 4, 10, 16 and 22 hours. The phytase activity (nmol Pi min⁻¹) decreased (P<0.001) with the time of incubation being the values of 23,4, 11,2, 7,9 and 6,5 for 4, 10, 16 and 22 hours, respectively.

Key words: Phytase, phytates, rumen, bacteria, phosphorus.

INTRODUCCIÓN

Los rumiantes en estados fisiológicos de altas demandas nutricionales y de elevada producción de carne y leche generalmente son suplementados con granos y/o subproductos de cereales y oleaginosas. Estos materiales contienen altos niveles de fósforo fítico (60-80% de P total) que es potencialmente utilizado por estas especies, por la actividad fitásica de los microorganismos del rumen.

Muy pocos trabajos han sido realizados sobre la utilización del fósforo fítico por las fitasas de los microorganismos del rumen bajo diferentes regímenes de alimentación. Raun y col. [5] señalan que la hidrólisis de los fitatos en el rumen es incompleta debido a la saturación de la actividad enzimática. Asimismo, Ellis y Tillman [3] indican que cuando se utilizan dietas que contienen altas proporciones de fósforo fítico es posible que no ocurra la hidrólisis total del compuesto.

Recientemente, Yanke y col. [9] han determinado la actividad fitásica de cultivos puros de bacterias ruminales bajo diferentes condiciones de alimentación. Estos estudios demuestran que la actividad fitásica del rumen es principalmente de origen bacteriano, confirmando los resultados de Raun y col. [5], y que, la actividad fitásica de las bacterias ruminales incrementa cuando se suministran dietas altas en concentrados.

Consecuentemente, el objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad fitásica *in vitro* del rumen, provenientes de inóculos de cabras alimentadas con dietas altas en forrajes o en concentrados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y dietas experimentales

Para medir la actividad fitásica *in vitro* del rumen, seis cabras, de la raza Alpino, con peso promedio de $70 \pm 5,3$ kg, distribuidas aleatoriamente, tres por tratamiento, fueron alimentadas con dos tipos de dietas, alta en forrajes (F, 80% de MS) y alta concentrado (C, 40% de MS), TABLA I.

Muestras ruminales y preparación del inóculo

De cada cabra, después de un período de adaptación de 15 días a las dietas experimentales, TABLA I, se tomaron 250 mL de líquido ruminal, previo filtrado a través de una gasa. Del fluido ruminal recolectado se separaron las bacterias por centrifugación diferencial directa. La primera centrifugación se realizó a 200g, por 10 minutos, con la finalidad de separar las partículas de alimento y una recentrifugación del sobrenadante

TABLA I
COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS (% MS)

	Forraje (F)	Concentrado (C)
Alfalfa (heno)	34,0	25,5
Gramínea (heno)	16,0	12,0
Remolacha (silage pulpa)	26,0	19,5
Cebada (paja)	4,0	3,0
Maíz (harina)	6,4	12,8
Cebada (harina)	6,4	12,8
Remolacha (pulpa deshidratada)	2,0	4,0
Soya (harina)	4,0	8,0
Bicarbonato de sodio	0,5	0,5
Minerales	0,7	0,7
Proteína cruda, %	13,3	14,2
FDN, %	52,15	44,22

FDN: Fibra detergente neutra.

a 12000g, por 30 minutos, para sedimentar las bacterias del rumen.

El residuo bacteriano fue lavado dos veces con una solución de NaCl 0.9%. Aproximadamente un gramo de bacteria, diluido en 10 mL de solución tampon tris-HCl 0.02M y pH 7.5, fue triturado con un ultra turax, tres veces durante 15 seg., dejando reposar por 10 seg. en hielo, entre cada molienda. Las muestras fueron centrifugadas a 2500rpm, durante 10 seg. y luego recentrifugado el sobrenadante a 13000rpm por 30 minutos.

Actividad fitásica

La metodología desarrollada por Bitar y Reinhold [2] para medir la actividad enzimática en alimentos y mucosa intestinal, fue adaptada para medir la actividad enzimática en bacterias ruminales, para lo cual, un mL del sobrenadante fue incubado con el sustrato, fitato de sodio 5mM, en baño de María a 39°C, durante 2 y 4 horas, para las dietas altas en forraje o en concentrado y, 4, 10, 16 y 22 horas, solo en la dieta alta en forrajes. Se adicionó, además, MgCl₂ 100mM, tampon tris-HCl 0,2M pH 6.5 y agua destilada. La actividad fitásica fue interrumpida con 3mL de ácido tricloroacético (20%). El material incubado fue centrifugado a 10000rpm, durante 10 seg. El sobrenadante fue utilizado para medir el fósforo inorgánico liberado [1]. Los valores fueron ajustados por la cantidad de fósforo inorgánico presente en el inóculo bacteriano.

Una unidad (U) de fitasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1nmol Pi min⁻¹ bajo las condiciones indicadas para la experimentación y por mL de inóculo [2].

TABLA II
FÓSFORO INORGÁNICO LIBERADO POR FITASAS MICROBIANAS (gPi mL⁻¹,%) DEL RUMEN DE CABRAS ALIMENTADAS CON DIFERENTES DIETAS

Tiempo, h	Pi liberado, gPi mL ⁻¹		SD	Pi liberado, %	
	F	C		F	C
2	128,7	126,8	10,8	32,13	31,66
4	156,1	158,1	10,8	38,96	39,46

Tiempo: P<0,008; Dieta: P<0,99; TxD: P<0,86

TABLA III
ACTIVIDAD FITÁSICA (nmol Pi min⁻¹) DE LAS BACTERIAS DEL RUMEN DE CABRAS ALIMENTADAS CON DIFERENTES DIETAS

Tiempo, h	Dieta		
	F	C	SD
2	28,0	28,7	3,0
4	18,0	19,5	3,0

Tiempo: P<0,02; Dieta: P<0,72; TxD: P<0,89

Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias comparadas por el método de amplitudes múltiples de Duncan [7].

RESULTADOS

La cantidad de fósforo liberado por las fitasas microbianas del rumen, durante 2 horas de incubación, fue de 128,7 y 126,8 g Pi mL⁻¹ para F y C, respectivamente, sin diferencias entre dietas. Cuando el tiempo de incubación aumentó a 4 horas la actividad fitásica incrementó significativamente (P<0,008) con valores de 156,1 y 158,1 para F y C, respectivamente, sin diferencias significativas entre los tipos de dietas, TABLA II.

El porcentaje de fósforo liberado del sustrato (fitato de sodio), a las 2 horas de incubación, fue de 32,13 y 31,66 para F y C, respectivamente, y a las 4 horas de 38,96 y 39,46, para el mismo orden de tratamientos.

La actividad fitásica de las bacterias (nmol Pi min⁻¹) fue similar entre dietas, con valores de 28,0 y 28,7 para F y C, a las 2 horas de incubación. La actividad fitásica disminuyó significativamente (P<0,02) con el tiempo de incubación, siendo los valores a las 4 horas de 18,0 y 19,5 para F y C, respectivamente, TABLA III.

Cuando el tiempo de incubación se extendió a 22 horas, en la dieta alta en forrajes, la proporción de fósforo liberado (ngPi mL⁻¹) del fitato de sodio incrementó significativamente (P<0,001), siendo los valores de 174,4, 208,6, 235,8 y 264,0 para 4, 10, 16 y 22 horas, con concentraciones de fósforo liberado de 43,54; 52,07; 58,87 y 65,91%, respectivamente para los mismos tiempos de incubación. La actividad fitásica (nmol Pi min⁻¹) disminuyó significativamente (P<0,001) con el tiempo

de incubación, siendo los valores de 23,4; 11,2; 7,9 y 6,5 para 4, 10, 16 y 22 horas, TABLA IV.

En la FIG. 1 se describen las ecuaciones de regresión entre el fósforo liberado y la actividad fitásica de las bacterias del rumen Vs los tiempos de incubación, siendo las ecuaciones de $Y = 4,9334x + 156,57$ ($R^2=0,55$; $P<0,05$) y $Y = 0,0267e^{-0,0705x}$ ($R^2=0,86$; $P<0,01$), respectivamente.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio indican que las bacterias del rumen son capaces de utilizar el fósforo presente como fitatos, a través de la enzima fitasa que los degrada, como fue demostrado por Raun y col. [5] y más recientemente por Yanke y col. [9].

La cantidad de fósforo inorgánico liberado de las moléculas de fitato de sodio y la actividad fitásica de los microorganismos del rumen fue similar en los diferentes regímenes alimenticios, probablemente debido a que la relación forraje:concentrado no fue suficientemente amplia. Los resultados obtenidos por Reddy y col. [6] indican un incremento en la actividad fitásica en respuesta a altos niveles de fitatos en la dieta de rumiantes, como consecuencia de la suplementación con elevadas proporciones de granos de cereales. Similarmente, Yanke y col. [9] obtuvieron valores de la actividad fitásica superiores, cuando utilizaron dietas con 90% de granos, en relación con la dieta con 100% de heno.

Cuando se extiende el tiempo de incubación a 4 horas, en ambos regímenes alimenticios, el fósforo inorgánico liberado aumenta de 32 a 39% y la actividad fitásica de las bacterias disminuye significativamente, posiblemente debido a un efecto de inhibición del fosfato libre sobre la actividad de la enzima, como señalado por Volfová y col. [8]. Otros estudios sin embargo indican que parece poco probable que este efecto ocurra en las bacterias del rumen [9]. Con tiempos de incubación que alcanzaron las 22 horas, realizado únicamente en la dieta con 80% MS de forrajes, se incrementa significativamente la concentración de fósforo inorgánico liberado, alcanzando un valor máximo de 66%, y la actividad fitásica disminuye significativamente, indicando la hidrólisis incompleta del fósforo fítico por las fitasas bacterianas, lo que podría explicarse por una saturación en la actividad enzimática, como reportado por Raun y col. [5] *in vitro*.

TABLA IV
ACTIVIDAD FITÁSICA Y FÓSFORO INORGÁNICO LIBERADO DEL FITATO DE SODIO POR LAS FITASAS DE LAS BACTERIAS DEL RUMEN

Tiempo, h	g Pi mL ⁻¹	SD	%Pi liberado	SD	nmolPi min ⁻¹	SD
4	174,42	6,26	43,54	1,56	23,4	0,4
10	208,57	6,26	52,07	1,56	11,2	0,4
16	235,81	6,26	58,87	1,56	7,9	0,4
22	264,01	6,26	65,91	1,56	6,5	0,4

Tiempo: P<0.001

La hidrólisis del sustrato fitato de sodio es incompleta, alcanzando el 66% con tiempos de incubación de 22 horas.

AGRADECIMIENTO

A ECOS-NORD de Francia y CONICIT de Venezuela por el apoyo a este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**. 15th. Washington, D.C.:1018. 1994.
- [2] BITAR, K.; REINHOLD, H. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosa of rat, chicken, calf and man. **Biochim. Biophys. Acta**. 268:442-452. 1972.
- [3] ELLIS, L.C.; TILLMAN, A.D. Utilization of phytin phosphorus in wheat bran by sheep. **J. Anim. Sci**. 20:606-607. 1961.
- [4] GREINER, R.; KONIETZNY, U.; JANY, K.L. D. Purification and characterization of two phytases from **Escherichia coli**. **Arch. Biochem. Biophys**. 303:107-113. 1993.
- [5] RAUN, A.; CHENG, E.; BURROUGHS, W. Phytate phosphorus hydrolysis and availability to rumen microorganisms. **J. Agr. Food Chem**. 4:869-871. 1956.
- [6] REDDY, N.R.; SATHE, S.K.; SALUNKHE, D.K. Phytases in legumes and cereals. In **Advances in Food Chemistry**. Edited by C.O. Chichester, E. M. Mrak G.F. Stewart. New York: Academic Press.:1-92. 1982.
- [7] STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and Procedures of statistics. A Biometrics Approach**. (2nd. ed.). New York. Mc Graw-Hill. 622 p. 1988.
- [8] VOLFOVA, O.; DVORAKOVA, J.; HANZLIKOVA, A.; JANDERA, A. Phytase from **Aspergillus niger**. **Folia Microbiol**. 39:481-484.
- [9] YANKE, L.J.; BAE, H.D.; SELINGER, L.B.; CHENG, K.J. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. **Microbiology**. 144:1565-1573. 1998.

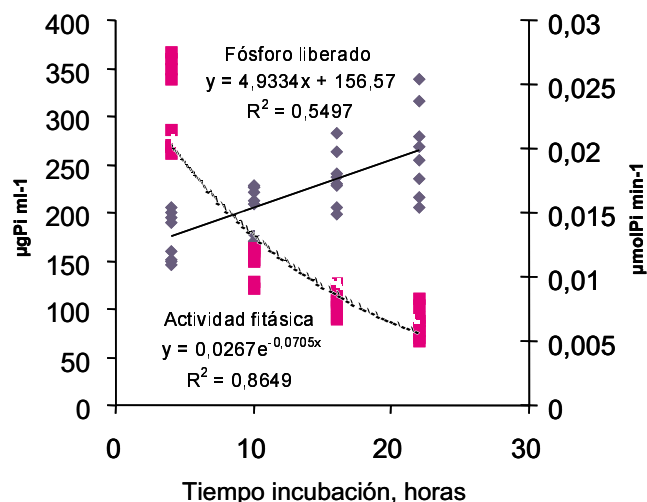


FIGURA 1. FÓSFORO LIBERADO (µg Pi mL-1) Y ACTIVIDAD FITÁSICA (µmol Pi min-1) DE FITASAS MICROBIANAS.

CONCLUSIONES

La metodología utilizada para medir la actividad fitásica de ingredientes alimenticios y de la mucosa intestinal, desarrollada por Bitar y Reinhold [2], se puede utilizar para medir la actividad fitásica de las bacterias del rumen, modificando el pH (6.5), la temperatura (39°C) y el tiempo de incubación (2 horas).

Las bacterias del rumen poseen actividad fitásica lo que les permite utilizar el fósforo fítico presente en los ingredientes alimenticios (granos y subproductos) que se incluyen normalmente en dietas para rumiantes con altas demandas por nutrientes.

No se pudo demostrar diferencias en la actividad fitásica de las bacterias del rumen por tipo de dieta debido a que la relación forraje:concentrado no fue suficientemente amplia, particularmente en los componentes estructurales.