



Visualización por fluorescencia de la degradación enzimática de las paredes celulares del trigo

Muchos nutrientes en los cereales permanecen encapsulados para los cerdos ya que estos no pueden romper las paredes celulares. Una xilanasasa puede ayudar a los cerdos creando un efecto anti-encapsulamiento. Recientemente, este efecto ha sido muy bien visualizado por fluorescencia.

● Inne Gantois. DSM Nutritional Products Europe Ltd.

Adaptación y traducción: José-Ángel López y Ana García. DSM Nutritional Products Iberia S.A. Publicado en *PIG PROGRESS*, Volumen 30, N° 6, 2014.

LOS ARABINOXILANOS (AX) son el principal constituyente de las paredes celulares de los cereales y no son asimilables por los monogástricos. El trigo contiene aproximadamente 114 g/kg de polisacáridos no amiláceos (NSP) que son predominantemente AX (71%). El 22% de los AX en el trigo son solubles en agua, el 78% restante son insolubles. Los efectos antinutricionales de los AX solubles en la digestión y absorción de los nutrientes en monogástricos son debidos a su capacidad de incrementar la viscosidad del contenido intestinal. Sin embargo, los AX insolubles están presentes en unas concentraciones mucho mayores y, por lo tanto, sus efectos adversos de "bloqueo" de nutrientes no deberían ser subestimados. El almidón de los cereales se encuentra en los gránulos dentro de una matriz de al-

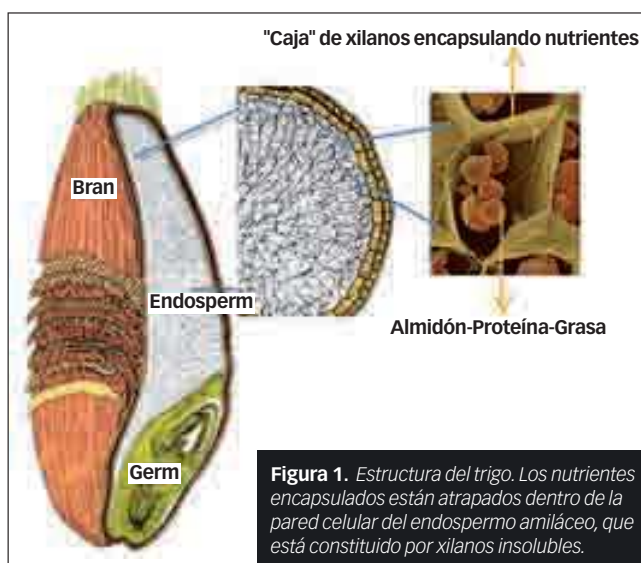


Figura 1. Estructura del trigo. Los nutrientes encapsulados están atrapados dentro de la pared celular del endospermo amiláceo, que está constituido por xilanos insolubles.



macemamiento de proteínas y encapsulados por unas finas capas de células que principalmente están compuestas por AX, tanto solubles como insolubles. Por tanto, ilustrativamente, la fina capa de células puede ser comparada a cajas de AX que encapsulan los nutrientes (Figura 1).

Los cereales contienen una capa de aleurona situada fuera del endospermo amiláceo que también es rica en AX, principalmente insolubles. El proceso de molienda y granulación en la fabricación de piensos no rompe todas las paredes celulares del endospermo o de la aleurona y tiene como resultado una separación física de los nutrientes del proceso digestivo debido a estas paredes celulares.

Por lo tanto, es importante para la digestibilidad óptima de los alimentos que las xilanasas sean capaces de degradar tanto los AX tanto solubles como insolubles.

Autofluorescencia

Un estudio llevado a cabo por la Universidad de Aalborg (Dinamarca), en colaboración con la empresa de biotecnología Novozymes, fue el primero en utilizar la autofluo-



anadorc



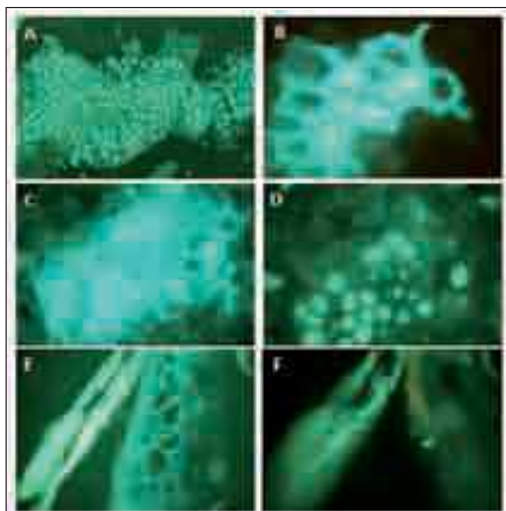


Figura 2 – A: Vista microscópica de trigo molido. B: Cerca de una estructura de pared celular del endospermo que contiene ácido felúrico. C-D: Paredes celulares antes (C) y después de la adición de xilanas (D), proceso que conduce a la ruptura de la arquitectura de las paredes celulares. E-F: Láminas de trigo entero inmediatamente después de la inyección de xilanas (E) y a las 3 horas post-inyección (F).

rescencia para visualizar *in situ* la degradación de las paredes celulares. La presencia de ácido felúrico en la pared celular de los cereales permite el uso de imágenes de autofluorescencia macroscópica.

El ácido felúrico está ligado a los residuos de arabinosa de los AX de los cereales. Este ácido emite fluorescencia azul verdosa con radiaciones UV. La degradación de las paredes celulares por xilanas puede ser monitorizada por una disminución de la fluorescencia debido a la ruptura de las paredes celulares de AX ricos en oligómeros solubles.

Con esta herramienta es posible visualizar los efectos anti-encapsulamiento de una xilanas comercial disponible (Nº Reg. UE 4a1607, DSM) y permite la distinción entre la degradación de las paredes celulares, el endospermo amiláceo y la capa de la aleurona. En la *Figura 2*, muestras de trigo molidas (tamiz 0,5 mm) analizadas por microscopía de fluorescencia muestran que el proceso de molturación del trigo no rompe las paredes celulares del endospermo o de la capa de la aleurona. Estas paredes celulares se rompieron tras la adición de xilanas, dejando visibles dentro de las células solamente cuerpos rígidos de proteína (aleurona) y almidón (endospermo amiláceo).





Mayor liberación de almidón

La herramienta de microscopía de fluorescencia evidencia que las paredes celulares de AX del trigo se rompen debido a la acción de las xilanasas. Con el fin de confirmar una mayor liberación de almidón como resultado de la degradación de las paredes celulares, la cantidad de almidón liberado del trigo molido fue medido usando el método de la glucosa oxidasa/peroxiadasa (GOPOD) (Figura 3).

La incubación de trigo molido a 40° C con niveles crecientes de xilanasa durante cuatro horas mostró un incremento significativo en la liberación de almidón. Estos resultados, junto con la degradación monitorizada de las paredes celulares, proporciona una clara evidencia de que la xilanasas puede superar el conocido "efecto caja" con un impacto beneficioso en la liberación de nutrientes en el pienso.

Impacto en el animal

El estudio anterior demostró que la molturación del trigo no es suficiente para destruir todas las paredes celulares del endospermo. Se plantea la hipótesis de que la digestión en el animal probablemente causa perforaciones en las "cajas" de AX del trigo y, por lo tanto, hace posible para las enzimas digestivas penetrar en estas "cajas" y digerir el almidón o crear la posibilidad de que el almidón fluya fuera de las células "rotas". Sin embargo, en los lechones, el

tiempo de permanencia del alimento en el estómago puede ser limitado. Se ha demostrado que alrededor de un 41% de la materia seca ingerida de una dieta basada en trigo tarda en pasar del estómago al duodeno alrededor de una hora. Este rápido flujo de una gran parte de la materia ingerida puede resultar en una degradación incompleta de

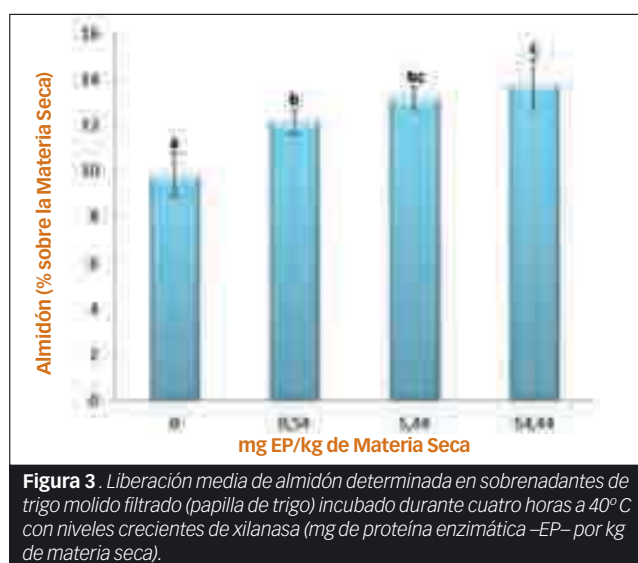


Figura 3. Liberación media de almidón determinada en sobrenadantes de trigo molido filtrado (papilla de trigo) incubado durante cuatro horas a 40° C con niveles crecientes de xilanasas (mg de proteína enzimática –EP– por kg de materia seca).

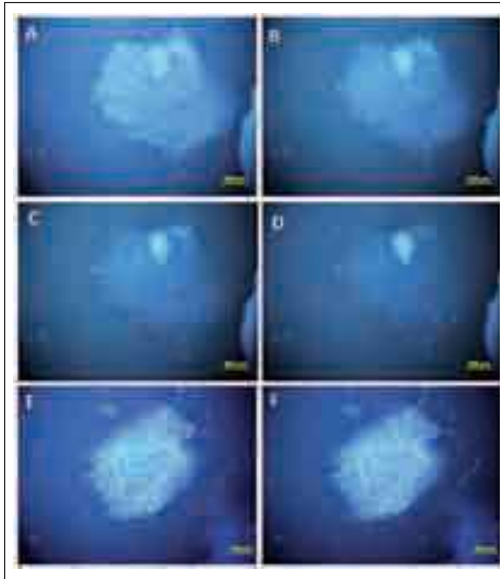


Figura 4. El contenido digestivo del estómago de los lechones alimentados con una dieta basada en trigo sacrificados a las 4 horas tras la ingesta fue incubado con xilanasa a 30° C. Inmediatamente después de la inyección (A), una hora (B), dos horas (C) y tres horas (D) tras la inyección. La inyección con una xilanasa inactivada (durante una hora a 90°C) (E) y tres horas después (F).

las paredes celulares y una disminución en la liberación de almidón. Para estudiar esto, se cuantificó la degradación de las paredes celulares del trigo en el contenido del estómago de los lechones así como la liberación de almidón. Los lechones fueron alimentados con una dieta basada en trigo hasta los 20 kg, después de lo cual se mantuvieron en ayuno durante 12 horas y dejándoles a continuación libre acceso al alimento durante 15 minutos. Una y cuatro horas después de la ingesta se recogió el contenido del estómago para su análisis.

La degradación del contenido estomacal fue estudiada mediante microscopía de fluorescencia después de la adición de xilanasa (Figura 4). La desaparición de las paredes celulares después de la adición de xilanasa confirma que incluso después de cuatro horas de permanencia en el estómago, las "cajas" de AX aún estaban presentes. Estudios anteriores también demostraron que una cantidad

considerable de nutrientes encapsulados en el intestino delgado de broilers alimentados con trigo era similar a lo que encontramos en los lechones. La liberación del almidón en las mismas muestras del contenido digestivo del estómago también fueron cuantificadas con y sin xilanasa (Tabla 1). Tras la incubación con xilanasa, se liberó un 20% más de almidón fue liberado en el contenido digestivo del estómago de los lechones sacrificados una hora después del suministro del alimento. No se detectó una liberación adicional de almidón con xilanasa en el contenido digestivo obtenido cuatro horas después de la alimentación pero el almidón liberado en la primera hora fue de cuatro a cinco veces mayor que en el contenido digestivo a las cuatro horas, mostrando que la liberación de almidón es mayor en los primeros momentos de su presencia en el estómago. Esta mayor liberación de almidón tras la adición de xilanasa después de una hora tras la alimentación, junto con la observación de que parte del contenido digestivo del estómago pasa al duodeno tras una hora, destaca el potencial de las xilanasas como una herramienta para mejorar la liberación de nutrientes.



Liberación de almidón

Este estudio proporciona una clara evidencia de que las xilanasas incrementan la liberación de almidón, apoyando la teoría de que el almidón está encapsulado por las estructuras de AX. Para optimizar la liberación de nutrientes del trigo, se necesita una xilanasa que sea capaz de digerir tanto los AX solubles como los insolubles. Para evitar el incremento de la viscosidad, la xilanasa necesita digerir los AX solubles en pequeños oligómeros, algunos de los cuales pueden fermentar en la parte distal del tracto gastrointestinal con algunos efectos beneficiosos adicionales. La digestión de la xilanasa, tanto de los AX solubles como de los insolubles, maximiza de este modo los beneficios de los piensos. 🐷

MUESTRA DE CONTENIDO DIGESTIVO	ALMIDÓN (% DE MATERIA SECA)
Estómago 1 h, pH 4.84	
● Control	2.79 ± 0.04
● Xilanasa (Nº Reg. UE 4a1607)	3.33 ± 0.02 +20%
Estómago 4 h, pH 1.88	
● Control	0.52 ± 0.01
● Xilanasa (Nº Reg. UE 4a1607)	51 ± 0.03

Tabla 1. Liberación de almidón del contenido digestivo del estómago de los lechones alimentados con un pienso basado en trigo (una y cuatro horas tras la ingesta).