

# Evaluación de $\alpha$ -amilasa y proteasa sobre el consumo y la digestibilidad de nutrientes de las dietas y parámetros fisiológicos en ovinos<sup>1</sup>

Abner A. Rodríguez-Carías<sup>2</sup>, Beatriz A. Quintana<sup>3</sup>,  
Luis C. Solorzano<sup>4</sup> y Paul F. Randel<sup>5</sup>

J. Agric. Univ. P.R. 101(1):63-78 (2017)

## RESUMEN

Se determinaron los efectos de la adición de enzimas exógenas sobre la ingestión y la digestibilidad de la materia seca (MS) y nutrientes y varios parámetros sanguíneos en corderos alimentados con una dieta basal compuesta por 34% de maíz molido, 40% heno de hierba tropical y 26% de harina de soya proporcionando 21% de almidón. Doce corderos mestizos (22 kg) fueron asignados a uno de cuatro tratamientos: ningún aditivo (1); dietas con adición de la  $\alpha$ -amilasa (2); adición de la proteasa (3); o la combinación de ambas enzimas (4). Las dietas (en MS) se ofrecieron diariamente al 4% del peso vivo animal en cuatro periodos experimentales de 28 días, que consistieron en 21 días de adaptación a la dieta seguida por siete días de recolección fecal completa. Se analizaron muestras de estos materiales para contenido de MS, almidón, proteína bruta (PB), y fibra detergente neutro (FDN) para determinar el consumo y la digestibilidad. Al final de cada periodo experimental se obtuvieron muestras de sangre de cada cordero para determinar las concentraciones de glucosa, beta-hidroxibutirato (BHB), ácidos grasos no esterificados (AGNE) e insulina. Los datos se analizaron de acuerdo con un diseño experimental cuadrado latino 4 x 4. Se realizaron contrastes de los tratamientos, utilizando la media de los cuadrados mínimos esperados ajustados para comparaciones múltiples (Tukey-Kramer), de las siguientes combinaciones dietas con adición de enzimas versus sin enzimas, aquellas con la amilasa versus sin amilasa y dietas con proteasa versus sin la misma. El consumo de MS fue similar en todos los tratamientos (1,106; 1,088; 1,105 y 1,088 g/d para las dietas 1, 2, 3 y 4 en orden). La adición de la proteasa disminuyó ( $P < 0.05$ ) el consumo de almidón (248 vs. 255 g/d) y aumentó, no significativamente, la digestibilidad de FDN (48.6 vs. 46.8%) en comparación con el tratamiento sin la enzima. La adición de enzimas a la dieta tendió ( $P < 0.10$ ) a disminuir la concentración sanguínea de BHB por debajo del nivel testigo (4.26 vs. 4.68 mg/dL). La concentración de AGNE en la sangre tendió a aumentar ( $P < 0.10$ ) en corderos alimentados con  $\alpha$ -amilasa versus sin  $\alpha$ -amilasa (0.17 vs. 0.14 mEq/L). El nivel de insulina tendió ( $P < 0.10$ ) a aumentar en corderos alimentados con la proteasa en

<sup>1</sup>Manuscrito sometido a la Junta Editorial el 12 de octubre de 2016.

<sup>2</sup>Catedrático, Departamento de Ciencia Animal, Recinto Universitario de Mayagüez.

<sup>3</sup>Ex-Estudiente Graduada, Departamento de Ciencia Animal, Recinto Universitario de Mayagüez.

<sup>4</sup>Catedrático Adjunto, Departamento de Ciencia Animal, Recinto Universitario de Mayagüez.

<sup>5</sup>Investigador, Departamento de Ciencia Animal, Recinto Universitario de Mayagüez.

comparación con los alimentados sin la enzima (80.3 vs. 71.8 pmol/L). Los niveles de glucosa fueron similares para todos los tratamientos. Ambas enzimas exógenas influyeron sobre los componentes sanguíneos, pero se observó un mayor efecto con la proteasa.

Palabras clave: aditivos, enzimas exógenas, dietas, ovinos

#### ABSTRACT

##### Evaluation of $\alpha$ -amylase and protease on diet nutrient intake and digestibility, and physiological parameters in lambs

The effects of adding exogenous enzymes on the intake and digestibility of dry matter (DM) and on nutrients, and several blood parameters were determined in lambs fed a basal diet of 34% ground corn, 40% tropical grass hay, and 26% soybean meal providing 21% dietary starch. Twelve crossbred lambs (22 kg) were assigned to one of four diets: no additives (1); diets containing  $\alpha$ -amylase (2); protease (3); or their combination (4). Diets (DM basis) were offered daily at 4% of animal BW in four 28-day experimental periods each consisting of 21 d of adaptation to the diet followed by 7 d of complete fecal collection. In each period, feed offered,orts and feces were collected, quantified and analyzed for contents of DM, starch, crude protein (CP) and neutral detergent fiber (NDF) to determine intake and digestibility. At the end of each experimental period, blood samples were collected from the individual lambs to determine the concentration of glucose, beta-hidroxy butyrate (BHB), nonesterified fatty acids (NEFA), and insulin. Data were analyzed according to a 4 x 4 Latin Square experimental design. Dietary treatment contrasts were performed using least square means adjustment for multiple comparisons (Tukey-Kramer) as follows: enzymes versus no enzymes, amylase versus no amylase and protease versus no protease. Dry matter intake was similar across treatments (1,106; 1,088; 1,105 and 1,088 g/d for control, and diets containing  $\alpha$ -amylase, experimental protease or their combination, respectively). Adding protease to the diet decreased ( $P<0.05$ ) starch consumption (248 vs. 255 g/d) and increased, but not significantly, NDF digestibility (48.6 vs. 46.8%) as compared to that of lambs fed without the experimental enzyme. Adding enzymes to the diet tended ( $P<0.10$ ) to decrease blood BHB concentration below the control level (4.26 vs. 4.68 mg/dL). Blood NEFA concentration tended to increase ( $P<0.10$ ) in lambs fed  $\alpha$ -amylase compared to those fed without  $\alpha$ -amylase (0.17 vs. 0.14 mEq/L). The insulin level tended ( $P<0.10$ ) to increase in lambs fed protease versus lambs not receiving the enzyme (80.3 vs. 71.8 pmol/L). Glucose levels were similar for all treatments. Both exogenous enzymes influenced blood metabolites; however, a greater effect was observed in lambs fed the protease.

Key words: additive, exogenous enzymes, diet, ovine

#### INTRODUCCIÓN

La utilización y evaluación de aditivos dietéticos para mejorar diversas características de los alimentos para animales ha sido el objetivo de muchas investigaciones a través de los años. En lo que respecta a los animales rumiantes, la mayoría de los estudios se han basado en

la evaluación de aditivos para manipular la fermentación ruminal, ya sea aquellos que alteren el ambiente del rumen, como las sustancias amortiguadoras; compuestos que modifiquen la actividad metabólica y población de ciertos microorganismos, como los ionóforos; y compuestos que degraden ciertos nutrientes mejorando así la utilización de los alimentos, como los microorganismos de alimentación directa (DFM) o algunas enzimas (Pinos-Rodríguez y González-Muñoz, 2000). También se ha evaluado la utilización de enzimas exógenas en dietas para rumiantes en busca de efectos tales como aumentar el consumo voluntario (CV) y la digestibilidad de los diversos nutrientes, remover sustancias antinutricionales o manipular la fermentación en el complejo retículo-rumen para reducir la formación de productos de excreción dañinos al medio ambiente (Walsh et al., 1993; Campbell y Bedford, 1992). Las enzimas exógenas utilizadas son producto de la biotecnología, los diversos tipos de las cuales actúan en ambientes con intervalos amplios de pH (4 a 9) y de temperatura (30 a 90 °C); también pueden trabajar sinérgicamente con las poblaciones microbiales del rumen e incrementar la degradabilidad de los alimentos con liberación de sus nutrientes. En sistemas intensivos de producción animal, la utilización de dietas con una alta proporción de granos de cereales es una práctica común. Las dietas típicas para ganado especializado para la producción de leche son de alta densidad energética y su contenido de PB suele ser mayor de 16%. La digestión ruminal del almidón ejerce un gran efecto sobre el comportamiento productivo de los rumiantes alimentados con dietas altas en granos (Huntington, 1997; Britton y Stock, 1986). Con el objetivo de mejorar la digestibilidad de semejantes dietas se han creado procesamientos físicos del grano como el rolado en seco y a vapor, entre otros (Owens et al., 1997). Otra estrategia ha sido evaluar la utilización de enzimas exógenas como amilasas y proteasas para mejorar el valor nutritivo (Rojo-Rubio et al., 2001). Las enzimas amilolíticas son de uso común en las industrias alimentarias para catalizar la hidrólisis de almidón (Reilly, 1985). Sin embargo, para uso con rumiantes a las enzimas amilolíticas y proteolíticas se les ha prestado menos atención (Rojo-Rubio et al., 2001) que a otras clases de enzimas como las fibrolíticas. Las enzimas exógenas añadidas a la dieta fortalecen la actividad amilolítica presente naturalmente en bacterias y también protozoarios (Mendoza et al., 1994, 1993) y hongos ruminales (Yanke et al., 1993). Rojo-Rubio et al. (2001) reportaron que la adición de una amilasa termoestable, aislada de *Bacillus licheniformis*, incrementó la digestión in vitro del almidón aportado por el sorgo y maíz ingeridos. También se ha estudiado el uso de las enzimas para aumentar la producción de leche, logrando Klingerman (2009) un resultado positivo. En cambio, Weiss et al. (2011) añadieron a la dieta una amilasa exógena sin

ver un efecto ni en la digestibilidad de energía, o de almidón, ni en la producción de leche. Por otro lado, los esfuerzos por evaluar la utilización de proteasas como aditivos en las dietas para rumiantes han sido limitados, posiblemente debido a la preocupación por un posible efecto negativo causado por la degradación de otras enzimas digestivas que son de naturaleza proteica. Además de aumentar la digestibilidad de la proteína dietética, el propósito de adicionar proteasas a dietas con alta proporción de almidón de maíz es promover la digestión del almidón al facilitar la liberación de los gránulos unidos a la zeína, que actúa como un agente adhesivo entre las moléculas del polisacárido. También se ha mencionado que las amilasas pueden ser útiles al actuar sinérgicamente con las enzimas extracelulares sintetizadas por las bacterias ruminales amilolíticas aún cuando las condiciones fisicoquímicas del rumen no sean las óptimas (Rojo-Rubio et al., 2001). El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de la adición de una  $\alpha$ -amilasa comercial y una proteasa experimental o su combinación sobre el CV, la digestibilidad de MS, PB, almidón y FDN y algunos parámetros fisiológicos en ovinos.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento de alimentación se realizó en el Proyecto de Pequeños Rumiantes localizado en la Finca Alzamora de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez (UPRM). El objetivo fue determinar el efecto de incluir una fuente de  $\alpha$ -amilasa, una proteasa y la combinación de ambas en una dieta cuya composición incluyó 21% de almidón, sobre el CV y digestibilidad de la MS, PB, almidón y FDN y sobre la concentración de algunos componentes sanguíneos en cordeiros. El experimento tuvo una duración de 84 días además de siete días preliminares de adaptación de los animales al manejo y a las dietas experimentales. Se utilizaron 12 ovinos criollos alimentados según sus requerimientos nutricionales teóricos (NRC, 2001) y con un peso vivo (PV) promedio inicial de 22 kg. Los animales se alojaron en jaulas individuales de dimensiones (1.52 x 1.22 x 1.30 m), provistas de comederos de piso y bebederos automáticos. Los ovinos se desparasitaron antes del comienzo del experimento mediante tratamiento con antihelmínticos comerciales. En cada periodo experimental, tres ovinos distintos se sometieron a cada uno de los cuatro tratamientos a evaluarse: T1, control (sin aditivo); T2,  $\alpha$ -amilasa (1.2 g/d); T3, proteasa (0.3 g/d); y T4, la combinación  $\alpha$ -amilasa + proteasa. Cada animal se sometió a los cuatro tratamientos a lo largo del experimento, siendo asignadas aleatoriamente las secuencias de tratamientos en los cuatro periodos. La selección de la dosis de la enzima  $\alpha$ -amilasa usada en el presente

estudio se basó en un trabajo previo de Klingerman et al. (2009), quienes analizaron diferentes dosis de la enzima y obtuvieron resultados positivos sobre la producción de leche. La dosis de proteasa fue la recomendada por los suplidores del producto.

Los animales se alimentaron con cantidades equivalente al 4% del PV en base seca diariamente con una dieta compuesta de 40% heno de gramíneas tropicales (HGT), 34% maíz partido y 26% harina de soya, con un contenido teórico de 21% almidón y 19% PB. El HGT se compró a un productor comercial de forrajes, se transportó al Proyecto de Pequeños Rumiantes y se trozó mecánicamente (trituradora de ramas Vermeer: BC1230A)<sup>6</sup> a un tamaño teórico de partícula de 5 a 10 cm para uso en el experimento. Dicho procedimiento se realizó buscando la uniformidad de las dietas y para reducir la selectividad animal. Se analizaron muestras de cada uno de los ingredientes utilizados para determinar contenidos de MS, mediante el secado al horno a 65° C durante 48 horas; y de PB, almidón y FDN en un laboratorio comercial (Dairy One Forage Lab., Ithaca, NY). Las dietas usadas se prepararon con o sin el aditivo correspondiente para cada ovino individual. Diariamente se ofreció la ración de heno en un comedero y en otro separado los granos de maíz y soya. Estos granos se mezclaron manualmente y se almacenaron en envases de plástico. Las dietas se ofrecieron a los ovinos en dos porciones diarias iguales, a las 8:00 a.m. y 2:00 p.m. Había bloques de sal y minerales disponibles en las jaulas y a cada animal se le inyectó intramuscularmente un complejo nutricional aportador de vitaminas A, D y E. El diseño experimental fue un cuadrado latino 4 x 4 con tres repeticiones. El experimento constó de cuatro periodos de 28 días, de los cuales 21 días fueron de adaptación a las respectivas dietas y siete días de recolección de datos comparativos. Para cuantificar el consumo voluntario se pesaron los ovinos al inicio y al final de cada periodo y se usó el PV para determinar la cantidad del ofrecimiento individual de la dieta. Durante los siete días de recolección de datos, en cada periodo experimental, se cuantificó el alimento ofrecido y rechazado para determinar el CV. Se tomaron muestras del alimento ofrecido y rechazado y se analizaron las mismas para determinar el contenido de las cuatro fracciones citadas y así determinar el consumo de cada una individualmente. Para calcular la digestibilidad aparente de la MS, PB, FDN y almidón se utilizaron bolsas recolectoras de heces ajustadas a los animales. Diariamente durante siete días, las heces recolectadas

<sup>6</sup>Los nombres de compañías y de marcas registradas solo se utilizan para proveer información específica y su uso no constituye garantía por parte de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico, ni endoso sobre otros productos o equipo que no se mencionan.

se pesaron en su totalidad y se tomó una alícuota de las mismas (15% del total). También se siguió tomando muestras del ofrecimiento y rechazo de las dietas. Las muestras compuestas de las dietas y las heces por ovino se analizaron para determinar los contenidos de las cuatro fracciones según indicado anteriormente.

Los indicadores sanguíneos del estado metabólico se determinaron al finalizar la fase comparativa de cada periodo experimental. Se tomaron muestras de sangre individuales que se enviaron al "Diagnostic Center for Population and Animal Health" (DCPAH), de la Universidad del Estado de Michigan, localizado en la ciudad de East Lansing, para determinar las concentraciones de los metabolitos  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB), ácidos grasos no esterificados (AGNE), y glucosa, además del nivel de actividad de la hormona insulina.

Las muestras de sangre se colectaron de la vena yugular utilizando una aguja y un tubo Vacutainer<sup>TM</sup>, hecho de plástico, sin aditivo anticoagulante. Se centrifugaron las muestras a 1,600 rpm durante 20 minutos y se recolectó el suero sobrenadante para someterse a los análisis antes mencionados. Para determinar el efecto de los cuatro tratamientos dietéticos y de los periodos experimentales sobre las variables dependientes: CV y digestibilidad de las cuatro fracciones dietéticas y las características sanguíneas, los datos se analizaron según un diseño experimental cuadrado latino 4 x 4 con tres repeticiones, utilizando el procedimiento GLIMMIX del programa estadístico SAS (2009). Además, se efectuaron pruebas de contrastes de los cuadrados medios esperados, utilizando la prueba Tukey-Kramer para establecer diferencias significativas. Los contrastes en cuestión fueron entre los tratamientos con enzima vs. sin enzima,  $\alpha$ -amilasa vs. sin  $\alpha$ -amilasa, y proteasa vs. sin proteasa (SAS, 2009).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tal como formulada, la dieta experimental basal contenía 21.1% de almidón, 19.1% de PB y 35.7% de FDN, valores que satisfacen los requerimientos teóricos de los ovinos utilizados (Cuadro 1; NRC, 2001). El promedio general de PB consumida fue de 169, 217, 253, 269 g/d, en los cuatro periodos experimentales sucesivos.

El consumo diario como porcentaje del peso corporal en base seca fue similar entre los cuatro tratamientos experimentales con variación desde 3.63% a 3.73%. El ofrecimiento diario de MS dietética fue equivalente al 4% del PV, lo que indica que los animales solo rechazaron una cantidad equivalente a valores entre 0.37% y 0.27% del PV. Además, no se observó inapetencia ni enfermedad u otro problema de salud durante el transcurso de la investigación.

CUADRO 1.—*Composición teórica de la dieta experimental basal, contenido de nutrientes en cada ingrediente y en la dieta basal.*

Contenido (%) (por ingrediente)	Grano de Maíz	Heno	Soya	Total
Inclusión en la dieta	34.00	40.00	26.00	100.00
Almidón	60.60	0.00	1.90	—
Proteína Bruta	9.40	5.00	53.40	—
FDN	11.80	72.20	11.80	—
Almidón en la dieta	20.60	0.00	0.49	21.10
Proteína Bruta en la dieta	3.20	2.00	13.80	19.10
FDN en la dieta	4.00	28.80	2.86	35.70

La adición de la  $\alpha$ -amilasa comercial, la proteasa experimental o la combinación de ambas enzimas no resultó en efectos principales significativos de tratamientos sobre el consumo y la digestibilidad de la MS y las otras fracciones consideradas, ni sobre los componentes de la sangre evaluados (Cuadros 2 y 3).

En cambio, el significativo efecto principal de períodos verificado sobre el consumo de la MS y nutrientes (Cuadro 2) se puede adjudicar al crecimiento continuo y aumento de la masa corporal, siendo el PV promedio de 22, 29, 34 y 36 kg del primero al cuarto periodo, respectivamente.

CUADRO 2.—*Niveles de probabilidad de los efectos principales de los tratamientos y períodos experimentales sobre el consumo y digestibilidad de la dieta y componentes sanguíneos.*

Variable dependiente	Probabilidad	
	Tratamiento	Periodo
Consumo		
MS	0.878	0.001
Almidón	0.137	0.001
PB	0.361	0.001
FDN	0.744	0.001
Digestibilidad		
MS	0.231	0.001
Almidón	0.229	0.064
PB	0.717	0.283
FDN	0.312	0.001
Componentes Sanguíneos		
BHB	0.303	0.043
AGNE	0.278	0.605
Insulina	0.178	0.098
Glucosa	0.652	0.016

CUADRO 3.—Efecto de la adición de una fuente de  $\alpha$ -amilasa comercial, de una proteasa experimental y la combinación de ambas enzimas en la dieta sobre el consumo y la digestibilidad de nutrientes y concentración de componentes en la sangre.

Variable dependiente	Tratamiento Experimental				EEM <sup>1</sup>
	Control T1	Amilasa T2	Proteasa T3	A + P T4	
Dietas (g/d) Ofrecido					
MS	1,235.80	1,218.87	1,201.65	1,193.49	40.82
Almidón	257.46	254.13	250.43	248.42	8.47
PB	207.09	204.37	201.42	199.88	6.82
FDN	441.43	435.04	429.09	426.71	14.66
Rechazado					
MS	129.61	131.28	96.78	104.94	21.99
Almidón	0.72	0.00	0.00	1.68	0.89
PB	6.88	6.56	4.83	6.19	1.27
FDN	92.06	94.52	69.68	72.63	15.69
Consumido					
MS	1,106.19	1,087.60	1,104.87	1,088.55	38.42
Almidón	256.74	254.13	250.43	246.74	8.61
PB	200.20	197.80	196.58	193.68	6.58
FDN	349.37	340.52	359.41	354.08	16.72
Digestibilidad (%)					
MS	72.96	72.09	72.04	71.86	0.64
Almidón	98.91	98.00	98.93	99.04	0.42
PB	76.05	75.45	75.92	75.86	0.66
FDN	48.15	45.55	48.75	48.42	1.61
Parámetros de la Sangre					
BHB, mg/dL	4.69	4.17	4.24	4.37	0.31
AGNE, mEq/L	0.14	0.17	0.13	0.18	0.02
Insulina, pmol/L	73.42	70.17	84.00	76.67	6.70
Glucosa, mmol/L	4.19	4.20	4.13	4.03	0.12

<sup>1</sup>Error estándar de la media

Al efectuar comparaciones entre las medias de tres combinaciones de tratamientos; los con amilasa versus sin amilasa (T2+T4 vs. T1+T3), los con proteasa versus sin proteasa (T3+T4 vs. T1+T2) y el control (ninguna enzima) versus los tres tratamientos con adición de enzimas (T1 vs. T2+T3+T4), se detectaron algunas diferencias significativas en las variables evaluadas (Cuadros 4 y 5). Los corderos alimentados con la proteasa experimental en la dieta (T3 y T4) consumieron menos almidón ( $P < 0.05$ ) que aquellos sin recibir la enzima (T1 y T2). También se verificó una tendencia ( $P = 0.09$ ) a mayor consumo de almidón en los corderos control (T1) que en los alimentados con una o ambas enzimas en la dieta (T2, T3 y T4). La diferencia ( $P < 0.05$ ) detectada en la digesti-

CUADRO 4.—Niveles de probabilidad de los contrastes entre cuatro combinaciones de tratamientos basados en los cuadrados medios esperados por tratamiento ajustado por la prueba de comparaciones múltiples Tukey-Kramer.

Variable dependiente	amilasa vs. no amilasa (T2+T4 vs. T1+T3)	proteasa vs. no proteasa (T3+T4 vs. T1+T2)	enzimas vs. no enzimas (T2+T3+T4 vs. T1)	amilasa vs. proteasa (T2 vs. T3)
<b>Consumo</b>				
MS	0.4189	0.9931	0.6144	0.5707
Almidón	0.3166	0.0344	0.0874	0.4036
PB	0.3121	0.1431	0.1699	0.7389
FDN	0.5731	0.3508	0.8923	0.2918
<b>Digestibilidad</b>				
MS	0.1795	0.1902	0.0439	0.9808
Almidón	0.3194	0.1871	0.5785	0.1052
PB	0.4821	0.7675	0.5675	0.4806
FDN	0.2755	0.1964	0.7097	0.0958
<b>Componentes de la Sangre</b>				
BHB	0.3489	0.5542	0.0800	0.8043
AGNE	0.0640	0.7854	0.4921	0.1306
Insulina	0.2793	0.0855	0.5295	0.0506
Glucosa	0.6825	0.3188	0.5918	0.6740

bilidad de la MS también favoreció el control (T1) sobre los tratamientos que incluyeron enzimas (T2, T3 y T4).

Referente a los componentes de la sangre evaluados, al realizar los contrastes de las combinaciones de los tratamientos se encontró que la concentración de BHB tendió (P=0.08) a ser menor en corderos alimentados con la amilasa comercial (T2), la proteasa experimental (T3) o la combinación de ambas enzimas (T4) que en el control (T1) (Cuadro 4 y 5). Se observó una tendencia (P=0.064) a aumentar la concentración de AGNE en animales alimentados con dietas conteniendo  $\alpha$ -amilasa (T2 y T4) que en aquellos sin la enzima (T1 y T3). En corderos alimentados con proteasa en la dieta (T3 y T4) los niveles de insulina tendieron (P=0.08) a ser superiores que en aquellos alimentos sin esta enzima (T1 y T2).

En este experimento, al adicionar la proteasa experimental en dietas para corderos conteniendo 21% de almidón disminuyó (P<0.05) el consumo del mismo, aunque esto puede no ser de importancia a nivel práctico, dada la pequeña diferencia entre estos valores (249 vs. 255 g/d) (Cuadro 5). El consumo del polisacárido tendió a ser menor también en las tres dietas con enzimas (250 g/d) que en el control (257 g/d). Resultó significativa (P<0.05) la disminución en la digestibilidad de la MS (73.0 vs. 72.0%) en las dietas con las enzimas versus el control.

CUADRO 5.—*Contrastes de medias con ajuste por comparaciones múltiples de los cuadrados medios esperados de las combinaciones de los tratamientos evaluados.*

Variable dependiente	amilasa vs. no amilasa (T2+T4 vs T1+T3)	proteasa vs. no proteasa (T3+T4 vs T1+T2)	enzimas vs. no enzimas (T2+T3+T4 vs T1)	amilasa vs. proteasa (T2 vs T3)
Consumo, g/d				
MS	1,088.08	1,096.71	1,093.67	1,088.08
Almidón	250.44	248.59 a	250.43 z	250.44
PB	195.74	195.13	196.02	195.74
FDN	347.30	356.75	351.34	347.30
Digestibilidad, %				
MS	71.98	71.95	72.00 a	71.98
Almidón	98.52	98.99	98.66	98.52 z
PB	75.65	75.89	75.74	75.65
FDN	46.99	48.59	47.57	46.99 z
Parámetros de la Sangre				
BHB, mg/dL	4.27	4.31	4.26 y	4.27
AGNE, mEq/L	0.17 z	0.15	0.16	0.17
Insulina, pmol/L	73.42	80.33 z	76.94	73.42 b
Glucosa, mmol/L	4.12	4.08	4.12	4.12

<sup>a, y</sup>Medias con letras diferente dentro de cada comparación diferen (p<0.05)

<sup>z</sup>Medias con letras diferente dentro de cada comparación diferen (p<0.10)

Al utilizar la  $\alpha$ -amilasa comercial no se observaron efectos sobre el CV, ni la digestibilidad de las fracciones estudiadas.

En otros estudios relacionados se han encontrado efectos positivos, negativos o ninguno al utilizar aditivos de enzimas exógenas en dietas para rumiantes. Muchas de esas investigaciones han tenido como objetivo la evaluación de enzimas exógenas tipo fibrolíticas para mejorar el consumo y la digestibilidad de los carbohidratos estructurales presentes en la pared de las células vegetales.

Aunque en menor magnitud, la utilización de enzimas exógenas para degradar los componentes presentes en el contenido celular de los granos de cereales ha sido también objeto de investigaciones en los últimos años. En un estudio, la adición de una  $\alpha$ -amilasa en la dieta para vacas lecheras, conteniendo de 26 a 31% de almidón procedente mayormente de granos secos de maíz, no afectó el CV, ni la producción y composición química de la leche, pero se observó una tendencia a aumentar la digestibilidad de la FDN al adicionar la enzima (Weiss et al., 2011). Semejante efecto no se manifestó en el experimento presente. Se ha sugerido que un efecto beneficioso de la adición de  $\alpha$ -amilasa exógena sobre la digestibilidad de FDN, si lo hubiera, sería una consecuencia de una mayor eficiencia de utilización de almidón a nivel ruminal (Tricarico et al., 2008). Posiblemente la alimentación cruzada de oligosacáridos entre los microorganismos retículo-ruminales, como resultado del aumento en la degradabilidad del almidón al adicionar la enzima, podría ser el mecanismo para semejante mejora en la digestibilidad de la pared celular (Russell y Strobel, 1989). Según otra explicación, al mejorar la degradabilidad del almidón en el complejo retículo-ruminal mediante la adición de  $\alpha$ -amilasa se mantienen niveles más consistentes de ciertos sustratos que requieren bacterias utilizadoras de ácido láctico, estimulando así la transformación de ácido láctico en otros compuestos y consecuentemente reduciendo la acidez del contenido retículo-ruminal. Un pH ruminal menos ácido y más estable beneficia la población de las bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas, mejorando consecuentemente la digestibilidad de la FDN. La lógica de estas posibles explicaciones podría aplicarse también al caso de una mejora en la digestibilidad de la FDN como resultado indirecto de la acción de una proteasa sobre los gránulos de almidón en el maíz, siendo esto compatible con el efecto de la enzima observado en el presente estudio (48.59 vs. 46.85%; aunque a  $P < 0.20$ ) (Cuadros 4 y 5).

Una tercera teoría postula que la adición de  $\alpha$ -amilasa exógena a la dieta resulta en fermentaciones ruminales secundarias, que generan sustratos en forma de ciertos ácidos grasos volátiles (AGV) de cadena ramificada, necesarios estos para el crecimiento y proliferación

de bacterias celulolíticas, lo que a su vez resulta en un aumento en la degradabilidad de las paredes celulares. Una cuarta teoría plantea que adicionar  $\alpha$ -amilasa exógena a la dieta genera una competencia entre las diversas bacterias ruminales que degradan almidón como sustrato, con disminución en las poblaciones de aquellas que producen ácido láctico en mayor proporción. Gencoglu et al. (2010) evaluaron el efecto de la adición de  $\alpha$ -amilasa en dietas con alto o bajo contenido de almidón (27.1 y 20.7%) en vacas lecheras lactantes y observaron un mayor consumo de MS y digestibilidad de la mayoría de los otros nutrientes con la excepción del almidón, que fue similar con o sin adición de la enzima en animales alimentados con la dieta baja en almidón. El PV y el índice de condición corporal de los animales no fueron afectados por los tratamientos. Dilorenzo et al. (2010) suplementaron una dieta basada en granos de maíz en forma de hojuelas secadas a vapor o el mismo grano rolado seco, con adición de  $\alpha$ -amilasa exógena a 600 KNU/kg MS y no obtuvieron un efecto sobre la digestibilidad de nutrientes ni sobre el desempeño de novillos en engorde. Asimismo, Ferraretto et al. (2011) adicionaron amilasa exógena a una dieta para vacas lactantes baja en almidón, lo que resultó en beneficio mínimo sobre el rendimiento y la composición de la leche. Rojo et al. (2005) observaron una disminución en el CV a medida que aumentaba el nivel de  $\alpha$ -amilasa suplementaria en la dieta. En dicho experimento se evaluaron in vivo dos enzimas exógenas industriales, una  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* y una glucoamilasa de *Aspergillus niger*. Usaron seis corderos (30 kg PV) equipados con cánulas ruminales y duodenales, cuya dieta incluyó 700 g/kg MS de granos de sorgo, para determinar el efecto de las enzimas sobre la ingestión, digestibilidad y fermentación ruminal. A medida que la adición de  $\alpha$ -amilasa aumentó, disminuyó el consumo de MS y de almidón, pero a su vez aumentó la digestibilidad de estas dos fracciones. Estos resultados sugieren que dicha enzima podría tener utilidad en rumiantes a los cuales se les ofrecen dietas altas en granos pero de relativa baja digestibilidad.

La utilización de proteasas como aditivo en dietas para rumiantes ha sido menos evaluada que la adición de  $\alpha$ -amilasa. En el presente experimento se observó una menor ingestión de almidón conjuntamente con una tendencia a mayor concentración de insulina en la sangre de los corderos al recibir las dietas conteniendo proteasa versus las sin proteasa. Con respecto a la digestibilidad, se infiere que la adición de la proteasa ocasiona cambios en la superficie externa de las proteínas que cubren el germen y endocarpio del grano de maíz, lo que en teoría provocaría un aumento en su degradabilidad ruminal y/o digestibilidad intestinal del almidón. Sin embargo, en este experimento la ventaja

sobre la digestibilidad de almidón fue escasamente a favor de proteasa versus no proteasa (T3 + T4 vs. T1 + T2) (98.99 vs. 98.46%,  $P < 0.19$ ). En teoría la mayor degradación del almidón pudo ocasionar un aumento en la absorción posterior de glucosa a nivel intestinal y por ende un aumento en la concentración de insulina, tal como se observó.

El hecho de que la utilización de enzimas como aditivo en dietas para rumiantes resulta en cambios en la concentración de algunos componentes sanguíneos sugiere que existen efectos sobre el metabolismo de los lípidos e hidratos de carbono en el cuerpo. DeFrain et al. (2005) estudiaron la suplementación con  $\alpha$ -amilasas en dietas para vacas lactantes y verificaron diferencias en los niveles sanguíneos de indicadores claves del metabolismo energético, como cuerpos cetónicos, hormonas y glucosa. En cambio, los efectos de la suplementación enzimática sobre la composición de la leche fueron mínimos. Estos autores observaron que las concentraciones plasmáticas pre-parto de BHB y AGNE aumentaron en vacas alimentadas con adición de  $\alpha$ -amilasa exógena en la dieta en comparación con los animales sin recibir la enzima. En las vacas lecheras post-parto las concentraciones plasmáticas de glucosa mostraron una tendencia ascendente como resultado de la adición de  $\alpha$ -amilasa en la dieta. Se sugirió que estos cambios, en BHB y AGNE pre-parto y glucosa post-parto, podrían ser el resultado de un cambio hacia menor dependencia del metabolismo de grasas y mayor en la utilización de carbohidratos en vacas suplementadas con la  $\alpha$ -amilasa. Otros autores han observado que ovinos subnutridos presentan concentraciones de AGNE superiores a las de animales con una alimentación adecuada (Fernández-Foren et al., 2011; Al-Qarawi, 2004). Nuñez-Ochoa y Boauda (2007) notaron que la concentración de BHB en la sangre de corderos tiende a aumentar cuando hay deficiencias energéticas en las dietas. La secreción de insulina es acelerada por la buena alimentación (Sano et al., 1999) y al contrario inhibida por la subnutrición (Jimeno et al., 2001). En el presente estudio se verificó una tendencia a disminuir la concentración de BHB en corderos alimentados con las enzimas en la dieta relativo al control (4.26 vs. 4.69 mg/dL; Cuadro 5). La adición de  $\alpha$ -amilasa en la dieta tendió a aumentar la concentración de AGNE (0.17 vs. 0.14 mEq/L; Cuadro 5) en relación a corderos alimentados sin la enzima. En cambio, los niveles de glucosa fueron similares entre todos los tratamientos experimentales. A pesar de las diferencias citadas en los niveles de BHB e insulina en la sangre entre corderos con o sin las enzimas suplementarias, los niveles de estos componentes y los de glucosa se mantuvieron dentro de los límites normales para ovinos [BHB = 2.08 a 6.25 mg/DL, Wittwer (2006); insulina = 16.67 a 250 pmol/L, Duygu-Udum et al. (2008); glucosa = 2.4 a 4.4

mmol/L, Wittwer (2006)]. La excepción a esta respuesta la constituyeron los niveles de AGNE, que fueron inferiores a los publicados como guías de lo normal [0.6769 mEq/L, Wittwer (2006)].

Los resultados de este experimento, en resumen, indican ausencia de diferencias significativas sobre el CV de MS, PB y FDN por los ovinos entre las cuatro dietas experimentales. El consumo de almidón se vio afectado negativamente ( $P < 0.05$ ) por la presencia de la enzima proteasa experimental, tanto sola como en combinación con  $\alpha$ -amilasa, en comparación con las dietas sin la proteasa. Se observó una menor digestibilidad de MS ( $P < 0.05$ ) al añadir una o ambas enzimas en las dietas de los ovinos, en comparación con el testigo. Se observó una tendencia ( $P < 0.10$ ) en el aumento del nivel de AGNE por la presencia de la enzima  $\alpha$ -amilasa en la dieta de los ovinos. Por el contrario, el nivel de BHB tendió ( $P < 0.10$ ) a disminuir al suministrar las enzimas en la dieta. La actividad de insulina tendió ( $P < 0.10$ ) a aumentar al añadir proteasa a la dieta. Sin embargo, la concentración de glucosa no varió en respuesta a los tratamientos esperados.

Según la evaluación realizada hasta la fecha, la magnitud del efecto encontrado al añadir las enzimas en la dieta de los rumiantes no justificaría su utilización en la práctica. Sin embargo, estas enzimas merecen un estudio más a fondo para determinar los efectos de su adición en dietas con diferentes niveles de almidón con miras a lograr una mayor efectividad de las mismas.

### CONCLUSIONES

Al incluir enzimas en la alimentación de los ovinos, en este experimento se observaron algunas diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) y tendencias ( $P < 0.10$ ) atribuibles a las mismas, en variables de consumo y digestibilidad de las dietas, así como en ciertos parámetros fisiológicos. Sin embargo, no queda claro cuán importante puede ser la adición dietética de las enzimas en los rumiantes a nivel práctico.

### LITERATURA CITADA

- Al-Qarawi, A., 2004. Changes in plasma insulin, thyroid hormones, non-esterified fatty acids and blood glucose in underfed najdi lambs. *Benha Vet. Med. J.* 15 (2): 1-8.
- Britton, R. y R. Stock, 1986. Acidosis, rate of starch digestion and intake. Agricultural Experiment Station, Oklahoma State University (ed.), pp. 125-136.
- Campbell, G. y M. Bedford, 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: a review. *Can. J. Anim. Sci.* 72: 449-466.
- Defrain, J. M., A. R. Hippen, K. F. Kaisceur y J. M. Tricarico, 2005. Effects of dietary  $\alpha$ -amilase on metabolism and performance of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88: 4405-4413.
- Dilorenzo, N., D. R. Smith, M. J. Quinn, M. L. May, C. H. Ponce, W. Steinberg, H. A. Engstrom y M. L. Galyean, 2010. Effects of grain processing and supplementation

- with exogenous amylase on nutrient digestibility in feedlot diets. *Livest. Sci.* Doi: 10.1016/j.livsci.2010.11.003.
- Duygu-Udum, C., M. Cetin, F. Balci, N. Gunes y C. Hecer, 2008. Effects of plasma insulin, glucose and NEFA concentrations of feeding frequency during long term in lambs. *J. Biol. Environ. Sci.* 2: 45-51.
- Fernández-Foren, A., J. Avecia, M. Vázquez, F. Forcada, I. Sartore y M. Carriquiry, 2011. Restricción alimenticia en ovinos: Respuesta endocrinometabólica dependiente de las reservas corporales. *Información Técnica Económica Agraria* 107 (4): 257-271.
- Ferraretto, L. F., R. D. Shaver, M. Espineira, H. Gencoglu y S. J. Bertics, 2011. Influence of a reduced-starch diet with or without exogenous amylase on lactation performance by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94: 1490-1499.
- Gencoglu, H., R. D. Shaver, W. Stenberg, J. Ensink, L. F. Ferraretto, S. J. Bertics, J. C. Lopes y M. S. Akins, 2010. Effect of feeding a reduced-starch diet with or without amylase addition on lactation performance of cows. *J. Dairy Sci.* 93: 723-732.
- Huntington, G., 1997. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *J. Anim. Sci.* 75: 852-867.
- Jimeno, V., T. Castro y P. Rebollar, 2001. Interacción nutrición-reproducción en ovino de leche. XVII Curso de Especialización FEDNA (Fundación española para el desarrollo de la nutrición animal): Avances en Nutrición y Alimentación Animal.
- Klingerman, C. M., W. Hu, E. Mckonell, M. DerBedrosian y L. Kung Jr., 2009. An evaluation of exogenous enzymes with amylolytic activity for dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92: 1050-1059.
- Mendoza, M., R. Britton y R. Stock, 1994. Effect of protozoa and urea level on in vitro starch disappearance and amylolytic activity of ruminal microorganisms. *Anim. Feed Sci. Technol.* 54: 315-325.
- Mendoza, M., R. Britton y R. Stock, 1993. Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.* 71: 1572-1578.
- National Research Council – NRC, 2001. Nutrient requirements of small ruminants. National Academy Press, Washington, DC.
- Núñez-Ochoa, L. y J. Boauda, 2007. Patología Clínica Veterinaria (1era ed.). L. Núñez-Ochoa y J. Boauda (eds.). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México.
- Owens, F., D. Secrist, W. Hill y D. Gill, 1997. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 75: 868-879.
- Pinos-Rodríguez, J. y S. González-Muñoz, 2000. Efectos biológicos y productivos de los ionóforos en rumiantes. *Interciencia* 25 (8): 379-385.
- Reilly, P., 1985. Enzymic degradation of starch. *En: Starch Conversion Technology*. G.M. Beyumm and J.A. Roels (eds). Macel Dekker, Inc. N.Y. p. 345.
- Rojo, R., G. Mendoza, S. González, L. Landois, R. Bárcena y M. Crosby, 2005. Effects of exogenous amylases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* on ruminal starch digestion and lamb performance. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 655-665.
- Rojo-Rubio, R., G. Mendoza-Martínez y M. Crosby-Galván, 2001. Uso de la amilasa termoestable de *Bacillus licheniformis* en la digestibilidad in vitro del almidón de sorgo y maíz. *Agrociencia* 35: 423-427.
- Russell, J. y H. Strobel, 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1-6.
- Sano, H., A. Takebayahi, Y. Kodama, K. Nakamura, H. Ito y Y. Arino, 1999. Effects of feed restriction and cold exposure on glucose metabolism in response to feeding and insulin in sheep. *J. Anim. Sci.* 77(2): 564-2573.
- SAS Institute Inc., 2009. SAS/STAT® 9.2 User's Guide, Second Edition. Cary, NC.
- Tricarico, J. M., J. D. Johnston y K. A. Dawson, 2008. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amilasa. *En: Enzymes, direct fed microbials and plant extracts in ruminant nutrition* R. J. D. Wallace, D. Colombatto y P. H. Robinson (eds.). *Anim Feed Sci. Technol.* 145: 136-150.

- Walsh, G., R. Power y D. Headon, 1993. Enzymes in animal feed industry. *Trends Biotechnol.* 11: 424-430.
- Weiss, W., W. Steinberg y M. Engstrom, 2011. Milk production and nutrient digestibility by dairy cows when fed exogenous amylase with coarsely ground dry corn. *J. Dairy Sci.* 94: 2492-2499.
- Wittwer, F., 2006. Exploración clínica de los animales domésticos. *En: Patología Clínica Animal*. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile. pp.92-148.
- Yanke, L., Y. Dong, T. Callister, H. Baem y K. Cheng, 1993. Comparison of amylolytic activities of ruminal fungi grown on cereal grains. *Can. J. Microbiol.* 39: 817-820.