

**Tesis Doctoral 2001 - IMED BEN MILED OUHIDA**

***Evaluación de complejos enzimáticos en la mejora del valor nutritivo de cereales y leguminosas en la alimentación de pollos en crecimiento***

**IMED BEN MILED OUHIDA**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos**

***Unidad de Nutrición Animal***

***Evaluación de complejos enzimáticos en la mejora del valor nutritivo de cereales y leguminosas en la alimentación de pollos en crecimiento***

Memoria presentada por

**IMED BEN MILED OUHIDA**

Para acceder al grado de **Doctor** en el programa de Producción Animal de la **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA** - Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos

**Bellaterra, 2001**

**José Francisco Pérez Hernández**, profesor Titular del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Universidad Autónoma de Barcelona

Certifica:

Que la memoria titulada "Evaluación de complejos enzimáticos en la mejora del valor nutritivo de cereales y leguminosas en la alimentación de pollos en crecimiento" presentada por **Imed Ben Miled Ouhida** para optar al grado de Doctor en Veterinaria, ha sido realizada bajo su dirección y, considerándola concluida, autorizo su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y, para que así conste, firmo la presente en Bellaterra, a 26 de Junio de 2001.

**Dr. J. F. Pérez**

## **AGRADECIMIENTOS**

*Es costumbre dedicar las primeras líneas de una tesis doctoral a agradecer la colaboración de todo aquel quien ha participado y por lo tanto ha hecho posible que se lleve a cabo. Personalmente, soy de la opinión que este trabajo no es más que el fruto de la buena acogida y orientación recibida en la Unidad de Nutrición Animal, es por ello y sin entrar en personalismos, quiero poner de manifiesto mi sinceros agradecimientos.*

*También, agradezco la colaboración personal y financiera de las empresas (ITPSA, Barcelona - España; Loders Croclaan, Wormerveer - Holanda y TOLSA, Madrid - España). Así mismo, agradezco la participación analítica del Centro de Análisis Química (CAQ) de la Universidad Autónoma de Barcelona.*

El presente trabajo experimental ha sido posible por la financiación obtenida del proyecto FEDER: FD 1997-1470, y el convenio UAB- Loders Croclaan (Ref. 162039)

***Dedicada a***

***A mi familia por su constante ayuda***

***y***

***a Sonia por su constante apoyo a lo largo de este último año, y espero de los que vienen***

**Abreviaturas más utilizadas**

**Resumen**

<b>INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	1
--	---

<b>CAPITULO 1- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	5
---	---

<b>1. CARACTERIZACIÓN DE LOS CARBOHIDRATOS EN LA ALIMENTACIÓN DE LOS ANIMALES MONOGÁSTRICOS</b>	7
1.1. CARBOHIDRATOS DE LOS CEREALES	9
1.1.1. <b>Azúcares de bajo peso molecular</b>	9
1.1.2. <b>El almidón</b>	9
1.1.3. <b>Los polisacáridos no amiláceos (PNA)</b>	9
1.1.3.1. <i>Los <math>\beta</math>-glucanos</i>	11
1.1.3.2. <i>Los arabinoxilanos</i>	11
1.2. CARBOHIDRATOS DE LAS LEGUMINOSAS	12
1.2.1. <b>Los oligosacáridos</b>	13
1.2.2. <b>Polisacáridos no amiláceos (PNA)</b>	14
1.2.2.1. <i>PNA presentes en la cascarilla</i>	16
1.2.2.2. <i>PNA presentes en los cotiledones</i>	21
1.3. MODELOS DE PARED VEGETAL	29
<b>2. CONSECUENCIAS NUTRICIONALES Y PRODUCTIVAS DE LOS PNA INGERIDOS POR LOS BROILERS</b>	31
2.1. DIGESTIÓN DE LOS NUTRIENTES	32
2.1.1. <b>Efectos antinutritivos de los <math>\beta</math>-glucanos y arabinoxilanos de los cereales</b>	32
2.1.2. <b>Efectos antinutritivos relacionados con la fracción no amilácea de las leguminosas</b>	34

2.2.	RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS	35
<b>3.</b>	<b>UTILIZACIÓN DE ENZIMAS EN LA ALIMENTACIÓN DE LAS AVES</b>	<b>37</b>
3.1.	HISTORIA	37
3.2.	MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ENZIMAS	38
3.2.1.	<b>Hidrólisis de los PNA</b>	38
3.2.2.	<b>Reducción de la viscosidad de la digesta</b>	41
3.2.3.	<b>Complemento de la actividad enzimática endógena</b>	41
3.2.4.	<b>Modificaciones en el tránsito digestivo</b>	43
3.3.	RESPUESTAS DIGESTIVAS Y PRODUCTIVAS	44
3.3.1.	<b>Digestibilidad de los nutrientes</b>	44
3.3.2.	<b>Resultados productivos</b>	47
3.3.2.1.	<i>Los enzimas mejoran los resultados productivos en el caso de cereales blancos</i>	47
3.3.2.2.	<i>¿Pueden los enzimas mejorar los resultados productivos en el caso de las leguminosas?</i>	53
 <b>Anexo:</b>		
	<b>UTILIZACIÓN DE ARCILLAS EN LA ALIMENTACIÓN DE LAS AVES: ASPECTOS NUTRICIONALES</b>	<b>57</b>
1.	PROPIEDADES DE LA SEPIOLITA COMO AGLOMERANTE	57
1.1.	<b>Aspectos tecnológicos</b>	57
1.2.	<b>Aspectos zootécnicos</b>	58
1.2.1.	<i>Parámetros productivos y calidad de la canal de broilers</i>	58
1.2.2.	<i>Parámetros de puesta y calidad del huevo en gallinas ponedoras</i>	60
1.2.3.	<i>Digestibilidad de los nutrientes y viscosidad de la digesta</i>	60

2.	MECANISMOS DIGESTIVOS ATRIBUIDOS AL USO DE LAS ARCILLAS	60
4.	<b>BIBLIOGRAFIA CITADA</b>	63
	<b>OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL</b>	79
CAPITULO 2-	<b>Enzymes (<math>\beta</math>-glucanase and arabinoxylanase) and/or sepiolite supplementation improve the nutritive value of barley-wheat based diets for broiler chickens</b>	83
	Publicado en: <i>British Poultry Science</i> , (2000) <b>41</b> : 617-624	
CAPITULO 3-	<b>Soybean (<i>Glycine max.</i>) cell wall composition and availability to feed enzymes</b>	103
	Enviado a publicar en <i>Journal of Agriculture and Food Chemistry</i>	
CAPITULO 4-	<b>Feed enzyme combinations with an identified cell wall polysaccharidase and proteolytic activity may enhance soybean meal carbohydrate and protein hydrolysis <i>in vitro</i></b>	123
	Enviado a publicar en <i>Animal Feed Science and Technology</i>	
CAPITULO 5-	<b>Effect of <math>\beta</math>-mannanase supplemented to soybean meal diets on broiler performance and ileal and whole tract digestibility</b>	141
CAPITULO 6-	<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	157
	<b>CONCLUSIONES</b>	169

## ÍNDICE DE TABLAS DE LA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Tabla I.1.** Composición general de los hidratos de carbono presentes en la dieta de animales monogástricos
- Tabla I.2.** Composición media (g/kg) de las semillas de cereales utilizadas en la alimentación animal
- Tabla I.3.** Contenidos en pentosanos y  $\alpha$ -glucanos de diferentes cereales (p.100 de MS)
- Tabla I.4.** Contenido (g/kg) en oligosacáridos de algunas variedades de soja
- Tabla I.5.** Carbohidratos (g Kg<sup>-1</sup>MS) de la torta de soja, altramuces, guisantes y habas
- Tabla I.6.** Contenido (%MS<sup>-1</sup>) en polisacáridos no amiláceos (PNA) de la torta de soja y perfil (%PNA<sup>-1</sup>) de monosacáridos contenidos en dicha fracción
- Tabla I.7.** Contenido (g/kg MS) de celulosa y fibra dietética soluble e insoluble en los cotiledones y la cascarilla de altramuces
- Tabla I.8.** Perfil de monosacáridos de la fracción de PNA (totales, solubles e insolubles) de la torta de soja, cotiledones y cascarilla de altramuces
- Tabla I.9.** Perfil (%) de monosacáridos de la fracción de PNA (total, solubles e insolubles) de la soja y de su concentrado proteico
- Tabla I.10.** Perfil (%) de monosacáridos y recuperación (%MS<sup>-1</sup>) del concentrado proteico de la soja (CPS), de la fracción no extractable con agua (WUS) y de la extracción secuencial de polisacáridos (ChSS, extractos con agentes quelantes; DASS, extractos con alcalinos diluidos; 1MASS, extractos con 1M KOH; 4 M ASS, extractos con 4 M KOH; y residual)
- Tabla I.11.** Efecto de adición de cantidades crecientes de PNAs sobre la digestibilidad aparente del almidón, proteínas o grasa en broilers.
- Tabla I.12.** Efectos de la administración de pentosanos (extraídos del trigo) en una dieta comercial de broilers sobre los resultados productivos
- Tabla I.13.** Absorción selectiva de los azúcares libres en algunas especies animales
- Tabla I.14.** Digestibilidad ileal de monosacáridos y energía metabolizable aparente (EMA) y verdadera (EMV) de dietas suplementadas con 200 g/kg de glucosa, galactosa, xilosa, arabinosa, y ácidos galactorónico y glucorónico
- Tabla I.15.** Efectos de la suplementación de  $\alpha$ -glucanasa sobre el peso relativo de páncreas, la viscosidad intestinal y la actividad enzimática digestiva en broilers y gallos alimentados con cebada frente al maíz
- Tabla I.16.** Tiempo de tránsito digestivo en aves de diferentes edades alimentados con dietas base de cebada con o sin enzimas  $\alpha$ -glucanasa
- Tabla I.17.** Efectos de la suplementación enzimática sobre la digestibilidad de proteína, grasa y almidón de los cereales en broilers
- Tabla I.18.** Efectos de la suplementación enzimática sobre la digestibilidad de los nutrientes de soja en broilers
- Tabla I.19.** Efecto del tratamiento físico (tostado vs extrusionado) y la suplementación enzimática de la soja sobre la digestibilidad aparente de la fracción de PNA, y la viscosidad de la digesta determinadas en broilers a 25 días de edad

- Tabla I.20.** Respuesta (porcentaje de incremento) de los pollos broilers (ganancia de peso vivo, GPV; índice de transformación IT) a la suplementación con enzimas para mejorar el uso de cereales.
- Tabla I.21.** Respuestas (Porcentaje de modificación) de los broilers (ganancia de peso vivo, GPV e índice de transformación IT) a la suplementación de dietas con enzimas para mejorar el uso de las leguminosas.
- Tabla I.22.** Efecto de la dilución de la dieta con arcillas sobre los resultados productivos de broilers (ganancia de peso vivo GMD e índices de conversión IC)
- Tabla I.23.** Efectos de la inclusión de 2% de sepiolita en la dieta de broilers sobre la viscosidad ileal y la relación de consumo de agua:consumo de alimento

## ÍNDICE DE FIGURAS DE LA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Figura I.1.** Estructura química de los  $\beta$ -glucanos de la cebada
- Figura I.2.** Estructura química de los arabinoxilanos del trigo
- Figura I.3.** Estructura química de la familia de oligosacáridos.
- Figura I.4.** Estructura de los galactomananos
- Figura I.5.** Estructura de un fragmento de pectinas
- Figura I.6.** Estructura química de un fragmento de D-xilanos
- Figura I.7.** Resumen de los PNA de la cascarilla
- Figura I.8.** Estructura de un fragmento de L-arabino-D-galactanos
- Figura I.9.** Estructura hipotética de las pectinas de manzana. SR, (en inglés “smooth regions”); HR, (en inglés “hairy regions”), en los cuales la distribución de los grupos acetil no está presentada, aunque existen evidencias de la existencia de grupos acetil excepto en las sub-unidades III
- Figura I.10.** Estructura de las cadenas de pectinas “smooth” y “hairy regions”
- Figure I.11.** Estructura hipotética de Galacturonanos
- Figura I.12.** Unidades repetidas de xiloglucanos de guisantes
- Figura I.13.** Resumen de los PNA presentes en los cotiledones del grano de soja
- Figura. I.14.** Tipo I de la membrana celular de la mayoría de las plantas propuesta por Carpita y Gibeaut, (1993).
- Figura I.15.** Mecanismos de la actividad enzimática sobre los  $\beta$ -glucanos (A), xilanos (B) y  $\beta$ -galactosidos (C)

## ABREVIATURAS MÁS UTILIZADAS en:

### 1. la revisión bibliográfica

A. U.:	Acidos Urónicos
Ara:	Arabinosa
CHO:	Carbohidratos
ELN:	Extractivos libres de nitrógeno
FAD:	Fibra Acida Detergente
FB:	Fibra Bruta
FND:	Fibra Neutra Detergente
Gal:	Galactosa
Glu:	Glucosa
GMD:	ganancia media diaria
IC:	Indice de Conversión
LAD:	Lignina Acida Detergente
Man:	Manosa
MS:	Materia Seca
PNA:	Polisacaridos No Amilacéos
PNAs:	Polisacaridos No Amilacéos solubles
Xyl:	Xilosa

### 2. el resto de los capítulos

1M ASS:	1 M Alkali Soluble Solids
4M ASS:	4 M Alkali Soluble Solids
BW:	Bodyweight
ChSS:	Chelating agent Soluble Solids
CP:	Crude Protein
DASS:	Dilute Alkali Soluble Solids
DM:	Dry Matter
EE:	Ether Extarcts = Fats
MRT:	Mean Retention Time
NSI:	Nitrogen Solubility Index
NSP:	Non Strach Polysaccharides
OM:	Organic Matter
PDI:	Protein Dispersibility Index
PB:	Purine Bases
RES:	Residual
SBM:	Soybean meal
SCVFA:	Short Chain Volatile Fatty Acids
sNSP:	Soluble Non Strach Polysaccharides
WSc:	Water Soluble from cotyledons
WSh:	Water Soluble from hulls
WUc:	Water Unextractable from cotyledons
Wuh:	Water Unextractable from hulls
WUS:	Water Unextractable solids.

## Resumen

El objetivo de esta tesis ha sido aportar información básica sobre el modo de acción de las enzimas carbohidrasas sobre los cereales viscosos o raciones convencionales no viscosas de maíz y soja. Partiendo de estos mecanismos, hemos valorado sus efectos sobre los parámetros productivos y digestivos en los pollos en crecimiento.

En particular, en el caso de los cereales blancos (cebada y trigo) estudiamos la efectividad de  $\alpha$ -glucanasas y arabinosilanasas sobre los resultados de producción (consumo de alimento, ganancia media diaria) y digestibilidad de la ración en pollos en crecimiento; y los posibles mecanismos involucrados, como la cinética de tránsito y viscosidad de la digesta. Para alcanzar este objetivo se realizaron 2 ensayos experimentales.

En el primero de ellos se utilizaron pollitos sexados machos que recibieron 4 raciones experimentales basadas en un 44% de cebada + trigo (2 x 2; con o sin enzimas, con o sin 2% de sepiolita) durante un periodo experimental de 36 días. Se realizaron dos balances de digestibilidad de la MO, PB y MG establecidos entre los días 21-22 y 41-42 de edad. Los resultados relativos a este experimento muestran que la suplementación de enzimas mejoró la ganancia media diaria de los animales y la eficiencia de conversión del alimento, sobre todo durante la primera fase de crecimiento (14%,  $P < 0.001$  y 10%,  $P < 0.001$ ; respectivamente). Las mejoras de los resultados productivos fueron fundamentalmente explicadas por una mejora significativa de la digestión y la retención de los componentes de la materia orgánica (5.6 up y 1.7 up.), y en especial de la fracción lipídica (13 up., y 3.5 up.) en el día 22° y 42°, respectivamente.

Teniendo en cuenta los resultados productivos obtenidos durante este primer ensayo, se planteó un segundo experimento en un diseño similar con el objetivo de caracterizar los posibles mecanismos determinantes de los resultados productivos. Entre los aspectos contemplados, se estudió i/ el ritmo de tránsito de la digesta (estimados a partir de la excreción fecal de un marcador indigestible o a partir de su cuantificación en el tracto digestivo de los animales en condiciones de equilibrio dinámico) y ii/ la viscosidad de la digesta del contenido del yeyuno e íleon.

Los resultados productivos fueron similares a los del primer ensayo. No se observaron diferencias significativas en el consumo de alimento, aunque con la suplementación enzimática se incrementaron los ritmos de crecimiento (+5%,  $P < 0.05$ ), y se mejoraron los índices de conversión de la dieta (7%,  $P < 0.01$ ). Se observó una mejora en la digestión durante el día 21° de todas las fracciones de la MO (PB, 6 u.p.,  $P < 0.001$ ; MG, 6 u.p.,  $P < 0.01$  y carbohidratos, 2.5 u.p.,  $P < 0.05$ ) y en consecuencia de la concentración energética de la ración (EMAn: 5.4% de 3110 a 3280 Kcal/ kg MS alimento). La suplementación enzimática redujo significativamente la viscosidad relativa al agua determinada en el intestino (yeyuno e íleon) y los tiempos de retención (MRT) de la digesta en el tracto digestivo.

La suplementación enzimática en la alimentación de los broilers en la actualidad consiste mayoritariamente en la inclusión de  $\alpha$ -glucanasas y arabinoxilanasas en raciones con cereales «viscosos». Sin embargo, recientemente, numerosas expectativas se están incorporando como son la búsqueda de estrategias enzimáticas dirigidas a mejorar el valor nutritivo de las leguminosas en general y la torta de soja en particular. En esta línea, nos planteamos como objetivo caracterizar «*in vitro*» e «*in vivo*» la efectividad de diferentes enzimas carbohidrasas sobre la digestión de los polisacáridos solubles e insolubles de la torta de soja.

Para atender estos objetivos, se planteó un primer ensayo de caracterización de los carbohidratos de la soja (cotiledones y cascarilla). El fraccionamiento (soluble e insoluble en agua) de la cascarilla de la soja mostró la existencia de una estructura insoluble mayoritariamente constituida por celulosa ( $\alpha$ -1,4-D-glucosa), mientras que la fracción soluble contiene una mayor proporción de manosa y galactosa (posiblemente  $\alpha$ -mananos del tipo galacto- y glucómananos). En cuanto a los cotiledones, su fraccionamiento mostró la existencia de estructuras complejas compuestas por un entramado de pectinas, hemicelulosas y celulosa. La incubación «*in vitro*» con enzimas de actividad pectinasa, xilanasas y celulasas mostró un bajo porcentaje de hidrólisis de los carbohidratos, aunque se incrementó (hasta un 20% de liberación de monosacáridos) tras la extracción de diferentes componentes del entramado de pared vegetal.

Puesto que es conocido el efecto del tostado de la soja sobre la solubilidad y la digestibilidad de la proteína, se planteó un segundo ensayo con el objetivo de establecer la influencia de un tostado suave o intenso sobre la eficiencia enzimática «*in vitro*», especialmente de la proteasa y diferentes carbohidrasas. Efectivamente, el tostado provocó un descenso gradual en la

solubilidad tanto de la fracción proteica como de los carbohidratos, lo que sugiere cambios estructurales del entramado de carbohidratos en su relación con la proteína. Ambas fracciones, las solubles e insolubles en agua fueron utilizadas como sustrato susceptible de hidrólisis por los enzimas carbohidrasas (pectinasa, xilanasa, mananasa y celulasa) en combinación o no con proteasa. La incubación de los sustratos solubles con enzimas carbohidrasas (en especial, celulasa y pectinasa) redujo la proporción de rafinosa y estaquiosa. Actividad que no fue evidenciada con la mananasa en su combinación con proteasa. La incubación con carbohidrasas de las fracciones no extractables con agua liberó una baja cantidad de monosacáridos, aunque se incrementó sinérgicamente con la inclusión de proteasa.

Sin embargo, la posible efectividad de los enzimas “*in vivo*” esta condicionada por aspectos asociados al animal, que no pueden ser simulados “*in vitro*”. Por ello, decidimos iniciar el desarrollo de pruebas de crecimiento en broilers en las que estudiar las posibles mejoras productivas y digestivas asociadas a la inclusión de enzimas de pared vegetal. En concreto, nos planteamos probar, en un primer ensayo, el efecto de incorporar a una ración base de maíz-soja una mananasa (a dos niveles de inclusión), asociado o no con proteasa. Para ello, se planteó un experimento similar al descrito para las  $\alpha$ -glucanasas y arabinoxilanasas. La suplementación con enzimas no provocó modificaciones significativas de los resultados productivos de los animales o de la digestibilidad de la ración. Sin embargo, la incorporación de mananasa a la dieta redujo significativamente la proliferación microbiana en íleon (medida como concentración de bases puricas) durante la primera fase de crecimiento de los pollitos. Aunque la experiencia fue realizada en jaulas, y no se observaron diferencias en productividad, nos planteamos como interesante valorar en el futuro las repercusiones productivas y sanitarias que este tipo de modificaciones microbianas pueden tener, especialmente en condiciones prácticas de producción.

## Summary

The aim of this thesis is to obtain basic information on the activity of carbohydrase enzymes over viscous cereals or conventional no viscous diets based on corn and soybean meal. The effects of enzymes supplementation in broiler chickens productive and digestive parameters will be also evaluated.

In particular, in the case of the white cereals (barley and wheat), we have studied initially the effectiveness of  $\alpha$ -glucanase and arabinoxylanase on the productive performances (Feed intake, bodyweight gain) and nutrient digestion in growing chicks; and the possible mechanisms involved, like the digesta kinetics and viscosity. Two experimental trials are presented.

Male chickens received 4 experimental diets based on 44% of barley + wheat (2 x 2; with or without enzymes, with or without 2% of sepiolite) during an experimental period of 36 days. Two balances of organic matter (OM), crude protein (CP) and fat (EE) were carried out on days 21-22 and 41-42 of age. The enzymes supplementation improved the daily weight gain of the animals and the food: gain ratios, mainly during the first phase (14%,  $P < 0.001$  and 10%,  $P < 0.001$ ; respectively). Productive results were simultaneous to significant increases of the whole-tract digestibility and retention of organic components, (5.6 and 1.7 percent units), especially the fatty fraction (13 and 3.5 percent units) on day 22 and 42, respectively.

The second experiment aimed to characterise the possible mechanisms involved. They were studied i/ the digesta mean retention time (MRT estimated from the faecal excretion of an indigestible marker or from its quantification in the animal digestive tract in steady state conditions) and ii / the jejunum and ileum digesta viscosity.

Productive results were similar to those of the first trial. Although, not significant differences were observed in food consumption, enzymes supplementation increased growth rates (+5%,  $P < 0.05$ ), and improved the FCR (7%,  $P < 0.01$ ). It was also observed a significant increase of the OM digestibility (CP, 6 percent units,  $P < 0.001$ ; EE, 6 percent units,  $P < 0.05$  and carbohydrates, 2.5 percent units,  $P < 0.05$ ) and metabolizable energy (EMAn: 5.4% from 3110

to 3280 Kcal / kg DM food). The enzymatic suplementación significantly reduced intestinal digesta viscosity (jejunum and ileum) and digesta MRT in the digestive tract.

Enzymatic supplementation in broilers feeding has expanded mainly as the  $\alpha$ -glucanase and arabinoxylanase inclusion in «viscous» cereal diets. However, recently numerous expectations are being incorporated in poultry feeding, addressed by the search of enzymatic strategies to improve the nutritive value of leguminous in general, and soybean meal in particular. In this line, we planed to characterise «in vitro» and «in vivo» the effectiveness of different carbohydrase enzymes on the digestion of soluble and insoluble soybean meal polysaccharides.

We designed a first trial to characterise soybean meal carbohydrates (cotyledons and hulls). Fractionation (Water soluble and Water insoluble) of soybean hulls showed the existence of an insoluble structure mostly constituted by cellulose ( $\beta$ -1,4-D-glucose), while the soluble fraction contains a higher proportion of mannose and galactose (possibly  $\beta$ -mannans of galacto- and gluco-mannans type). Fractionation of cotyledons showed the existence of complex structures composed by a matrix of pectins, hemicellulose and cellulose. The "in vitro" incubation with pectinase, xylanase and cellulase enzymes released a low percentage of monosaccharides, but increased (until 20%) after cell wall fractionation.

Knowing the effect of toasting on SBM protein solubility and digestibility, the second experiment aimed to establish relationships between toasting (low and severe) and the "in vitro" enzymatic efficiency, especially of protease and different carbohydrases. Effectively, toasting soybean caused gradual decreases in protein and carbohydrate solubility, indicating structural changes of the carbohydrate matrix in their relationship with proteins. Both, water-soluble and water-insoluble fractions were incubated with carbohydrases (pectinase, xylanase, mannanasa and cellulase) in combination or not with protease. Incubation of the soluble substrates with carbohydrases (especially cellulase and pectinase) reduced raffinose and stachyose. Similar results were not observed with mannanase. Incubations of the water-insoluble fractions released a low monosaccharide quantity, but synergically increased with the simultaneous incubation with protease.

However other aspects that cannot be simulated "in vitro" will affect efficiency of enzymes "in vivo" associated to the animal gastro-intestinal conditions. Then, we decided to check in

"in vivo" trials the possibility of improving productive and digestive performances in broilers. In a first trial, we proved the effects of incorporating to a corn-soybean meal diet a mannanase enzyme (at two inclusion levels) associated or not with protease. Experimental design was similar to that described above for the  $\alpha$ -glucanase and arabinoxylanase trial. Enzymes supplementation didn't cause significant modifications on productive or digestive results. However, mannanase incorporation significantly reduced the ileum microbial content (measured as purine bases concentration, during the first phase of chicken's growth). Although the experience was carried out in cages, and the not differences in the productivity observed, we think interesting to evaluate the productive and health impact of this effect on the microbial colonisation of small intestine digesta, especially under practical conditions.

## **INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La presencia en determinados cereales de polisacáridos no amiláceos solubles, como los arabinosilanos en el trigo o  $\beta$ -glucanos en la cebada, puede provocar efectos negativos sobre la digestibilidad de los nutrientes en el tracto digestivo y sobre las condiciones de producción de las aves. Entre estos efectos se puede citar una reducción en la digestibilidad del almidón, proteína y lípidos, una reducción de los resultados productivos (GMD e IC); así como el empeoramiento de la calidad de la canal (animales sucios y con lesiones que pueden ser decomisados en matadero). Durante estas últimas décadas tanto productores como nutrólogos han buscado explicaciones y soluciones a estos problemas; dirigidas a incrementar los márgenes económicos de la producción utilizando ingredientes que resultan en principio más baratos y abundantes.

Entre las soluciones propuestas en los últimos años, y apoyadas en el desarrollo reciente de la biotecnología, destaca la utilización de diferentes enzimas con actividad carbohidrasa. Su inclusión en la dieta mejora con éxito el valor nutritivo de los cereales (cebada-, Svihus y col., 1997; centeno-, Smuliowska y Mieczkowska, 1996; y trigo, Marquardt y col., 1994), y la producción de las aves, sobre todo broilers. En último término las mejoras dependen de su actividad hidrolítica sobre la estructura de algunos PNA presentes en el cereal (arabinosilanos y  $\beta$ -glucanos), y por lo tanto la eliminación de sus efectos negativos.

Tras el esfuerzo realizado para mejorar con éxito el aprovechamiento de los cereales como ingredientes mayoritarios, recientemente asistimos a un interés creciente sobre las proteaginosas. En concreto, el esfuerzo es especialmente intenso con la torta de soja que contiene niveles apreciables de oligosacáridos (4-6%) y polisacáridos no amiláceos (20%; Svihus y col., 1998), también relacionados con ciertos efectos antinutritivos en las aves (Melito y Tovar, 1995). En general, los carbohidratos de las leguminosas se caracterizan por ser estructuralmente más complejos que los de las cereales (May, 1990), y por tanto inaccesibles en mayor medida a los enzimas endógenos del tracto digestivo del animal monogástrico. En concreto, los  $\beta$ -galactosidos pueden ser responsables de flatulencia (Rakis, 1975) y de una disminución en la energía metabolizable de la dieta (Coon y col., 1990; Leske y col., 1993; Leske y col., 1999). Por otra parte, los polisacáridos de la paredes vegetales de leguminosas constituyen un posible reservorio de nutrientes por lo que se están llevando también a cabo numerosos estudios dirigidos a la preparación de combinaciones enzimáticas

capaces de hidrolizarlos (Marsman y col., 1995; Marsman y col., 1997a,b; Huisman y col., 1999).

Sin embargo, a pesar de una cierta efectividad “*in vitro*” (Marsman y col., 1997a), los resultados “*in vivo*” de estas enzimas no han sido siempre consistentes; lo que refleja la existencia de condicionantes “*in vivo*” que deben ser estudiados. Por el momento no están totalmente claros los mecanismos que explican fundamentalmente los efectos negativos de la fracción no amilácea sobre los procesos de digestión y absorción. Se han propuesto varias explicaciones: la presencia de PNA indigestibles en la estructura de la pared celular i/ limita la accesibilidad de los enzimas digestivos a los nutrientes (cuerpos proteicos, vesículas lipídicas y gránulos de almidón), ii/ aumenta la viscosidad del contenido digestivo, hecho que puede reducir la difusión de enzimas y nutrientes, iii/ reduce la motilidad intestinal, que conllevaría un tránsito intestinal ralentizado y iv/ favorece el desarrollo de una flora microbiana activa en los últimos tramos del tracto digestivo interfiriendo negativamente la digestión y absorción de otros nutrientes.

Por otra parte, si el mecanismo de actuación de los enzimas permite modificar características físicas ó químicas de la digestión; otras alternativas a la suplementación enzimática podrían teóricamente ejercer una efectividad similar. Por ejemplo, en estos últimos años se ha propuesto la dilución de las dietas con 1 ó 2% de arcillas (ej. sepiolita) que según algunos autores puede mejorar además de la calidad del granulo, las condiciones digestivas y productivas. Entre los mecanismos propuestos se sugiere que la presencia de arcillas ralentiza el tránsito intestinal de la digesta (permitiendo un mayor tiempo de digestión y absorción) y/o reduce la viscosidad de la digesta, mecanismo que sería común al de la suplementación enzimática. Sin embargo en dietas con altos contenidos en PNAs, que en sí mismas ya presentan largos tiempos de retención, un ralentecimiento del paso digestivo podría en principio ser contraproducente y no explicar por sí sólo las supuestas mejoras productivas. Es por lo tanto interesante estudiar posibles interacciones entre el tipo de dieta y la suplementación con enzimas y/o sepiolita.

**CAPITULO 1**

**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## 1. CARACTERIZACIÓN DE LOS CARBOHIDRATOS EN LA ALIMENTACIÓN DE LOS ANIMALES MONOGÁSTRICOS

Los hidratos de carbono son los componentes más abundantes en los alimentos destinados a los animales monogástricos, constituyendo generalmente más del 60% de la materia seca (Patridge, 1993). Entre los diferentes ingredientes utilizados, los cereales proporcionan la mayor parte de la energía de la dieta en forma de estructuras químicas sencillas, como los azúcares libres (1), disacáridos, oligosacáridos (2), y complejas, como pueden ser el almidón (3) y los polisacáridos no amiláceos. En general, aquellos polisacáridos que no pertenecen a los grupos 1, 2 y 3 se agrupan bajo el nombre polisacáridos no amiláceos (PNA). En esta misma línea, Englyst (1989) clasificó los polisacáridos en dos grupos: los polisacáridos amiláceos de reserva (  $\alpha$ -glucanos) y los polisacáridos estructurales de la membrana celular (PNA). Esta última fracción incluye fundamentalmente la celulosa, hemicelulosa, y las pectinas (Tabla I.1); algunos de ellos son hidrosolubles (PNAs) y otros insolubles en agua.

Desde el punto de vista nutricional, los carbohidratos indigestibles se clasifican bajo la denominación de fibra dietética. Trowell y col. (1985) definieron la fibra dietética como la suma de polisacáridos y lignina resistentes a la hidrólisis enzimática en el intestino delgado de los humanos, siendo los PNAs los principales componentes de esta fracción en el caso de los cereales. En cambio, Englyst y Commings (1987) propusieron definir la fibra dietética como la suma de PNA, conservando los conceptos originalmente descritos por Trowell y col. (1985). Por lo tanto, el término fibra dietética cubre una gran variedad de polisacáridos exceptuando el almidón (  $\alpha$ -glucanos) y los azúcares libres.

Desde un punto de vista analítico, el estudio de los carbohidratos ha exigido el desarrollo de una auténtica batería de métodos de determinación. Según el análisis Weende, la fibra bruta (FB) se refiere al resto de material vegetal obtenido después de un ataque ácido y alcalino. Sin embargo, una parte importante de la fracción fibrosa es solubilizada y englobada en los extractivos libres de nitrógeno (ELN). Como consecuencia, el término “fibra bruta” carece de una utilidad precisa en la alimentación de los animales monogástricos, y en especial en la de los animales rumiantes. Como alternativas se han desarrollado otras metodologías gástricas (FND, FAD, LAD; Goering y Van Soest, 1975) definidas para caracterizar con mayor precisión el fraccionamiento de los polisacáridos de origen vegetal forrajero. El

método utiliza soluciones detergentes para separar la fracción insoluble en detergente neutro (FND, fibra neutra detergente), en detergente ácido (FAD, fibra ácida detergente) o insoluble en ácido sulfúrico concentrado (LAD, lignina ácido detergente). Considerando que gran parte de los PNA solubles en el agua y las pectinas no se recogen en la FND, este análisis, puede también resultar insatisfactorio (Theander y Aman, 1980).

**Tabla I.1.** Composición general de los hidratos de carbono presentes en la dieta de animales monogástricos.

Clasificación	Subgrupo	Componentes
Azúcares (1-2)	<b>Monosacáridos</b>	Glucosa, galactosa, fructosa, xilosa, arabinosa
	<b>Disacáridos</b>	Sacarosa, trehalosa
Oligosacáridos (3-9)	<b>α-galactosidos</b>	Rafinosa, estaquiosa, verbascosa, fructooligosacáridos
	<b>Malto-oligosacáridos</b>	Maltodextrinas
Polisacáridos (>9)	<b>Almidón</b>	Amilosa, Amilopectina, almidones modificados
	<b>Polisacáridos no amiloideos</b>	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; padding-left: 10px; margin-right: 10px;"> <p>+ PNA solubles</p> <p>+ PNA insolubles</p> </div> <div style="margin-right: 10px;"> <p>→</p> <p>→</p> <p>→</p> </div> <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="margin-bottom: 10px;"> <p>→</p> </div> <div style="margin-bottom: 10px;"> <p>→</p> </div> <div> <p>→</p> </div> </div> <div style="margin-left: 10px;"> <p>→</p> <p>→</p> <p>→</p> </div> </div> <ul style="list-style-type: none"> <li>* -glucanos;</li> <li>* Pentosanos</li> <li>* Arabinogalactanos</li> <li>* Galactomananos</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>* -glucanos;</li> <li>* Pentosanos</li> </ul>

Recientemente, se está realizando un mayor esfuerzo por determinar la estructura química de los carbohidratos, y por establecer sus relaciones con el aprovechamiento digestivo (Bach Knudsen, 1997). En su conjunto, se trata de métodos enzimáticos y químicos reproducibles en la determinación de azúcares de bajo peso molecular, almidón y PNA de la pared celular (Bach Knudsen y Li, 1991; Englyst y col., 1994; Theander y col., 1994).

En base a estas metodologías, se han publicado diferentes revisiones sobre la composición de la fracción de carbohidratos presentes en diferentes ingredientes (Aman y Graham, 1990; Champ, 1996; Bach Knudsen, 1997; Robyt, 1997). A partir de ellas se desprende que: –a) el almidón es el principal carbohidrato de los cereales, b) las leguminosas contienen mayores niveles de azúcares de bajo peso molecular y mayores niveles de PNA, c) la fracción de bajo peso molecular de las leguminosas está constituida básicamente por –galactosidos.

## 1.1. CARBOHIDRATOS DE LOS CEREALES

### 1.1.1. Azúcares de bajo peso molecular

Entre los carbohidratos de bajo peso molecular presentes en los cereales podemos distinguir una fracción reducida de monosacáridos libres (0.2-0.6% de MS), y una fracción de oligosacáridos de sacarosa (<2% de MS).

### 1.1.2. El almidón

En los cereales, el almidón es el principal polisacárido del endospermo, que se encuentra en forma de gránulos de entre 2 y 100 micras. El tamaño y la forma del gránulo de almidón varía entre especies e incluso entre variedades. En general, los gránulos de almidón en los cereales son pequeños y polihédricos mientras que los de los tubérculos (ej. patata) son más grandes y esféricos, y los de las leguminosas con forma de riñón (Gallant y col., 1992). A primera vista el almidón está formado por dos tipos de polímeros, amilosa y amilopectina, pero su estructura es aún más compleja (ver apartado 1.2.2). La amilosa es una molécula lineal de 500-600 unidades de D.glucosa unidas por enlaces (1-4). La amilopectina es una molécula de características similares a la amilosa, aunque más corta y ramificada con enlaces (1-6) cada 24 a 30 unidades de glucosa. En la mayoría de los cereales, la relación amilosa:amilopectina es de una amilosa por cada tres moléculas de amilopectina aproximadamente (Robyt, 1997). El almidón es hidrolizado mayoritariamente en intestino delgado por los enzimas endógenos y se absorbe en forma de glucosa. Sin embargo, dependiendo de la composición (amilosa:amilopectina) y/o el procesado del grano (Reid y Hillman, 1999), parte de este puede escapar del intestino delgado para fermentarse en los últimos tramos del tracto digestivo, formando una fracción definida como almidón resistente.

### 1.1.3. Los polisacáridos no amiláceos (PNA)

Entre los diferentes PNA, los polisacáridos no amiláceos solubles de los cereales representan una fracción importante debido a sus implicaciones nutricionales en la alimentación de los animales monogástricos. Desde un punto de vista estructural, pueden ser relativamente simples como los  $\beta$ -glucanos, o más complejos como los arabinoxilanos. Sus contenidos y

características varían entre cereales, siendo el ratio arabinosilanos: -glucanos mayor en el grano de centeno y trigo que en cebada y avena. Sin embargo, la proporción de arabinosilanos solubles del total es relativamente baja (<10% en el trigo y centeno), mientras que de -glucanos solubles es más elevada, 54% en la cebada y 80% en la avena (Aman y col., 1989).

**Tabla I.2.** Composición media (g/kg) de las semillas de cereales utilizadas en la alimentación animal

	Maíz	Trigo	Cebada	Centeno	Avena
<b>Azúcares de bajo peso molecular</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>21</b>	<b>32</b>	<b>17</b>
Monosacáridos	4	3	4	6	2
Sacarosa	13	11	12	19	11
Rafinosa	2	4	5	4	3
Estaquiosa	1	2	1	3	2
Verbascosa	-	-	-	-	-
<b>Almidón</b>	<b>690</b>	<b>651</b>	<b>587</b>	<b>613</b>	<b>468</b>
<b>Total PNA</b>	<b>97</b>	<b>119</b>	<b>186</b>	<b>152</b>	<b>232</b>
<i>Polisacáridos no celulósicos solubles</i>	<b>9</b>	<b>25</b>	<b>56</b>	<b>42</b>	<b>40</b>
Glu	1	4	39	6	28
Gal	1	2	1	1	2
Man	2	2	2	2	2
Xil	2	9	6	20	2
Ara	3	7	6	12	3
A. urónicos	1	1	2	1	3
<i>Polisacáridos no celulósicos insolubles</i>	<b>66</b>	<b>74</b>	<b>88</b>	<b>94</b>	<b>111</b>
Glu	9	7	8	20	5
Gal	4	2	2	4	5
Man	1	1	2	3	1
Xil	28	38	50	41	78
Ara	19	22	22	24	15
A. urónicos	6	4	4	3	7
<i>Celulosa</i>	22	20	43	16	82
<i>Lignina Klason</i>	11	19	35	21	66
<b>Fibra dietética</b>	<b>108</b>	<b>138</b>	<b>221</b>	<b>174</b>	<b>298</b>
<b>CHO + lignina</b>	<b>823</b>	<b>823</b>	<b>834</b>	<b>850</b>	<b>787</b>

Fuente: Bach Knudsen, (1997)

La mayoría de -glucanos y arabinosilanos, tanto solubles como insolubles, se encuentran en el endospermo de la semilla, y en menor cantidad en la capa de aleurona (Fincher y Stone, 1986). Björk y col. (1984) sugieren que los PNA constituyentes de las paredes celulares del endospermo encapsulan las reservas de almidón, proteínas y grasas presentes en el interior de

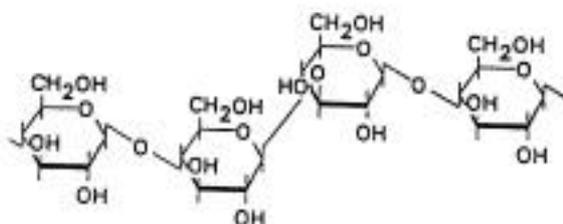
la célula. Según sus contenidos en PNAs, de menor a mayor, los cereales más utilizados en la alimentación de monogástricos son: el arroz, el maíz, el trigo, el triticale, la avena, el centeno y la cebada. El contenido en PNAs dependerá no solo del tipo de cereal, sino también de genotipo, la variedad (Campbell y col., 1989) y las condiciones de cultivo y conservación (Brufau y col., 1993; Williams y col., 1997).

### 1.1.3.1. Los $\beta$ -glucanos

Desde el punto de vista de su estructura química, los  $\beta$ -glucanos son similares a la celulosa, exceptuando el tipo de enlaces (1-4) que unen las unidades de D-glucosa e intercalando al azar ramificaciones de cadenas de D-glucosa mediante enlaces (1-3) como se presenta en la Figura I.1.

Según Classen y Bedford (1991), la proporción de enlaces (1-3) y (1-4) no es constante, y aproximadamente 85% de los  $\beta$ -glucanos de la cebada están formados por dos o tres enlaces (1-4) separados por un enlace (1-3). Los enlaces (1-3) rompen la linealidad de la molécula, e impiden la formación de fibrillas, favoreciendo su solubilidad y el incremento de la viscosidad. En el caso de la cebada y avena, los  $\beta$ -glucanos son de estructura relativamente sencilla. Si bien existe una gran variabilidad entre diferentes tipos de cebada (Edney y col., 1991).

Figura I.1. Estructura química de los  $\beta$ -glucanos de la cebada



### 1.1.3.2. Los arabinoxilanos

Son polisacáridos de estructura química más compleja que los  $\beta$ -glucanos. Básicamente están constituidos por polímeros de xilosa y arabinosa, formando polímeros lineales de D-xilosa

unidas por enlaces (1-4) y ramificaciones de arabinosa en los carbonos C2 y C3 (Figura I.2). Estas ramificaciones son consideradas responsables de la solubilidad del polímero en agua, y de la formación de soluciones viscosas.

Figura I.2. Estructura química de los arabinoxilanos del trigo

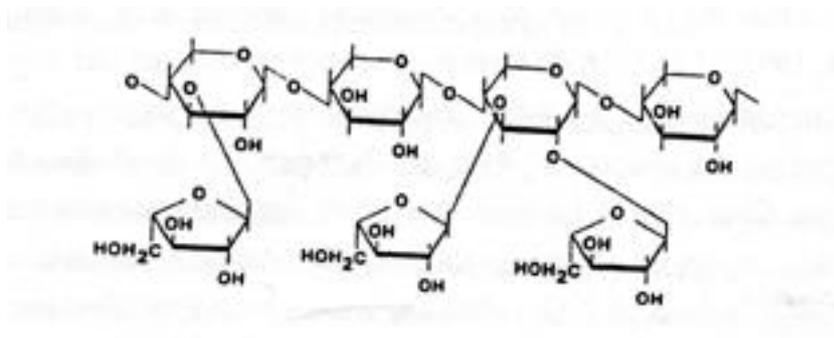


Tabla I.3: Contenidos en pentosanos y -glucanos de diferentes cereales (p.100 de MS)

	Cebada		Trigo		Triticale		Centeno	
	Pent.	$\beta$ .glu						
Henry (1985)	5.7	4.4	6.6	0.7	7.1	0.7	8.5	1.9
Choct y Annison (1990)	7.5	3.3	6.1	0.5	7.0	0.7	8.9	1.1
Bach Knudsen y col. (1991)	nd	nd	6.2	0.4	nd	nd	nd	nd
Gaudon (1995)	4.3	3.9	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Perez-Vendrell y col. (1998)	nd	3.7	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Bach Knudsen (1997)	nd	4.2	nd	0.8	nd	nd	nd	1.6
<b>Media</b>	<b>5.8</b>	<b>3.9</b>	<b>6.1</b>	<b>0.6</b>	<b>7.1</b>	<b>0.7</b>	<b>8.7</b>	<b>1.5</b>

nd: no determinado

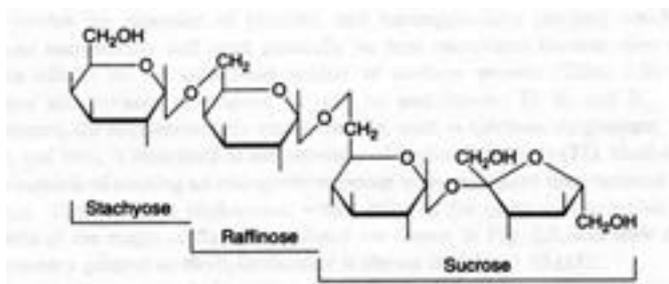
## 1.2. CARBOHIDRATOS DE LAS LEGUMINOSAS

En comparación con los cereales, las semillas de leguminosas contienen en general una mayor proporción de azúcares de bajo peso molecular (sobre todo -galactósidos, hasta 19%) y de polisacáridos no amiláceos (12 a 44%). En particular, la soja contiene en torno al 30 % de carbohidratos, con aproximadamente 4 a 5.5% de oligosacáridos (Tabla I.4; rafinosa y estaquiosa) y un 21% PNA (Svihus y col., 1998).

### 1.2.1. Los oligosacáridos

Los  $\alpha$ -galactósidos, como rafinosa, estaquiosa y verbascosa, son componentes de un número importante de leguminosas. Entre las diferentes leguminosas, los altramuces presentan valores elevados de rafinosa (19 a 44 g/kg MS), estaquiosa (92 a 110 g/kgMS) y verbascosa (13 a 40 g/kgMS). La torta de soja extractada (Tabla I.4) contiene de 40 a 55 g/kgMS de  $\alpha$ -galactósidos (rafinosa, 5-10 g/kg, estaquiosa, 30-50 g/kg y bajos niveles de verbascosa y ajugosa; Coon y col., 1988). En particular, los  $\alpha$ -galactósidos están compuestos por una sacarosa a la que se unen diferente número de D-galactosa con enlaces (1-6) formando, respectivamente rafinosa, estaquiosa, verbascosa y ajugosa (Figura I.3).

**Figura I.3. Estructura química de la familia de oligosacáridos.**



**Tabla I.4. Contenido (g/kg) en oligosacáridos de algunas variedades de soja Fuente: Trugo y col. (1995)**

Soja	Sacarosa	Rafinosa	Estaquiosa	$\alpha$ -galactósidos
<i>Bossier</i>	46	10	33	43
<i>BR-9</i>	53	7	46	53
<i>Davis</i>	47	6	37	43
<i>Santa Rosa</i>	39	4	41	45

### 1.2.2. El almidón

Como anteriormente descrito con los cereales, el almidón difiere entre leguminosas y cereales. Desde un punto de vista estructural, el gránulo de almidón está compuesto por un elevado número de regiones cristalinas en una matriz amorfa (French, 1984). El análisis de

difracción con rayos X produce dos "tipos de patrones espectrales" A y B, provenientes de dos tipos de estructuras cristalinas. En comparación a los patrones de tipo A presentes en los almidones de cereales y los de tipo B presentes en los almidones de tubérculos, el almidón de leguminosas presenta un patrón intermedio "C" que es producto de una mezcla de patrones tipo A y B (Gernat y col., 1990). Entre cadena de amilosa y amilopectina, la amilopectina se asocia más a las estructuras cristalinas favoreciendo la formación de hélices. Entre leguminosas (Tabla I.5), los guisantes y las habas, contienen altos niveles de almidón (400-500g/kg); en comparación con la torta de soja y los altramuces presentan contenidos en almidón relativamente bajos (18-27 g/kg).

### 1.2.3. Polisacáridos no amiláceos (PNA)

En las leguminosas, los polímeros de PNA presentan una mayor variabilidad estructural que los cereales, presentando estructuras químicas muy ramificadas y en general complejas. En su clasificación se pueden adoptar los siguientes criterios:

- identidad de los monosacáridos constituyentes
- configuración espacial (piranos o furanos) de los monosacáridos constituyentes
- posición de los enlaces glucosídicos
- orientación del enlace hemiacetal ( o )
- secuencia de monosacáridos en la cadena
- constituyentes no-carbohidratos.

A tenor de esta complejidad y variabilidad, el estudio analítico de los PNA requiere la adaptación de procedimientos técnicos capaces describir las propiedades físicas y químicas de la fibra, y proporcionar una información más precisa de la secuencia de monosacáridos y su configuración estructural. En general, la primera etapa consiste en eliminar los azúcares libres, oligosacáridos y el almidón mediante diferentes etapas de extracción. En particular, aunque su concentración es inferior a la de los cereales, el almidón de las leguminosas es eliminado para facilitar el estudio de los polisacáridos de la pared celular evitando las confusiones con el resto de PNA (Englyst, 1989).

Una vez realizada esta extracción, el resto de polisacáridos incluye un entramado de componentes solubles e insolubles; si bien las respectivas fracciones aislables varían considerablemente con las condiciones de fraccionamiento utilizadas (pre-tratamiento

físico, tratamiento enzimático, temperatura, tiempo y pH; Redgwell y Selvendran, 1986). Básicamente los PNA pueden estructurarse en tres grupos: la celulosa, los polímeros no-celulósicos y los polisacáridos pécticos. Mientras, los dos primeros se encuentran fundamentalmente en la cascarilla, las pectinas se encuentran mayoritariamente en los cotiledones (Theander y Westerlund, 1993).

En la Tabla I.5 se presenta la composición en azúcares libres, -galactósidos, almidón, celulosa, y fracciones solubles e insolubles de los PNA (g/kg) de la torta de soja extractada y otras leguminosas (Bach Knudsen, 1997).

**Tabla I.5. Carbohidratos ( $\text{g Kg}^{-1}\text{MS}$ ) de la torta de soja, altramuces, guisantes y habas**

	Soja	Altramuces	Guisantes	Habas
-galactósidos	60	77	50	54
Sacarosa	70	24	30	27
Almidón	27	18	454	407
Celulosa	62	131	53	81
PNA solubles	63	134	52	50
PNA insolubles	92	139	76	59

**Fuente: Bach Knudsen (1997)**

Comparada con otras leguminosas, la torta de soja contiene aproximadamente 62 g/kg de celulosa, 63 g/kg de PNA solubles y unos 92 g/kg de PNA no-celulosicos insolubles (Bach Knudsen, 1997). La fracción de PNA puede representar por lo tanto alrededor de un 15 a 22% de la materia seca de la torta de soja alcanzando una composición media presentada en la Tabla I.6.

**Tabla I.6. Contenido ( $\% \text{MS}^{-1}$ ) en polisacáridos no amiláceos (PNA) de la torta de soja y perfil ( $\% \text{PNA}^{-1}$ ) de monosacáridos contenidos en dicha fracción**

Autores	$\% \text{MS}$	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glu	A.U.
Chesson, (1987)	22.7	2.4	0.0	11.7	9.7	5.4	20.7	33.3	16.8
Carré y col. (1990)	16.5	1.0	1.5	15.8	7.7	3.6	28.0	23.0	19.0
Bach Knudsen (1997)	21.7	1.4	0.0	11.9	8.7	5.9	18.7	31.5	21.9
Huisman y col. (1998)	14.5	2.0	3.0	19.0	8.0	3.0	28.0	21.0	18.0
Marsman y col. (1997a)	17.2	3.0	1.4	11.6	2.8	3.5	28.0	26.0	23.5

Entre los monosacáridos contenidos en los PNA de la soja, la glucosa y galactosa representan más del 50%, junto a los ácidos urónicos (16-23%) y arabinosa (11-19%). Si bien los resultados reflejan una elevada homogeneidad entre muestras, se han constatado diferencias en la composición de los carbohidratos de cascarilla y cotiledones, que justificarían variaciones en la composición media de los PNA en función de la proporción de cascarilla residual en la torta extractada.

### 1.2.3.1. PNA presentes en la cascarilla

La cascarilla de los altramuces (Tabla I.7) presenta altos niveles de glucosa (60%, con enlaces glucosídicos  $\beta$ -1-4, celulosa), xilosa (12-14%) y manosa (2.5%), y unos niveles de galactosa significativamente bajos en comparación a los cotiledones.

Tabla I.7. Contenido (g/kg MS) de celulosa y fibra dietética soluble e insoluble en los cotiledones y la cascarilla de altramuces

	%	Fibra dietética		
		Celulosa	Soluble	Total
Cotiledones	75.2	12	31	289
Cascarilla	24.8	507	34	895

Fuente: Evans y col. (1993)

Los PNA solubles de la cascarilla de altramuces (Tabla I.7) constituyen solamente 3 a 4% del total de su fibra dietética, siendo su fracción mayoritaria la celulosa insoluble. La composición de la fracción soluble de la cascarilla (Tabla I.8) es aproximadamente 41% xilosa, 14% manosa, 10% galactosa y 17% ácidos urónicos. Su composición representa aproximadamente en relación con el total presente en la cascarilla un 10% de xilosa, 21% manosa, 17% galactosa, y 5% del total de ácidos urónicos. Según algunos autores, los polisacáridos solubles de la cascarilla estarían compuestos de cadenas de  $\beta$ -galactomananos (Chesson, 1987) y cadenas cortas de arabinoxilanos (Aspinall, 1988).

Tabla I.8. Perfil de monosacáridos de la fracción de PNA (totales, solubles e insolubles) de la torta de soja, cotiledones y cascarilla de altramuces.

	<i>Torta de soja</i>		
	<i>Totales</i>	<i>Insol.</i>	<i>Sol.</i>
<i>Ram</i>	1.2 (33.3)	1.1	1.6
<i>nosa</i>	10.4 (34.6)	9.2	14.1
<i>Arab</i>	7.6 (10.5)	9.2	3.1
<i>inos</i>	5.2 (38.5)	4.3	7.8
<i>a</i>	16.5 (39.0)	13.5	25.0
<i>Xilos</i>	39.8 (6.1)	50.3	9.4
<i>a</i>	19.3 (52.1)	12.4	39.1
<i>Man</i>			
<i>osa</i>			
<i>Gala</i>			
<i>ctosa</i>			
<i>Gluc</i>			
<i>osa</i>			
<i>A.Ur</i>			
<i>onic</i>			
<i>os</i>			

*Sol: Solubles; Insol: Insolubles; Entre parentesis (solubilidad en %)*

*Fuente: Bach Knudsen (1997) en caso de la soja; Evans y col. (1993) en caso de los altramuces*

Comparada con los altramuces u otros ingredientes de interés comercial, la torta de soja presenta un mayor contenido en  $\alpha$ -mananos, como refleja su contenido en manosa (4.7 %PNA<sup>-1</sup> y 1.22 %MS<sup>-1</sup>). Las mayores cantidades de manosa se encuentran fundamentalmente en las formas solubles (Tabla I.8), lo que quizás justifique su implicación en el desarrollo de efectos negativos sobre la digestión intestinal de los animales monogástricos.

Químicamente, los  $\alpha$ -mananos (Figura I.4) son polímeros de D-manosa unidos por enlaces (1-4) a los que se unen unidades de D-galactosa mediante enlaces (1-5) en una relación 2:3. Su estructura química parece ser similar a la estructura de la goma arábica descrita por Whisther y Saarnio (1957), lo que justificaría una similitud en sus efectos digestivos.

**Figura I.4. Estructura de los galactomananos**



Sin embargo, no todas las estructuras que contienen manosa presentan comportamientos físico-químicos similares. Mientras que son solubles los  $\alpha$ -mananos de la cascarilla, la manosa de los cotiledones esta integrada en fracciones poco solubles (Tabla I.9; Bach Knudsen, 1997). Este hecho se ve reforzado al incrementarse la proporción de manosa de 1 a 4% (Huisman y col., 1998) en los residuos obtenidos después de la extracción de las pectinas y hemicelulosas con agentes quelantes y alcalinizantes (1 y 4 M KOH). La mayor parte de los  $\alpha$ -mananos de los cotiledones parece estar ligada a las estructuras celulósicas.

**Tabla I.9. Perfil (%) de monosacáridos de la fracción de PNA (total, solubles e insolubles) de la soja y de su concentrado proteico.**

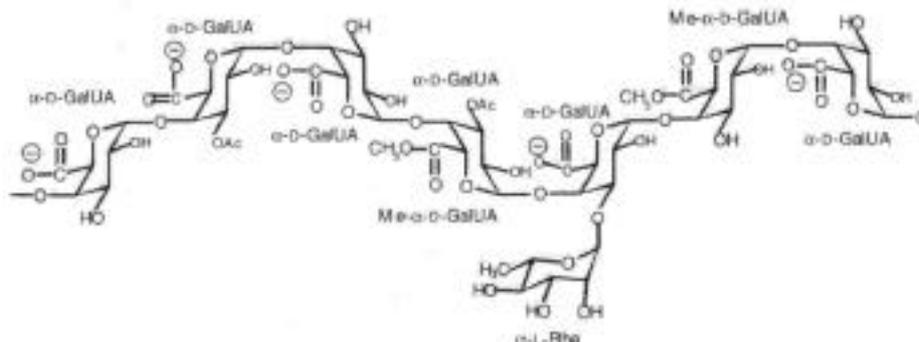
	Torta de soja			Aislado proteico de soja		
	Total	Insoluble	Soluble	Total	Insoluble	Soluble
<i>Rha</i>	1.2	1.1	1.6	1.1	1.0	1.3
<i>Ara</i>	10.4	9.2	14.1	14.1	12.4	6.3
<i>Xyl</i>	7.6	9.2	3.1	6.8	7.2	6.3
<i>Man</i>	5.2	4.3	7.8	5.1	7.2	2.5
<i>Gal</i>	16.5	13.5	25.0	30.4	24.7	37.5
<i>Glu</i>	39.8	50.3	9.4	19.3	33.0	2.5
<i>A. Uronico</i>	19.3	12.4	39.1	23.1	14.4	33.8
<b>PNA</b>	<b>257</b>	<b>(74%)</b>	<b>(26%)</b>	<b>177</b>	<b>(55 %)</b>	<b>(45 %)</b>

**Fuente: Bach Knudsen (1997)**

Junto a la celulosa y galactomananos, la cascarilla de soja contiene también cantidades menores de pectinas y hemicelulosas.

Las pectinas son polisacáridos compuestos de ácidos urónicos D-galactopiranosos con enlaces (1-4), sobre los que se une un gran número de grupos carboxilos en forma de ésteres de metilo (Cheetham y col., 1993), y sobre los que en algunos casos se ha indicado la presencia de grupos 2-O-acetilo ó 3-O-acetilo. Más en detalle, su composición es similar a las pectinas de los cítricos y manzanas que presentan una alta proporción ( $\pm 75\%$ ) de ácidos galacturónicos con grupos carboxilo metilesterificados. Respecto a su comportamiento físico-químico, las pectinas se extraen en la fracción soluble con agentes quelantes como el oxalato de amonio o disodio etileno diaminotetracetato, y en extracciones posteriores con alcalinizantes (Aspinall, 1988; Huisman y col., 1998).

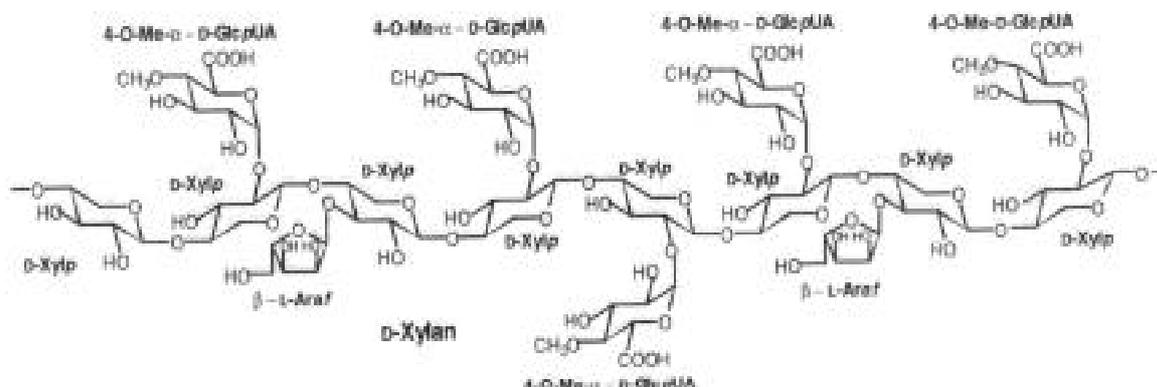
**Figura 1.5. Estructura de un fragmento de pectinas**



Las hemicelulosas consisten fundamentalmente en unas cadenas 4-D-xilosa con ramificaciones mayoritariamente de arabinosa, ácido glucurónico y residuos de ácido 4-O-metil-glucurónico (Aspinall, 1988). Básicamente, la fracción denominada como hemicelulosa, puede clasificarse en dos tipos (hemicelulosa A y hemicelulosa B);

Las Hemicelulosas A son fracciones insolubles en agua aunque extractables con agentes alcalinos. Su composición está basada fundamentalmente en cadenas simples de xilanos con una pequeña proporción de residuos de ácidos glucurónicos ( $\pm 3\%$ ). Las Hemicelulosas B son solubles en agua estando mayoritariamente constituidas por arabinoglucuronoxilanos ó arabinoxilanos ácidos.

**Figura I.6 Estructura química de un fragmento de D-xilanos**



En la Figura I.7, se presenta una breve revisión de las estructuras químicas descritas de PNA mayoritarios en la cascarilla de las leguminosas.

**Figura I.7. Resumen de los PNA de la cascarilla**

<b>Polímeros</b>	<b>Cadenas laterales</b>
<p>i/ Celulosa (<math>\pm</math> 60% PNA)  <math>\Rightarrow</math> 4)- -D-Glucp-(1<math>\Rightarrow</math>4)- -D-Glucp-(1<math>\Rightarrow</math>4)- -D-Glucp-(1<math>\Rightarrow</math></p>	
<p>ii/ Galactomananos (&lt; 10 %)  <math>\Rightarrow</math> 4)- -D-Manp-(1<math>\Rightarrow</math>4)- -D-Manp-(1<math>\Rightarrow</math>4)- -D-Manp-(1<math>\Rightarrow</math></p>	Cadenas (1-5) D-galactosa
<p>iii/ Pectinas (homogalacturonanos) (10 -15 %) <math>\pm</math> acetilados en los carbonos C2 y C3; <math>\Rightarrow</math>4)- -D-GalUA-(1<math>\Rightarrow</math>4)- -D-GalUA-(1<math>\Rightarrow</math>4)- -D-GalUA-(1<math>\Rightarrow</math></p>	
<p>iv/ Xilanos simples (&lt;15 %)  <math>\Rightarrow</math>4)- -Xylp-(1<math>\Rightarrow</math>4)- -D-Xylp-(1<math>\Rightarrow</math>4)- -D-Xylp-(1<math>\Rightarrow</math>4)-                      -D-Xylp-(1<math>\Rightarrow</math>                      (pequeña proporción de ácidos glucurónicos &lt; 3%)</p>	
<p>v/ Arabinoglucuronoxilanos  <math>\Rightarrow</math>4)- -Xylp-(1<math>\Rightarrow</math>4)- -D-Xylp-(1<math>\Rightarrow</math>4)- -D-Xylp-(1<math>\Rightarrow</math>4)-                      -D-Xylp-(1<math>\Rightarrow</math></p>	(1-3) L-arabinosa f (1-2) L-arabinosa f (1-2) ácido glucurónico (1-2) 4-O-ácido metil-glucurónico

**Fuente: Robyt, (1997)**

**1.2.3.2. PNA presentes en los cotiledones**

Los resultados de composición presentados en la Tabla I.9 (torta de soja vs. concentrado proteico de soja) permiten evidenciar las diferencias de composición entre cascarilla y cotiledones. La soja descascarillada (concentrado proteico) se asocia con un descenso apreciable del contenido en glucosa y un aumento notable de los contenidos en galactosa y arabinosa. En general, la galactosa, arabinosa i ácidos urónicos presentan una elevada solubilidad, mientras que otros como la xilosa, manosa y glucosa presentan una reducida solubilidad.

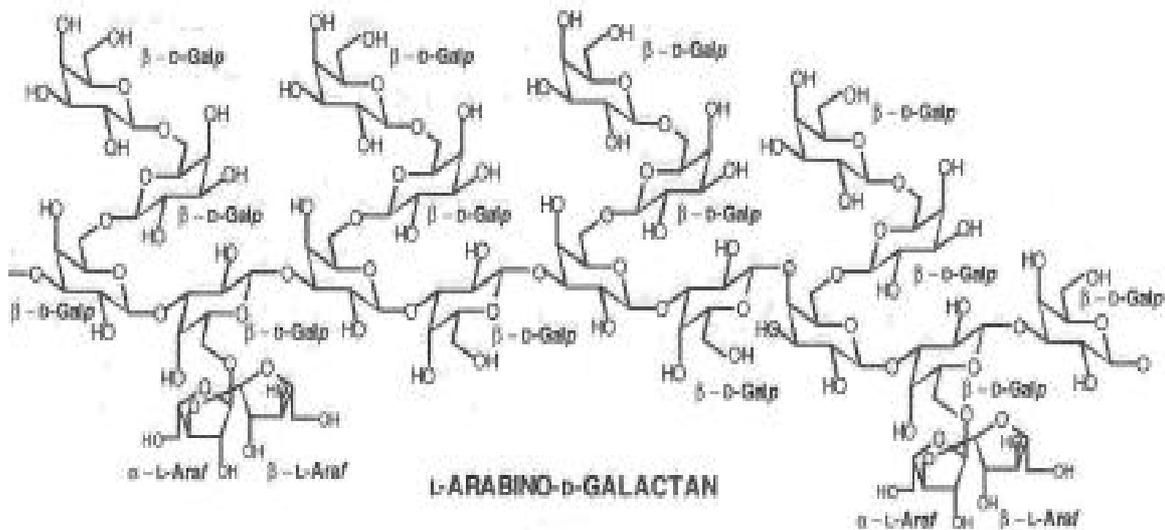
Fraccionar los polisacáridos de la torta de soja, conlleva en primer lugar solubilizar la proteína mediante agentes desnaturalizantes como el sodio dodecil sulfato (Huisman y col., 1998) seguida por una serie de extracciones con agentes quelantes y alcalinizantes como el oxalato de amonio o disodio etilenodiaminotetra-acetato (Aspinall, 1988) ó ácido 1,2-diaminociclohexano-N,N,N',N'-tetraacetico (CDTA, Huisman y col., 1998). En el fraccionamiento posterior de los polisacáridos (Tabla I.10, Huisman y col., 1998), la primera extracción (ChSS, agentes quelantes + DASS, agentes alcalinos diluidos) libera un 45% de polisacáridos con alta proporción de arabinosa (25%), galactosa (37%) y ácidos uronicos. Esta fracción ha sido descrita esencialmente como arabinogalactanos neutros y polisacáridos ácidos complejos.

*Tabla I.10. Perfil (%) de monosacáridos y recuperacióm (%MS<sup>-1</sup>) del concentrado proteico de la soja (CPS), de la fracción no extractable con agua (WUS) y de la extracción secuencial de polisacáridos (ChSS, extractos con agentes quelantes; DASS, extractos con alcalinos diluidos; IMASS, extractos con 1M KOH; 4 M ASS, extractos con 4 M KOH; y residual). Fuente: Huisman y col. (1998).*

<i>% Monosacáridos</i>	<i>CPS</i>	<i>WUS</i>	<i>ChSS + DASS</i>	<i>1M ASS</i>	<i>4M ASS</i>	<i>Residual</i>
<i>Perfil (%)</i>						
<i>Rha</i>	2	2	2	2	1	1
<i>Fuc</i>	3	3	3	3	3	0
<i>Ara</i>	19	19	25	23	12	3
<i>Xyl</i>	8	8	6	11	28	3
<i>Man</i>	3	2	1	1	2	4
<i>Gal</i>	28	29	37	35	18	2
<i>Glu</i>	21	21	1	5	26	76
<i>Acidos uronicos</i>	18	17	26	20	10	11
<i>Recuperación (% NSP<sup>-1</sup>)</i>		97	45 (38 +7)	16	7	18

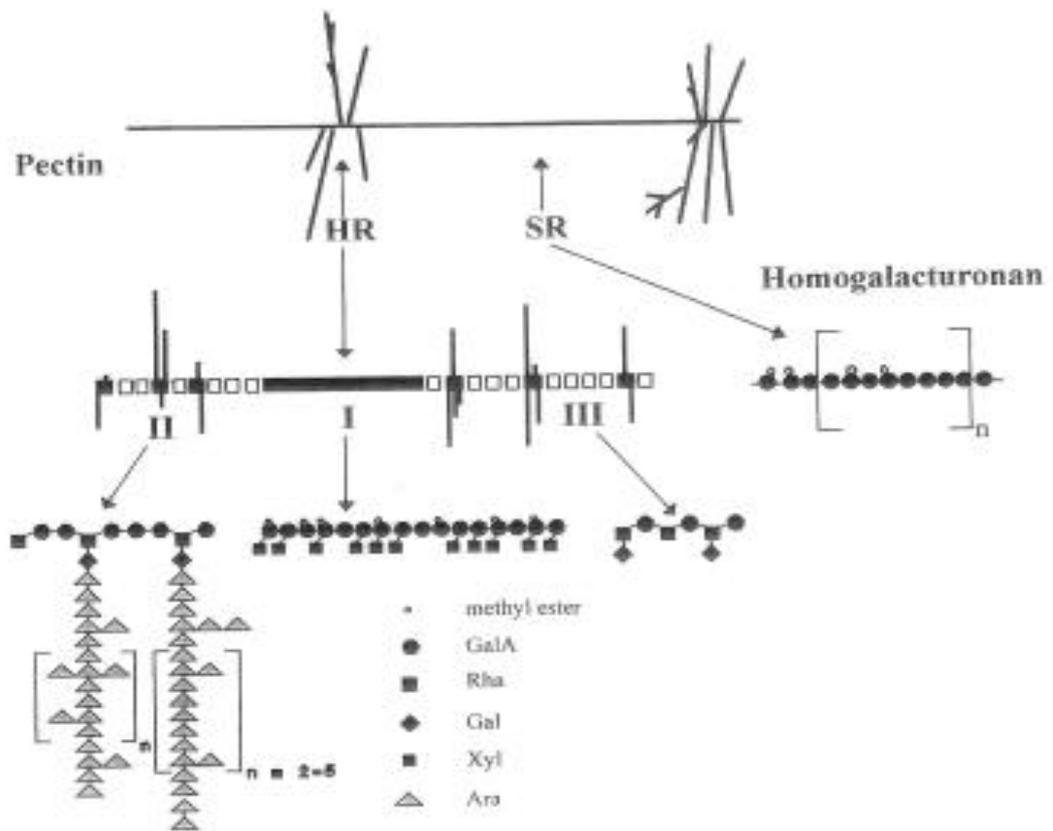
Según Aspinall, (1988), los arabinogalactanos tienen una estructura de cadenas lineales de moléculas de D-galactopiranososa con enlaces (1-4) asociados a cadenas laterales de disacáridos de L-arabinofuranoxil-(1-5)-L-arabino-furanosa tal como se presenta en la Figura I.8.

Figura I.8. Estructura de un fragmento de L-arabino-D-galactanos



Las fracciones extractadas de los cotiledones con agentes quelantes ó 1M KOH contienen también polisacáridos ácidos del tipo de las pectinas. Una gran parte de estos polisacáridos ácidos de las paredes celulares se encuentran asociadas mediante enlaces iónicos con el  $\text{Ca}^{2+}$ , permitiendo su solubilidad en soluciones alcalinas. Esta fracción está básicamente compuesta de arabinosa, galactosa, y ácidos urónicos (ó galacturónicos). La hidrólisis parcial (Aspinall y col., 1967) de estas cadenas libera una serie de oligómeros (-homólogos) como la galacturonobiosa y galacturonotriosa, confirmando su similitud con las pectinas descritas de las pulpas de frutas (Figura I.5), y oligosacáridos ácidos constituidos por ácido D-galacturónico y residuos de L-ramnosa.

*Figura I.9. Estructura hipotética de las pectinas de manzana. SR, (en ingles “smooth regions”); HR,(en ingles “hairy regions”), en los cuales la distribución de los grupos acetil no esta presentada, aunque existen evidencias de la existencia de grupos acetil excepto en las sub-unidades III*



*Fuente: Schols y Voragen (1996).*

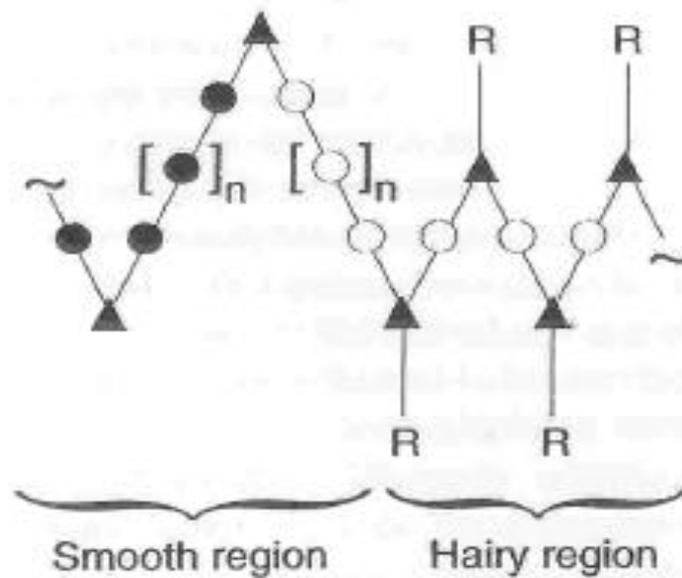
La hidrólisis parcial, también confirma la presencia de unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosas unidas en el carbono 4 como en el caso de arabinogalactanos. La acetólisis de estos polisacáridos también libera dos tipos de disacáridos (2-O-  $\beta$ -L-fucopiranosil-D-xilosa y 2-O-  $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa) así como cadenas simples de D-xilopiranosas (Aspinall y Baillie, 1963).

A partir de estas descripciones, se confirma que las pectinas son polisacáridos compuestos de ácidos urónicos D-galactopiranosil unidos con enlaces (1-4), presentándose una gran parte de sus grupos carboxilos en forma de éster de metil (metilesterificación de los grupos carboxilos). Algunas pectinas son también grupos acetilados (2-O) ó (3-O) en las unidades

de ácido urónico D-galactopiranosil, con una talla molecular media de 100.000 Da (20.000–400.000).

Los homogalacturonanos (HG) de las pectinas no contienen cadenas laterales, refiriéndose a regiones ligeras (en inglés “*smooth regions*”) como se presenta en la Figura I.10. También, existe un pequeño número de unidades de  $\alpha$ -ramnopiranosil (1 cada 25) unidas al carbono C-2 de las unidades de ácido urónico galactopiranosil. Los Ramnogalacturonanos-I (RG-I) son estrictamente repeticiones de disacáridos de (1,2)- $\alpha$ -L-ramnosil-(1-4)- $\beta$ -D-galactosil ácido urónico. Los Ramno-galacturonanos contienen muchas cadenas laterales constituyendo las regiones de más peso (en inglés “*hairy regions*”). Las cadenas laterales de arabinosil- y galactosil- se unen a unidades de ramnosa (aproximadamente 20-80% de las mismas) en los carbonos C-4. Tanto arabinanos, galactanos como arabinogalactanos del tipo I y II pueden estar asociados a las cadenas principales de ramnogalacturonanos (Albersheim y col., 1996).

Figura I.10. Estructura de las cadenas de pectinas “*smooth*” y “*hairy regions*”



Fuente: Aman y Westerlund (1996)

Por otro lado, las pectinas se dividen en dos categorías en función de la proporción de ácidos galacturónicos esterificados con grupos metilo. Una pequeña proporción de pectinas ligeras (“*low methyl pectins*” < 50 %) y una mayor proporción de pectinas pesadas (“*high methyl pectins*” > 50%).

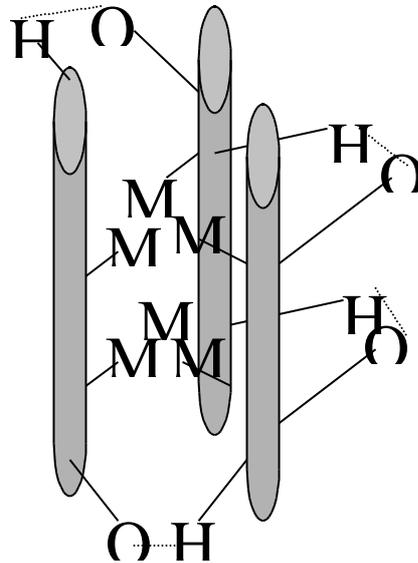
De las características de las pectinas solubles, se destaca su propiedad de formar gel dependiendo de varios factores físicos o químicos como temperatura, pH, concentración de solutos y concentración de cationes bivalentes. Además, la estructura de las pectinas misma afecta la formación de gel, dependiendo de su peso molecular, su grado de esterificación, la presencia de amidas (que se forman al tratar las pectinas con amonio), la presencia de grupos acetilo en las cadenas de galacturónico, y la presencia de unidades de -L-ramnosa (Robyt, 1997).

La formación de gel por las moléculas de pectinas se debe a la presencia de algunas áreas a lo largo de su estructura lineal capaz de formar complejos con otras moléculas de pectinas. Estas áreas se denominan zonas de contacto cuya extensión es muy limitada, lo que favorece la formación de estructura de gel en lugar de precipitaciones.

La sustitución de las unidades de -L-ramnopiranosil en la posición de oxígeno O-2 de las cadenas de D-galacturonanos produce una discontinuidad en la cadena y puede limitar la dimensión de las zonas de contacto. Los estudios de difracción con rayos X muestran que las sales sódicas de la pectina existen en forma de una gruesa hélice, con tres ácidos D-galacturónicos en cada vuelta de la hélice. El pectinato cálcico y ácido pectínico tienen la misma estructura de hélice pero están ordenados relativamente en diferentes formaciones cristalinas. Las hélices de ácido pectínico están organizadas en cadenas paralelas con grupos metilo éster de soporte, permitiendo unas áreas cilíndricas (hidrofóbicas) a lo largo del eje de la hélice.

El pectinato de calcio tiene unos iones cálcicos acomplejados con los grupos carboxilos e hidroxidos de las dos hélices que transcurren en direcciones contrarias, dando una estructura tridimensional de la matriz de gel. También, pueden existir enlaces covalentes entre diferentes cadenas de la membrana celular, como puede ser la dimerización de ácidos ferúlicos (ej. aquellos presentes en las regiones pesadas de las pectinas de remolacha).

Figure I.12. Estructura hipotética de Galacturonanos



Fuente: Robyt (1997).

### Arabinoglucuronoxilanos:

Los xilanos ácidos se encuentran generalmente en los tejidos lignificados de las monocotiledoneas y dicotiledoneas; y son aislables con una extracción alcalina. Los arabinoxilanos ácidos han sido aislados como polisacáridos extracelulares a partir de cultivos celulares de soja (Kato y Matsuda, 1985). La caracterización parcial de la estructura de estos polisacáridos (Figura I.5) sugiere que son xilanos (4-xilosas) con unidades de arabinofuranosa, ácido glucurónico y/o 4-O- metilglucurónico como cadenas laterales (Aman y Westerlund, 1996). Más del 90% de xilosas en la cadena no presenta ramificaciones, si bien una parte (5-17%) puede ser también acetilada en los grupos hidróxilos de los carbonos C-2 y C-3 (Aman y Westerlund, 1996).

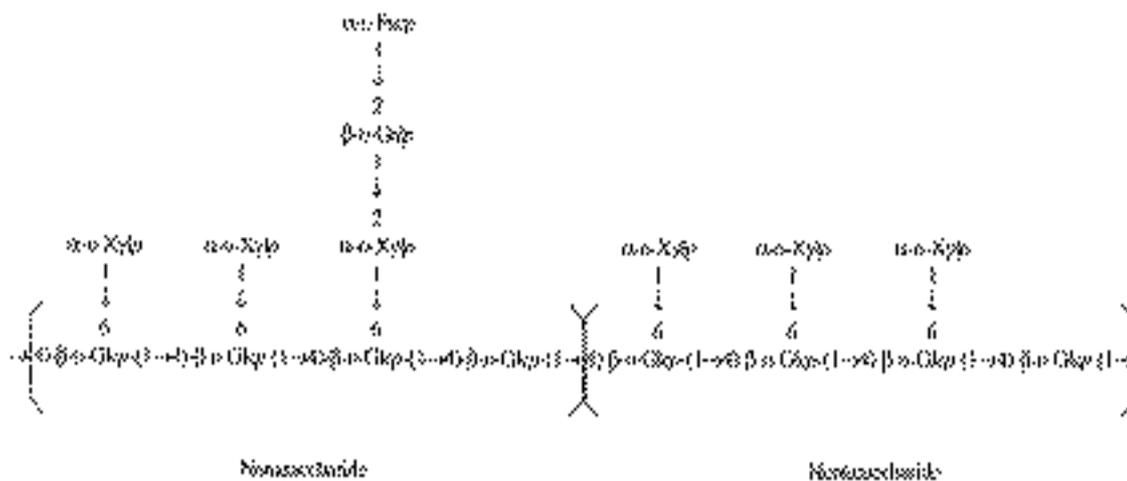
### Xiloglucanos:

Los xiloglucanos se encuentran generalmente en las membranas celulares primarias de las plantas pudiendo alcanzar entre 20 y 25% del tejido de los dicotiledones. Los xiloglucanos contienen glucosa, xilosa y galactosa en una relación 4:3:1, y en algunos casos pequeñas cantidades de arabinosa. La cadena principal contiene enlaces tipo  $\beta$ -(1-4) -D-glucopiranosil con cadenas laterales de  $\beta$ -L-xilopiranosil unidas en la 6<sup>a</sup> posición de algunas unidades de

glucosa y galactosa y en la 2ª posición de las unidades de xilosa. Algunas unidades de  $\alpha$ -L-fucosa se unen en la 2ª posición de algunas unidades de galactosa. La heterogeneidad de las fracciones de xiloglucanos aisladas se debe a diferencias de peso molecular, composición y distribución de las cadenas laterales anteriormente descritas.

Los xiloglucanos presentan una estructura de 2 hélices y una conformación similar a la celulosa. En los tejidos primarios, los xiloglucanos están altamente asociados a las microfibrilas de celulosa mediante puentes de hidrogeno. Algunos polisacáridos libres ó mezclados con celulosa pueden ser aislados de las membranas celulares de la soja mediante la extracción con 24% de hidróxido de potasio.

Figura 1.12. Unidades repetidas de xiloglucanos de guisantes



Fuente: Aman y Westerlund (1996)

### Glucomananos:

Los glucomananos consisten en cadenas de manopiranosil unidas con enlaces (1-4) en los que la manosa puede ser sustituida por algunas unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosil. *In vitro*, los glucomananos de las fracciones insolubles pueden formar unas asociaciones no covalentes con la celulosa cristalina. La presencia de manosa en las fracciones extraídas con solventes alcalinos concentrados indica su presencia en aproximadamente 2%.

**Proteínas estructurales:**

Las membranas celulares contienen también proteínas estructurales, como extensina (aproximadamente 5% de pared celular vegetal primaria). La extensina es una glucoproteína ( $\pm 50\%$  proteína) con una composición inusual de aminoácidos, con 40% hidroxiprolina y unos altos niveles de lisina y serina. La tirosina esta implicada en los enlaces fenólicos de la extensina, hecho que puede ser considerado para explicar la insolubilidad de esa proteína de la membrana celular.

En la Figura I.13, se presenta un breve resumen de las estructuras químicas descritas para los PNA mayoritarios presentes en los cotiledones de las leguminosas

*Figura I.13. Resumen de los PNA presentes en los cotiledones del grano de soja*

<b><i>Polimeros</i></b>	<b><i>Cadenas laterales</i></b>
i/ <u>Arabinogalactanos</u> (aproximadamente 34-45% PNA) => 4)- -D-Galp-(1=>3 ó 4)- -D-Galp-(1=>3 ó 4)- -D-Galp-(1=>	=>1)- -D-Galp-(1=>5)- -D-Galp-(1=>5) =>1)- -L-Araf -(1=>5)- -L-Araf-(1=>5)
ii/ <u>Arabinanos</u> =>5)- - ra-(1=>5)- -Ara-(1=>	=>(3=>1)- - ra =>(2=>1)- - ra
iii/ <u>Ramnogalacturonanos</u> (aproximadamente 22% PNA) <u>HG (homogalactuonanos)</u> => 4)- -D-GalUA-(1=>4)- -D-GalUA-(1=>4)- -D-GalUA-(1=>	Unidas al C4 de las unidades de ramnosa =>arabinogalactanos =>4- -D-galactopiranososa
<u>RG (rhamnogalacturonanos)</u> => 4)- -D-GalUA-(1=>2)- -L-Rhamp-(1=>4)- -D-GalUA-(1=>	
Iv/ <u>Arabinoglucuronoxilanos</u> (2-3% PNA) =>4)- -Xylp-(1=>4)- -D-Xylp-(1=>4)- -D-Xylp-(1=>4)- -D-Xylp- (1=>	=> (1-3) L-arabinosa f => (1-2) L-arabinosa f => (1-2) Acido glucurónico => (1-2) 4-O-Acido metil glucurónico
v/ <u>Xiloglucanos</u> (5-7% PNA) => 4)- -D-Glcp-(1=>4)- -D-Glcp-(1=>4)- -D-Glcp-(1=>	=> (1=>6)-D-Xylp => -L-Fucp(1=>2)- - D-Galp-(1=>2)- - D-Xylp-(1=>6)
Vi/ <u>Glucomananos</u> =>4)- - D-Gluc-(1=>4)- - D-Man-(1=>4)- -Man-(1=>4)- - Gluc- (1=>4)- - an-(1=>4)- - an-(1=>	Unidas en las unidades de manosa C3 => Arabinosa C6 => - Xilosa; - Galactosa
Vii/ <u>Celulosa</u> (aproximadamente 15-19% PNA) => 4)- -D-Glucp-(1=>4)- -D-Glucp-(1=>4)- -D-Glucp-(1=>	

**Fuente: Robyt (1997).**

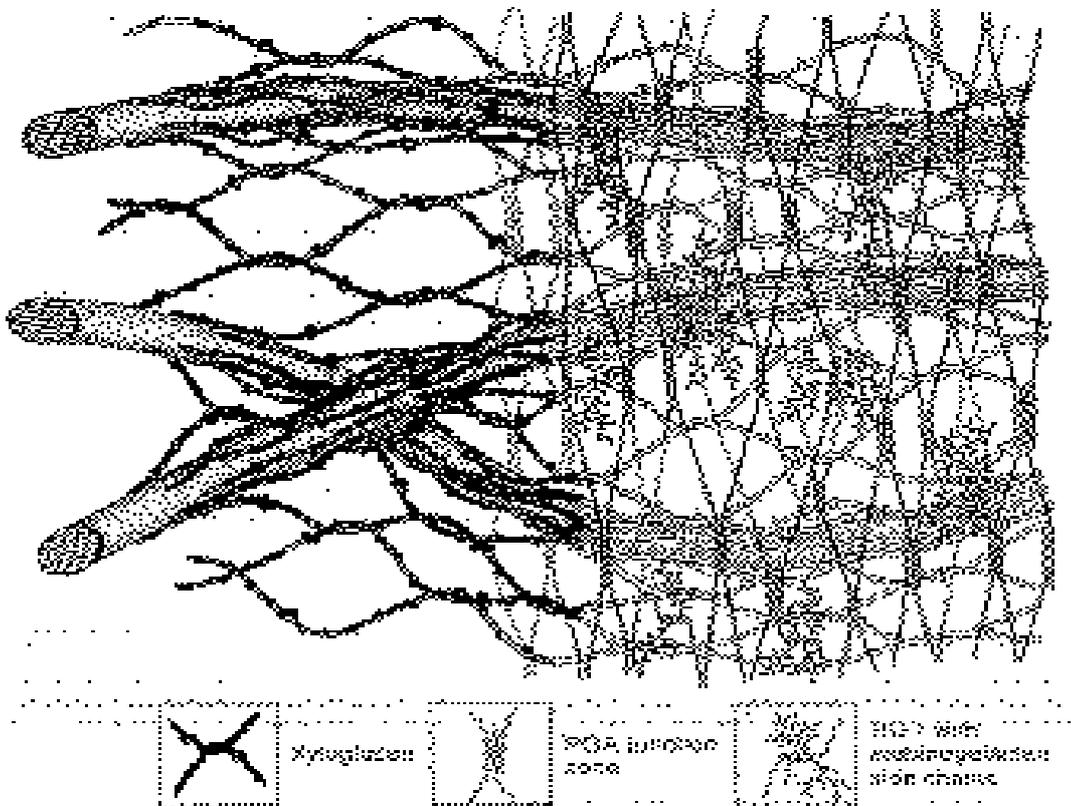
### 1.3. MODELOS DE PARED VEGETAL

Los modelos recientes propuestos en la descripción de la pared celular vegetal proponen tres estructuras constituyentes

1. Un marco de celulosa - xiloglucanos
2. los polisacáridos pécticos
3. las proteínas estructurales,

Según Huisman y col. (1998) y Huisman y col. (1999) se puede solubilizar la proteína y extraer la fracción de polisacáridos insolubles en agua sin modificar la integridad de la estructura de los PNA. En 1993, Carpita y Gibeaut propusieron un modelo de interacción entre los componentes de la pared celular primaria (Figura I.14).

*Figura. I.15. Tipo I de la membrana celular de la mayoría de las plantas propuesta por Carpita y Gibeaut, (1993).*



En breve, la pared celular primaria puede ser descrita como la combinación de dos fases. Una fase de microfibrillas de celulosa y posiblemente de proteínas como la extensina, que forma un marco insoluble; y una fase de matriz compuesta de polisacáridos no-celulósicos, que rellenan este marco insoluble. En esta estructura, la hemicelulosa se une a la celulosa mediante puentes de hidrógeno permitiendo la regulación de la resistencia y la porosidad de las células mediante un control de separación entre microfibrillas. Los polisacáridos pécticos rellenan la matriz mediante la formación de gel, mientras que los homogalacturónanos la mantienen mediante la interacción con iones  $\text{Ca}^{2+}$  (McCann y Roberts, 1991). Los enlaces covalentes entre los polisacáridos pueden también reforzar esta estructura como ha sido descrito por Rombouts y Thibault (1986) en las pectinas de remolacha.

## 2. CONSECUENCIAS NUTRICIONALES Y PRODUCTIVAS DE LOS PNA INGERIDOS POR LOS BROILERS

En comparación con el maíz, las aves alimentadas en base a trigo, cebada o centeno presentan una menor productividad, limitada por los efectos negativos de la fracción soluble de  $\beta$ -glucanos y arabinosilanos sobre la digestión (White y col., 1983; Antoniou y Marquardt, 1982; Choct y Annison, 1992a,b; Choct y col., 1996). En particular, los PNAs pueden ejercer un efecto barrera a la acción de los enzimas hidrolíticos al aprisionar el resto de nutrientes en las células del endospermo (Hulet y col., 1993; Ward, 1995, Williams y col., 1997). Por otra parte, su presencia se ha relacionado con incrementos de viscosidad y modificaciones fisiológicas y morfológicas en el tracto digestivo. Los PNAs pueden reducir la difusión de nutrientes (Feighner y Dashkevich, 1988) e incrementar la osmolaridad de la digesta provocando un aumento en la retención de líquido en la digesta y un incremento en la presencia de heces húmedas (White y col., 1981; Hesselman y Aman, 1986; Petterson y col., 1990).

El resto de polisacáridos no amiláceos insolubles puede provocar también modificaciones digestivas no relacionadas con la viscosidad. En concreto, los polisacáridos insolubles (celulosa, xilanos y fracciones insolubles de  $\beta$ -glucanos y arabinosilanos) son capaces de adsorber gran cantidad de agua (Robertson y Eastwood, 1981) con un incremento notable en el volumen digestivo, lo que estimula la motilidad intestinal y altera el tránsito digestivo (Almirall y Estevé-García, 1994; Dänicke y col., 1997; Lazaro, 1999). Según Carré y col. (1990) y Annison, (1991), la capacidad de las aves para digerir la fracción de PNA insolubles es prácticamente nula. De hecho contrariamente a los PNA solubles, la adhesión bacteriana a los PNA insolubles es poco probable debido a sus propiedades laxantes y a los tiempos de retención reducidos en el tracto digestivo. Sin embargo, aparte de su efecto diluyente no se han descrito mayores efectos negativos.

## 2.1. DIGESTIÓN DE LOS NUTRIENTES

### 2.1.1. Efectos antinutritivos de los $\beta$ -glucanos y arabinosilanos de los cereales

Como hemos señalado anteriormente, la alimentación de animales jóvenes (broilers o lechones) con raciones con altos niveles de cebada o centeno provoca una reducción de la productividad de los animales (baja ganancia media diaria -GMD y altos índices de conversión -IC) (Moran y col., 1969; Petterson y Aman, 1988,1989; Groot Wassink y col., 1989; Petterson y col., 1990). Determinantes de la baja productividad son las alteraciones digestivas debidas a la presencia de PNA viscosos, que reducen la ingestión de alimento, dificultan la difusión de los nutrientes, alteran la microbiología, la histología y la fisiología intestinal, conllevando una reducción en la digestibilidad de los nutrientes.

Evidencias de estas alteraciones digestivas, son los resultados de Choct y Annison (1992a,b) y Choct y col. (1996) quienes observaron una reducción significativa de la digestibilidad del almidón, proteína y sobre todo de la fracción lipídica tras el aporte de cantidades crecientes de PNAs en una dieta estándar de broilers.

En este contexto se enmarcan los descensos en la digestibilidad de la grasa, sobre todo los ácidos grasos saturados de cadena larga, cuya digestión presenta una mayor dependencia de la formación de micelas (Martinez, 1992; Choct y Annison, 1992b). Por otra parte, el incremento en las pérdidas endógenas de lípidos, como los esteres de colesterol y triaciglicerol de la bilis (Noble y col., 1988), puede reducir tambien la digestibilidad de la grasa.

Hesselman y Aman (1986) observaron también una reducida digestibilidad ileal del nitrógeno (<0.55) en pollos jóvenes alimentados con una ración base de cebada en comparación con valores de 0.90 obtenidos con dietas de maíz y soja. Similares efectos han sido descritos para la digestibilidad aparente fecal de proteína (Hesselman y Aman, 1986; Helander y Inberr, 1988, Rotter y col., 1990; Freisen y col., 1991; Marquardt y col., 1996). Según Larsen y col. (1993), la presencia de PNAs viscosos incrementa las pérdidas endógenas de nitrógeno, posiblemente debido a la formación de complejos (PNAs-enzimas digestivos) que impiden el ataque del enzima sobre su sustrato.

En cuanto a la digestión del almidón entre diferentes cereales, Mannion (1981) y Hesselman y Aman (1986) no observaron diferencias en su digestibilidad fecal a pesar de observarse claras diferencias en digestibilidad ileal. Salih y col. (1991) sugieren que la fermentación microbiana en los últimos tramos del intestino determina la degradación y utilización del almidón; por lo que podría enmascarar las diferencias observadas a nivel ileal. Sin embargo, es necesario señalar que la fermentación microbiana en los últimos tramos del tracto digestivo es muy limitada en aves jóvenes, y solamente los animales más adultos pueden en cierta medida beneficiarse de la utilización fermentativa de los carbohidratos (Jeroch y Dänicke, 1993; Philip y col., 1995).

Según los datos presentados en la Tabla I.11, se puede resumir que tanto los  $\beta$ -glucanos como los arabinosilanos de los cereales ejercen “per se” un efecto negativo sobre la digestibilidad tanto del almidón, como de la proteína y la grasa de la dieta.

**Tabla I.11.** Efecto de adición de cantidades crecientes de PNAs sobre la digestibilidad aparente del almidón, proteínas o grasa en broilers.

Tratamientos	PNAs G/kg	Digestibilidad (%)		
		Almidón	Proteína	Grasa
Control (dieta base de sorgo)	25.9	96	75	93
Control + 20 g (wep)/kgMS	43.8	91	70	87
Control + 5 g (aep)/kgMS	30.8	96	75	93
Control + 10 g (aep)/kgMS	34.9	95	73	92
Control + 25 g (aep)/kgMS	48.0	92	69*	76*
Control + 40 g (aep)/kgMS	65.7	82*	61*	69*
				<b>C18:1 C18:2</b> 71
Control (68% Sorgo)	Nd	98	69	96
Control + 30g pentosanosa/ kg MS	Nd	92**	63*	41* 82*
Control + 30g ( _ arabinosa + _ xilosa) / kgMS	Nd	98	72	66 95
Control (61% Sorgo)	Nd	90.0	79.1	93.7
Control + 40g (PNAs) / kg MS	Nd	56.3*	52.3*	38.6*

wep : pentosanosa extraída con agua;

aep : pentosanosa extraída con alcohol.

nd: nd determinado

\*diferencias estadísticamente significativas

### 2.1.2. Efectos anti-nutritivos relacionados con la fracción no amilácea de las leguminosas

Las leguminosas contienen en general una mayor proporción de  $\alpha$ -galactósidos y PNA (Bach Knudsen, 1997) que los cereales más utilizados (cebada y trigo o maíz). Con estructuras químicas más complejas y variadas, la presencia en la ración de determinadas leguminosas se ha relacionado también con efectos negativos sobre la digestión y la absorción de los nutrientes.

Por ejemplo, la presencia de oligosacáridos ( $\alpha$ -galactósidos) en las leguminosas puede provocar descensos en la digestibilidad de los animales monogástricos, que no están dotados con el enzima 1,6  $\alpha$ -galactosidasa (Giltzermann y Auricchio, 1965). Su ingestión está relacionada con ciertas alteraciones de los mecanismos de digestión, como flatulencia y diarreas (Rackis, 1975; Saini, 1989); ambos relacionados con una mayor actividad microbiana de fermentación en intestino delgado. Se han descrito también sus efectos sobre la presión osmótica del contenido digestivo, que incrementa la retención de líquido en la digesta y heces; y los posibles incrementos de la viscosidad de la digesta (Annison, 1995) que podría limitar además la digestión y absorción del resto de nutrientes (Coon y col., 1990).

Los efectos negativos de los  $\alpha$ -galactosidos fueron evidenciados en la alimentación de gallos (Leske y col., 1993) al suplementar con niveles crecientes de rafinosa, estaquiosa ó sacarosa el aislado proteico de la soja. Los resultados de este experimento evidencian que tanto la incorporación de rafinosa como estaquiosa provocó descensos significativos de los contenidos energéticos de la dieta (respectivamente 11 y 12%), descenso no provocado por la sacarosa. En ensayos realizados por Coon y col. (1990) y Leske y col. (1991) se concluyó que la extracción alcohólica de los oligosacáridos de la soja puede incrementar la EMn de la dieta. Entre los resultados citados por Coon y col. (1990) es de resaltar que la extracción de  $\alpha$ -galactósidos redujo la fermentación cecal, aumentó el pH y el tiempo de permanencia de la digesta en los ciegos. Según ellos, estos cambios pueden facilitar una mayor digestión de la fibra (hemicelulosa y celulosa) y un aumento del aporte energético de la dieta.

Por otra parte, junto a los oligosacáridos, las leguminosas contienen cantidades apreciables de PNA cuyos efectos sobre la digestión son motivo en la actualidad de un gran interés. En un trabajo reciente Svihus y col. (1998) estudiaron en las aves la digestibilidad ileal aparente de diferentes tipos de torta de soja (tostado de la soja integral después de eliminar

la grasa, HSB; torta de soja con bajo contenido en oligosacáridos, ROM; aislado proteico concentrado de soja, SPC, después de la extracción con 60% etanol y ácido; y aislado proteico de soja, ISP). La comparación entre dietas permitió estudiar los efectos de un amplio rango de concentraciones de fibra dietética (de 27.6 g/kg en la dieta de ISP hasta 187.6 g/kg en la dieta de HSB). Los resultados evidenciaron que el nivel de fibra dietética se asoció con un descenso significativo de la digestibilidad ileal de nitrógeno, grasa y minerales (P y Ca), confirmando su efecto antinutritivo directo sobre la digestión y absorción de otros nutrientes. La digestibilidad ileal menor en el caso de la dieta de HSB, fue coincidente con un incremento significativo de la viscosidad de la digesta ( $6.3 \pm 0.2$  vs  $4.1 \pm 0.3$  cPs en las dietas de HSB y ROM, respectivamente).

En concreto, en el caso de la torta de soja, la mayoría de los efectos anti-nutritivos de sus polisacáridos se han relacionado con la presencia de  $\alpha$ -mananos en la cascarilla y cotiledones, cuya elevada solubilidad podría interferir los procesos de digestión y absorción (Chesson, 1987). Su mecanismo de acción sería similar a la goma arábica (Whisther y Saarnio, 1957), sustancia de la que se conocen los efectos negativos desde hace más de 40 años. En concreto, Borchert y Ackerson (1950) y Anderson y Warnick (1964) demostraron los efectos negativos de la goma arábica (mayoritariamente  $\alpha$ -mananos) añadida en la dieta sobre los resultados productivos de las aves (GMD y IC). Los resultados sugieren una interferencia de estos polisacáridos con los procesos de digestión y absorción de los nutrientes posiblemente asociada a su naturaleza viscosa. Altos niveles de  $\alpha$ -mananos provocan una reducción en la retención de nitrógeno y la absorción de grasa y energía metabolizable (Kratzer y col., 1967). En la misma línea, se ha citado que los  $\alpha$ -mananos reducen la absorción intestinal de glucosa y de amino ácidos (Elsenbans y col., 1980), así como la captación de los minerales (estudios *in vitro*; citados por Nelson y col., 1996).

## 2.2. RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS

Como consecuencia de estas alteraciones digestivas, los rendimientos productivos de los animales pueden verse afectados. La utilización de cereales blancos en las dietas de aves (sustituyendo el maíz por cebada, centeno, avena o trigo) esta generalmente relacionada con descensos en los parámetros productivos (Fengler y Marquardt, 1988; Petterson y Aman,

1988; Bedford y Classen, 1992; Jeroch y Dänicke, 1993; Jeroch y col., 1995; Crouch y col., 1997). Choct y Annison, (1992b) señalaron una relación inversa entre los parámetros productivos de los broilers y los contenidos de la dieta en pentosanos; resultados que han sido corroborados posteriormente (Choct y col., 1996).

**Tabla I.12.** Efectos de la administración de pentosanos (extraídos del trigo) en una dieta comercial de broilers sobre los resultados productivos

<i>Dieta</i>	<i>Pentosanos totales (g/kgMS)</i>	<i>Ganancia de peso (g/semana)</i>	<i>Indice de Conversión</i>
<i>Control (dieta base de sorgo)</i>	25.9	430	1.58
<i>Control + 20g (wep)/kg MS</i>	43.8	312*	2.08*
<i>Control + 5g (aep)/kg MS</i>	30.8	348*	1.94*
<i>Control + 10g (aep)/kg MS</i>	34.9	352*	1.95*
<i>Control + 25g (aep)/kg MS</i>	48.0	268**	2.49**
<i>Control + 40g (aep)/kg MS</i>	65.7	216**	2.70**

*wep* : pentosanos extraídos con agua; *aep* : pentosanos extraídos con alcohol;

\*Diferencias estadísticamente significativas.

Fuente: Choct y col. (1996)

Junto a la depresión de los parámetros productivos anteriormente señalados, Ikegami y col. (1983) y Brenes y col. (1993a) sugieren que la ingestión de altos niveles de PNAs puede provocar un incremento de la proporción de peso del tracto digestivo respecto a la canal.

### 3. UTILIZACIÓN DE ENZIMAS EN LA ALIMENTACIÓN DE LAS AVES

#### 3.1. HISTORIA

Los enzimas han sido experimentalmente utilizados en la alimentación de las aves desde hace más de 40 años (estudios de Jensen y col., 1957 y Berg, 1959). Sin embargo, su éxito inicial fue escaso debido a la naturaleza de los complejos enzimáticos utilizados. Al principio, los enzimas se aislaron a partir de órganos animales, hecho que facilitaba su desnaturalización. Recientemente, la biotecnología ha permitido sintetizar enzimas a partir de microorganismos (bacterias y hongos; Vambelle y col., 1990) y asistir a una utilización comercial espectacular de las mismas. En concreto, en el año 2000, el mercado internacional de enzimas en la alimentación animal ha llegado a mover una cifra de 100 millones de dólares. Sin embargo, aunque parezca lo contrario; solamente 10% de los piensos de animales monogástricos eran suplementados con cocktails enzimáticos entre los años 1999/2000, (Sheppy, 2001). En concreto, 65% de los piensos base de cereales viscosos, destinados a aves contienen enzimas carbohidrasas.

En la actualidad, se reconocen ampliamente los efectos benéficos sobre los animales monogástricos al suplementar con enzimas las raciones con contenidos apreciables de PNA. En la última década se han celebrado 4 symposiums (Suiza 1993; Holanda 1995; China 1996 y Holanda 1999) centrados todos ellos en este tema, y la Comisión Europea ha aceptado los enzimas como nuevos aditivos desde el año 93 bajo la Directiva 93/113/CE. Los trabajos de investigación presentados permiten aceptar las bases científicas que justifican la adición de enzimas ( -glucanasas y xilanasas) para mejorar el uso de cereales blancos. A partir de este primer paso la industria de alimentación animal ha puesto en marcha estudios de otros productos enzimáticos (proteasas, -galactosidasas, -mananasas, celúlasas y fitasas) para mejorar el uso de diferentes fuentes proteicas y eliminar factores antinutritivos como los oligosacáridos de las leguminosas. Recientes estimaciones sugieren que este mercado mueve una cifra de 20 millones de dólares y que un 5% de las dietas base de maíz-soja para broilers contiene enzimas (Sheppy, 2001).

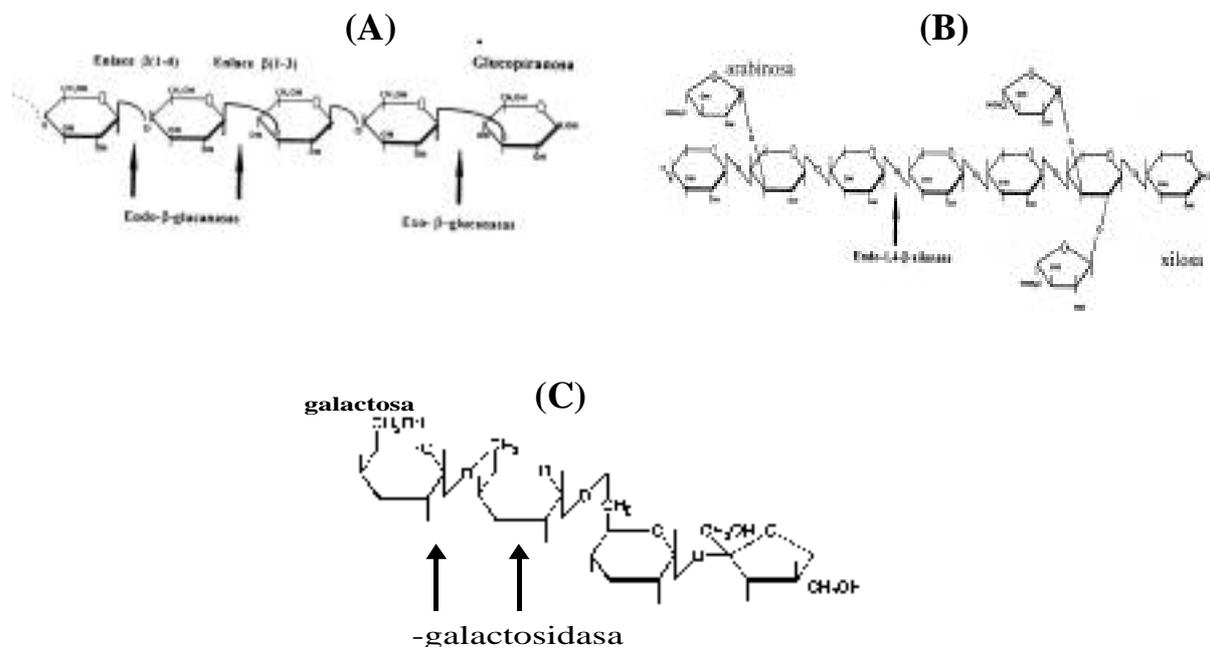
### 3.2. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ENZIMAS

Hasta el momento, la mayoría de los enzimas utilizados son de tipo carbohidrasas y en particular PNA-hidrasas. Considerando su importancia cuantitativa y sus efectos antinutritivos, la suplementación enzimática adecuada esta destinada a romper la estructura molecular de los PNA, eliminando sus efectos antinutritivos y liberando azúcares de mayor absorción.

#### 3.2.1. Hidrólisis de los PNA

Brevemente, la actividad de los enzimas puede resumirse en una desramificación de las cadenas laterales (caso de los ramificados) y la ruptura de las cadenas lineales de PNA. Los mecanismos de hidrólisis de polisacaridos son complejos, pero puede ser simplificada de forma gráfica (Figura I.15). En ella se observan los mecanismos de actuación de los enzimas  $\beta$ -glucanasa, xilanasa y  $\beta$ -galactosidasa sobre los polisacáridos de  $\beta$ -glucanos, xilanos y  $\beta$ -galactosidos, respectivamente.

**Figura I.15.** Mecanismos de la actividad enzimática sobre los  $\beta$ -glucanos (A), xilanos(B) y  $\beta$ -galactosidos (C)



Partiendo de esta hidrólisis, es de esperar que la hidrólisis de los PNA puede incrementar la EMA de la dieta proporcionalmente a la cantidad de azúcares liberados (Marsman y col., 1997a). Sin embargo, la situación es aún más compleja. Por ejemplo, los  $\alpha$ -glucanos y arabinosilanos presentes en cereales se encuentran en proporciones inferiores al 10% (Tabla I.2), y considerando un nivel de incorporación de los cereales inferior al 70%, los niveles de  $\alpha$ -glucanos y arabinosilanos difícilmente superan el 7% de la dieta. En cambio, la inclusión de enzimas puede permitir mejoras superiores al 7% citado (Tabla I.20).

Una de las explicaciones propuestas por Williams y col. (1997) sugiere que el mecanismo de acción de los enzimas no es tanto llegar a una hidrólisis completa de los polisacáridos y a la consiguiente absorción de los azúcares liberados, como provocar cortes en las cadenas de PNA. Este fraccionamiento permitiría reducir sustancialmente las consecuencias negativas del entramado fibroso, como son la viscosidad y la retención de agua. En el mismo sentido, se han señalado incluso que la degradación completa de los polisacáridos en sus correspondientes monosacáridos no es siempre conveniente. Por ejemplo, la degradación de los pentosanos (arabinosilanos de los cereales ó arabinoglucuronosilanos de leguminosas), libera unidades de arabinosa, xilosa y ácidos urónicos, cuya absorción es reducida e incluso una vez absorbidos puede ser mayoritariamente excretados en la orina (Longstaff y col., 1988; Yule y Fuller, 1992; Schutte, 1991).

La baja digestibilidad aparente de estos monómeros en las aves esta relacionada con dos mecanismos; unos bajos ritmos de absorción a través de la barrera intestinal (Tabla I.13) y una baja eficiencia de utilización metabólica.

*Tabla I.13. Absorción selectiva de los azúcares libres en algunas especies animales*

	<i>Velocidad de absorción (referencia glucosa 100)</i>					
	<i>Glucosa</i>	<i>Galactosa</i>	<i>Fructosa</i>	<i>Manosa</i>	<i>Xilosa</i>	<i>Arabinosa</i>
<i>Ratones</i>	100	109	42	21	20	12
<i>Hámster</i>	100	88	16	12	28	10
<i>Humanos</i>	100	122	67	-	-	-
<i>Palomas</i>	100	115	55	33	37	16

*Fuente: Pond y col. (1995)*

Por ejemplo, la manosa, azúcar que difiere de la glucosa solamente por la configuración del grupo hidróxilo en el carbono 2, se absorbe solamente al 20% comparada con la glucosa. En cuanto a la arabinosa y la xilosa su absorción es la más baja de todos los monosacáridos comparados (Schutte, 1991). Por otra parte, la suplementación en la dieta de xilosa y arabinosa libres ha sido asociada con una excreción urinaria de aproximadamente el 50% de la xilosa y del 10 al 15% de la arabinosa ingerida lo que sugiere una ineficiencia metabólica de utilización. En cuanto a los ácidos urónicos (ácido glucurónico y galacturónico), según Longstaff y col. (1988) carecen de valor nutritivo en la alimentación de aves, si bien la información bibliográfica al respecto es escasa.

En el caso de la torta de soja, la liberación completa de la xilosa, arabinosa, ramnosa y ácidos urónicos contenidos sumaría un 35 - 45% de la fracción no amilácea, lo que representa una cantidad elevada de esos azúcares en intestino delgado (70 a 90g/ kg de soja ingerida). La presencia de estos monosacáridos puede provocar fermentaciones predisponentes a severos efectos negativos como las diarreas observadas por Longstaff y col. (1988). En efecto, estos autores describen descensos significativos en la digestibilidad ileal de la energía como causa de la suplementación de la dieta con xilosa, arabinosa, y ácidos galacturónico y glucurónicos libres (resultados, Tabla 1.14).

*Tabla 1.14. Digestibilidad ileal de monosacáridos y energía metabolizable aparente (EMA) y verdadera (EMV) de dietas suplementadas con 200 g/kg de glucosa, galactosa, xilosa, arabinosa, y ácidos galacturónico y glucurónico*

	<i>Digestibilidad ileal (%)</i>	<i>EMA (Kj/g)</i>	<i>EMV(Kj/g)</i>
<i>Glucosa</i>	100 ± 0.0	14.0 ± 0.52	15.0 ± 0.16
<i>Galactosa</i>	99 ± 0.2	-	-
<i>Xilosa</i>	93 ± 4.1	12.0 ± 0.61	13.4 ± 0.16
<i>Arabinosa</i>	63 ± 10.3	11.7 ± 1.21	13.1 ± 0.37
<i>Acidos galacturónicos</i>	59 ± 5.9	11.7 ± 0.34	12.3 ± 0.26
<i>Acidos glucurónicos</i>	64 ± 8.9	11.6 ± 0.45	12.7 ± 0.23

*Fuente: Longstaff y col. (1988)*

### 3.2.2. Reducción de la viscosidad de la digesta

La suplementación de dietas en base a cereales blancos con  $\alpha$ -glucanasas y/o arabinosilanasas provoca descensos de la viscosidad de la digesta (Annison y Choct, 1991; Bedford, 1993; Chesson, 1993; Barrier-Guillot y col., 1995; Smits y Annison, 1996; Yasar y Forbes, 1998; McCracken y col., 1998; García, 2000) asociada con mejoras en la digestibilidad del almidón, proteína, materia grasa y energía de la dieta (Hasselman y Aman, 1986; Rotter y col., 1989; Carré y col., 1992; Bedford y Classen, 1992; Viveros y col., 1994a; Boros y col., 1995; Philip y col., 1995; Piquer, 1996; Bedford, 1996).

Según Bedford (1996), los enzimas actúan fundamentalmente mediante la reducción de la capacidad gel-formadora de los PNAs. Esta actuación mejora la difusión de los nutrientes a través de la mucosa intestinal, y limita la proliferación microbiana en tramos posteriores del tracto digestivo, reduciendo la deconjugación de las sales biliares (Coates y Rolles, 1981).

Como consecuencia, la reducción en la viscosidad de la digesta permite mejorar la mezcla del sustrato con el jugo digestivo y aumentar la digestión y absorción de los nutrientes (Ishiki y Nakahiro, 1983; Hesselman y Aman, 1986; Marquardt y col., 1987; Petterson y Aman, 1989; Almirall y Estevé-García, 1995; Choct y col., 1996). Estas mejoras se acompañan sistemáticamente con un incremento en la EMAn de la dieta (Choct y Annison, 1990 y Van Der Klis y col., 1995).

Desde un punto de vista histológico, Viveros y col. (1994b) sugieren que la reducción de la viscosidad por la suplementación enzimática provoca también modificaciones estructurales del tracto digestivo. Una reducción de la longitud y peso intestinal y del espesor de la mucosa podría reducir notablemente su gasto energético y de aminoácidos, mejorando la utilización de los nutrientes. Johnson y col. (1984) y Johnson y Gee (1986) confirman que la ingestión de PNAs incrementa la tasa de proliferación de los villi y microvilli y provoca una reducción de la actividad enzimática de la superficie epitelial.

### 3.2.3. Complemento de la actividad enzimática endógena

A lo largo de los últimos 40 años, la edad de sacrificio de los pollos broilers se ha reducido aproximadamente en un día por año transcurrido. Como consecuencia cada vez cobra una mayor importancia relativa la fase de arranque durante la cual los procesos digestivos de los

pollitos no están del todo maduros (Nitsan y col., 1991; Williams y col., 1997) y la actividad enzimática endógena (amilasa, lípasa, tripsina y quimotripsina) es reducida (Zelanka, 1968; Krogdahl y Sell, 1989; Sell y col., 1991). A pesar del incremento rápido de la actividad pancreática después de la eclosión (Zehava y Sklan, 1998), los pollitos son incapaces de digerir toda la carga de alimento ingerido (Nitsan, 1995) y sobre todo cuando se trata de dietas con altos niveles de PNA. De hecho, la digestibilidad de la dieta se incrementa rápidamente entre la 1ª y 3ª semana de vida, y no se establece hasta la 6ª (Sell, 1996). En concreto, con una semana de vida la EMAn de los cereales (cebada y trigo) puede ser 20% inferior que a la 3ª semana de edad, efecto que puede ser más marcado con las leguminosas (Mahagna y Nir, 1996). En consecuencia, en las condiciones actuales de producción de pollos broilers, podemos indicar que los animales presentan durante la mayor parte de su periodo productivo un potencial digestivo insuficiente. Según Almirall y col. (1995), la suplementación de  $\alpha$ -glucanasa a dietas base de cebada-trigo reduce el peso relativo de la páncreas e incrementa las actividades endógenas de amilasa, lípasa y tripsina (Tabla I.15), lo que pone en evidencia circunstancias ambientales que limitan la actividad enzimática endógena.

**Tabla I.15.** Efectos de la suplementación de  $\alpha$ -glucanasa sobre el peso relativo de páncreas, la viscosidad intestinal y la actividad enzimática digestiva en broilers y gallos alimentados con cebada frente al maíz

<i>Dieta</i>	<i>Páncreas g/100g PV</i>	<i>Viscosidad mPa.s</i>	<i>Amilasa 10<sup>-1</sup> U/g</i>	<i>Tripsina 10<sup>-1</sup> U/g</i>	<i>Lipasa 10<sup>-1</sup> U/g</i>
<i>Broilers 21 días</i>					
Maíz	0.411	1	22.7	8.5	39.5
Cebada	0.515*	29*	15.7*	9.8*	24.9**
Cebada + Enzimas	0.45	3**	24.4	12.5*	31.6*
<i>Gallos</i>					
Maíz	0.131	1	24.6	11.5	14.0
Cebada	0.151	19**	27.9	15.6	7.8*
Cebada+ Enzimas	0.150	4*	27.8	12.7	10.9

\* diferencias estadísticamente significativas; Fuente: Almirall y col. (1995).

### 3.2.4. Modificaciones en el tránsito digestivo

En los broilers, el tiempo de tránsito de la digesta a través del intestino delgado es reducido, inferior a 2h (Ishiki y col., 1989; Noy y Sklan, 1995). Según los mismos autores el 80% de energía de la dieta se absorbe en los primeros tramos del intestino delgado, lo que justifica que para que un enzima sea efectivo debe actuar en la primera mitad del tracto digestivo en tiempos no superiores a una hora (Bedford, 1996). Según Shires y col. (1987) el tiempo de tránsito a través del tracto digestivo es uno de los condicionantes fundamentales en la digestión y absorción de los nutrientes por las aves; siendo éste un parámetro muy variable en función de la composición de la dieta y la edad del animal.

En relación a la suplementación enzimática la mayor parte de trabajos destacan una aceleración del ritmo de tránsito intestinal en los animales jóvenes (Ferrando y col., 1987; Jeroch y Dänicke, 1993; Zhengkan, 1996; Dänicke y col., 1997; Lazaro, 1999). Sin embargo, los resultados de Salih y col. (1991), muestran que tal efecto no es constante en animales adultos y solamente los broilers jóvenes presentan un tránsito digestivo más acelerado como consecuencia de la suplementación enzimática. Estas observaciones han sido corroboradas por los resultados de Almirall y Estevé-García (1994), en los que una reducción de la viscosidad de la digesta acelera el tránsito intestinal en pollos broilers y lo ralentiza en gallos. Cabe destacar que la aceleración del tránsito de la digesta en broilers al suplementar la dieta con enzimas fue compatible con las mejoras digestivas, lo que puede de alguna manera contradecir que la menor digestibilidad de los animales jóvenes se debe exclusivamente a su mayor ritmo de tránsito.

**Tabla 1.16.** Tiempo de tránsito digestivo en aves de diferentes edades alimentados con dietas base de cebada con o sin enzimas  $\beta$ -glucanasa.

Animales	Tratamiento	T1 (h) <sup>a</sup>	T50 (h) <sup>b</sup>	MRT (h) <sup>c</sup>
Broilers	Cebada	1.6 ± 0.27	8.9 ± 0.98	14.1 ± 2.2
	Cebada + $\beta$ -glucanasa	0.5 ± 0.27*	5.5 ± 1.21*	11.5 ± 1.6
	P<	0.02	0.07	0.36
Gallos	Cebada	0.2 ± 0.06	3.4 ± 0.40	7.9 ± 1.62
	Cebada + $\beta$ -glucanasa	0.7 ± 0.18*	4.8 ± 0.48*	8.3 ± 1.07
	P<	0.04	0.04	0.82

<sup>a</sup> y <sup>b</sup> tiempos necesarios para la excreción de 1 y 50% de cromo, respectivamente; <sup>c</sup> tiempo medio de retención; \*diferencia significativa; Fuente: Almirall y Estevé-García (1994)

### 3.3. RESPUESTAS DIGESTIVAS Y PRODUCTIVAS

#### 3.3.1. Digestibilidad de los nutrientes

En la Tabla I.17, se presenta una revisión breve de las variaciones observadas en la digestibilidad de la proteína, grasa y almidón en pollos en crecimiento asociado a la suplementación enzimática de dietas base de cereales blancos. Los resultados de Almirall y col. (1995) con raciones base de cebada (60%, de diferentes variedades de alta y baja viscosidad) muestran que la suplementación enzimática mejora la digestibilidad del almidón, proteína y lípidos. Marquardt (1996), Schutte y col. (1995) y Dänicke y col. (1995) indican que la suplementación con xilanasa de dietas base de trigo y centeno mejora la digestión de todos los nutrientes y en concreto de las grasas saturadas de origen animal. Los mismos resultados han sido citados por Choct y col. (1996) al suplementar con xilanasa dietas base de sorgo (61%) con o sin la suplementación de PNAs extraídos del trigo. Según este estudio, la adición de PNAs extraídos del trigo reduce la digestión de todos los nutrientes sin excepción, efecto que se neutraliza con una suplementación enzimática.

Simultáneamente se observaron mejoras en la retención de nitrógeno asociadas a la suplementación con enzimas dietas base de centeno (Broz y Canterranne, 1990 ; Petterson y col., 1993); con dietas base de trigo (Carré y col., 1992 ; Schutte y col., 1995); y con dietas base de cebada (Rotter y col., 1990; Almirall y Estevé-García, 1995). En cuanto a la digestión de la fracción de almidón, Carré y col. (1992) describen un incremento con la suplementación enzimática de dietas base de trigo. Resultados similares han sido citados por Annison (1992) y por Petterson y col. (1993) con dietas base de trigo y centeno, respectivamente.

La constatación de estas mejoras asociadas a la utilización de enzimas ha impulsado la adopción de diferentes estrategias en la formulación de raciones (Annison, 1995; Brenes y col., 1996; Marquardt y Brufau, 1996). Brenes y col. (1996) resumen las siguientes estrategias; i/ dar un valor energético al enzima, e introducirlo como nuevo ingrediente en la matriz de ingredientes y ii/ reducir la especificación energética de la dieta en función del enzima y del ingrediente susceptible de ser mejorado.

**Tabla I.17.** Efectos de la suplementación enzimática sobre la digestibilidad de proteína, grasa y almidón de los cereales en broilers

Autores	Dietas	Digestibilidad		
		proteínas	grasa	almid.
Friesen y col. (1992)	Trigo	85.1	76.1	nd
	Trigo + enzimas	88.0*	79.3*	nd
	Cebada de alta viscosidad	83.0	75.2	nd
	Cebada de alta viscosidad + enzimas	87.0*	85.0*	nd
	Cebada de baja viscosidad	66.8	43.2	nd
	Cebada de baja viscosidad + enzimas	86.5*	79.9*	nd
	Centeno	67.5	24.9	nd
	Centeno + enzimas	74.6*	48.3*	nd
	Avena	68.4	17.4	nd
Avena + enzimas	84.2*	51.0*	nd	
Petterson y Aman (1993)	Centeno	48.0	22.7	84.7
	Centeno + arabinoxilanas	64.0*	48.7*	96.3*
Almirall y col. (1995)	Cebada	77.1	72.3	nd
	Cebada + $\beta$ -glucanasa	83.7*	86.2*	nd
Almirall y Estevé-García (1995)	Maíz	87.0	83.8	95.7
	Maíz + $\beta$ -glucanasa	86.5	82.4	94.8
	Cebada de baja viscosidad	74.1	76.7	89.7
	Cebada de baja viscosidad + $\beta$ -glucanasa	83.4*	80.8*	95.9*
	Cebada de alta viscosidad	69.4	76.4	94.6
	Cebada de alta viscosidad + $\beta$ -glucanasa	80.9*	78.8	96.5*
Van Der Klis y col. (1995)	Trigo (50 % en la dieta)	75.8	66.9	88.6
	Trigo + endoxilanas	79.8*	74.6*	91.1*
Choct y col. (1996)	Sorgo	79.1	93.7	90.0
	Sorgo + PNAs	52.3*	38.6*	56.3*
	Sorgo + PNAs + enzimas	81.3	87.8	92.4
Francesch y col. (1999)	Maíz	80.9	79.4	nd
	Maíz + Roxazyme ( $\beta$ -glucanasa, xilanasas...)	82.8	80.1	nd
	Trigo	79.3	75.8	nd
	Trigo + Roxazyme ( $\beta$ -glucanasa, xilanasas...)	81.7*	79.4*	nd
	Cebada	79.4	75.3	nd
	Cebada + Roxazyme ( $\beta$ -glucanasa, xilanasas...)	81.0*	78.3*	nd
	Centeno	74.5	59.7	nd
	Centeno + Roxazyme ( $\beta$ -glucanasa, xilanasas...)	77.7*	72.6*	nd
Lázaro, (1999)	Centeno	49.6	59.8	nd
	Centeno + Enzimas	53.6*	75.5*	nd
García, (2000)	Cebada de diferentes variedades	62.6	nd	nd
	Cebada de diferentes variedades + Enzimas	64.3	nd	nd

\*Diferencia significativa debida a la inclusión de enzimas dentro de la misma dieta; nd: no determinado

En lo que se refiere a la suplementación enzimática destinada a mejorar el valor nutritivo de leguminosas los resultados no han sido siempre consistentes, ni a nivel digestivo ni productivo. En algunos estudios, la suplementación enzimática de la torta de soja ha permitido mejoras en la digestibilidad ileal de los  $\alpha$ -galactosidos (Slominski,1994), y de la fracción de PNA (Marsman y col.,1997b) asociados con un incremento en la retención de proteína (Ghazi y col., 1997a,b; Zanella y col., 1999) y en la concentración en EMA (Ghazi y col., 1996, 1997a,b; Zanella y col., 1999). Sin embargo, otros autores (Douglas y Parsons, 2000) no han evidenciado diferencias al suplementar las dietas base de soja con preparados enzimáticos.

**Tabla 1.18.** Efectos de la suplementación enzimática sobre la digestibilidad de los nutrientes de soja en broilers

Dieta	Digestibilidad			Autores
	Proteínas	Grasa	Almidón	
Soja	82.6	Nd	nd	Irish y col. (1995)
Soja + $\alpha$ -galactosidasa	84.4	Nd	nd	
Soja + invertasa	83.2	Nd	nd	
Soja + $\alpha$ -galactosidasa + invertasa	85.0	nd	nd	
Soja	63.6	nd	nd	Ghazi y col. (1997a)
Soja + $\alpha$ -galactosidasa	76.4*	nd	nd	
Soja + proteasa	81.6*	nd	nd	
Soja + $\alpha$ -galactosidasa + proteasa	84.2*	nd	nd	
Soja	84.9	74.0	99.3	Marsman y col. (1997b)
Soja + proteasa (Neutrase)	85.6	79.8**	99.3	
Soja + carbohirasa (Energex)	85.7	77.8*	99.2	
Soja + Neutrase + Energex	84.5	74.7	99.3	

\*Diferencias significativas; nd: no determinado

En cuanto a la hidrólisis de los PNA, Marsman y col. (1997a) estudiaron “*in vitro*” la accesibilidad de la fracción no extractable con agua (WU) de la torta de soja no tostada, tostada y extrusionada a diferentes complejos enzimáticos (Enzimas de actividad proteolítica y carbohidrasas). La comparación entre los diferentes sustratos y combinaciones enzimáticas refleja la posibilidad de hidrolizar ampliamente la fracción no amilácea (hasta 49% de monosacáridos y 33% de ácidos urónicos liberados). Estos resultados fueron confirmados “*in vivo*” con broilers al observar, tras la suplementación de la dieta con diferentes PNA-hidrolasas, mejoras significativas en la digestibilidad ileal aparente de la fracción de PNA

(Tabla I.19). Marsman y col. (1997b) señalan también una interacción entre el tipo de procesado de la soja y la acción enzimática. Los resultados sugieren que la suplementación con carbohidrasas sobre la soja tostada aumenta la digestibilidad ileal aparente de la fracción de PNA (20.6 vs 11.4%), en menor medida que aquella detectada con la extrusión (26.7 vs 14.5%). En cualquier caso, la complejidad de sus carbohidratos justifica una mayor dificultad en su hidrolisis, y posiblemente la necesidad de combinar estrategias.

*Tabla I.19. Efecto del tratamiento físico (tostado vs extrusionado) y la suplementación enzimática de la soja sobre la digestibilidad aparente de la fracción de PNA, y la viscosidad de la digesta determinadas en broilers a 25 días de edad (Fuente: Marsman y col., 1997b).*

<i>Dieta</i> <i>Carbohidrasas</i>	<i>Tostado</i>		<i>Extrusión</i>	
	<i>sin</i>	<i>con</i>	<i>Sin</i>	<i>con</i>
<i>Digestibilidad ileal aparente de los PNA</i>	11.4	20.6	14.5	26.7*
<i>Viscosidad de la digesta ileal, Cps.</i>	3.52	3.44	3.53*	3.41

\* diferencias significativas

### **3.3.2. Resultados productivos**

#### *3.3.2.1. Los enzimas mejoran los resultados productivos en el caso de los cereales blancos*

Las mejoras observadas en digestibilidad al suplementar con enzimas los cereales blancos permite alcanzar mejoras en los resultados productivos de los pollos en crecimiento (Tabla I.20). Generalmente, los mayores efectos de las  $\alpha$ -glucanasas se presentan durante las 3 primeras semanas tras eclosión, siendo menores durante la 2ª fase de engorde. En particular, la respuesta a la suplementación enzimática en dietas de alta viscosidad es mayor a edades tempranas (dietas base de centeno-, Friesen y col., 1991, Dänicke y col., 1999; Avena-, Friesen y col., 1992 y Marquardt y col., 1996; Cebada-, Petterson y col., 1991 y Niu y col., 1996; si bien este efecto no está tan claro en el trigo (Steenfeldt y col., 1998). Se ha señalado que con la edad, el consumo de agua respecto al alimento ingerido incrementa, con lo que se reduce la concentración de PNA en la digesta y la viscosidad de la misma (Petterson y col., 1993). Este descenso en la viscosidad asociado con el desarrollo del tracto digestivo y el

establecimiento de una flora intestinal activa hacen que la respuesta a la suplementación enzimática sea menos evidente conforme avanza la edad del pollo (Tabla I.20).

**Tabla I.20.** Respuesta (porcentaje de incremento) de los pollos broilers (ganancia de peso vivo, GPV; índice de transformación IT) a la suplementación con enzimas para mejorar el uso de cereales.

<b>Enzimas</b>	<b>Aplicación g/ kg pienso</b>	<b>Dieta</b>	<b>Edad (semana)</b>	<b>Porcentaje de GPV</b>	<b>Porcentaje de IC</b>	<b>Referencia</b>
Amilasa Takadiasa / clarasa	1-4	Cebada	0-4	11-18	12-16	Jensen y col. (1957)
Amilasa Clarasa 300	2	Cebada	0-4	13-31	8	Fry y col. (1958)
Amilasa fúngica	1-8	Cebada	2-4	29-39	13-15	
Proteasa bacteriana	0.002-0.016	Cebada	2-3	20-32	9-13	
Amilasa bacteriana cristalina	0.2	Cebada	0-3	1	6	
B. subtilis –zymbest	1	Cebada	0-4	6	0	Daghir y Rottensten (1966)
Amilasa A <i>B. subtilis</i>	0.4	Cebada	0-4	14	4	Moran y McGinnis (1968)
	0.4	Cebada	0-3	14	4	
Amilasas	0.5-5	Cebada	0-4	12	--	Petersen y Sauter (1968)
Amilasa A bacteriana	1.1	Centeno	0-3	7	4	Moran y col. (1969)
L-amilasa	1.1	Maíz	0-3	2	2	
$\alpha$ - $\beta$ -Amilasa	2	Cebada	1-3	3	1	Herstad y McNab (1975)
Proteasa bacteriana	2	Cebada	1-3	1	-1	
Celulasa ( <i>Irpex lacteus</i> )	0.2	Cebada	0-3	30	18	Gohl y col. (1978)
Pectinasa – Irgazyme 100	1	Centeno	0-2	31	12	Patel y col. (1980)
$\beta$ -glucanasa	0.5	Cebada	0-3	17-43	5-13	Hesselman y col. (1981)
Amilasa – <i>B. subtilis</i>	1.5-3	Cebada	0-4	15-25	2-3	Mannion (1981)
Celulasa ( <i>Tri. viride</i> )	2	Cebada	1-3	7	6	Rexen (1981)

Continúa en la página siguiente

<b>Enzimas</b>	<i>Aplicación g/ kg pienso</i>	<i>Dieta</i>	<i>Edad (semana)</i>	<i>Porcentaje de GPV</i>	<i>Porcentaje de IC</i>	<i>Eferencia</i>
Celulasa ( <i>Tri. viride</i> )	0.4	Cebada	0-3	19	8	White y col. (1981)
$\beta$ -glucanasa	0.05-0.5	Cebada	0-3	8-29	3-10	Hesselman y col. (1981)
Pectinasa – Irgazyme 100	0.1	Centeno		18	--	Grammer y col. (1982)
Pectinasa – Irgazyme 100-S	0.1	Centeno		28	--	
Celulasa Onuzuka Celulasa	0.1	Var. Cebadas	1-3	2.5-17	0-11	Hijikuro (1983)
$\beta$ -glucanasa –Islado de Onazuka 3S	--	Cebada	0-3	31	--	White y col. (1983)
Pectinasa, Xilanasa y Celulasa	2-6	Maíz, cebada, sorgo	1-3	7-11	--	Isshiki y Nakahiro (1983)
$\beta$ -glucanasa (origen bacterino-vegetal)	0.25	Cebada	0-6	10	3	Campbell y col. (1984)
$\beta$ -glucanasa enzeco®	0.5	Cebada	0-3	5	9	Newman y col. (1985)
$\beta$ -glucanasa ( <i>Asp. Niger</i> )	0.05-0.5	Cebada	1-4	1.6-6.4	0-3.4	Broz y Frigg (1986a)
$\alpha$ -Amilasa ( <i>Asp. Oryzae</i> )	0.1	Cebada	1-4	4.4	1	
$\beta$ -glucanasa ( <i>Avizyme</i> )	0.5-2	Cebada	1-4	0-17	3.9-9.1	
		Avena		0-24	8-11	
Celulasa ( <i>Irpex lacteus</i> )	0.1-0.5	Maíz	8-25	0-2	0	Broz y Frigg (1986b)
		Trigo		0-2	2	
		Cebada		4-7	2	
		Centeno		9-26	6-8	

*Continúa en la página siguiente*

<b>Enzimas</b>	<b>Aplicación g/ kg pienso</b>	<b>Dieta</b>	<b>Edad (semana)</b>	<b>Porcentaje de GPV</b>	<b>Porcentaje de IC</b>	<b>Referencia</b>
β-glucanasa – Glucanasa GV-P	0.5	Cebada-alta visc.	0-3	25	17	Hesselman y Aman (1986)
		Cebada-baja visc.		28	22	
α-Amilasa, proteasa	0.25-1	Alta energía	0-7	--	5	Collier y Hardy (1986)
		Baja energía		--	7-16	
β-glucanasa – Glucanasa GV-P	0.08-0.72	Avena	0-3	-1--8	1	Petterson y Aman (1987)
β-glucanasa – Glucanasa GV-P	0.7-2.8	Cebada // Avena	0-5	1.4	1.7	Elwinger y Säterby (1987)
β-glucanasa ( <i>B. subtilis</i> )	0.23-2.3	Avena silvestre	0-6	68-70	24-26	Campbell y col. (1987)
Celulasa, β-glucanasa ( <i>Tri. viride</i> )	2	Centeno	0-3	14-20	11-22	Marquardt y col. (1987)
Celulasa, β-glucanasa ( <i>Tri. Viride</i> )	0.2	Triticale	0-6	5.8-10.4	2.6-6.4	Scholtyssek y Knorr (1987)
β-glucanasa	0.5	Tampón	0-3	5.9	6.7	Newman y Newman (1987)
		Cebada desnuda		8.5	10	
		Cebada sin wexy		3.4	8	
		Cebada wexy		11.3	9	
		Cebada		-4	2	
Arabinoxilanasas TSE-8	0.8	Trigo	0-5	3	0	Petterson y Aman (1988)
	0.8	Centeno		34	6	
	0.8	Triticale		3	2	
Arabinoxilanasas TSE-8	0.1-0.9	Trigo / centeno	0-4	10-17	1-8	Petterson y Aman (1989)
Preparados enzimáticos	--	Centeno	0-3	52	17	Groot Wassink y col. (1989)
Glucanasa GP-5000	0.5	Alta proteína	0-3	12-18	4.3-8.2	Petterson y col. (1990)
		Baja proteína		13.5-16.5	5-7	

*Continúa en la página siguiente*

<b>Enzimas</b>	<b>Aplicación g/ kg pienso</b>	<b>Dieta</b>	<b>Edad (semana)</b>	<b>Porcentaje de GPV</b>	<b>Porcentaje de IC</b>	<b>Referencia</b>
Zymbest – <i>B. Subtilis</i>	0.25	Cebada sin cascara	0-8	5.2	-5.5	Salih y col. (1991)
Roxazyme (β-glucanasa; xilanasa)	0.1-0.2	Cebada	0-6	1.7-2.4	2.3-2.8	Brufau y col. (1991)
Pentosanase <i>Tri. Longibrachitum</i>	2	Centeno	1-3	5.1	6.5	
Gridazyn GV-feed	1	Cebada	0-6	0.2-1.4	2-3.6	Francesc y col. (1992)
Multienzyme	0.1	Trigo	0-6	1.7	2.3	Adams y van Beek (1992)
β-glucanasa – <i>Tri. Longibrachiatum</i>	0.129	Cebada	0-3	22.4	11	Friesen y col. (1992)
Celulasa- <i>Tri. Viride</i>	0.4	Cebada	2-3	0-49	2.1-35	
		Avena		28-29	20-26	
		Centeno		4.3-46	7-18	
Roxazyme – <i>Tri. Viride</i> (β-Glucanasa; xilanasa)	0.1-0.2	Cebada	3-5	-3.5-5.5	-1-1	Brufau y col. (1993)
Roxazyme G (xilnasa; β-Glucanasa; celulasa)	0.2	Cebada // trigo	0-6	8.6	8.7	Brenes y col. (1993c)
Xilanasa	0.2	Trigo		12.6	6.2	
Xilanasa	--	Trigo alta visc.	0-6	0	1.1	Valdman y Vahl (1994)
	--	Trigo baja visc.		1.9	3.8	
β-glucanasa-Luctazyme- <i>B.subtilis</i> y <i>H. insolens</i>	0.5	Cebada	0-7	7.4	3.7	Viveros y col. (1994a)
β-glucanasa-Luctazyme- <i>B.subtilis</i> y <i>H. insolens</i>	0.3	Cabada	0-4	17-25	20-26	
Celúlasa (Kyoa) – <i>Tri. reesei</i>	0-20	Maíz	1-3	1.6	0.5	Marquardt y col. (1994)
Awzyme, MEC- GPL	0.02-0.05	Cebada	0-6	3	4	Gippert y col. (1994)
	1	Triticale		12-23	5-14	Flores y col. (1994)
Roxazyme (celulasa, pectinasa, pentosanasa)	0.2	Cebada	1-6	2.8-7.6	0.8-6	Vranjes y Wenk (1995)
Avizyne(β-glucanasa, arabinoxilanasa y pectinasa)	1	Sorgo + PNAs	0-6	44	31	Choct y col. (1996)
Roxazyme G (celulasa, pectinasa, pentosanasa)	--	Cebada	0-3	5.7	7.8	Albustany (1996)

*Continua en la pagina siguiente*

<b>Enzimas</b>	<b>Aplicación g/ kg pienso</b>	<b>Dieta</b>	<b>Edad (semana)</b>	<b>Porcentaje de GPV</b>	<b>Porcentaje de IC</b>	<b>Referencia</b>
Avizyme1100 (proteasa, $\beta$ -glucanasa, xilanasa)	1	Cebada	2-4	20.6	12.5	Svihus y col. (1997)
$\beta$ -glucanasa	--	Cebada	1-4	5.5	1.2	Williams y col. (1997)
Hostazym C (celulasa)	--	Cebada	1-6	-1.2	5.7	Estevé-García y col. (1997)
Hostazym X (pentosanasa)	--	Trigo	1-6	0	2.8	
Endofeed ( $\beta$ -glucanasa, xilanasa)	--	Centeno	0-3	-2.2-8.1	-1.1-19.9	Lazaro (1999)
Endofeed ( $\beta$ -glucanasa, xilanasa)	--		0-6	18.2	14.7	
Endofeed ( $\beta$ -glucanasa, xilanasa)		Cebada	0-3	2.6-15.1	-8.5-0.7	García (2000)
Grindazym <sup>TM</sup> ( $\beta$ -glucanasa, xilanasa)		Trigo	0-3	2.3-7.5	-7-3.9	

### *3.3.2.2. ¿Pueden los enzimas mejorar los resultados productivos en el caso de las leguminosas?*

Contrariamente a lo observado con los cereales, hasta el momento se han realizado pocos estudios relativos a la utilización de enzimas destinados a mejorar el valor nutritivo de las proteaginosas, y en la mayor parte de los casos los resultados han sido poco uniformes. Los trabajos de Ghazi y col. (1997a,b), con torta de soja suplementada proteasa y -galactosidasa muestran mejoras en la ganancia de peso e índices de conversión durante la primera fase de crecimiento. Sin embargo otros estudios no han presentado las mismas diferencias (Irish y col., 1995; Marsman y col., 1997b; Zanella y col., 1999; Douglas y Parsons, 2000).

Según Marsman y col. (1997b) la combinación entre tratamientos físicos de la torta de soja (tostado e extrusión) con diferentes complejos enzimáticos (de actividad proteolítica y carbohidrasa), no permitió mejorar significativamente los resultados productivos por encima del tratamiento físico de extrusión (Tabla I.21).

Similares resultados contradictorios han sido observados con otras leguminosas. Según Brenes y col. (1993a), la suplementación de piensos con un 50% de altramuces polisacáridasas (Energex), proteasa (Bio-Feed Pro) y galactosidasa (Novozyme) mejoró la ganancia de peso e índice de conversión de los animales, siendo la preparación enzimática (Bio-Feed Pro) de actividad proteasa la más efectiva (Tabla I.21). Sin embargo, en otros estudios no se observó diferencia alguna al suplementar dietas base de guisantes (Brenes y col., 1993b; Igbasan y Guenter, 1996; Igbasan y col., 1997) con diferentes preparados enzimáticos destinados a hidrólizar su fracción de PNA.

**Tabla I.21.** Respuestas (Porcentaje de modificación) de los broilers (ganancia de peso vivo, GPV e índice de transformación IT) a la suplementación de dietas con enzimas para mejorar el uso de las leguminosas.

<b>Enzimas</b>	<b>Aplicación g/ kg pienso</b>	<b>Dieta</b>	<b>Edad (semana)</b>	<b>Porcentaje de GPV</b>	<b>Porcentaje de IC</b>	<b>Referencia</b>
1) Energex (pentosanasa; $\beta$ -glucanasa; hemicelulasa)	3	Altramuces	1-3	11.3	10	Brenes y col. (1993a)
2) Bi-feed Pro (proteasa)	3			23.5	11.2	
3) Novozyme (E3)	3			15.0	8.1	
Mezcla 1 + 2 + 3	1			17.9	9.9	
1) Energex (Pentosanasa; $\beta$ -glucanasa; hemicelulasa)	3	Guisantes	1-3	-6.9	1.3	Brenes y col. (1993b)
2) Bi-feed Pro (proteasa)	3			0.8	1.8	
Mezcla 1 + 2	3			-8.7	-1.2	
3) Celulasa Tv	3			-1.8	2.6	
Mezcla 1 + 2 + 3	1			-4.4	1.3	
$\alpha$ -galactosidasa (especies de aspegelus)	0.2	Soja		5.3	0.2	Irish y col. (1995)
Invertasa	1			-6.2	2.8	
$\alpha$ -galactosidasa + invertasa	0.2//1			0.1	2.8	
Fitasa (Notuphos 1000)	--	Soja en dieta baja en fosforo	0-3	9.5	0.7	Sebastian y col. (1996)
$\alpha$ -galactosidasa	0.25	Soja	0-3	19	-3.5	Ghazi y col. (1997a,b)
Proteasa	0.1			33	1.6	
$\alpha$ -galactosidasa + Proteasa	0.25/ /0.1			38	5.6	
<i>Proteasa + Hemicelulasa</i>	--	Soja tostada	0-6	1.9	3.6	Marsman y col. (1995)
	--	Soja extrusinada		2.8	4.8	

Continua en la pagina siguiente

<b>Enzimas</b>	<i>Aplicación g/ kg pienso</i>	<i>Dieta</i>	<i>Edad (semana)</i>	<i>Porcentaje de GPV</i>	<i>Porcentaje de IC</i>	<i>Referencia</i>
<i>Neutrased (proteasa)</i>	--	Soja	0-3	0	1.3	Marsman y col. (1997b)
Energex (Pentosanasa; $\beta$ -glucanasa; hemicelulasa)	--			0.6	1.3	
Neutrased + Energex	--			3.2	3.1	
Pectinasa	--	Guisantes	0-2	1	0	Igbasen y col. (1997)
Pectinasa + $\alpha$ -galactosidasa	--			2.7	0	
Avizyme 1500 (xilanasas, proteasa y amilasa)	0.1	Soja	0-3	-9.6-4.2	-4.9-4.8	Douglas y Parsons (2000)
Energex + Bio-Feed Plus	0.2//0.2	Altramuz	0-3	0-4.6	-0.3-2.8	Hughes y col. (2000)