

Efecto del ácido tánico sobre la digestibilidad de alimentos concentrados para rumiantes

Tomás F. Martínez Moya.

Departamento de Biología Aplicada. Área de Biología Animal. CITE II-B. Universidad de Almería. Campus Universitario de La Cañada. 04120 -Almería. e-mail: tomas@ual.es

INTRODUCCIÓN

La proteína ingerida por los rumiantes con los alimentos es rápidamente hidrolizada por los microorganismos ruminales (Broderick *et al.*, 1991) hacia péptidos y aminoácidos. Esta rápida hidrólisis y la posterior desaminación conducen a una pérdida de nitrógeno a través de las paredes del rumen (Leng y Nolan, 1984), buena parte del cual será convertido en urea y eliminado a través de la orina, resultando que el nitrógeno de la ración es ineficientemente utilizado. En relación con el almidón, la rápida hidrólisis de este componente en el rumen tiene un doble efecto negativo para el rumiante: a) la excesiva acidificación del ambiente ruminal, con sus consiguientes efectos negativos (Slyter, 1976; Sauvant, 1999), y b) la utilización poco eficiente en el rumen de la energía contenida en el almidón, comparada con su hidrólisis en el intestino delgado (Owens *et al.*, 1986).

La posibilidad de retardar la degradación ruminal de la proteína y el almidón, incrementando la biodisponibilidad intestinal y la consiguiente eficiencia de utilización de estos nutrientes, es un objetivo perseguido desde hace tiempo. En este sentido, han sido numerosos los procedimientos utilizados, tanto de tipo físico como químico (Broderick *et al.*, 1991). En la actualidad existe un interés creciente en evaluar el potencial de los taninos, componentes naturales de numerosas especies vegetales, considerados tradicionalmente como agentes de potentes efectos antinutritivos para los rumiantes (Kumar y Singh, 1984) debido a su capacidad para unirse a macromoléculas, principalmente a proteínas (Robbins *et al.*, 1987), reduciendo así la digestibilidad de los nutrientes. Recientes estudios apuntan hacia la posibilidad de que los taninos produzcan, bajo determinadas circunstancias, efectos positivos sobre la utilización de la proteína de los alimentos por los rumiantes, principalmente en relación con los forrajes (Waghorn, 1990; Aerts *et al.*, 1999a; Barry y McNabb, 1999), pero también sobre los concentrados (Pace *et al.*, 1993; Hervás *et al.*, 2000). El fundamento químico de la interacción entre los taninos y las proteínas, altamente dependiente del pH (Perez-Maldonado *et al.*, 1995), así como la particular anatomía y fisiología del tubo digestivo de los rumiantes (Swenson, 1993), están haciendo posible un cambio de percepción de los polifenoles en la alimentación de los rumiantes (Lowry *et al.*, 1996; Aerts *et al.*, 1999b; Butter *et al.*, 1999).

El mecanismo por el cual los taninos reducen la digestibilidad de las estructuras internas de las semillas no está suficientemente aclarado. La microscopía electrónica de barrido (MEB) aporta información útil, aunque no de carácter cuantitativo, sobre los fenómenos que tienen lugar en la interacción entre los microorganismos ruminales y las estructuras internas de las semillas que digieren. Los estudios se han centrado en las semillas de cereales (McAllister *et al.*, 1990, 1994), siendo menos conocidas las leguminosas bajo esta perspectiva. La mayoría de los estudios de MEB se han centrado sobre el uso de formaldehído y la micronización (McAllister *et al.*, 1990, 1994; Wang *et al.*, 1996) como procedimientos orientados a la manipulación de la degradabilidad de las semillas en el rumen.

Por otra parte, es conocido que algunos de los procedimientos propuestos para ralentizar la hidrólisis de las barinas vegetales en el rumen, como la aplicación de formaldehído, son responsables de una sobreprotección de las mismas capaz de ocasionar una posterior pérdida de

biodisponibilidad intestinal de los nutrientes (Hvelplund y Hesselholt, 1987). Por este motivo, parece oportuno evaluar este aspecto en relación con el uso de los taninos.

A la vista de lo anterior, los objetivos que se plantearon en el presente trabajo fueron los siguientes: 1) evaluar los efectos del ácido tánico (AT) en la protección de los alimentos concentrados de origen vegetal frente a la hidrólisis por la microbiota ruminal, y 2) evaluar la posibilidad de que esta sustancia provoque una disminución de la utilización de la proteína en el intestino. Para abordar estos objetivos se diseñaron los dos experimentos que se exponen y discuten por separado a continuación.

EXPERIMENTO I: EVALUACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD RUMINAL DE LOS ALIMENTOS CONCENTRADOS

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se usaron cuatro ovejas adultas de raza Segureña, alojadas individualmente y dotadas con una cánula ruminal permanente. Los animales fueron alimentados dos veces al día con una ración basada en heno de veza y avena, y cebada partida, con una razón de materia seca de 4:1 a favor del forraje frente al concentrado. Los animales tuvieron a su disposición un suplemento mineral en bloques y acceso *ad libitum* al agua.

Preparación de las muestras

Se emplearon semillas de leguminosas (haba, judía, soja y guisante) y de cereales (cebada y maíz). Fueron molidas y tamizadas a través de una malla de 1.5 mm de luz. Las harinas así obtenidas fueron tratadas con una solución de ácido tánico al 10%, de la que se utilizó un volumen tal que la relación final de ácido tánico alcanzada fue del 1%, 2.5% y 5% sobre la materia seca (MS), y se añadió una cantidad suficiente de agua destilada para garantizar una distribución homogénea del AT en toda la muestra. La mezcla se agitó vigorosamente durante 30 minutos y a continuación, se secó en una estufa de aireación forzada a una temperatura de 45 °C durante un tiempo de 4 días. Las muestras fueron nuevamente molidas y pasadas por un tamiz de 1.5 mm de diámetro de luz previamente a los ensayos. Simultáneamente se prepararon unos controles de las distintas materias utilizando únicamente agua destilada, procediendo de manera similar a la descrita.

Digestibilidad in sacco

Las harinas de las seis semillas tratadas con las distintas concentraciones de ácido tánico fueron incubadas *in sacco* de acuerdo con el procedimiento descrito por Mehrez y Ørskov (1977). Se introdujeron aproximadamente 3 g de cada materia en bolsitas de poliéster (Ankom Technology Co., Fairport, NY) con unas dimensiones internas de 9x5 cm, y un diámetro de poro de 50±15 µm. Se colocaron simultáneamente 12 bolsas por animal en cada ensayo, correspondientes a un duplicado por cada uno de los seis tiempos evaluados (2, 4, 8, 12, 24 y 48 horas) por materia y nivel de tratamiento. Todas las bolsas fueron introducidas simultáneamente y la retirada de las mismas a cada uno de los tiempos se hizo comenzando por las dos fijadas en la posición superior. Una vez extraídas, las bolsitas fueron aclaradas con abundante agua corriente hasta que el agua fue de lavado quedó limpia, e inmediatamente fueron secadas en una estufa a 65 °C. Una vez seco, el contenido de las bolsas de cada duplicado fue mezclado, y se tomaron muestras para determinar la humedad a 105 °C y el contenido en proteína bruta (PB), determinado como el N Kjeldahl x 6.25. Ambos parámetros se expresaron como % en peso sobre la MS del residuo que

permaneció en las bolsitas. Los análisis de PB se limitaron a las muestras de leguminosas ya que, debido a su alto contenido en proteína, el efecto del AT se pondría más fácilmente del manifiesto

La digestibilidad de la MS y la PB se expresó en porcentaje, y fue determinada para cada tiempo de incubación a partir de la proporción que permaneció en las bolsas de nylon tras la incubación en el rumen. La cinética de la degradación fue ajustada a la ecuación descrita por Ørskov y McDonald (1979) [$D = a + b(1 - e^{-ct})$], siendo "D" la pérdida de peso del contenido de las bolsitas tras "t" horas; "a" la fracción inmediatamente degradable; "b" la fracción potencialmente degradable; y "c" la velocidad de la degradación (h^{-1}) de la fracción "b". La estimación de la fracción rápidamente degradable (a) se llevó a cabo mediante la agitación de las bolsas en buffer de McDougall (1948) a 39 °C durante un tiempo de 15 minutos con ayuda de un agitador magnético. Los parámetros no lineales a, b y c fueron estimados mediante un procedimiento iterativo de mínimos cuadrados utilizando una aplicación informática específica (Table Curve 2D, Jandel Scientific, AISN Software, 1994). Los parámetros de degradabilidad efectiva de la materia seca (DEMS) y de la proteína (DEPB) fueron calculados según la ecuación descrita por Ørskov y McDonald (1979): $\%DE = a + [(b \times c)/(c+k)]$; en la que "k" es la velocidad estimada del flujo de vaciado del rumen ($\% h^{-1}$). La DEMS y DEPB fueron estimadas utilizando flujos de vaciado ruminal de 2, 5 y 8% h^{-1} , que se considera que representan flujos de vaciado lento, intermedio y rápido, respectivamente (ARC, 1984).

Electroforesis del residuo de la incubación

Con objeto de visualizar las posibles diferencias en la degradación de la fracción proteica que tuvieron lugar en las harinas, se llevaron a cabo separaciones electroforéticas en geles de poliacrilamida (PAA) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), utilizando el sistema discontinuo de tampones descrito por Laemmli (1970). Las muestras se tomaron del contenido de las bolsas tras los distintos tiempos de incubación en el rumen, y se homogeneizaron para obtener una concentración de 100 mg/ml en una solución tamponadora formada por Tris-HCl 50 mM, ClNa 50 mM, 2% SDS (p/v), pH 9.0, mediante el uso de un sonicador (MICROSON XL200, Misonix Inc., Farmingdale, NY, USA). Las soluciones fueron centrifugadas (15 min, 20.000 g, 4°C) y los sobrenadantes diluidos (1:1) en tampón de muestra (Tris 0.125 M; glicerol al 20% (v/v); azul de bromofenol 0.04% (v/v); SDS al 2% (p/v); β -mercaptoetanol al 20% v/v) y fueron hervidas durante 5 minutos. Se añadieron 10 μ l de la mezcla a cada pocillo. Los geles separadores (10 x 7.5 x 0.075 cm) se prepararon con PAA al 12%, y los almacenadores con PAA al 4%. La tinción de las proteínas se llevó a cabo con azul de Coomassie (BBC R-250) al 0.1% (p/v) en una solución de metanol:ácido acético:agua (40:10:50). Los geles fueron destefidos con una solución de metanol:ácido acético:agua (35:10:55), antes de ser fotografiados.

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Los granos de las semillas de maíz, soja, cebada y trigo fueron molidos y tamizados para obtener un tamaño de partícula entre 2 y 3 mm, seleccionando sólo aquellos que quedaron entre ambos tamices. Se añadió una cantidad suficiente solución de ácido tánico para aportar una cantidad equivalente al 5% (p/p) de la MS de las distintas semillas, y se procedió a la incubación *in sacco* en el rumen del mismo modo que se ha descrito previamente. El contenido de las bolsas de nylon fue fijado durante 3 horas en glutaraldehído al 5% en tampón cacodilato 0.1M, pH 7.2. Tras este tiempo, las muestras fueron lavadas cinco veces en tampón cacodilato 0.1M, pH 7.2, siendo suspendidas en el mismo tampón y almacenadas a 4°C hasta el momento de la deshidratación. La deshidratación hasta punto crítico, la metalización y la visualización de las muestras se llevaron a cabo según el procedimiento habitual del Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía, seguido por una comparación de medias (Test de Tukey) con objeto de conocer si las diferencias entre los tratamientos eran significativas. Los porcentajes de digestibilidad de la MS, de la PB, y de las DEMS y DEPB fueron normalizados mediante la transformación del arco seno de su raíz cuadrada (Sokal y Rohlf, 1981) previamente al análisis estadístico. Todos los cálculos se llevaron a cabo utilizando una aplicación informática específica (Statgraphics Plus 4.0, Statistical Graphics Corp., Rockville, Maryland).

RESULTADOS

Digestibilidad in sacco

La evolución de los valores de digestibilidad *in sacco* de la MS para los distintos tipos de materias ensayadas se representa en la Fig. 1. Los valores de los parámetros "a", "b" y "c" de la ecuación de Ørskov y McDonald (1979), así como los valores de degradabilidad efectiva de la MS para las distintas materias y los distintos niveles de tratamiento con ácido tánico se muestran en la Tabla 1. El valor de estos parámetros para la degradabilidad de la PB de las semillas de leguminosas se muestra en la Tabla 2. En todos los casos la presencia del ácido tánico supuso una disminución en la digestibilidad de la MS, detectándose un efecto más marcado para los cereales en comparación con las leguminosas (Fig. 1). Las mayores diferencias respecto a los tratamientos se pusieron de manifiesto a las 24 horas de incubación, pero se atenuaron a las 48 h. Los valores de degradabilidad efectiva de la MS confirman la ralentización de desaparición del contenido de las bolsas en la incubación *in sacco* cuando las materias fueron tratadas con AT, ya que en todos los casos esta degradabilidad se redujo entre un 15 y un 50%. Este efecto resultó más claro cuanto mayor se consideró la velocidad del flujo de vaciado ruminal ($k=0.08 \text{ h}^{-1}$, frente a $k=0.02 \text{ h}^{-1}$). En relación con los parámetros cinéticos de desaparición de la PB de las leguminosas (Tabla 2), los resultados fueron similares, observándose un efecto dosis dependiente del ácido tánico. La degradabilidad efectiva de la PB también resultó menor cuando se consideraron velocidades de vaciado ruminal mayores (Tabla 2). La pérdida de digestibilidad ruminal de MS y PB estuvo basada en: 1) una disminución de la fracción inmediatamente degradable (a) para todas las harinas y dosis estudiadas; 2) un incremento de la fracción potencialmente degradable (b); y 3) una disminución de la velocidad de degradación (c) de la fracción "b". Las diferencias fueron significativas ($P<0.05$) a las concentraciones superiores de ácido tánico.

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Los resultados obtenidos en el estudio de MEB para las tres semillas utilizadas se muestran en la Fig. 2 para la cebada, en la Fig. 3 para el maíz y en la Fig. 4 para la soja.

Efecto del AT sobre la digestión de la semilla de cebada: La adición de AT a la semilla de cebada produjo una disminución de la digestión bacteriana de la matriz proteica (compárense las Figs. 2.3 y 2.6), que en ausencia de tratamiento es el lugar de mayor afinidad para las bacterias ruminales. Sin embargo, este efecto protector frente al ataque de las bacterias ruminales no tuvo su reflejo en los gránulos de almidón expuestos en las semillas molidas, que si fueron colonizados y digeridos (Figs. 2.5 y 2.6). Es destacable cómo a igualdad de tiempos de incubación, los gránulos de la cebada previamente tratada con AT fueron más extensamente digeridos que los de la misma cebada sin tratamiento. El aspecto general de las semillas indica que los gránulos permanecieron atrapados en su matriz durante la incubación, a diferencia de la misma materia no tratada, en la que la matriz proteica fue ampliamente digerida y los gránulos de almidón probablemente liberados al medio ruminal.

Efecto del AT sobre la digestión de la semilla de maíz: La digestión del endospermo céreo de la semilla tratada con AT siguió el mismo patrón que se ha descrito para la cebada, es decir, un efecto protector preferente sobre la estructura celular que no fue capaz de impedir, sin embargo, el ataque a los gránulos de almidón (no mostrado). En el endospermo córneo, sin embargo, se detectaron las únicas evidencias del efecto protector del ácido tánico sobre la digestión del almidón encontradas en el presente estudio. El AT creó una barrera protectora extraordinariamente efectiva a la hora de evitar la colonización y la consiguiente digestión de los gránulos de almidón fracturados (compárense las Figs. 3.1, 3.2 y 3.3 con las Figs. 3.4, 3.5 y 3.6). Únicamente la incubación prolongada, por encima de 12 horas comenzó a mostrar los primeros indicios de ataque a estos gránulos tratados con AT (Fig. 3.6). La matriz proteínica del endospermo córneo tratado con AT resultó extraordinariamente resistente al ataque de las bacterias ruminales (Fig. 3.2), contribuyendo a ello sin duda la riqueza en proteínas del tipo prolaminas, cuyos gránulos se observan en la Fig. 3.2.

Efecto del AT sobre la digestión de la semilla de soja: La adición de ácido tánico a la semilla de soja provocó la reducción de la digestión de las estructuras celulares proteínicas de la semilla de soja de manera muy efectiva durante, al menos, las primeras 12 horas de incubación en el rumen (Figs. 4.5 y 4.6). Fruto de ello, las láminas de la superficie de fractura de las semillas expuesta al ataque de los microorganismos ruminales permanecieron prácticamente intactas durante parte de la incubación (Fig. 4.5). Sin duda el efecto más sorprendente fue el observado sobre los gránulos de almidón. Desde fases tempranas (4 horas), los gránulos de almidón en las semillas tratadas aparecen muy colonizados y ampliamente atacados por las bacterias ruminales (Fig. 4.4), a diferencia de lo observado en los gránulos de almidón de la soja no tratada, en los que no hubo evidencias de daños por digestión ruminal incluso cuando se analizaron las muestras después de 12 horas de incubación (Fig. 4.3).

Separación electroforética de las fracciones proteicas

Los resultados de la separación electroforética de las distintas fracciones proteicas de la harina de guisante contenidas en los extractos preparados a partir de los residuos de las bolsas incubadas en el rumen a los distintos tiempos se muestran en la Fig. 5. En los geles se observa la persistencia de una mayor cantidad de proteína soluble en aquellas materias tratadas con ácido tánico en relación con la desaparición de las fracciones de proteína soluble que tuvo lugar en las harinas no tratadas.

DISCUSIÓN

Digestibilidad ruminal

La evaluación de los efectos de los taninos en los rumiantes es complicada, tanto por las adaptaciones de estos animales a la presencia de los taninos en las raciones, como por la particularidad y complejidad de su fisiología digestiva. En los últimos tiempos es creciente la tendencia que comienza a valorar la existencia de posibles efectos beneficiosos de los taninos en alimentación de rumiantes bajo determinadas circunstancias (Butter *et al.*, 1999). En los sistemas extensivos, basados en alimentos forrajeros en los que el componente proteico suele ser el principal factor limitante, la ingestión de contenidos elevados en taninos puede determinar una disminución de la digestibilidad de los carbohidratos estructurales (Barry y Duncan, 1984; Yu *et al.*, 1995), dada la capacidad de los compuestos polifenólicos para unirse al componente fibroso. Dado que el rumen es el único compartimento en el que pueden ser aprovechados los alimentos fibrosos, el resultado global de esta pérdida de digestibilidad ruminal es la disminución de los índices productivos. Este hecho es especialmente claro cuando los forrajes son pobres en proteína. Sin embargo, se ha observado una utilización más eficiente del nitrógeno proteico de la ración cuando ésta incluyó leguminosas con contenidos moderados de polifenoles (por debajo

del 5%), como han demostrado distintos estudios (McNaab *et al.*, 1993; Waghorn *et al.*, 1994, 1998). De este modo, la concepción generalizada de los taninos como sustancias antinutritivas está cambiando, pasando a ser considerados como sustancias con potenciales efectos beneficiosos sobre el aprovechamiento del nitrógeno de las raciones bajo ciertas circunstancias (Lowry *et al.*, 1996).

Los estudios orientados a la evaluación de los taninos en relación con sus efectos sobre la digestibilidad ruminal de los alimentos concentrados proteicos y energéticos de origen vegetal han sido menos numerosos. Es conocido que tanto los concentrados proteicos como los energéticos son rápida y extensamente degradados en el rumen, no llegando al intestino más que una pequeña fracción de la proteína y la energía ingerida con los alimentos concentrados. Sin embargo, la digestión de estos componentes en el intestino es mucho más eficiente desde el punto de vista metabólico que su digestión en el rumen. La utilización del ácido tánico como protector de la harina de soja fue estudiada por Hatfield (1970) y Driedger y Hatfield (1972), quienes demostraron una menor degradación de la harina de soja en el rumen, así como efectos beneficiosos sobre el crecimiento y la retención de nitrógeno. Más recientemente, Pace *et al.* (1993) obtuvieron conclusiones similares. Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman el efecto protector dosis-dependiente del ácido tánico sobre la degradación de las distintas harinas de leguminosas y cereales utilizadas.

No obstante, otros estudios encontraron que el efecto de los taninos hidrolizables sobre la digestibilidad de la harina de soja fue muy escaso (Hervás *et al.*, 2000), haciendo responsable de esta débil protección obtenida, por una parte, a la laxitud de la unión entre este tipo de taninos y las proteínas, y por otra, a la facilidad con la que los taninos hidrolizables son metabolizados en el rumen. Los resultados del presente estudio sólo pueden ser comparados en relación con la harina de soja, al no existir ninguna otra materia prima en común, y en este caso, la reducción que el AT causó sobre la digestibilidad tanto de la materia seca como de la proteína fue mucho mayor que la obtenida en el trabajo de Hervás *et al.* Entre las posibles causas que explicarían esta discrepancia puede estar el distinto origen del ácido tánico utilizado, pues han sido descritas notables diferencias en los componentes del ácido tánico de distintas fuentes comerciales (Verzele y Delahaye, 1983; Hagerman *et al.*, 1992), que se han reflejado en diferencias significativas en su capacidad para unirse a proteínas y/o precipitarlas (Makkar y Becker, 1993). Por otra parte, se ha demostrado la existencia de especies bacterianas ruminales capaces de hidrolizar los complejos entre taninos hidrolizables y proteínas (Broker *et al.*, 1994), otras que pueden degradar a los taninos hidrolizables (Nelson *et al.*, 1995; Skene y Broker, 1995; Odenyo y Osuji, 1998), e incluso a los condensados (Perez-Maldonado y Norton, 1996; Bhat *et al.*, 1998). No obstante, en todos los casos revisados, la actividad tanasa fue muy débil, necesiéndose cultivos puros de las bacterias, con tiempos de incubación muy largos (2-3 días) para detectar los efectos en estas condiciones óptimas de cultivo. Este hecho hace pensar que la repercusión de la actividad tanasa ruminal en condiciones fisiológicas no resulte suficiente para superar una interacción AT-proteína durante el corto periodo de supervivencia de los alimentos concentrados en el rumen. Dada la rápida digestión de las harinas de leguminosas y concentrados, una reducción de su degradabilidad capaz de persistir hasta 12 horas de incubación resulta de gran interés, aunque si se mantienen las bolsas en el rumen durante un tiempo mayor, el efecto protector llegase a desaparecer.

Si se compara el efecto del AT con otras sustancias utilizadas para la reducción de la degradación de harinas de semillas, como el formaldehído, se deduce que éste resultaría menor a igualdad de concentración. Así, Antoniewicz *et al.* (1992) encontraron que incluso la concentración del 1% ya fue suficiente para producir reducciones en la digestibilidad ruminal de la PB cercana al 90% en algunas leguminosas tras 12 horas de incubación ruminal. Otros estudios llegaron a conclusiones similares (Thomas *et al.*, 1979; Varvikko *et al.*, 1983). Pero existe un riesgo derivado de la fuerte protección aportada por el formaldehído: el margen entre la

protección y la sobreprotección (con la consiguiente pérdida de digestibilidad post-ruminal) es muy estrecho (Kowalczyk *et al.*, 1982). El AT, por el contrario, produjo efectos más progresivos sobre la digestibilidad ruminal de las harinas, lo que representa una indudable ventaja con vistas a conseguir el grado de protección deseado. En este sentido, tanto la supervivencia de las fracciones proteicas de las semillas durante la incubación *in sacco*, como la reversibilidad de las uniones entre el AT y las proteínas se muestra en la Fig. 5 para la semilla de guisante.

En relación con los posibles efectos tóxicos de los taninos sobre los animales, se ha descrito que los taninos condensados raramente son tóxicos, y a concentraciones moderadas sólo ejercen efectos antinutritivos (Singleton y Kratzer, 1969). Los taninos hidrolizables pueden ser más perjudiciales tanto para monogástricos (Jansman, 1993) como para rumiantes, pudiendo producir graves efectos cuando se utilizaron concentraciones superiores al 20% sobre el total de MS de la ración (Butter *et al.*, 1999). No obstante, las concentraciones de AT utilizadas en el presente trabajo están muy alejadas de esos valores, dado que únicamente se limitarían a alimentos los concentrados, y estos representan un porcentaje pequeño en el conjunto de la ración.

Se ha descrito que la afinidad de los taninos por los carbohidratos es considerablemente menor que por las proteínas (Butter *et al.*, 1999). Aún así, distintos estudios han observado pérdidas de digestibilidad del almidón por la presencia de taninos (Waldo, 1973; Deshpande y Salunkhe, 1982; Makkar *et al.*, 1987). Sin embargo, Davis y Hosney (1979) no lograron discernir si la unión entre taninos y almidón era más dependiente de aquellos o de éste. En el presente estudio se observó una reducción de la digestibilidad de la MS en las semillas de cereales cuando éstos se trataron con AT (Fig. 1; Tabla 1). La protección de la semilla de cebada resulta de interés con objeto de evitar los efectos indeseables derivados de la rápida degradación de la misma en el rumen. En el caso del maíz, aunque se trata de una semilla mucho más lentamente degradada en el rumen, también puede resultar de interés su protección en el rumen con objeto de favorecer una digestión metabólicamente más eficiente en el intestino (Owens *et al.*, 1986). Sin embargo, los parámetros cinéticos de la ecuación de Ørskov y McDonald (1979) no permiten conocer si el efecto protector del ácido tánico se dirigió específicamente al almidón de las semillas o si su protección fue indirecta como resultado de la protección de otros componentes de la semilla. En este sentido, los estudios de microscopía electrónica de barrido son un interesante complemento a los estudios de digestibilidad.

Microscopía electrónica de barrido

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, la naturaleza de la defensa del AT frente a los microorganismos ruminales radica en la protección que éste ejerce en la matriz proteica, y no por un efecto protector de los gránulos de almidón en sí, unido a la fuerza de las relaciones entre el gránulo de almidón y la matriz proteica (muy estrecha en el endospermo córneo del grano de maíz, pero mucho más laxa en el endospermo céreo). Este mecanismo ha sido descrito previamente para el formaldehído (McAllister *et al.*, 1994), y en este mismo sentido, ya Schaffert *et al.* (1974) describieron que la cantidad de proteína digestible presente en los granos de sorgo podría ser el principal factor limitante para la utilización de las variedades con alto contenido en taninos.

El gránulo de almidón intacto probablemente no posea estructuras externas afines para la unión de los taninos, de manera que por esta razón el ácido tánico no resulta protector frente al ataque de los microorganismos. De hecho, las materias tratadas con AT mostraron que sus gránulos de almidón fueron más digeridos que los de la misma semilla sin tratamiento. En efecto, los gránulos de almidón también son digeridos en las materias tratadas con AT (Figs. 2.5 y 2.6; Figs. 4.4 y 4.6), mientras que la matriz proteica es más resistente (Fig. 4.5 y 4.6). Por esta razón, parece que la interacción del AT tiene lugar con las proteínas de la matriz que circunda a los gránulos de almidón, y el mecanismo más probable de este efecto sea la creación de puentes de hidrógeno. Esta aparente ausencia de interacción entre el gránulo de almidón y el AT está en

contraste con otras evidencias que apuntan en sentido contrario (Despahnde y Salunkhe, 1982). Sin embargo, no se han encontrado referencias que estudien el efecto de los taninos sobre la digestión del gránulo de almidón aislado, no incluido en la semilla de procedencia, motivo por el cual es prácticamente imposible distinguir entre la interacción del AT con el almidón o con las proteínas estructurales de las semillas.

En este sentido, es destacable que los gránulos poligonales de almidón del endospermo córneo del maíz, que han sido previamente fracturados por la molienda, son ávidamente digeridos por los microorganismos, mientras que los mismos gránulos tratados con ácido tánico no lo son. De lo anterior parece deducirse que el AT muestra afinidad por el almidón, pero las interacciones son posibles únicamente si el gránulo de almidón muestra alguna superficie interna expuesta. El resultado final, en cualquier caso, del uso del ácido tánico supone un flujo incrementado tanto de carbono como de nitrógeno hacia el intestino delgado.

A la vista de los resultados, el AT, y probablemente por extensión la mayoría de los taninos, parece una sustancia prometedora en la optimización del aprovechamiento de las proteína y el almidón en las semillas de cebada, maíz y de soja. Su mecanismo protector parece ser directo sobre las proteínas, y de manera indirecta sobre el almidón, que queda encerrado y no accesible a los microorganismos ruminales, y la consecuencia directa es el paso de ambos componentes hacia el intestino, donde pueden ser digeridos de manera mucho más eficiente que en el rumen

EXPERIMENTO 2: EFECTO DEL ÁCIDO TÁNICO SOBRE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA *IN VITRO* DE DISTINTAS FUENTES PROTEICAS

MATERIAL Y MÉTODOS

Enzimas

Las enzimas utilizadas fueron: pepsina (EC 3.4.23.1, tipo A, de mucosa estomacal porcina, actividad: 475 U/mg polvo, Sigma), tripsina (EC 3.4.21.4, tipo IX, de páncreas porcino, actividad 14900 U/mg proteína, Sigma), quimotripsina (EC 3.4.21.1, tipo II, de páncreas bovino, actividad: 50 U/mg de polvo, Sigma), y peptidasa (de mucosa intestinal porcina, actividad: 102 U/g de polvo, Sigma).

Fuentes proteicas

Las fuentes proteicas utilizadas en los ensayos fueron: seroalbúmina bovina (BSA), hemoglobina bovina (HB), gelatina (GE; tipo A, de piel porcina), obtenidas de Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA), y harinas de soja (HS) y de guisante (HG), obtenidas de un proveedor local.

Preparación de las muestras

Los distintos complejos entre las proteínas y el AT fueron preparados como se describe a continuación. En el caso de las semillas de soja y de guisante, éstas fueron molidas y pasadas a través de un tamiz de 1 mm de luz. Las harinas resultantes fueron tratadas con una solución acuosa de AT (10% p/v), hasta alcanzar unas proporciones finales del 1.0, 2.5 y 5.0% (p/p) basándose en la materia seca. Se añadió agua destilada en cantidad suficiente para asegurar una distribución homogénea del AT en las harinas, y se agitó activamente durante 15 minutos. El exceso de agua de la mezcla se eliminó posteriormente mediante el secado de las muestras en una estufa de aireación forzada a 45°C durante el tiempo necesario (alrededor de 48 horas). Cuando la mezcla estuvo seca, se volvió a moler y se pasó a través de un tamiz de 0.4 mm de luz antes de ser utilizada en los ensayos. Las fuentes proteicas solubles en agua (BSA, caseína y HB) se mezclaron directamente con AT, y la interacción con este compuesto se aseguró mediante

agitación continua de la mezcla durante 20 min. En todos los casos, los controles se prepararon como se describe anteriormente, pero utilizando únicamente agua destilada en lugar de AT.

Hidrólisis enzimática in vitro de las fuentes proteicas

Fundamento: El cambio en la hidrólisis enzimática de las proteínas tratadas o no con AT se evaluó *in vitro* empleando la titulación con pH-stat, de acuerdo con Pedersen y Eggum (1983). Este método está basado en que los grupos libres amino y carboxílicos formados tras la hidrólisis de las proteínas estarán más o menos ionizados dependiendo del pH del medio de reacción. De este modo, la hidrólisis de las proteínas está acompañada de la liberación o de retirada del medio de reacción de H^+ , dependiendo del pH. Esto significa que si el pH del medio de reacción se mantiene a un valor constante de 8.0, la relación entre la cantidad de enlaces peptídicos hidrolizados, y la cantidad de base consumida para impedir la variación del pH es proporcional y equimolar.

El parámetro biológico utilizado para evaluar la hidrólisis enzimática fue el grado de hidrólisis (GH), y fue calculado de acuerdo con Alder-Nissen (1986) según la ecuación: $GH (\%) = (h/h_{tot}) \times 100$; siendo h el equivalente de hidrólisis, y h_{tot} el número total de enlaces peptídicos de la proteína. Para la mayoría de las proteínas este valor ha sido calculado a partir de la masa molecular media de las propias proteínas, y asumiendo que la masa molecular media de los aminoácidos que la componen es de 120 Da.

Descripción de los ensayos: Para la determinación del grado de hidrólisis (GH) de las fuentes proteicas, con o sin tratamiento previo con AT (1.0, 2.5 y 5.0% p/p), se prepararon las soluciones de las distintas materias conteniendo 8 mg de proteína/ml (Kjeldahl N x 6.25) y se ajustaron a pH 8.0 con NaOH 0.1N. Una vez estabilizada la mezcla de reacción, se añadió un extracto multienzimático, preparado según Rozan *et al.* (1997), formado por tripsina pancreática porcina, quimotripsina pancreática bovina y peptidasa intestinal porcina, que aportó 10 unidades de actividad proteasa por mg de proteína, medida según Walter (1984). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua mediante un agitador magnético y a temperatura constante de 37°C. Cada determinación fue realizada por triplicado. El grado de hidrólisis después de 45 minutos de reacción, en las condiciones descritas, se consideró como una medida de la digestibilidad proteica *in vitro* (Pedersen y Eggum, 1983).

Ensayos en fase ácida y fase alcalina: Con objeto de valorar el posible efecto de una fase ácida inicial sobre el grado de hidrólisis de las fuentes proteicas, se incluyó un ensayo previo a pH 3.5 y con adición de 12.5 U de pepsina por mg de proteína que simulase el paso por el estómago. La actividad proteasa ácida se midió según Anson (1938). Esta fase previa duró 15 minutos, manteniendo la temperatura a 37°C y la mezcla de reacción en agitación continua. Terminada esta fase, el pH fue estabilizado a 8.0, y se siguió el procedimiento descrito previamente durante otros 45 minutos para obtener el valor del grado de hidrólisis en condiciones alcalinas.

Cuantificación de los aminoácidos totales liberados durante la hidrólisis enzimática

La cantidad de aminoácidos totales presentes en el vaso de reacción fue determinada mediante el procedimiento descrito por Church *et al.* (1983), usando *o*-ftalaldialdehído (OPA). El método se basa en la reacción entre dicho compuesto y el β -mercaptoetanol con las aminas primarias (grupos α -amino), dando lugar a un complejo que absorbe fuertemente a 340 nm. La solución extemporánea de OPA contenía 50 ml de tetraborato sódico 0.1M; 5 ml de SDS al 20%; 80 mg de *o*-ftalaldialdehído disueltos en 1 ml de metanol; y 0.2 ml de β -mercaptoetanol, completándose con agua destilada hasta 100 ml de volumen. Las muestras obtenidas del vaso de reacción (100 μ l, conteniendo 800 μ g de proteína) fueron mezcladas inmediatamente con el mismo volumen de TCA al 20% (p/v), y la solución resultante se centrifugó (15.000 g, 15 min.). Se tomaron 10 μ l del sobrenadante y añadieron directamente a 1.0 ml del reactivo OPA, mezclando brevemente e incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, se midió la absorbancia a 340

nm, y se comparó con un estándar elaborado con L-leucina. Los resultados se expresaron como μg de equivalentes de L-leucina liberados por cada mg de proteína. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Electroforesis de los productos de la hidrólisis

Todas las separaciones electroforéticas se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida (PAA) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), utilizando el sistema discontinuo de tampones descrito por Laemmli (1970), según se ha descrito en el Experimento I.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una comparación de medias (test de Tukey). Los valores de % GH fueron normalizados previamente a su análisis estadístico mediante la transformación del arco seno de su raíz cuadrada, de acuerdo con Sokal y Rohlf, 1981.

RESULTADOS

Grado de hidrólisis

Los valores del grado de hidrólisis (GH) obtenido para las fuentes proteicas utilizadas con los diferentes niveles de inclusión del AT (0, 1.0, 2.5 y 5%), y con el desarrollo de una única fase alcalina o con la inclusión de una fase ácida previa, se muestran en la Tabla 3.

Efecto de una fase ácida previa sobre la hidrólisis alcalina: No se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) sobre el grado de hidrólisis de las fuentes proteicas entre el desarrollo de una única fase alcalina y la inclusión de una fase ácida previa a la fase alcalina. La única excepción la presentó la hemoglobina no tratada. Esta materia mostró un notable incremento en el % GH cuando se sometió a hidrólisis ácida mas alcalina (10.46 ± 0.35) en comparación con el % GH que se obtuvo cuando se desarrolló la hidrólisis en una única fase alcalina (7.10 ± 0.33).

Efecto de la concentración de AT: La inclusión de AT a diferentes niveles (del 1 al 5%) resultó en una reducción del valor de % GH para la BSA, que pasó de 12.1 ± 0.70 cuando no fue tratada con AT a 6.8 ± 0.57 cuando el AT se incluyó al 5%, ambos valores para la fase alcalina. En el ensayo en dos fases, ácida seguida de alcalina, el % GH pasó de 10.9 ± 0.17 de la BSA sin tratar a 7.6 ± 0.15 para la materia tratada al 5% de AT. Ninguna de las demás materias ensayadas mostró disminución en el valor de % GH cuando se incrementaron los niveles de inclusión del AT. Por el contrario, el incremento fue significativo ($P < 0.05$) para la HS, HG y HEM cuando se incluyó el AT. La caseína no mostró diferencias significativas independientemente del nivel de inclusión del AT en los ensayos.

Aminoácidos totales liberados en la hidrólisis in vitro

La cantidad de aminoácidos totales liberados hidrólisis enzimática de las materias tratadas o no con distintos niveles de AT se detalla en la Tabla 4.

Efecto de una fase ácida previa sobre la hidrólisis alcalina: La cantidad total de aminoácidos liberados para todas las materias, e independientemente del nivel ensayado de AT, fue significativamente mayor ($P < 0.05$) cuando se incluyó en el ensayo la fase ácida previa. El tratamiento ácido y la actuación de la pepsina favorecieron la liberación de aminoácidos en todas las fuentes proteicas ensayadas.

Efecto de la concentración de AT: El incremento de la cantidad de AT (del 1 al 5%) produjo una disminución significativa ($P < 0.05$) en la cantidad de aminoácidos liberados de la BSA. Así, se pasó de 122.29 ± 6.52 μg de equivalentes de L-leucina liberados por 100 mg de proteína para la BSA no tratada, a los 39.76 ± 8.87 μg L-leucina/100 mg proteína cuando se incluyó el AT al 5%

en la fase alcalina. Este efecto también fue marcado cuando se estudiaron las dos fases, ácida y alcalina, pasando de 149.80 ± 6.44 para la BSA no tratada, a los 94.38 ± 4.44 μg L-leucina/100 mg proteína para la BSA tratada con un 5% de AT. La caseína tratada al más alto de los niveles (5% AT) mostró un descenso significativo ($P < 0.05$) en la liberación de aminoácidos en la fase alcalina (de 113.25 ± 1.59 a 80.72 ± 6.71), pero la inclusión de la fase previa ácida superó este efecto (de 108.63 ± 1.74 a 110.04 ± 2.97). El resto de materias ensayadas mostró un incremento significativo ($P < 0.05$) en la cantidad de aminoácidos totales liberados al final de tiempo de ensayo, independientemente del nivel de inclusión del AT en el mismo.

Detección electroforética de los productos de la reacción

Solamente la BSA mostró una clara reducción de la proteólisis cuando se añadió AT a la mezcla de reacción (Fig. 6), medida como la persistencia de las fracciones proteicas en los geles SDS-PAGE a lo largo del tiempo de ensayo (carril 1: tiempo cero; carril 8: 2700 segundos). En el extremo contrario se situó la caseína, que fue totalmente hidrolizada (Fig. 7), independientemente del nivel de AT añadido.

DISCUSIÓN

Los taninos son considerados como sustancias antinutritivas que afectan a los procesos digestivos de los animales, aunque sus mecanismos de acción últimos en el tubo digestivo no están completamente aclarados. El principal aspecto a considerar cuando se estudian los efectos antinutritivos de los taninos consiste en su capacidad para formar complejos insolubles con la proteína bajo condiciones adecuadas (Martin *et al.*, 1985). Esta capacidad de unión de los taninos con las proteínas endógenas y/o de los alimentos dentro del intestino es considerada responsable de algunos de sus efectos sobre la digestión y absorción de los nutrientes.

Aunque los estudios químicos y bioquímicos en relación con las interacciones entre los taninos y las proteínas son abundantes en la literatura, la extrapolación de los resultados obtenidos en los mismos a los efectos en organismos vivos debe hacerse con precaución, dado que los niveles de taninos o las relaciones entre los taninos y las proteínas utilizados están muy alejados de aquellos que se podrían establecer en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, se podrían obtener mejores conclusiones de aquellos estudios en los que los niveles de taninos se aproximen más a los que pueden existir en los alimentos. En el presente trabajo se han utilizado niveles relativamente bajos de AT para evaluar los efectos de esta sustancia sobre la solubilidad de las proteínas, y sobre la hidrólisis enzimática de las mismas, que oscilaron entre el 1 y el 5% sobre la MS. La elección de esta cantidad se realizó atendiendo a varias razones: a) es altamente improbable que en condiciones fisiológicas pueda existir un contenido en taninos en forma "libre" o reactiva dentro del tubo digestivo suficiente como para provocar que el conjunto de la ración contenga valores próximos al 5% de la MS total ingerida (Barry y Manley, 1986); b) los efectos beneficiosos descritos sobre los índices productivos de los rumiantes han tenido lugar con contenidos en taninos por debajo del 5% (Waghorn, 1990; Wang *et al.*, 1996); y c) la máxima concentración de AT utilizada en los ensayos de los efectos del AT sobre la digestibilidad ruminal de las fuentes proteicas fue del 5% (ver Experimento I).

Es generalmente aceptado que bajo las condiciones existentes en el tubo digestivo de los mamíferos, los taninos forman complejos insolubles con las proteínas y almidones, lo que determina una reducción en la biodisponibilidad de ambos. Se ha sugerido que factores como el tamaño molecular (proteínas de menos de 20 kDa muestran poca afinidad por los taninos), y el contenido en prolina (a mayor contenido en prolina, mayor afinidad) afectan a la formación de los complejos entre taninos y proteínas. De hecho, algunos herbívoros salvajes (y también animales de laboratorio) han desarrollado la capacidad de segregar proteínas salivares ricas en este aminoácido como mecanismo protector frente a los efectos de los taninos en tramos

posteriores del tubo digestivo (Mehansho *et al.*, 1987a,b). Por el contrario, se conoce poco acerca de la influencia de la estructura de los taninos en su interacción con las proteínas (Hagerman, 1992).

Con objeto de probar si la combinación de las proteínas con AT afectaba a su posterior hidrólisis por las enzimas digestivas, se diseñaron experimentos empleando una digestión *in vitro* con pH-stat, método ampliamente aceptado para evaluar la hidrólisis de proteínas por enzimas digestivas (Alder-Nissen, 1986; Rozan *et al.*, 1997). En cada experimento las enzimas se añadieron a la mezcla de reacción tras ser ésta estabilizada a pH 8.0. Bajo tales condiciones, sólo la BSA mostró tanto un menor grado de hidrólisis como una menor liberación de aminoácidos conforme se aumentaba la concentración de AT en la mezcla de reacción (Tablas 3 y 4). Este resultado podría deberse a la alta afinidad de esta proteína por los taninos (Hagerman y Butler, 1981), unida a su alta solubilidad, lo que sugeriría la existencia de complejos solubles BSA-AT caracterizados por la formación de una cubierta hidrofóbica que obstaculizaría la hidrólisis enzimática (McManus *et al.*, 1983). Mole y Waterman (1985) también obtuvieron una disminución en la proteólisis de la BSA tratada con AT. En contraste con los resultados obtenidos con la BSA, el resto de las proteínas usadas en este estudio se hidrolizaron mejor después de ser incubadas en presencia de AT. En el caso de la HB, el efecto fue menos evidente, puesto que se ha descrito que las proteínas con estructura globular y compacta parecen tener una menor afinidad por los taninos (Hagerman y Butler, 1981).

Se ha sugerido la posibilidad de que los taninos se vuelvan a unir a las proteínas endógenas en las partes inferiores del intestino, debido a que el pH vuelve a caer en el rango óptimo para esa unión (Swenson, 1993), y esto puede ocasionar efectos sobre sustratos y/o enzimas (Mitaru *et al.*, 1984; Yu *et al.*, 1995,1996), e incluso se han descrito daños histológicos en el yeyuno distal e ileon (Dawson, 1999). Este hecho ha sido responsabilizado de la disminución de la digestibilidad en este tramo posterior, conduciendo a pérdidas del nitrógeno de los alimentos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las proteínas capaces de superar la hidrólisis del duodeno y llegar al yeyuno manteniendo masas moleculares por encima de 20 kDa es muy poco probable que sean aprovechadas eficientemente en dicho tramo. Las enzimas completan la hidrólisis proteica en este tramo final del intestino delgado son las amino y carboxipeptidasas, ambos tipos incluidas en el grupo de las exopeptidasas digestivas. Comparativamente, las exopeptidasas tienen una actividad hidrolítica sobre los enlaces peptídicos menos eficiente que las potentes endopeptidasas del duodeno (tripsina, quimotripsina, elastasa), puesto que tienen limitada su actuación a los extremos de las moléculas, dando como resultado una hidrólisis menos eficiente. Como resultado, las exopeptidasas pueden liberar aminoácidos de la molécula a una velocidad muy modesta, por lo que estas proteínas que llegan con su estructura íntegra al tramo final del intestino delgado tienen muy poco valor biológico. Por otra parte, aquellos pequeños polipéptidos de unas decenas de aminoácidos, resultado final de la hidrólisis de las proteasas pancreáticas, y sobre los que actúan las enzimas exopeptidasas liberando aminoácidos absorbibles, en principio no son moléculas que presenten afinidad por los taninos, pues de acuerdo con Hagerman y Butler (1981), las proteínas de masas moleculares inferiores de 20 kDa son escasamente afectadas por los taninos. De este modo, las consecuencias de los taninos libres sobre la digestión derivados de su unión a las proteínas en estos tramos parecen en principio poco importantes. De hecho, pudiera resultar incluso beneficioso que existieran proteínas suficientemente grandes de bajo valor biológico para que los taninos libres se unieran a ellas y de esta forma protegieran a las vellosidades intestinales de una alteración relacionada con los procesos de absorción (Bravo *et al.*, 1994).

La explicación más aceptable que puede darse a la hidrólisis enzimática aumentada de las proteínas ensayadas, excepto la BSA, sea que el AT utilizado a estos bajos niveles, pueda causar ligeros o moderados cambios de conformación que afecten a su estructura terciaria. Esta alteración puede ser suficiente para permitir a las enzimas proteolíticas el acceso a un mayor

número de enlaces peptídicos de las proteínas. Esta explicación es compatible con los resultados de algunos estudios, que han descrito un incremento en la absorción neta de aminoácidos desde el intestino delgado en animales alimentados con dietas que contenían cantidades moderadas de taninos (McNabb *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996).

Los tres métodos diferentes que han sido utilizados para evaluar los efectos del AT sobre la hidrólisis de las proteínas (pH stat, liberación de aminoácidos totales, y estudio de los productos de hidrólisis mediante SDS-PAGE), ofrecieron resultados consistentes entre ellos. Aunque cada método ha sido utilizado en diversos estudios de digestibilidad, y tiene validez por sí mismo, la combinación de los tres aporta una información más completa a la hora de evaluar los procesos proteolíticos que el uso de uno de ellos por separado.

Los estudios *in vitro*, aunque no son verdaderamente representativos del conjunto de los fenómenos biológicos que tienen lugar *in vivo*, son útiles para conocer los efectos de factores aislados del resto de fenómenos que puedan ocurrir en condiciones fisiológicas, y en este caso, han servido para conocer ciertos efectos de los taninos sobre la digestión de las proteínas.

CONCLUSIONES

Experimento 1: El ácido tánico aplicado a los alimentos concentrados energéticos y proteicos ha mostrado su efectividad a la hora de reducir la digestión de los mismos dentro del rumen. Esta sustancia protege preferentemente a las proteínas de las semillas, e indirectamente al almidón, de su hidrólisis por los microorganismos ruminales. De lo anterior se deduce su utilidad tanto para aumentar la disponibilidad intestinal de la proteína y el almidón de los alimentos concentrados, como para prevenir las alteraciones metabólicas derivadas de la rápida digestión del almidón de los cereales.

Experimento 2: El ácido tánico no impidió la hidrólisis enzimática post-ruminal *in vitro* de las fuentes proteicas, salvo excepciones concretas, teniendo lugar en algunos de los casos incluso un incremento de esta hidrólisis en materias primas que previamente interaccionaron con esta sustancia. Es, por tanto, poco probable que en condiciones fisiológicas, y a un bajo nivel de inclusión, este compuesto resulte un impedimento para la hidrólisis post-ruminal de la proteína.

A modo de conclusión final, el uso de los taninos respecto a otros métodos físicos o químicos para regular la digestión de del almidón puede presentar algunas ventajas, como: a) la posibilidad de sobreprotección es menor que con el uso de otras sustancias, como el formaldehído; b) dada la dependencia de las uniones de los taninos y otras macromoléculas del pH, existe la posibilidad de revertir esas uniones entre taninos y proteínas en las condiciones de pH del abomaso (entre 2 y 3) y del duodeno (por encima de 8), quedando ésta disponible para las enzimas proteolíticas intestinales; y c) la posibilidad de realizar selección genética de aquellas variedades que posean un nivel óptimo de taninos para conseguir proteger a los almidones de una digestión rápida, puesto que son sustancias naturales que existen en los vegetales y no han de ser adicionadas externamente. En este sentido, se han aislado genes responsables de la síntesis de taninos en distintas especies vegetales (Morris y Robbins, 1998; Winkel-Shirley, 1998), por lo que parece posible incorporar esta característica a especies forrajeras que no la poseen.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece la concesión del III Premio de Investigación "Francisco Fernández López" al tribunal evaluador y a las instituciones que lo patrocinan (Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, Colegio Oficial de Veterinarios de Almería, Ayuntamiento de Almería, y Pienso "La Foca").

BIBLIOGRAFÍA

- Aerts RJ, McNabb WC, Molan A, Brand A, Barry TN and Peters JS (1999a) *J Sci Food Agric* 79:79-85.
- Aerts, R.J., Barry, T.N. and McNabb, W.C. (1999b) *Agriculture, Ecosystems and Environment* 75:1-12.
- Alder-Nissen, J. (1986) *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*; Elsevier Applied Science: London; 1986.
- Anson, M.L. (1938) *J. Gen. Physiol.* 22:79-89.
- Antoniewicz, A., Van Vuuren, A.M., Van der Koelen, C.J. y Kosmala, I. (1992) *Anim. Feed Sci. Technol.* 39:111-124.
- A R C (1984) *The nutrient requirements of ruminant livestock*. Sup. 1. CAB. Farnham Royal, UK.
- Barroso, F.G., Martínez, T.F., Paz, T. y Parra, A. (2001) *J. Arid Environments* 49:301-314.
- Barry TN and McNabb WC (1999) *Br. J. Nutr.* 81:263-272.
- Barry, T.N. y Duncan, S.J. (1984) *Br. J. Nutr.*, 51: 485-492.
- Barry, T.N. y Manley, T.R. (1986) *J. Sci. Food Agric.*, 37: 248-254.
- Bhat, T.K., Singh, B. y Sharma, O.P. (1998) *Biodegradation* 9:343-357.
- Bravo, L., Abia, R., Eastwood, M.A. y Saura-Calixto, F. (1994) *Br. J. Nutr.* 71:933-946.
- Broderick, G.A., Wallace, R.J. y Ørskov, E.R. (1991) Tsuda, T., Sasaki, Y. And Kawashima, R. (Eds.) *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*. Academic Press. Tokyo. págs. 541-592.
- Broker, J.D., O'Donovan, L.A., Skene, I.K., Clark, K., Blackall, L. y Muslera, P. (1994) *Letts. Appl. Microbiol.* 18:313-318.
- Butter, N.L., Dawson, J.M. and Buttery, P.J. (1999) *Secondary Plant Products. Antinutritional and Beneficial Actions in Animal Feeding*. Caygill, J.C. and Mueller-Harvey, I. (eds.) . Nottingham Univ. Press. Nottingham, UK. pp. 51-70.
- Church, F.C.; Swaisgood, H.E.; Porter, D.H. y Catignani, G.L. (1983) *J. Dairy Sci.* 66:1219-1227.
- Davis, A.B. y Hosney, R.C. (1979). *Cereal Chem.* 56: 310-314.
- Dawson, J. M., Buttery, P.J., Jenkins, D., Wood, C.D. y Gill, M. (1999) *J. Sci. Food Agric* 79:1423-30.
- Deshpande, S.S. y Sahunkhe, D.K. (1982) *J. Food Sci.*, 47: 2080-2082.
- Driedger, A. y Hatfield, E.E. (1972) *J. Anim. Sci.* 34:465-468.
- Hagerman, A.E. y Butler, L.G. (1981) *J. Biol. Chem.* 256: 4494-4497.
- Hagerman, A.E., Robbins, C.T., Weerasuriya, Y., Wilson, T.C., McArthur, C. (1992) *J. Range Manage* 45:57-62.
- Hatfield, E.E. (1970) *Feedstuffs* 19:23-25.
- Hervás, G., Frutos, P., Serrano, E., Mantecón, A.R. y Giráldez, F.J. (2000). *J. Agric. Sci. (Camb.)* 135:305-310.
- Hvelplund, T. y Hesselholt, M. (1987) *Acta Agric. Scand.* 37:469-477.
- Jansman, A.J.M. (1993) *Nutr. Res. Rev.* 6:209-236.
- Kowalczyk, J., Robinson, J.J. y Otwinowska, A. (1982) *Anim. Feed Sci. Technol.*, 7:225-232.
- Kumar, R. y Singh, M. (1984) *J. Agric. Food Chem.* 1984:447-453.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature*, 227:680-685.
- Lee, J., Harris, P.M., Sinclair, B.R. y Treloar, B.P. (1995) *Austr. J. Agric. Res.* 46:1587-1600.
- Leng, R.A. y Nolan, J.V. (1984) *J. Dairy Science*, 67:1072-1089.
- Lowry, J.B., McSweeney, C.S. y Palmer, B. (1996) *Aust. J. Agric. Res.* 47:829-842.
- Makkar, H.P.S. y Becker, K. (1993) *J. Sci. Food Agric.* 62:295-299.
- Makkar, H.P.S., Singh, B. y Dawra, R.K. (1987) *Int. J. Anim. Sci.* 2:127-140.
- Martin, M.M., Rockholm, D.C. y Martin, J.S. (1985) *J. Chem. Ecol* 11:485-494.
- McAllister, T.A., Cheng, K.J., Rode, L.R. and Buchanan-Smith, J.G. (1990) *Can. J. Anim. Sci.* 70:581-589.
- McAllister, T.A., Bae, H.D., Jones, G.A. and Cheng, K.J. (1994) *J. Anim. Sci.* 72:3004-3018.
- McDougall, E. I. (1948) *Biochem. J.* 43:99-109

- McManus, J.P., Lilley, T.H. y Haslam, E. (1983) *Plant Resistance to Insects*. Hedin, P.A. (ed.) American Chem. Soc., Washington DC. USA. págs. 123-137.
- McNabb, W.C., Waghorn, G.C., Barry, T.N. y Shelton, I.D. (1993) *Br. J. Nutr.* 70:647-661.
- Mehansho, H., Ann, D. K., Butler, L. G., Rogler, J. y Carlson, D. M. (1987a) *J. Biol. Chem.* 262: 12344-12350.
- Mehansho, H., Butler, L. G. y Carlson, D. M. (1987b) *Ann. Rev. Nutr.* 7: 423-440.
- Mehrez, A.Z. y Ørskov, E.R. (1977) *J. Agric. Sci. (Cambridge)* 88:645-650.
- Mitanu, B.N., Reichart, R.D. y Blair, R. (1984) *J. Nutr.*, 114: 1787-1796.
- Mole, S. y Waterman, P.G. (1985) *J. Chem. Ecol.*, 11: 1323-1332.
- Morris, P. y Robbins, M.P. (1998) *Biotechnology and Improvement of Forage Legumes*. McKersie, B.D. y Brown, D.C.W. (eds.) CAB International, Oxon, UK. págs. 147-173.
- Nelson, K.A., Schofield, P. y Zinder, S. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3293-3298.
- Odenyo, A.A. y Osuji, P.O. (1998) *Can. J. Microbiol.* 44:905-909.
- Ørskov, E.R. y McDonald, I. (1979) *J. Agric. Sci.*, 92:499-503.
- Owens, F.N., Zinn, R.A. y Kim, Y.K. (1986) *J. Anim. Sci.* 63:1634-1648.
- Pace, V., Settineri, D. and Catillo, G. (1993) *Zoot. Nutr. Anim.* 19:73-79.
- Pedersen, B. y Eggum, B.O. (1983) *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 49: 265-277.
- Perez-Maldonado RA, Norton BW and Kerven GL, (1995) *J. Sci. Food Agric* 69:291-298 (1995).
- Perez-Maldonado, R.A. y Norton, B.W. (1996) *Brit. J. Nutr.* 76:501-513.
- Robbins, C.T., Hanley, T.A., Hagerman, A.E., Hjeljord, O., Baker, D.L., Schwartz, C.C. y Mautz, W.W. (1987) *Ecology*, 68: 98-107
- Rozañ, P., Lamghari, R., Linder, M., Villaume, C., Fanni, J., Parmentier, M. y Méjean, L. (1997) *J. Agric. Food Chem.* 45:1762-1769.
- Sauvant D, Meschy F y Mertens D. (1999) *INRA Prod Anim* 12:49-60.
- Schaffert, R.E., Lechtengberg, V.L., Oswalt, D.L., Axtell, J.D., Pickett, R.C. y Rhykerd, C.L. (1974) *Crop Sci.* 14:640-643.
- Singleton, V. L. y Kratzer, F. H. (1969) *J. Agr. Food Chem* 17(3):497-512.
- Skene, I.K. y Broker, J.D. (1995) *Anaerobe* 1:321-327.
- Slyter L.L. (1976) *J. Anim. Sci.* 43:910-929.
- Sokal R y Rohlf JF (1981) *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research* (2nd ed.). Freeman, San Francisco, 861 pp.
- Swenson, M.J. y Reece, W.O. (1993) *Duke's Physiology of Domestic Animals*. Cornell University Press, New York.
- Thomas, E., Trenkle, A. y Borroughs, W. (1979) *J. Anim. Sci.* 49:1337-1345.
- Varvikko, T., Lindberg, J.E., Setälä, J. y Syrjala-Quist, L. (1983) *J. Agric. Sci. (Camb)* 101:603-612.
- Verzele, M., Delahaye, P. (1983) *J. Chromatogr.* 268:469-476.
- Waghorn, G.C. (1990) *Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminants*. Akin, D.E., Ljungdahl, L.G., Wilson, J.R. y Harris, P.J. (eds.) Elsevier Sci. Inc. pp. 137-147.
- Waghorn, G.C., Douglas, G.B., Niezen, J.H., McNabb, W.C. y Foote, A.G. (1998) *Proc. N. Z. Grassland Assoc.* 60:89-98.
- Waghorn, G.C., Shelton, I.D. y McNabb, W.C. (1994) *J. Agr. Sci.*, 123: 99-108
- Waldo, D. R. (1973) *J. Anim. Sci.* 37:1062-1074.
- Walter, H.E. (1984) *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. V, págs. 270-280. H.J. Bergmeyer (Ed.). Verlag Chemie Weinham, Germany.
- Wang, Y., Douglas, G.B., Waghorn, G.C., Barry, T.N., Foote, A.G. y Purchas, R.W. (1996) *J. Agric. Sci.* 126:87-98.
- Winkel-Shirley, B. (1998) *Seed Sci. Res.* 8:415-422.
- Yu, F., McNabb, W.C., Barry, T.N. y Waghorn, G.C. (1995) *J. Sci. Food Agric.* 69:223-234.
- Yu, F., Moughan, P.J., Barry, T.N. y McNabb, W.C. (1996) *Br. J. Nutr.* 76:359-371.

Tabla 1. Parámetros de la cinética de degradación *in sacco* de la MS según Ørskov y McDonald (1979).

materia	% AT	a	b	c	DEMS*		
					$k=0,02h^{-1}$	$k=0,05h^{-1}$	$k=0,08h^{-1}$
Haba	0	21,00	76,75	0,057	77,89 ^a	61,99 ^a	53,03 ^a
	1	15,72	84,28	0,044	73,58 ^{ab}	55,08 ^{ab}	45,54 ^{ab}
	2,5	11,91	88,09	0,036	68,37 ^b	48,61 ^b	39,09 ^b
	5	7,67	92,33	0,019	52,53 ^c	33,00 ^c	25,31 ^c
Judía	0	17,64	75,47	0,072	76,61 ^a	62,05 ^a	53,26 ^a
	1	16,88	77,86	0,049	72,11 ^{ab}	55,34 ^{ab}	46,38 ^a
	2,5	10,78	89,22	0,033	66,08 ^b	45,99 ^b	36,61 ^b
	5	9,71	90,29	0,021	55,96 ^c	36,41 ^c	28,48 ^c
Soja	0	27,01	72,79	0,040	75,37 ^a	59,18 ^a	51,11 ^a
	1	21,93	78,07	0,023	63,52 ^b	46,38 ^b	39,25 ^b
	2,5	15,56	84,44	0,015	52,16 ^c	35,34 ^c	29,12 ^c
	5	14,14	85,86	0,015	51,49 ^c	34,36 ^c	28,00 ^c
Guisante	0	25,16	75,47	0,059	81,50 ^a	65,98 ^a	57,16 ^a
	1	13,02	88,80	0,049	76,23 ^a	57,15 ^{ab}	46,92 ^b
	2,5	10,88	89,16	0,025	60,41 ^b	40,60 ^b	32,11 ^c
	5	9,60	90,40	0,009	37,22 ^c	23,13 ^c	18,56 ^d
Cebada	0	37,06	59,53	0,082	84,96 ^a	74,11 ^a	67,26 ^a
	1	29,46	69,24	0,050	78,97 ^{ab}	64,15 ^b	56,16 ^{bc}
	2,5	22,35	73,02	0,041	71,23 ^c	55,03 ^c	46,89 ^c
	5	16,02	83,99	0,017	55,10 ^d	37,70 ^d	31,02 ^d
Maíz	0	19,90	54,98	0,067	62,22 ^a	51,36 ^a	44,93 ^a
	1	13,66	60,53	0,050	56,99 ^{ab}	44,00 ^{ab}	37,01 ^{ab}
	2,5	12,64	59,07	0,040	52,05 ^b	38,93 ^b	32,36 ^b
	5	10,665	46,15	0,033	39,33 ^c	28,95 ^c	24,09 ^c

* Degradabilidad efectiva de la MS, según la expresión: $Dg MS = a + [(b \times c)/(c+k)]$, siendo "k" la velocidad del flujo de vaciado del rumen (% h⁻¹).

Los valores que comparten superíndice dentro de cada materia no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Tabla 2. Parámetros de la cinética de degradación *in sacco* de la PB según Ørskov y McDonald (1979).

materia	% AT	a	b	c	DEPB*		
					$k=0,02\ h^{-1}$	$k=0,05\ h^{-1}$	$k=0,08\ h^{-1}$
Haba	0	30,03	69,97	0,084	86,54 ^a	73,89 ^a	65,87 ^a
	1	24,52	75,48	0,046	77,13 ^b	60,69 ^b	52,08 ^b
	2,5	16,99	83,01	0,026	63,91 ^{cd}	45,39 ^c	37,35 ^{cd}
	5	14,02	85,98	0,020	57,01 ^d	38,59 ^d	31,22 ^d
Judía	0	33,15	66,85	0,093	88,17 ^a	76,63 ^a	69,09 ^a
	1	26,89	73,11	0,051	79,41 ^{ab}	63,81 ^b	55,35 ^b
	2,5	21,26	78,74	0,041	74,18 ^b	56,74 ^c	47,94 ^c
	5	13,37	86,63	0,036	69,06 ^c	49,63 ^d	40,26 ^d
Soja	0	26,39	73,61	0,077	84,82 ^a	71,02 ^a	62,49 ^a
	1	19,79	80,21	0,041	73,70 ^b	55,93 ^b	46,97 ^b
	2,5	14,26	85,74	0,026	62,72 ^c	43,59 ^c	35,29 ^c
	5	10,89	89,11	0,019	54,30 ^d	35,43 ^d	27,99 ^d
Guisante	0	32,85	67,11	0,084	87,05 ^a	74,92 ^a	67,22 ^a
	1	25,01	74,25	0,049	77,74 ^b	61,76 ^b	53,21 ^b
	2,5	22,74	77,24	0,033	70,83 ^c	53,45 ^c	45,30 ^c
	5	16,35	82,59	0,021	58,65 ^d	40,78 ^d	33,52 ^d

* Degradabilidad efectiva de la PB, según la expresión: $DEPB = a + [(b \times c)/(c+k)]$, siendo "k" la velocidad del flujo de vaciado del rumen ($\% h^{-1}$).

Los valores que comparten superíndice dentro de cada materia no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabla 3. Grado de hidrólisis (%DH) de las distintas fuentes proteicas tratadas o no tratadas con ácido tánico, para las dos fases ensayadas (alcalina o ácida + alcalina).

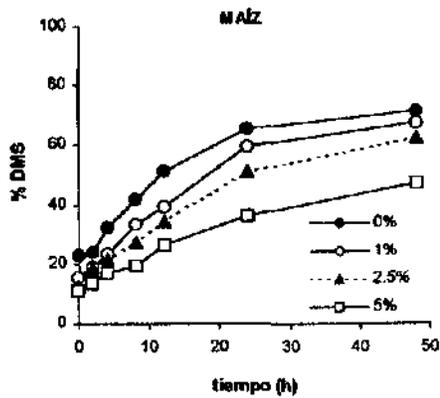
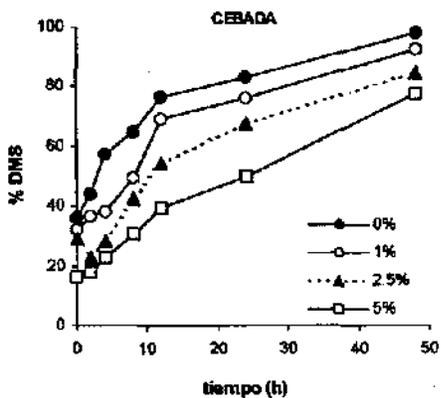
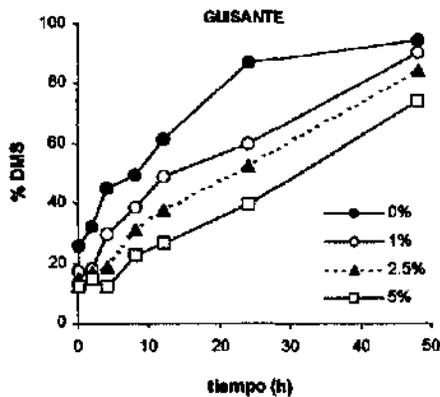
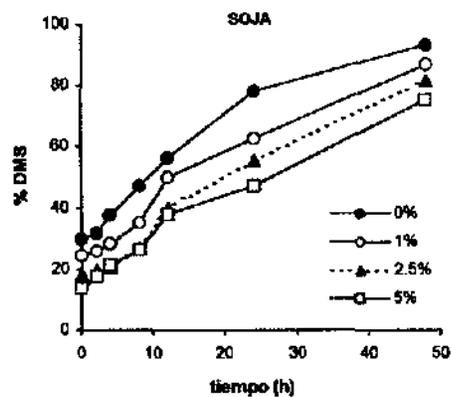
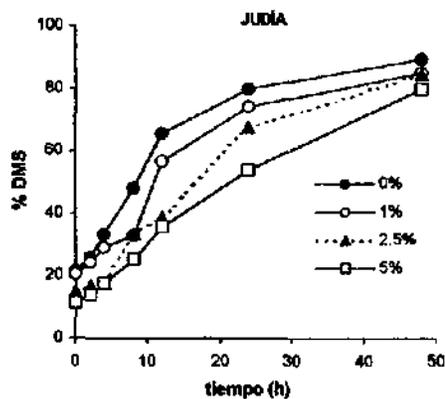
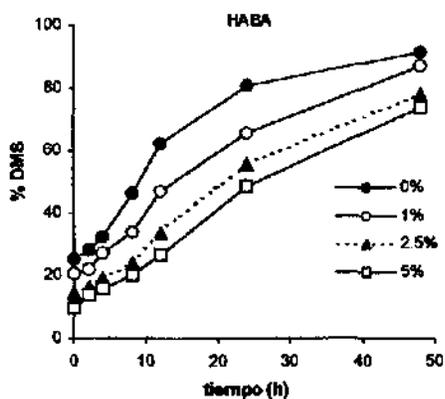
	Control (0% AT)		1% AT		2,5% AT		5% AT	
	Fase	Fases	Fase	Fases	Fase	Fases	Fase	Fases
	alcalina	ácida + alcalina						
Caseína	11,73 ± 0,26 ^a	12,22 ± 0,49 ^a	11,62 ± 0,17 ^a	10,75 ± 0,37 ^A	12,00 ± 0,05 ^a	12,42 ± 0,29 ^A	11,83 ± 0,55 ^a	12,59 ± 0,39 ^A
BSA	12,10 ± 0,70 ^d	10,95 ± 0,17 ^C	10,29 ± 0,44 ^c	8,69 ± 0,26 ^B	8,03 ± 0,33 ^b	8,15 ± 0,42 ^{AB}	6,80 ± 0,57 ^a	7,65 ± 0,15 ^A
Soja	3,30 ± 0,39 ^a	2,80 ± 0,20 ^A	3,57 ± 0,07 ^a	2,90 ± 0,01 ^A	3,34 ± 0,15 ^a	3,97 ± 0,26 ^B	4,62 ± 0,07 ^b	6,88 ± 0,14 ^C
Guisante	3,00 ± 0,08 ^a	2,24 ± 0,14 ^A	3,46 ± 0,19 ^b	3,86 ± 0,02 ^B	3,45 ± 0,27 ^{ab}	3,63 ± 0,36 ^B	4,68 ± 0,24 ^c	4,87 ± 0,10 ^C
Hemoglob.	7,14 ± 0,33 ^a	10,46 ± 0,35 ^C	7,36 ± 0,19 ^a	8,41 ± 0,23 ^A	8,16 ± 0,24 ^b	8,48 ± 0,27 ^A	9,52 ± 0,37 ^c	9,68 ± 0,47 ^B

Los valores de DH para cada nivel de tratamiento en fase alcalina (letras minúsculas) y ácida + alcalina (letras mayúsculas) que comparten superíndices no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Tabla 4. Cantidad de aminoácidos totales liberados en la hidrólisis *in vitro* de las materias tratadas o no con ácido tánico. Los resultados se expresan como µg de equivalentes de L-leucina por mg de proteína.

	Control (0% AT)		1% AT		2,5% AT		5% AT	
	Fase	Fases	Fase	Fases	Fase	Fases	Fase	Fases
	alcalina	ácida + alcalina	alcalina	ácida + alcalina	alcalina	ácida + alcalina	alcalina	ácida + alcalina
Caseína	113,25 ± 1,59 ^a	108,63 ± 1,74 ^A	97,39 ± 1,84 ^b	129,92 ± 5,56 ^B	103,21 ± 0,92 ^b	112,25 ± 9,23 ^{AB}	80,72 ± 6,71 ^a	110,04 ± 2,97 ^{AB}
BSA	122,29 ± 6,52 ^a	149,80 ± 6,44 ^D	83,53 ± 4,87 ^b	131,93 ± 1,81 ^C	80,92 ± 6,66 ^b	104,02 ± 4,91 ^b	39,76 ± 8,87 ^a	94,38 ± 4,44 ^A
Soja	49,60 ± 5,05 ^a	88,76 ± 4,01 ^A	49,00 ± 4,36 ^a	91,97 ± 2,12 ^A	72,29 ± 4,22 ^b	98,59 ± 1,52 ^B	92,17 ± 4,55 ^c	117,67 ± 4,27 ^C
Guisante	61,65 ± 2,43 ^b	85,94 ± 2,72 ^A	54,02 ± 3,61 ^a	117,67 ± 1,25 ^C	69,48 ± 1,25 ^c	98,59 ± 6,66 ^B	94,58 ± 3,92 ^b	119,08 ± 2,12 ^C
Hemoglob.	61,85 ± 0,92 ^a	110,64 ± 5,12 ^B	68,07 ± 2,76 ^a	114,06 ± 2,85 ^B	65,86 ± 5,56 ^a	104,42 ± 0,92 ^A	91,16 ± 6,03 ^b	104,02 ± 2,72 ^A

Los valores de aminoácidos totales para cada nivel de tratamiento en la fase alcalina (letras minúsculas) y ácida + alcalina (letras mayúsculas) que comparten superíndices no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).



Con tanino

Sin tanino



0 horas



4 horas

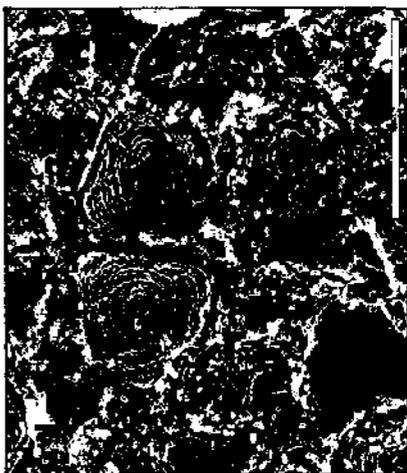
CEBADA



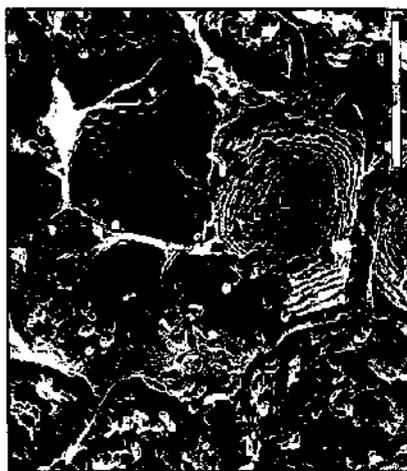
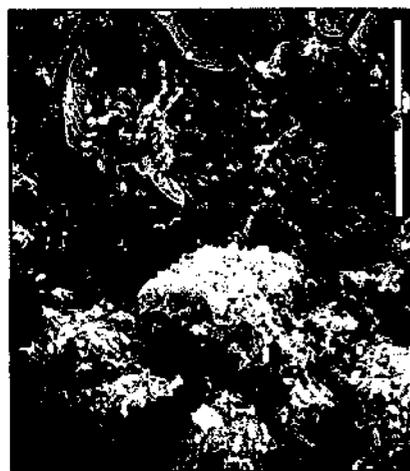
8 horas

Con tanino

Sin tanino

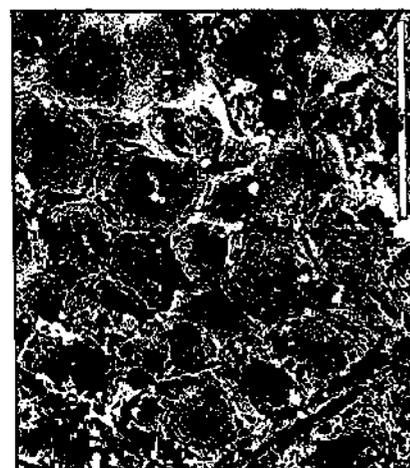


4 horas



8 horas

MAÍZ



12 horas

Con tanino

Sin tanino



4 horas

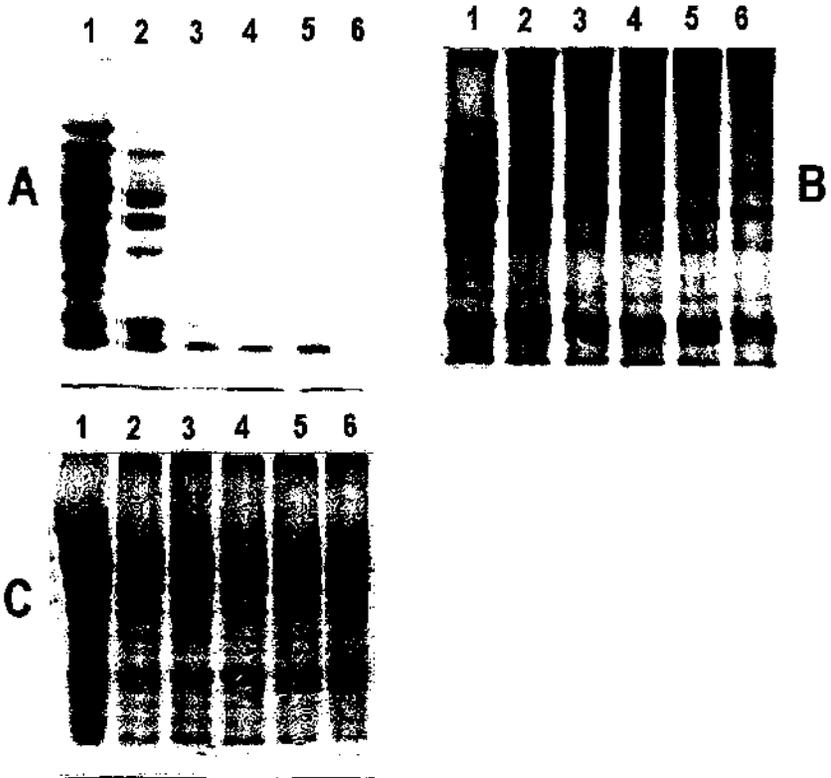


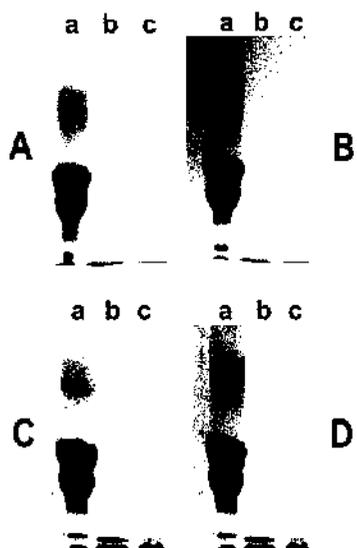
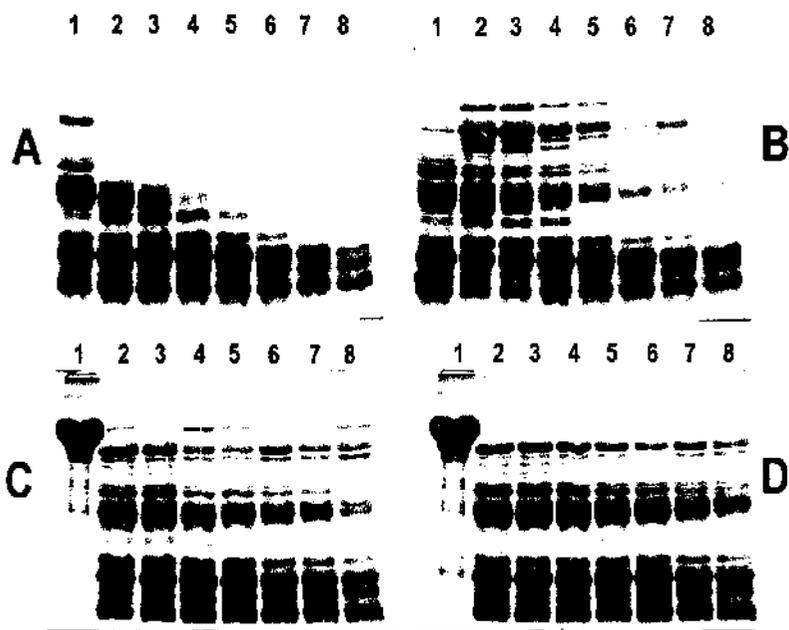
8 horas

SOJA



12 horas





PIES DE FIGURA

Figura 1. Digestibilidad de la MS tras la incubación ruminal *in sacco* a los distintos niveles de tratamiento con ácido tánico.

Figura 2. Digestión ruminal *in sacco* de la semilla de cebada sin tratar (1, 2 y 3) y tratada (4, 5 y 6) a distintos tiempos de incubación.

Figura 3. Digestión ruminal *in sacco* del endospermo córneo de la semilla de maíz sin tratar (1, 2 y 3) y tratada (4, 5 y 6) a distintos tiempos de incubación.

Figura 4. Digestión ruminal *in sacco* de la semilla de soja sin tratar (1, 2 y 3) y tratada (4, 5 y 6) a distintos tiempos de incubación.

Figura 5. Fracciones proteicas de la semilla de guisante que permanecieron en el residuo de las bolsas tras la incubación *in sacco* a distintos tiempos. (A): semilla no tratada; (B): 2.5% ácido tánico; (C): 5% ácido tánico. Carril 1: 0 horas; carril 2: 4 horas; carril 3: 8 horas; carril 4: 12 horas; carril 5: 24 horas; y carril 6: 48 horas.

Figura 6. Efecto del ácido tánico sobre la hidrólisis enzimática de las fracciones individuales de la seroalbúmina bovina. (A): control sin ácido tánico. (B), (C) y (D): con ácido tánico al 1%, 2.5% y 5%, respectivamente. Carril 1: tiempo cero; carril 8: tiempo 2700 segundos.

Figura 7. Efecto del ácido tánico sobre la hidrólisis enzimática de las fracciones individuales de la caseína bovina. (A): control sin ácido tánico. (B), (C) y (D): con ácido tánico al 1%, 2.5% y 5%, respectivamente.

