Descomposición de los polisacáridos de gramíneas con diferente grado de polimerización por lactobacilos

W. HÜHBAUCH, G. VOIGTLÄNDER y A. KLEEBERGER

Institut für Grünlandlehre. República Federal de Alemania

RESUMEN

Compuestos puros de fructosanas de hierba se redujeron con ayuda de microorganismos en una prueba tipo. El periodo de descomposición microbiana de fructosanas polimerizadas aumentaba evidentemente con el grado de polimerización. Así, llegamos a la conclusión de que debía existir una dependencia de la digestibilidad alterada de otras importantes sustancias orgánicas de las plantas forrajeras sobre la condensación, que aumenta con el envejecimiento de las plantas. En estudios sobre la degradación de fructosanas se encontraron diferencias significativas entre las diferentes especies de lactobacilos. Mientras que todas las cepas de Lactobacillus casei *eran capaces de degradar las fructosanas de* Dactylis glomerata *o* Phleum pratense *sin importar el grado de polimerización, ninguna cepa de* Lb. plantarum *y* Lb. brevis *pudo atacar estos polisacáridos.*

INTRODUCCIÓN

La variación del valor alimenticio de los forrajes ha sido muy estudiada y se sabe que a medida que se incrementa el estado de desarrollo disminuye la digestibilidad tanto de la materia orgánica como la de algunos de sus componentes (9, 11). La variabilidad en la composición de diferentes elementos de los componentes polimerizados no explica con suficiente claridad la variación de la digestibilidad de esas sustancias. En principio parece existir una relación causal con el grado de condensación de las sustancias orgánicas polimerizadas. El ejemplo de las fructosanas de las gramíneas probará en qué medida la utilización bacteriana de tales componentes está influenciada por su diferente grado de polimerización.

EXPERIMENTAL

Separación y caracterización de las fructosanas

La base del tallo es el principal órgano de almacenamiento de reservas hidrocarbonadas en las gramíneas. En las zonas templadas las gramíneas almacenan una cantidad considerable de fructosanas antes de la floración (10). Conocemos, por investigaciones realizadas anteriormente, que el grado de polimerización de las fructosanas del dactilo y el fleo es muy diferente (3, 5). Por consiguiente, las fructosanas se extraen de la base del tallo en el caso del dactilo y del haplocormo en el caso del fleo. La distribución del peso molecular de la fructosana se calculó mediante cromatografía en columna con "Sephadex 6-75 superfine" (Pharmacia). Los constituyentes de la fructosana, fructosa y glucosa fueron determinados por tratamiento enzimático. Ambos métodos están descritos en un trabajo anterior (7). El tipo de enlace y estructura de las cadenas de la fructosana se determinó por medio de espectrometría de infrarrojos: 1-2 mg. de fructosana purificada se homogeneizaron con 300 mg. de bromuro potásico y se secaron a 85° C. Se prensó hasta conseguir un disco y el espectro se registró con un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo IR-257.

Descomposición bacteriana de la fructosana

Las bacterias que pueden reducir la fructosana fueron obtenidas del jugo extraído del ensilado mediante prensado. Tiras sólidas del medio de cultivo MRS se tomaron de pruebas piloto pero se modificó el medio MRS de forma que las fructosanas del dactilo y el fleo fueron la única fuente de carbohidratos. Estos últimos se redujeron después de la inoculación con el jugo del ensilado. Las tiras se incubaron a 30° C en medio anaerobio y atmósfera con 90 % de N_2 y 10 % de CO_2. El cultivo de bacterias creció en esas condiciones sin esporas, katalasa negativa e inmotilidad.

El sustrato nutritivo del experimento principal estuvo constituido por un medio de cultivo MRS sin dextrosa, en el cual el extracto de levadura se sometió antes a fermentación por medio de enterobacterias para tener seguridad de que el medio estaba libre de carbohidratos. La única fuente de carbohidratos presente en este medio nutritivo después de la esterilización eran las fructosanas del dactilo o del fleo o bien el trisacárido rafinosa. Estas fuentes de carbohidratos se tomaron de soluciones esterilizadas con una concentración del 1 %. Se añadieron al medio nutritivo hasta obtener una concentración final de 0,1 %. Así, el experimento está constituido por tres bloques.

Las inoculaciones se hicieron simultáneamente. En cada caso, 0,1 ml. de jugo del ensilado se añadieron directamente a 10 ml. de la solución testigo con los cultivos de bacterias que se habían obtenido de las tiras del medio de cultivo sólido descrito anteriormente. Las muestras con fructosana del fleo y rafinosa fueron inoculadas con cultivos que habían crecido en un medio de cultivo sólido con fructosana del fleo. Las muestras con fructosana de dactilo se inocularon con cultivos que habían crecido en un medio de cultivo con las mismas fructosanas. Estas muestras se incubaron a una temperatura de 30° C. Después de un período de incubación de cuarenta horas tanto las

muestras inoculadas como las no inoculadas, así como las muestras sin carbohidratos, se controlaron cada dos horas por duplicado. Así la descomposición de los carbohidratos se determinó cada dos horas en una alícuota de las soluciones incubadas que se purificaron con proteína. Se utilizó una técnica colorimétrica con molibdato de arsénico (16) aplicada en un trabajo anterior (6).

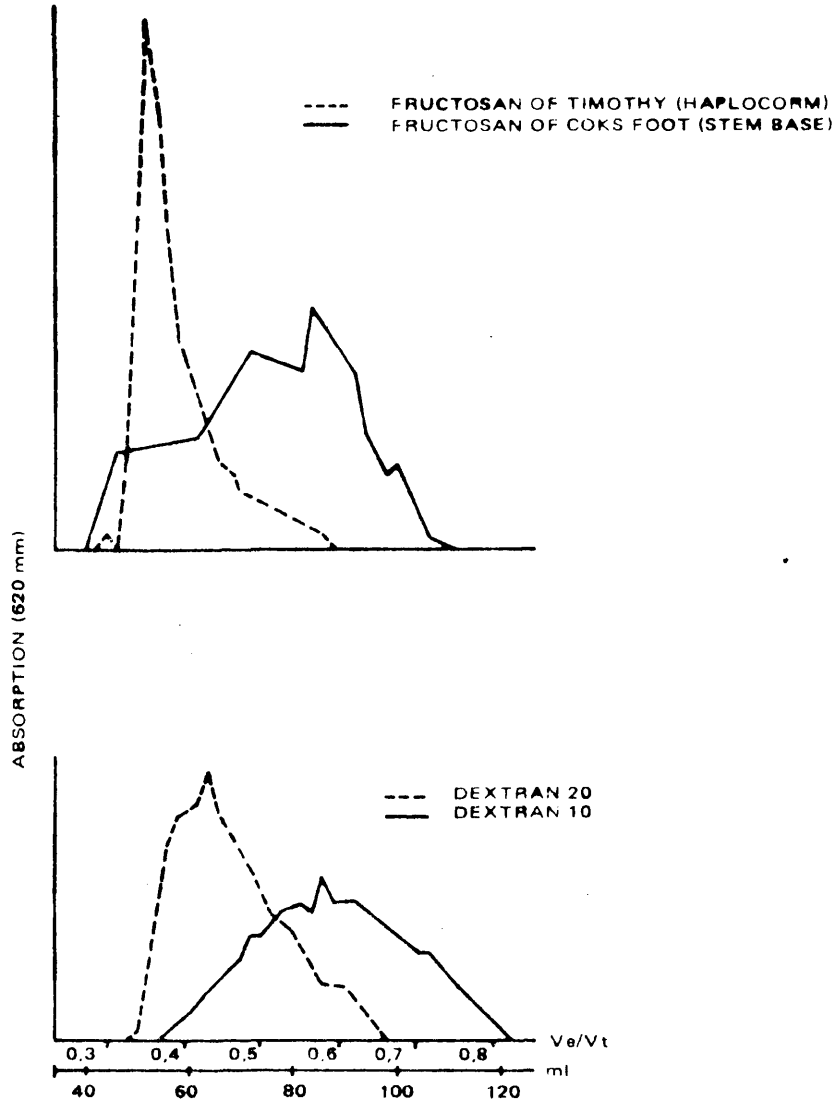

FIG. 1.—*Distribución del peso molecular de fructosanas del haplocormo de fleo y base del tallo de dactilo en Sephadex G 75. Sustancia de referencia: dextrano 10 y dextrano 20*

RESULTADOS

Peso molecular y composición de la fructosana

La figura 1 muestra la distribución del peso molecular de la fructosana del fleo y el dactilo y el de las sustancias de referencia Dextrano 20 y Dextrano 10. La mayoría de las fructosanas del fleo concuerdan con la distribución del peso molecular del Dextrano 20, las fructosanas del dactilo con la la del Dextrano 10.

Puesto que la relación entre el cociente del volumen diluido (V_e) y el volumen total (V_t) con el logaritmo del peso molecular medio (log. Mn) es linear (12), se puede calcular el peso molecular medio de las fructosanas (cuadro núm. 1).

CUADRO NUM. 1

PESO MOLECULAR MEDIO ($\overline{M}_n$) Y GRADO DE POLIMERIZACION (DP) DE FRUCTOSANA DEL HAPLOCORMO DE FLEO Y BASE DEL TALLO DE DACTILO. SUSTANCIA DE REFERENCIA: DEXTRANO 10 Y DEXTRANO 20

Origen de la fructosana y sustancia de referncia	Según el grado de filtración		Según el cociente de los constituyentes fructosa : glucosa	
	$\overline{M}_n$	(DP)*	DP	(M_n)**
Fleo (haplocormo)	25.500	(157,3)	155	(25.128)
Dactilo (base del tallo)	10.600	(65,3)	52	(8.442)
	6.200	(38,2)		
Dextrano 10	5.700	(35,1)	—	—
Dextrano 20	15.000	(92,5)	—	—

(*) Calculado a partir de $\overline{M}_n$.
(**) Calculado a partir de DP.

La distribución de las fructosanas del dactilo es relativamente amplia con $V_e/V_t = 0{,}49$ y $V_e/V_t = 0{,}56$, lo cual es bastante sorprendente. La distribución del peso molecular de las fructosanas del fleo es, sin embargo, más limitada con un máximo en $V_e/V_t = 0{,}35$. Para estas últimas puede, pues, determinarse con claridad un peso molecular medio de 25.500 correspondiente a un grado de polimerización de 157,3. Las fructosanas del dactilo presentan un peso molecular de 10.600 y 6.200 y un grado de polimerización de 65,3 y 38,2, respectivamente.

Ambas fructosanas están basadas en la sacarosa como se deduce del hecho de que el grado de polimerización es similar si los resultados se calculan en base al peso molecular después de separación con Sephadex 6-75 o bien por la relación fructosa/glucosa (cuadro núm. 1).

La figura 2 muestra el espectro con el intervalo en el que, de acuerdo con VERSTRAETEN (20), el campo característico para compuestos de cetosas está comprendido entre 100 y 700 $cm.^{-1}$. Las fructosanas del fleo y el dactilo tienen una absorción máxima en 822, 875, 924, 946 $cm.^{-1}$ y 822, 856, 875, 924, 948 $cm.^{-1}$, respectivamente. Por tanto, existe una completa identidad que

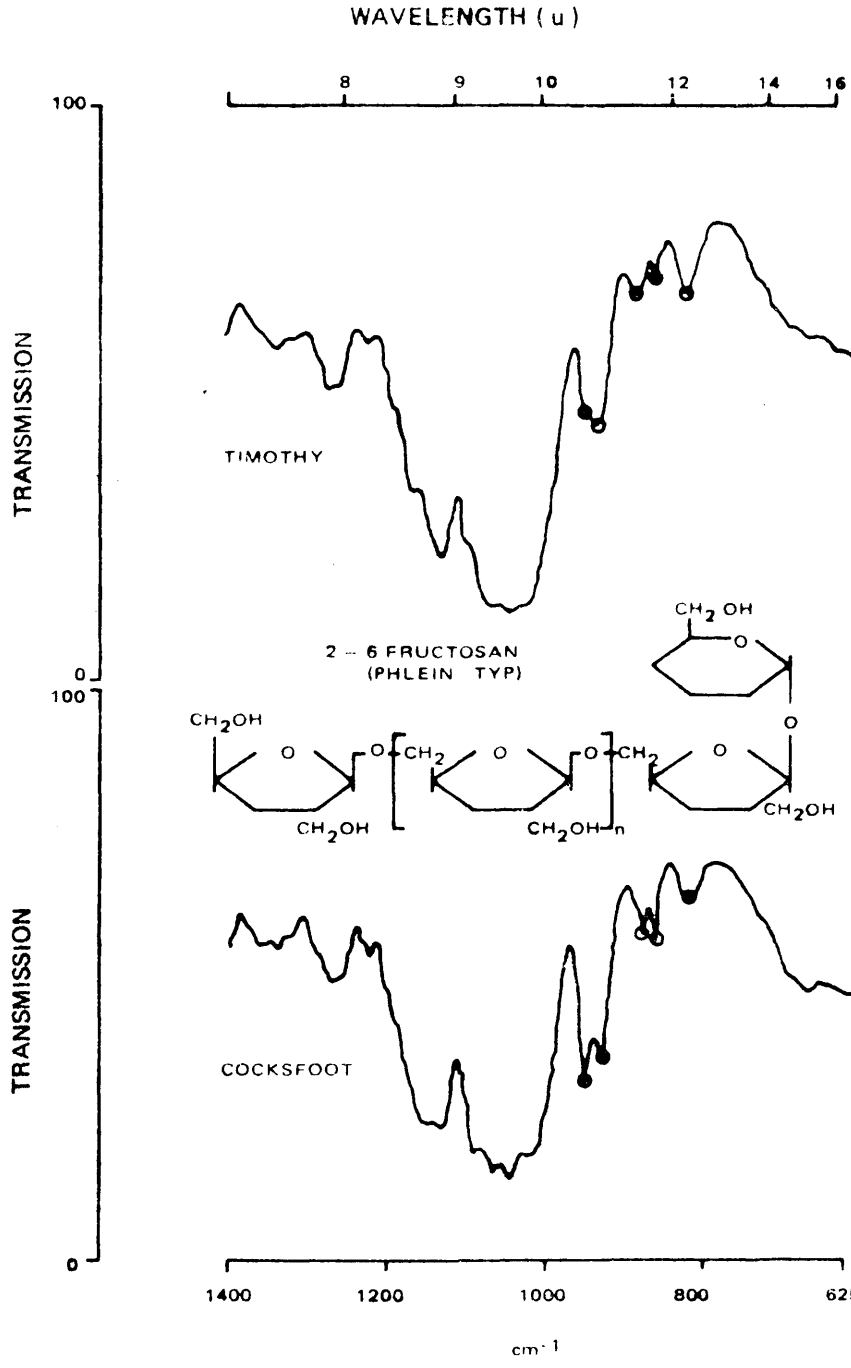

FIG. 2.—*Espectros infrarrojos de fructosanas del haplocormo de fleo y base del tallo de dactilo*

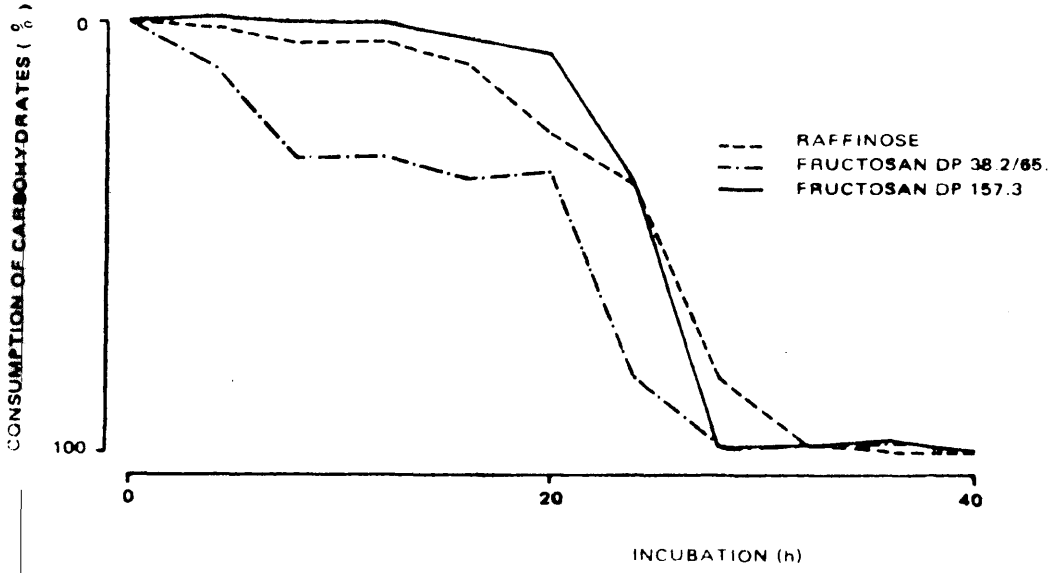

FIG. 3.—*Descomposición de fructosana inoculada con fluido de ensilado prensado*

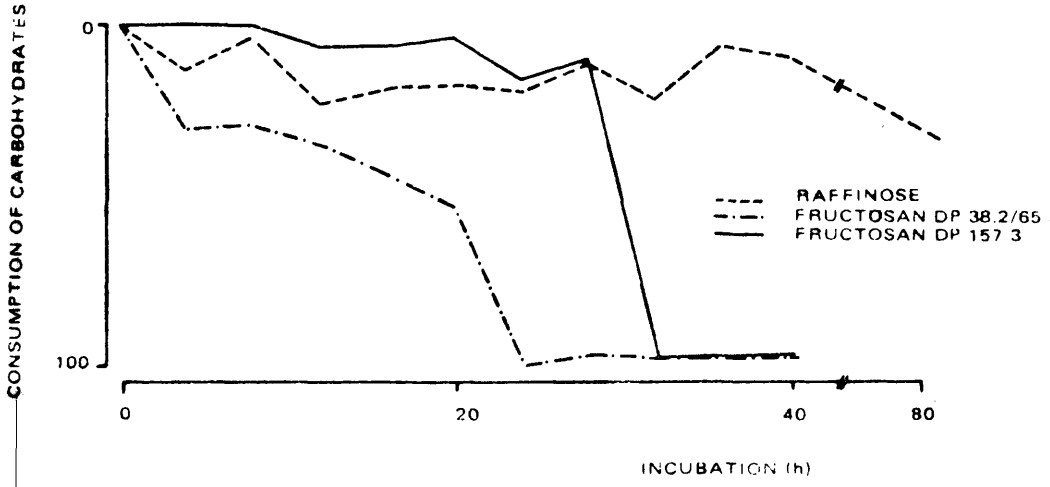

FIG. 4.—*Descomposición de fructosana inoculada con bacterias separadas y purificadas*

está en concordancia con la tendencia típica del compuesto 2,6-fleina de las fructosanas. Así la única diferencia encontrada entre ambas fructosanas es su DP (grado de polimerización).

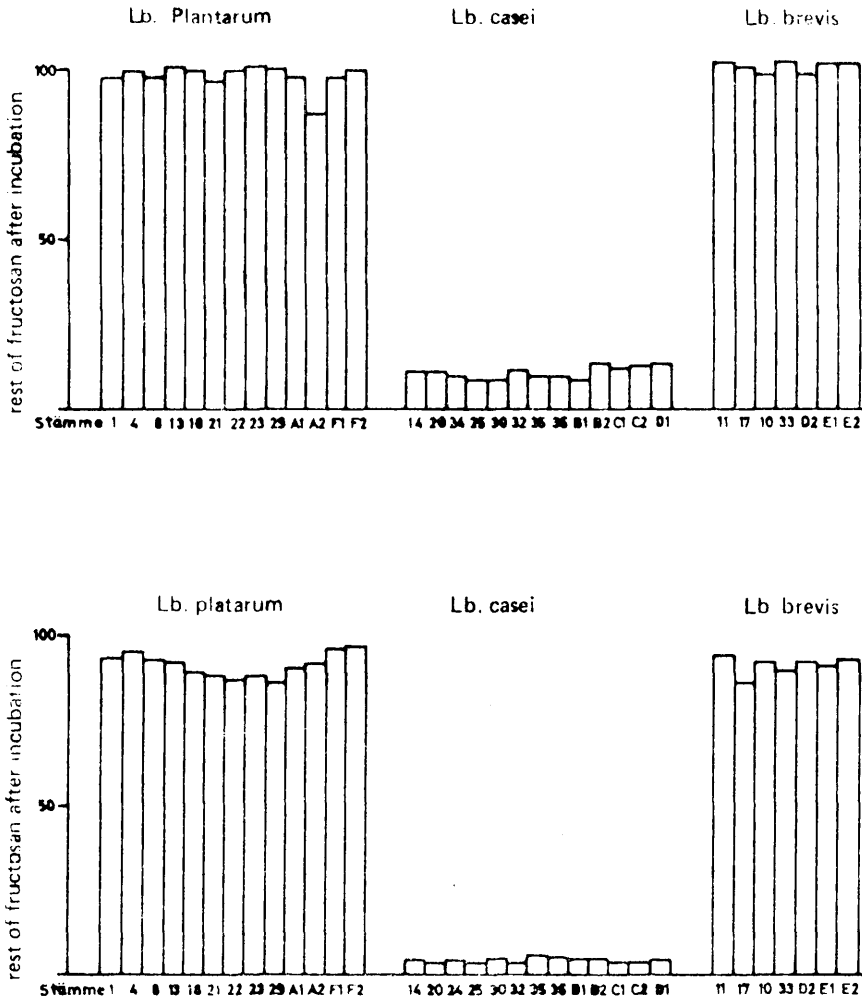

FIG. 5.—*Fructosana restante después de cuarenta y ocho horas de incubación con lactobacilos; arriba, base del tallo del dactilo; abajo, haplocormo de fleo*

Descomposición bacteriana de las fructosanas

Las figuras 3 y 4 muestran el esquema de descomposición de los diferentes polímeros de fructosanas del fleo y el dactilo. La fructosana con DP 157,3 (calculado a partir de M_n) se reduce por medio de un cultivo de bacterias del jugo de ensilado no antes de un período de adaptación de doce horas, mientras que las fructosanas con DP 65,3/38,2 se reduce inmediatamente.

El 30 % de las fructosanas de más bajo grado de polimerización se reducen en un período de ocho horas. Sin embargo, las fructosanas con DP 157,3 no son atacadas durante este período. Ambas fructosanas son completamente reducidas por los microorganismos después de un período de veinte a veintio-

cho horas. Después de cuarenta horas la descomposición de las dos fructosanas era prácticamente total. Sorprendentemente la rafinosa se descompone más lentamente.

Los cultivos obtenidos mediante tiras muestran un esquema de descomposición similar (fig. 4). Pero la diferencia en la velocidad de reducción entre ambos tipos de fructosanas es mucho más marcada. El 30 % de fructosanas de cadena corta son reducidas después de cuatro horas, mientras que las fructosanas del fleo, con un mayor grado de polimerización, apenas se descomponen después de ocho horas. Sólo del 10 al 15 % de las fructosanas del fleo se descomponen en un período de adaptación de veintiocho horas mientras que las fructosanas del dactilo desaparecen virtualmente después de veinticuatro horas.

El largo período de adaptación, la descomposición de las fructosanas del fleo entra en una fase logarítmica en la que el contenido total es reducido por los microorganismos en cuatro horas dejando un resto casi despreciable. Sin embargo, en el caso de la rafinosa sólo se consume el 35 % incluso si el período de incubación se prolonga hasta noventa horas. Los lactobacilos del ensilado de gramíneas han sido clasificados de acuerdo con SHARPE y col. (15). Se han identificado tres especies: *Lactobacilus plantarum, Lb. casei* y *Lb. brevis.* Son las especies más importantes desde el punto de vista de las fermentaciones del ensilado. Las diferentes cepas de las tres especies se comportan con bastante similitud respecto a sus caracteres fisiológicos. No obstante, existen notables diferencias en la capacidad de descomposición de las fructosanas entre las tres especies de lactobacilos. Como se demuestra en la figura 5 la fructosana es prácticamente descompuesta en su totalidad por todas las cepas de *Lb. casei* mientras que ocurre lo contrario con cualquiera de las cepas de *Lb. plantarum* o *Lb. brevis.*

DISCUSIÓN

La amplia distribución de los pesos moleculares de las fructosanas del dactilo con un límite inferior menor que 2.000 ha contribuido ciertamente al hecho de que se reduce mucho más rápidamente por los microorganismos cultivados en medio sólido que las fructosanas del fleo, las cuales se sintetizan casi totalmente a partir de moléculas altamente polimerizadas. El hecho de que las diferencias en la velocidad de descomposición de los carbohidratos de diferente calidad de polimerización no son tan obvias después de la inoculación con fluido de ensilado, indica que, en este caso, cooperan diferentes microorganismos en la descomposición. Esto causa un consumo más rápido de todos los carbohidratos. Ambas fructosanas se consumen casi completamente en cuarenta horas.

Así se deduce que las diferencias cualitativas en este tipo de compuesto no aparecen en las pruebas de digestión tradicionales (19), ya que en éstas el período de incubación dura cuarenta y ocho horas. Por eso queda velado un hecho que, en nuestra opinión, puede ser muy importante. Ciertamente, grandes cantidades de moléculas de carbohidratos altamente polimerizados, como ya se demostró con el almidón, se aprovechan mucho mejor por los rumiantes que las cantidades correspondientes de monosacáridos (14). Todos los carbohidratos altamente polimerizados son, probablemente, particularmente efecti-

vos, si no causan hiperacidez en el rumen a pesar de su digestibilidad, que es superior en un 100 % (8) a la de las fructosanas. La disposición de los rumiantes a tomar alimento, mencionada a menudo, debe ser particularmente efectiva si coincide una digestibilidad alta con la ausencia de hiperacidez. Este experimento demuestra, además, que el grado de polimerización de los compuestos orgánicos ejerce una influencia fundamental en su utilización microbiana, esto es, los procesos en el rumen se afectan de la misma manera que, por ejemplo, el ensilado o la henificación.

Puede ser posible una influencia análoga con otros tipos de compuestos, por ejemplo, la hemicelulosa, ya que ninguna investigación sobre los elementos separados de estos carbohidratos polimerizados ha explicado aún el deterioro de la digestibilidad con la edad del crecimiento. Es un principio biológico que las plantas tratan de evitar la presión osmótica, que se aumenta con asimilados primarios (monosacáridos), al producir compuestos altamente polimerizados. Pudimos observar claramente este proceso con fructosanas (5, 6) y sacamos la conclusión de que la condensación de estas sustancias es al menos una razón del deterioro de su digestibilidad. La condensación aumenta con la edad. Las inclusiones intercelulares o intracelulares (posiblemente junto con la lignina) o el aumento del grado de ramificación de las moléculas podrían ser otras razones.

La insignificante descomposición del trisacárido rafinosa (fig. 4) puede estar en contradicción con esta teoría. Pero debe tomarse en consideración que sólo se recuperó una pequeña parte altamente especializada de la microflora con ayuda de los cultivos en medio sólido, y que la combinación de la microflora cambia durante el proceso de fermentación. Existe otro hecho a tener en cuenta en esta teoría: después de la inoculación con fluido de ensilado apenas queda algo de la rafinosa, mientras que, después de noventa horas, sólo se consume el 35 % de la rafinosa en aquellas muestras que se inoculan con microorganismos cultivados en medio sólido. Con respecto a la facilidad de descomposición de las fructosanas, los tres grupos de lactobacilos identificados resultaron ser bastantes homogéneos. Mientras que todas las cepas de *Lb. casei* usaban casi completamente tanto las fructosanas de la base del tallo de dactilo como las de fleo, el *Lb. plantarum* y *Lb. brevis* eran inactivos frente a estos carbohidratos. Una conducta tan definida puede servir como criterio taxonómico para la caracterización de los lactobacilos. Por otra parte esto demuestra una actividad de los microorganismos muy selectiva en general, y la importancia del uso del ajuste del biotopo en la inoculación artificial de material vegetal.

BIBLIOGRAFIA

(1) BUDZIER, H.H., 1964: *Beiträge zur Methodik der mikrobiologischen Methodik von Gärfutter. 7. Mittlg. Die Kolonientypen von stäbchenförmigen Milchsaurebakterien auf Tomatensaft-Acetat-Agar.* Zbl. Bakt. Abt. II, vol. 118, págs. 667-670.

(2) EICHHOLTZ, F., 1960: *Silage und ähnliche Gärerzeugnisse. Sammlung.* Die Wissenschaft. Braunschweig.

(3) GROTELUESCHEN, R.D., and SMITH, D., 1968: *Carbohydrates in grasses. III Estimations of the degree of polymerization of the fruktosans in the stem basis of timothy and bromegrass near seed maturity.* Crop. Sci., vol. 8, págs. 210-212.

(4) KAUFMANN, W., 1968: *Hohe Leistung von Milchkühen und Mastrindern erfordern beste Futterqualität und richtige Rationsgestaltung* (Vortrag). Arch. DLG., vol. 43, páginas 20-31.

(5) KÜHBAUCH, W., 1973: *Veränderung der Gehalte an Glukose, Fruktose, Saccharose und Fruktosan sowie des Polymerisationsgrades von Fruktosanmolekülen in Blättern und Stengeln einiger Knaulgrassorten während des Wachstums.* Landwirtsch. Forsch. Vol. 26, páginas 173-181.

(6) KÜHBAUCH, W., 1973: *Veränderung von Kohlenhydratfraktionen in Blättern und Stengeln einiger Knaulgrassorten während des Wachstums.* Landwirtsch. Forsch. vol. 26, páginas 213-220.

(7) KÜHBAUCH, W., 1974: *Fruktosangehalt, -polymerisationsgrad und -struktur in verschiedenen Pflanzenteilen von Knaulgras.* Z. Acker- u. Pflanzenbau. Vol. 139, págs. 97-108.

(8) NEHRING, K., 1968: *Die Bestimmung der Kohlenhydrate in den Futterstoffen - ein Beitrag zur Entwicklung der Futtermittelanalyse.* Sitzungsber. dt. Akad. Landwirtschaftswissensch. Vol. 10, págs. 101-118.

(9) NEHRING, K., and HOFFMANN, B., 1971: *Untersuchungen zur Weiterentwicklung der Futtermittelanalyse.* Arch. Tierern. Vol. 21, 347-366.

(10) OJIMA, K., and ISAWA, T., 1968: *The variation of carbohydrates in various species of grasses and legumes.* Canad. J. Bot. Vol. 46, págs. 1507-1511.

(11) PAQUAY, R.; BAERE, R. de; LOUSSE, A.; LOMBA, F.; CHAUVAUX, G., 1970: *Effect of grass maturity stage in dry cows. 2. Digestibility of the organic components and nitrogen balance.* 2. Tierphysiol., Tierernähr. Futtermittelkde. Vol. 26, págs. 332-339.

(12) PHARMACIA-Sweden, 1970: *Gel Filtration in Theory and Practice.*

(13) REHM, H.J., 1967: *Industrielle Mikrobiologie.* Berlín.

(14) SHARPE, M.E., 1962: *Taxonomy of the lactobacilli.* Dairy Sci. Abstr. Vol. 24, página 109.

(15) SHARPE, M.E.; FRYER, T.F., and SMITH, D.G., 1966: *Identification of the Lactic acid bacteria,* in: *Identification methods for microbiologists,* part A. London.

(16) SOMOGYI, M., 1952: *Notes on sugar determination.* J. Biol. Chem. Vol. 195, páginas 19-23.

(17) SUZUKI, M., 1968: *Fructosan in timothy haplocorm.* Canad. J. Bot. Vol. 46, páginas 1201-1206.

(18) THOMSON, D.J., and BEEVER, D.E., 1973: *Structural fibre in ruminant rations. Report 5th Europ. Grassld. Congr.*

(19) TILLEY, J.M.A., and TERRY, R.A., 1963: *A two-stage technique for the* in vitro *digestion of forage crops.* J. Brit. Grassl. Soc. Vol. 18, pp. 104-111.

(20) VERSTRAETEN, L.M.J., 1964: *Infrared spectra of some 2-ketoses.* Anal. Chem. Volumen 36, págs. 1040-44.

DECOMPOSITION OF GRASS POLYSACCHARIDES OF DIFFERENT DEGREE OF POLYMERIZATION LACTOBACILLI

SUMMARY

Pure compounds of grass fructosan of a different extent of polymerization were reduced with the aid of microorganisms in a model test. The period of the microbial decomposition of polymeric fructosans grew longer evidently with increasing extent of polymerization. So we came to the conclusion that there must be a dependence of the altered disgestibility of other important organic substances of feed plants upon the condensation, which increases as the plants grown older. In studies on the degradation of fructosan significant differences among the species of lactobacilli were found. While all strains of *Lactobacillus casei* were able to degrade fructosan from *Dactylis glomerata* or *Phleum pratense* regardless of the degree of polymerization, no member of *Lb. plantarum* and *Lb. brevis* could attack these polysaccharides.