

Enzimas exógenas fibrolíticas afectan la composición química, consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes de heno de pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.)^{1,2}

Karla Tous-Rivera³, Elide Valencia⁴, Abner A. Rodríguez⁵,
Paul F. Randel⁶ y Adesogan Adegbola⁷

J. Agric. Univ. P.R. 94(1-2):131-146 (2010)

RESUMEN

Se realizaron dos experimentos para determinar el efecto de la aplicación de enzimas exógenas de tipo fibrolíticas sobre la composición química, consumo voluntario (CV), digestibilidad de varias fracciones químicas y degradabilidad de la materia seca aparente (DIVMS_a) y verdadera (DIVMS_v) de heno de pasto guinea (HPG) [*Panicum maximum* Jacq. (= *Urochloa maxima* (Jacq.) R. Webster)]. Los productos enzimáticos utilizados fueron Promote^{NET} y Biocellulase^{A-20} derivados de *Trichoderma longibratum* y *Aspergillus reesei*, con potencia principalmente de celulasas y xilanasas. En el primer experimento, nueve carneros cruzados Blackbelly x criollo, de 26.8 kg peso vivo (PV) promedio se usaron en un diseño de Cuadrado Latino 3 x 3 con tres periodos experimentales de 18 días de duración. Los tratamientos consistieron de heno sin aditivo (testigo), heno tratado con Promote^{NET} y heno tratado con Biocellulase^{A-20}, aplicado por rociada 24 h antes de ofrecerse a los animales. El ofrecimiento diario de heno fue al 4% del PV en base seca (BS). Los tratamientos enzimáticos aumentaron los contenidos de materia seca (MS) y proteína bruta (PB) en el HPG respecto al testigo (P < 0.05); también se observó una tendencia a reducir las concentraciones de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y hemicelulosa, pero la misma no fue significativa (P > 0.05). El CV de MS de los HPG tratados con Biocellulase^{A-20} y Promote^{NET} (1,139 y 938 g/d, respectivamente) superaron al testigo (921 g/d). Los consumos de PB, FDN y FDA de HPG tratado con Biocellulase^{A-20} fueron mayores (P < 0.05) que los de HPG sin aditivo o tratado con Promote^{NET}.

¹Manuscrito sometido a la Junta Editorial el 17 de octubre de 2008.

²Esta investigación se realizó con fondos del programa del USDA-Tropical and Subtropical Agriculture Research (TSTAR 125).

³Ex-estudiante graduado, Departamento de Industria Pecuaria, Box 9000, Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, PR 00681

⁴Catedrático, Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales, Box 9000, Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, PR 00681. Autor para correspondencia. Tel.: 787-265-3851, E-mail: elideval@uprm.edu

⁵Catedrático, Departamento de Industria Pecuaria, Box 9000, Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, PR 00681.

⁶Catedrático, Departamento de Industria Pecuaria, HC-02 Box 11656, Subestación de Lajas, Universidad de Puerto Rico, Lajas, PR 00667-9801.

⁷Catedrático, Departamento de Ciencia Animal, Universidad de la Florida, Gainesville, FL.

El consumo diario de MS como porcentaje del PV fue mayor ($P < 0.05$) en corderos alimentados con HPG tratado con ambos productos enzimáticos respecto al testigo (4.06% con Biocellulase^{A-20}, 3.15% con Promote^{NET} vs. 2.86% con el testigo). La digestibilidad aparente de la MS aumentó ($P < 0.05$) por 5.89 y 4.24 puntos porcentuales en los henos tratados con Biocellulase^{A-20} y Promote^{NET} respecto al testigo (50.12%). Se observaron aumentos significativos en la digestibilidad de otras fracciones para HPG tratado con Biocellulase^{A-20} y Promote^{NET} (PB, 3.23 y 3.18; FDN, 7.96 y 4.31; FDA, 7.69 y 7.9 unidades porcentuales, respectivamente). La digestibilidad de MS, de PB y de FDA no difirieron ($P > 0.05$) entre los dos tratamientos enzimáticos, mientras que la digestibilidad de FDN fue mayor para el HPG tratado con Biocellulase^{A-20}. En el segundo experimento se encontró que las DIVMS_A y DIVMS_V fueron mayores ($P < 0.05$) para el HPG tratado con ambas enzimas respecto al testigo (DIVMS_A por 2.75 y 2.12 unidades porcentuales para Biocellulase^{A-20} y Promote^{NET}; DIVMS_V por 2.42 y 1.73 unidades, respectivamente). Estos resultados indican que la aplicación de complejos enzimáticos fibrolíticos a henos de gramíneas tropicales de baja calidad puede mejorar la calidad nutritiva sustancialmente.

Palabras clave: Enzimas, composición química, consumo voluntario y digestibilidad

ABSTRACT

Exogenous fibrolytic enzymes affect chemical composition, animal intake and digestibility of guinea grass hay (*Panicum maximum* Jacq.)

Two experiments were conducted for determining effects of applying exogenous fibrolytic enzymes to guineagrass hay (GH) [*Panicum maximum* Jacq. (= *Urochloa maxima* (Jacq.) R. Webster)] upon chemical composition, voluntary intake (VI), digestibility of various chemical fractions, and apparent and true dry matter (DM) degradability. The enzymatic products used were Promote^{NET} and Biocellulase^{A-20}, derived from *Trichoderma longibratum* and *Aspergillus reesei*. These products contain mainly cellulase and xylanase. In the first experiment, nine mature Blackbelly x creole crossbred rams of 26.8 kg mean body weight (BW) were used in a 3 x 3 Latin Square design, with 18-d periods. Treatments consisted of untreated hay (control), hay treated with Promote^{NET}, and hay treated with Biocellulase^{A-20}, applied by spraying 24 h prior to feeding. Daily hay offerings were at 4% of BW on a dry matter (DM) basis. Enzyme treatment increased contents of DM and crude protein (CP) in the treated GH in comparison with those contents of the untreated hay. A tendency to reduce neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and hemicellulose concentrations through the enzymatic treatments was also observed but was not significant ($P > 0.05$). The VI of DM of hays treated with Biocellulase^{A-20} and Promote^{NET} (1,139 and 938 g DM/d, respectively) exceeded that of the control (921 g DM/d). The VI of CP, NDF and ADF were higher for hay treated with Biocellulase^{A-20} than for GH untreated or treated with Promote^{NET}. Rams fed enzyme-treated hay had higher ($P < 0.05$) DM intake as a percentage of BW when compared with those fed untreated GH (4.06% for Biocellulase^{A-20}, 3.15% for Promote^{NET}, and 2.86% for the control). Apparent DM digestibility increased ($P < 0.05$) by 5.89 and 4.24 percentage units for Biocellulase^{A-20}- and Promote^{NET}-treated hays in comparison with that of the control (50.12%). Significant increases over the control were observed in digestibility of three other fractions for GH treated with Biocellulase^{A-20} and Promote^{NET} (CP, 3.23 and 3.18; NDF, 7.96 and 4.31; ADF, 7.69 and 7.9 percentage units). Digestibility of dry matter, CP and ADF did not differ ($P > 0.05$) between enzymatic treatments, whereas NDF digestibility was higher ($P < 0.05$) for GH treated with Biocellulase^{A-20}. In the second ex-

periment, apparent dry matter degradability (IVDMDA) and true dry matter degradability (IVDMDT) were found to be higher ($P < 0.05$) for GH treated with both enzymes than for those of the control (IVDMDA by 2.75 percentage units for Biocellulase^{A-20}, 2.12 for Promote^{NET}; IVDMDT by 2.42 and 1.73 units, respectively). These results indicate that application of fibrolytic enzymatic complexes to low-quality tropical grass hay can improve the nutritional value substantially.

Key words: Enzymes, chemical composition, voluntary intake and digestibility

INTRODUCCIÓN

La crianza de pequeños rumiantes (ovinos y caprinos) en Puerto Rico representa una alternativa interesante para los productores locales debido principalmente a limitaciones de terreno para la producción de vacunos para carne y leche. Además, el bajo costo de inversión inicial que esta alternativa representa, comparado con el costo en las otras empresas pecuarias, la hacen económicamente atractiva. Actualmente, el pastoreo de gramíneas tropicales naturalizadas (GTN) es el método más común para la alimentación de pequeños rumiantes, debido a su bajo costo de establecimiento y facilidad de manejo. Sin embargo, esta práctica se ve limitada en periodos de sequía, cuando ocurre una disminución en la disponibilidad y la calidad del forraje. Ante esta situación, los productores locales de pequeños rumiantes han adoptado el uso de forraje henificado como base de la alimentación. Su bajo costo de producción, facilidad de almacenamiento y disponibilidad en tiempos de sequía hacen del uso de heno, producido en la finca o comprado, una alternativa satisfactoria en algunos casos. Sin embargo, uno de los factores limitantes al alimentar los hatos con heno de GTN es su bajo valor nutritivo (en términos de composición química, CV y digestibilidad) debido a las características inherentes de estas especies y a la falta de controles que garanticen o determinen la calidad de los henos comerciales.

Se ha dedicado mucha investigación a evaluar distintas metodologías físicas y químicas para mejorar el valor nutritivo de diversos alimentos utilizados en la nutrición animal. El costo de procesamiento al utilizar métodos físicos y las exigencias de bioseguridad al utilizar métodos químicos ha sido disuasivo, por lo que se han enfocado los nuevos esfuerzos a la evaluación de métodos biológicos. Entre estos métodos se encuentra la utilización de inóculos microbianos y enzimas exógenas para mejorar el valor nutritivo de los alimentos. Las enzimas exógenas tipo oligosacaridas han sido ampliamente evaluadas como mejoradoras del valor nutritivo en dietas para no-rumiantes, mayormente en porcinos y aves (pollos de engorde) (Rode y Beauchemin, 1998). Las enzimas exógenas de tipo fibrolíticas han sido utilizadas como aditivo para pro-

mover la fermentación durante el proceso de ensilaje (Lewis et al., 1996). Asimismo, la práctica de rociar productos enzimáticos sobre el forraje al momento de ofrecerse al ganado es otra alternativa novel que está bajo estudio. La mayoría de los estudios para evaluar este tipo de aditivo en dietas para rumiantes han utilizado ganado vacuno lechero y especies forrajeras de clima templado. Las respuestas obtenidas han variado ampliamente entre positivas (aumento en la digestibilidad del forraje y en el rendimiento animal), negativas (disminución en ganancia de peso diaria y en digestibilidad de la MS), y no efecto. Esta variabilidad en respuesta a la utilización de enzimas fibrolíticas exógenas en la alimentación de rumiantes se debe a la amplia diversidad de productos existentes, que varían en el tipo de enzima que contienen, la fuente de la misma (cepa microbiana, ej., bacterianas o micóticas), el método de aplicación al forraje, la tasa de inclusión y la actividad enzimática. También intervienen factores de la planta como la especie forrajera y su estado de madurez.

Están ampliamente documentadas las diferencias en la composición y distribución de los componentes de la pared celular entre forrajeras de clima templado y tropical. También es bien conocido el efecto adverso de la madurez sobre el valor nutritivo de los forrajes en general. Sin embargo, se conoce poco sobre la eficacia de enzimas exógenas fibrolíticas para mejorar el valor nutritivo de GTN cosechadas y henificadas en avanzado estado de madurez. Se necesita investigación para verificar la utilidad y potencial de enzimas exógenas fibrolíticas para mejorar el valor nutritivo de dicho tipo de henos y su consecuente utilización en la alimentación de ovinos y caprinos.

El objetivo de este estudio fue determinar los efectos de la aplicación de dos preparaciones comerciales de enzimas exógenas tipo fibrolíticas sobre la composición química, consumo voluntario y digestibilidad de heno de pasto guinea cosechado a ocho semanas de madurez. Además, se evaluó los efectos de estas dos preparaciones de enzimas sobre la degradabilidad aparente y verdadera de la MS del mismo heno.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Laboratorio de Nutrición y Alimentación Animal del Departamento de Industria Pecuaria y en el pabellón de pequeños rumiantes localizado en las facilidades de la Finca Alzamorá, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. Se evaluó el efecto de la adición de dos complejos comerciales conteniendo enzimas exógenas tipo fibrolíticas sobre la composición química, CV y digestibilidad de heno de pasto guinea (HPG). Además, se determinó la degradabilidad aparente ($DIVMS_A$) y verdadera ($DIVMS_V$) de la MS del HPG.

El material vegetativo se cosechó a las ocho semanas de rebrote en la Estación Experimental Agrícola de Fortuna, en Juana Díaz.

Se evaluaron los efectos de dos complejos de enzimas exógenas: Promote^{NET} (Agribrand, Canadá)⁸ y Biocellulase^{A-20} (Loders Croklaan, Channahon, IL, EE.UU.) (Cuadro 1). Para dicha evaluación se realizó un ensayo metabólico, utilizando carneros como unidades experimentales, mediante la técnica de recolección total de heces fecales. Se cuantificó el consumo y la digestibilidad de MS, PB y paredes celulares (FDN) del HPG. Como unidades experimentales se utilizaron nueve carneros cruzados Barbados Blackbelly × criollo de 26.8 kg de PV promedio. Previo al experimento, los carneros se desparasitaron (Ivomec®) y esquilaron. Los animales se asignaron aleatoriamente a los tres tratamientos experimentales y se colocaron en jaulas metabólicas provistas de comederos y bebederos, por un periodo de adaptación de 7 d previo al experimento. Se realizó el ensayo metabólico para evaluar tres tratamientos en tres periodos experimentales. Los tratamientos experimentales fueron un testigo de HPG ofrecido sin el aditivo y HPG tratado con cada uno de los complejos enzimáticos Promote^{NET} y Biocellulase^{A-20}.

Se redujo el tamaño de partícula del HPG trozándolo con una cortadora comercial a aproximadamente 8 cm de largo, con el propósito de reducir la ingestión selectiva por los carneros. Posteriormente, ambos productos enzimáticos se aplicaron (rociados con una bomba de espalda) directamente al forraje 24 h antes de ofrecerlo a los animales.

CUADRO 1. Descripción de enzimas exógenas comerciales tipo fibrolíticas evaluadas.

Características	Enzima ¹	Enzima ¹
Nombre comercial	Promote ^{NET}	Biocellulase ^{A-20}
Fuente (microorganismos)	<i>Trichoderma longibratum</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Enzimas activas	celulasa	xilanasa, celulasa, β-glucanasas
Razón de aplicación recomendada	0.65 mg/kg	14.5 mg/kg
pH óptimo	5.0	5.0
Temperatura óptima	40° C	39° C
Actividad enzimática celulasa ² (fpu/g)	33.7	51.3
Actividad enzimática xilanasa ³ μmol/min/ml)	5,190	3,530

¹Información suministrada por fabricante

²Unidades de papel filtro por gramo.

³Micromoles de xilosa equivalentes liberados, liberados por mililitro por minuto.

⁸Las marcas registradas sólo se usan 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.

Para su aplicación, las enzimas se diluyeron con agua destilada a la razón recomendada por el fabricante de 1:10 y 1:20 para Promote^{NET} y Biocellulase^{A-20}, respectivamente. Los productos enzimáticos se añadieron al forraje a una razón de 0.65 mg/kg MS para Promote^{NET} y a 16.5 mg/kg en base húmeda (BH) para Biocellulase^{A-20} (dosis recomendadas según experimentos previos). El heno se ofreció a los carneros diariamente a razón del 4% del PV en base seca.

Se utilizaron tres carneros por tratamiento en cada uno de los tres periodos experimentales de 18 d de duración, con adaptación a las dietas experimentales por 12 d y recolección de datos comparativos por 6 d. Durante la adaptación a la dieta se ofreció el HPG al 4% del PV en base seca ajustando la cantidad diariamente para obtener 20% de rechazo en base seca.

Los carneros se pesaron al comienzo y final de cada periodo experimental. Se cuantificó el consumo voluntario de forraje por cada animal y se tomaron muestras del alimento ofrecido y el rechazado. Para determinar la digestibilidad aparente de la MS, PB y fracciones de las paredes celulares (FDN y FDA), diariamente se pesaron las heces fecales en su totalidad, y se tomaron y almacenaron alícuotas representativas (10% del total) para análisis químicos posteriores.

Muestras compuestas del forraje ofrecido, del rechazado y de las heces individuales por periodo experimental se molieron, se pasaron a través de un cedazo de 1 mm de porosidad, y se almacenaron a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron posteriormente para determinar el contenido de MS, PB, FDN y FDA según la metodología estándar (AOAC, 1990; Van Soest et al., 1991). En las muestras del forraje ofrecido se determinaron también los contenidos de materia inorgánica (MI) y orgánica (MO) por diferencia (100 - MI), hemicelulosa calculada (FDN - FDA) y lignina, para una mayor evaluación del efecto de la adición de los complejos enzimáticos sobre la composición química inicial.

Se analizaron muestras del forraje ofrecido a cada carnero asignado a los tres tratamientos en cada periodo experimental para determinar $DIVMS_A$ y $DIVMS_V$ utilizando la máquina de incubación Ankom®. Se incubaron las muestras de forraje durante 48 h a 39.5° C, en un medio de líquido ruminal, obtenido de un ejemplar caprino mantenido bajo condiciones de pastoreo de GTN en combinación con saliva artificial (McDougall, 1948) en proporciones de 60:40. Después del periodo de incubación, las muestras se secaron al horno (65° C/48 h) hasta un peso constante para determinar la $DIVMS_A$. Para determinar $DIVMS_V$, las muestras previamente incubadas se trataron con una solución detergente neutro (100° C/1 h), se lavaron con acetona, se secaron por 48 h, y se pesaron. Este proceso buscaba remover el contenido celular digerible, dejando solamente el residuo fibroso indigerible.

Los datos de CV, digestibilidad aparente de MS, PB, FDN y FDA y consumo de MS digerible se sometieron a análisis según un diseño de cuadrado latino 3 × 3 con tres observaciones por tratamiento en tres períodos experimentales, utilizando el modelo general lineal (SAS Inst., 1990).

El modelo estadístico fue:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_k + \beta_i + \gamma_j + \epsilon_{ijk}$$

en donde los componentes del modelo son:

Y_{ij} = variable dependiente evaluada (i.e., consumo voluntario)

μ = media general estimada

α_k = efecto del tratamiento, k

β_i = efecto del periodo experimental, i

γ_j = efecto del animal, j

ϵ_{ijk} = error aleatorio, asociado con la respuesta a lo factores ijk

Los datos relacionados al efecto de la adición de las enzimas fibrolíticas sobre la composición química inicial del forraje y la $DIVMS_A$ y $DIVMS_V$ se analizaron según un diseño completamente aleatorizado con nueve repeticiones por tratamiento. En el caso de las variables que mostraron varianzas de tratamiento significativas se realizó la separación de las medias por la prueba t de Bonferroni, estableciendo diferencias a $P < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A excepción del pH y la temperatura óptima para su actividad, los complejos enzimáticos evaluados difieren en su fuente microbiana, tipo de enzimas que contienen, actividad enzimática y dosis de aplicación recomendada (Cuadro 1). El pH óptimo para la actividad hidrolítica de ambas enzimas es de 5.0, en conformidad con lo reportado por Morgavi et al. (2000) y dentro de los límites de 4 a 5 establecidos por Beauchemin et al. (2003) para este tipo de producto. La temperatura óptima de actividad enzimática de ambas preparaciones fluctúa entre 39 y 40° C, lo que es común para estos productos y se asemeja a la del ambiente ruminal.

La composición química del HPG utilizado en este experimento (Cuadro 2) muestra un perfil de componentes típico para gramíneas tropicales henificadas en etapa relativamente madura. El HPG presentó una baja concentración de PB, altos contenidos de las fracciones de la pared celular (FDN, FDA y lignina), pero una baja concentración de hemicelulosa.

Luego de 24 h de aplicar las preparaciones enzimáticas al heno, el contenido de MS del HPG tratado con los dos aditivos aumentó ($P < 0.05$) respecto al testigo (Cuadro 2). Estos resultados son similares a los

CUADRO 2. Composición química de heno de pasto guinea cosechado a ocho semanas de rebrote y tratado o no con enzimas exógenas comerciales tipo fibrolíticas.

Componente %	Tratamiento			EEM ¹
	Testigo	Promote ^{NET}	Biocellulase ^{A-20}	
Materia Seca	93.39 b	95.10 a	96.41 a	0.72
Materia Orgánica ²	89.86 b	91.92 ab	93.64 a	1.04
Materia Inorgánica ²	10.14 a	8.09 b	6.33 b	0.68
Proteína Bruta ²	3.11 b	3.26 a	3.34 a	0.02
FDN ²	70.04	69.96	69.29	3.83
FDA ²	56.26	55.44	54.40	2.88
Hemicelulosa ^{2,3}	14.90	14.85	13.69	8.63
Lignina ²	10.88	9.69	7.80	1.92

¹Error estándar de la media.

² Base seca.

³Calculado por diferencia FDN-FDA.

Medias con letras diferentes en la misma línea difieren significativamente a $P < 0.05$
Valores = medias de tres muestras.

informados por Dean et al. (2005) en los cuales la aplicación de enzimas exógenas aumentó levemente el contenido de MS en ensilaje de pasto bermuda (*Cynodon dactylon* L.). Colombatto et al. (2004) también observaron un aumento en el contenido de MS en ensilajes de maíz al aplicarle enzimas fibrolíticas por rociado antes de ofrecerse a los animales.

Los contenidos de MO y MI también variaron entre los henos tratados con las preparaciones enzimáticas y el heno no tratado. El contenido de MO de HPG tratado con Biocellulase^{A-20} fue mayor ($P < 0.05$) que el del testigo, mientras el de HPG tratado con Promote^{NET} no difirió de los otros dos tratamientos. En cambio, en ambos HPG rociados con las preparaciones enzimáticas la concentración de MI fue menor ($P < 0.05$) que en el testigo. El tratamiento con las preparaciones de enzimas comerciales aumentó ($P < 0.05$) la concentración de PB por 0.15 (Promote^{NET}) y 0.23 (Biocellulase^{A-20}) unidades de porcentaje respecto al testigo. Este leve aumento en la concentración de PB en los HPG tratados con los complejos enzimáticos es contrario a los resultados de Dean et al. (2005), en los cuales el contenido de PB en heno de pasto guinea y el ensilaje de pasto bermuda no se afectó con la aplicación de enzimas tipo fibrolíticas. Las concentraciones de FDN, FDA y hemicelulosa no demostraron efectos de los tratamientos enzimáticos, en concordancia con los resultados obtenidos por Dean et al. (2005) y Colombatto et al. (2004) en estudios efectuados con ensilajes de pasto bermuda y maíz, respectivamente. Kung et al. (2000) observaron que la aplicación de enzimas (xilanasa y celulasa) a raciones completas conteniendo ensilaje

de maíz y alfalfa redujo el contenido de FDN y FDA, mientras que Krause et al. (1998) observaron una disminución de esta índole en cebada. En el presente experimento, a pesar de no observarse diferencias significativas atribuibles a la aplicación de las enzimas en las fracciones de la pared celular del forraje, sí se detectó una tendencia (diferencias numéricas) hacia una reducción en la fracción ligno-celulósica y de hemicelulosa en el HPG. En el material vegetativo tratado con Biocelulase^{A-20} el contenido de FDA y hemicelulosa se redujo por 1.80 y 1.21 unidades porcentuales, respectivamente, relativo al testigo, mientras que al aplicar Promote^{NET} las respectivas reducciones en las mismas fracciones fueron 0.82 y 0.05. Esta tendencia divergente en actividad degradativa entre las dos preparaciones comerciales sobre la pared celular del forraje puede deberse, entre otros factores, a la fuente y tipo de enzimas activas en las preparaciones. El producto Biocelulase^{A-20} contiene un complejo de enzimas (xilanasas, celulasa y β -glucanasas) y la tasa de aplicación al forraje recomendada es mayor que la recomendada para Promote^{NET}, que contiene solamente celulosas (Cuadro 1). En cambio, Dean et al. (2005) observaron que Promote^{NET} fue más efectiva que Biocelulase^{A-20} en reducir la fracción ligno-celulítica en pasto Bermuda.

El CV de los animales es controlado por un sistema complejo que se ve afectado por variables de la planta, el animal y el medio ambiente (Van Soest, 1994). Está bien documentado el hecho de que el alto contenido de fibra en los forrajes asociado con las altas temperaturas ambientales limita el CV en áreas tropicales (Teller et al., 1990). El calor también ejerce un efecto directo sobre el animal. La temperatura ambiental máxima promedio durante los meses de marzo a mayo, en que se realizó este estudio, osciló entre 30.6 y 31.6° C con un promedio de 31.1° C. Estas temperaturas son muy superiores al límite máximo de la zona termo-neutral del animal, en que el consumo de alimentos se maximiza.

Durante el experimento, los valores promedio de consumo de MS fueron de 921, 938 y 1,139 g/d en los tratamientos experimentales, testigo, HPG tratado con Promote^{NET}, y HPG rociado con Biocelulase^{A-20}, respectivamente (Cuadro 3). El tratamiento del HPG con el complejo enzimático aportador de tres tipos de enzimas (Biocelulase^{A-20}) aumentó el consumo por márgenes de 218 y 201 g/d ($P < 0.05$) sobre el testigo y el tratamiento Promote^{NET}, respectivamente. Este mayor consumo de forraje condujo a una mayor ($P < 0.05$) cantidad de forraje ofrecido, mientras la cantidad de HPG rechazado varió poco entre los tratamientos.

Las diferencias en los consumos y ofrecimientos de PB, FDN y FDA entre los tratamientos evaluados corresponden a las mismas diferen-

CUADRO 3. Consumo de MS y otras fracciones de heno de pasto guinea cosechada a las ocho semanas de rebrote y tratado o no con enzimas exógenas comerciales tipo fibrolíticas.

Componente	Testigo	Promote ^{NET}	Biocellulase ^{A-20}	EEM ¹
	Consumo Voluntario (g/d)			
Alimento Ofrecido				
MS	1,116.36 b	1,134.34 b	1,337.98 a	19.65
PB	35.09 b	36.10 b	44.68 a	0.63
FDN	756.71 b	766.57 b	944.58 a	15.07
FDA	448.04 b	448.08 b	550.79 a	16.91
Alimento Rechazado				
MS	195.37	196.49	198.09	20.49
PB	5.29	5.40	5.55	0.56
FDN	180.02	180.87	188.87	23.76
FDA	75.94	75.70	79.32	9.88
Consumo				
MS	920.99 b	937.85 b	1,139.00 a	22.22
PB	29.80 b	30.70 b	37.38 a	0.65
FDN	576.69 b	585.69 b	755.94 a	26.89
FDA	372.10 b	372.38 b	471.47 a	20.61

¹Error estándar de la media.

Medias con letras diferentes en la misma línea difieren significativamente ($P < 0.05$) Valores de la media de $N =$ tres repeticiones.

cias observadas en la MS. Las cantidades ofrecidas y consumidas por los corderos alimentados con HPG tratado con Biocellulase^{A-20} fueron mayores ($P < 0.05$) que las de los animales que consumieron HPG sin aditivo o tratado con Promote^{NET} (Cuadro 3).

El consumo diario de MS como porcentaje del peso vivo de los carneros fue significativamente diferente entre los tres tratamientos experimentales, siendo mayor ($P < 0.05$) para los de HPG tratado con ambos productos enzimáticos que el del testigo (2.86%). Entre aquéllos el consumo fue mayor ($P < 0.05$) con Biocellulase^{A-20} (4.06%) que con Promote^{NET} (3.15%).

El consumo sobresaliente de MS y otras fracciones analizadas que resultó del tratamiento del HPG con Biocellulase^{A-20} puede deberse a un pasaje aligerado y menor tiempo de retención ruminal del forraje ingerido, ocasionado por el menor contenido de FDN, lo que también disminuiría el tiempo de masticación; o bien a la presencia de FDN de mayor degradabilidad ruminal en el HPG tratado. Según Ørskov (2005) y Whetsell et al. (2004) la reducción de partículas grandes a pequeñas en el retículo-rumen para la formación del bolo alimenticio depende, entre otros factores, de la masticación inicial, la rumia con la remasticación y

reinsalivación y la degradación microbial. Estos factores pudieron verse afectados por la aplicación de enzimas fibrolíticas al forraje y por ende afectar la retención ruminal y el consumo.

Los resultados presentes no concuerdan con los de Lewis et al. (1996) quienes no observaron un efecto sobre el consumo de heno de cebada por la aplicación de enzimas tipo fibrolíticas. Sheperd y Kung (1996) no encontraron diferencias en el CV de ensilaje de maíz entre tratamientos con aplicación o no de las enzimas fibrolíticas celulasas y hemicelulasas. Bowman et al. (2002) encontraron que el consumo de MS y otras fracciones de una ración completa compuesta de granos de cebada, ensilaje de cebada y henilaje de alfalfa no se afectó por la inclusión de Promote^{NET}. En cambio, y más a tono con el presente estudio, Feng et al. (1996) reportaron que la utilización de enzimas aumentó el consumo total de MS de forraje henificado, mientras que Szasz et al. (2002) encontraron que el consumo de MS de la paja de la gramínea “Bluegrass” (*Poa pratensis*) tendió a aumentar a consecuencia del tratamiento con las enzimas celulasa y xilanasa, en comparación con un testigo sin tratar.

La aplicación por rociado de ambos aditivos aportadores de enzimas exógenas tipo fibrolíticas al HPG, 24 h antes de ofrecerlo a los corderos, aumentó ($P < 0.05$) la digestibilidad de la MS comparado con HPG sin los aditivos (Cuadro 4). La digestibilidad de la MS subió por 5.89 y 4.24 unidades de porcentaje en el HPG tratado con Biocelulase^{A-20} y Promote^{NET}, relativo al testigo. Las digestibilidades de PB, FDN y FDA también fueron mayores ($P < 0.05$) para el HPG tratado con los complejos enzimáticos que en el testigo. La aplicación del complejo enzimático que reunía actividad de xilanasa, celulasa y β -glucanasa (Biocelulase^{A-20}) logró aumentos ($P < 0.05$) en la digestibilidad de PB, 3.23; FDN, 7.96; y FDA, 7.69 puntos porcentuales comparado con el heno no tratado. Por su parte, el aditivo conteniendo solamente celulasa (Promote^{NET}) aumentó ($P < 0.05$) las mismas digestibilidades por 3.18, 4.31 y 7.3 unida-

CUADRO 4. Digestibilidad porcentual de la MS y otras fracciones de heno de pasto guínea cosechada a las ocho semanas de rebrote y tratado o no con enzimas exógenas comerciales tipo fibrolíticas.

Fracción (%)	Testigo	Promote ^{NET}	Biocelulase ^{A-20}	EEM ¹
Materia Seca	50.12 b ²	54.36 a	56.01 a	0.62
Proteína Bruta	61.36 b	64.54 a	64.54 a	0.43
FDN	47.94 c	52.25 b	55.90 a	1.35
FDA	48.09 b	51.39 a	55.78 a	1.62

¹Error estándar de la media

²Medias con letras diferentes en la misma línea difieren significativamente a $P < 0.05$.

des porcentuales, respectivamente, por encima del testigo. Al comparar los dos productos de enzimas exógenas evaluados, los efectos sobre las digestibilidades de MS, PB y FDA fueron similares ($P > 0.05$), sin embargo, la digestibilidad de FDN fue mayor al tratar el HPG con Biocellulase^{A-20} que con Promote^{NET}. El patrón de mayor respuesta en la digestibilidad de la MS y FDN al tratamiento del HPG con Biocellulase^{A-20} podría atribuirse a su mayor espectro de enzimas.

Por otra parte, al producir el doble beneficio de mayor CV y aumentada digestibilidad, el aditivo Biocellulase^{A-20} aumentó ($P < 0.05$) la cantidad de MS digerida en un 38%, relativo al heno testigo (461.6 vs. 638.0 g), mientras en el caso de Promote^{NET} el mayor valor (509.8 g) relativo al testigo se debió en gran parte al efecto sobre la digestibilidad. Los efectos positivos obtenidos sobre la digestibilidad en el presente estudio son consonos con los observados por Dean et al. (2005) de aumentos en la digestibilidad de seis puntos porcentuales como resultado del uso de enzimas exógenas fibrolíticas comerciales. Otros autores (Feng et al., 1996; Lewis et al., 1996) también reportaron aumentos en la digestibilidad de la MS y la FDN en novillos por aplicación del mismo producto a henos de "Orchardgrass" (*Dactylis glomerata*) y otras gramíneas antes de su alimentación. Pinos-Rodríguez et al. (2002) demostraron que la aplicación de enzimas fibrolíticas aumentó las digestibilidades de MS, MO y PB de heno de alfalfa, mientras que en heno de ballico hubo mayor digestibilidad de las fracciones hemicelulosa y FDN. Según Oba y Allen (1999), este tipo de efecto sobre la digestibilidad de la fibra puede asociarse con una menor acumulación de FDN en el rumen. Posiblemente la adición de enzimas exógenas ocasiona una mayor fragilidad de las partículas, más rápida degradación y menor retención de las mismas en el retículo-rumen. En otros estudios relacionados, Szasz et al. (2002) no observaron diferencias en las digestibilidades de la MS, MO, FDN y FDA cuando la paja de la gramínea "Bluegrass" era tratada o no con enzimas exógenas. En cambio, Nadeau et al. (2000) observaron aumentos en digestibilidad de FDN y celulosa en ensilaje de alfalfa tratado con enzimas.

En estudios de crecimiento animal, Titi y Tabbaa (2004) encontraron que el peso final de ovinos alimentados con cebada tratada con enzimas fue mayor que el de aquéllos alimentados con el forraje sin el aditivo. Beauchemin et al. (2003) y Wallace et al. (2001) postularon que los resultados variables de consumo y digestibilidad del forraje obtenidos al utilizar enzimas exógenos comerciales pueden deberse a factores tales como la actividad y características de las enzimas utilizadas, la insuficiente o excesiva dosificación, el tiempo de aplicación de los productos previo al ofrecimiento del forraje al animal, y la especie vegetal y estado de madurez de ésta.

A modo similar a los resultados obtenidos en la digestibilidad in vivo de la MS y otras fracciones, la $DIVMS_A$ fue mayor en HPG tratado con ambos tipos de enzimas exógenas que en HPG sin tratar (32.9, 33.6 y 30.8% para Promote^{NET}, Biocellulase^{A-20} y el testigo, respectivamente). Estos resultados se asemejan a los observados por Feng et al. (1996), en donde la aplicación de enzimas, mayormente xilanasas y celulasas, a gramíneas de región templada, mejoró la $DIVMS_A$ del forraje relativo al del testigo, siendo los valores de 43.5 y 38.7%, respectivamente. Encontraron, además, que la aplicación de soluciones de enzimas a gramíneas secas mejoró la $DIVMS_A$ más que la aplicación de enzimas a forraje fresco o marchitado.

Colombatto et al. (2003) observaron que la $DIVMS_A$ de alfalfa aumentó con la utilización de una preparación de enzimas, incluyendo Promote^{NET}, después de 18 h de incubación, pero en ensilaje de maíz, con el mismo complejo enzimático, no se observó ningún tipo de respuesta. Estos autores sugirieron la posibilidad de que las enzimas exógenas tengan especificidad de sustratos, lo cual puede ser la razón para las inconsistencias en los estudios realizados con las mismas. Dean et al. (2005) encontraron que la aplicación de Promote^{NET} aumentó la $DIVMS_A$ de ensilaje de pasto bermuda más que otros productos enzimáticos que probaron. En este caso se atribuyó la mayor efectividad de Promote^{NET} a su estado líquido, por lo cual se requiere la aplicación de una mayor cantidad de producto al compararse con los productos enzimáticos en forma sólida.

En el criterio $DIVMS_V$ se observó el mismo patrón de respuesta (38.8, 40.4, y 41.2% para el testigo y tratamiento con Promote^{NET} y Biocellulase^{A-20}, respectivamente), lo que significa aumentos de 2.12 y 2.75 puntos porcentuales comparado con el testigo. Feng et al. (1996) observaron que la utilización a nivel alto de una preparación de enzimas de celulasas y xilanasas para tratar gramíneas templadas aumentó la $DIVMS_V$ sobre la del control. De acuerdo a sus resultados, la aplicación de las enzimas al forraje previo a la incubación fue efectiva en aumentar la degradabilidad del sustrato. También favoreció la digestibilidad, el consumo y la velocidad de paso de partículas fuera del rumen. En cambio, la aplicación del producto enzimático previo a la cosecha del forraje no mejoraba, y hasta podía reducir, la desaparición de MS al compararse con el tratamiento testigo.

CONCLUSIÓN

La aplicación por rociado de las dos preparaciones de enzimas exógenas comerciales de tipo fibrolíticas, Promote^{NET} y Biocellulase^{A-20}, mejoró la composición química del heno de pasto guinea cosechado a

ocho semanas de rebrote, logrando disminuir las fracciones FDN, FDA, lignina y MI, así como aumentar el contenido de MS y PB. Además, hubo aumentos en el CV relativo al PV, la digestibilidad de MS, PB, FDN y FDA, el consumo de MS digerible y la degradabilidad aparente y verdadera de la MS. Estos resultados demuestran que los tratamientos enzimáticos en cuestión constituyen una alternativa biológicamente viable para mejorar la calidad del heno de esta gramínea tropical. Se obtuvo una mayor respuesta en HPG tratado con Biocelullase^{A-20} que con Promote^{NET}, lo cual puede deberse a su mayor inclusión de diversas enzimas activas (celulasas, xilanasas y β -glucanasas). El efecto de las enzimas exógenas sobre la composición química y la digestibilidad del HPG sugiere que el mecanismo de su efecto involucra la susceptibilidad a la acción microbiana en el rumen. Los datos presentes no alcanzan a arrojar luz sobre posibles mecanismos post-ruminales.

El presente trabajo aporta información sobre los efectos en la composición química, el CV, la digestibilidad y degradabilidad que resultan de la aplicación de dos productos comerciales de enzimas exógenas de tipo fibrolíticas sobre un heno de gramínea tropical. Queda demostrado que rociar el heno con este tipo de enzimas constituye una alternativa para mejorar la calidad de henos de baja calidad y por ende su utilidad en la alimentación de pequeños rumiantes. Posiblemente esta práctica podría abaratar el costo de la alimentación mediante una economía de alimentos importados. Sin embargo, es necesario evaluar el efecto de este tipo de tratamiento con enzimas sobre otros criterios del desempeño animal como la ganancia de peso por animales en crecimiento. Además, sería conveniente evaluar el efecto del tratamiento enzimático en otras fuentes de alimentación utilizadas actualmente en el país, como ciertos concentrados incluidos como ingredientes en las raciones totalmente mezcladas (RTM).

LITERATURA CITADA

- AOAC. Association of Official Analytical Chemist, 1990. Official Methods of Analysis. Arlington, VA.
- Beauchemin, K. A., D. Colombatto, D. P. Morgavi y W. Z. Yang, 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81:E37-E47.
- Bowman, G. R., K. A. Beauchemin y J. A. Shelford, 2002. The proportion of the diet to which fibrolytic enzymes are added affects nutrient digestion by lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:3420-3429.
- Colombatto D., F. L. Mould, M. K. Bhat, D. P. Morgavi, K. A. Beauchemin y E. Owens, 2003. Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentation of pure cellulose and xylan by mixed ruminal microorganism in vitro. *J. Anim. Sci.* 81:1040-1050.

- Colombatto, D., F. L. Mould, M. K. Bhat, R. H. Phipps y E. Owens, 2004. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage III. Comparison of enzymes derived from psychrophilic, mesophilic or thermophilic sources. *Anim. Feed Sci. Technol.* 111:145-159.
- Dean, D. B., A. T. Adesogan, N. Kruger y R. C. Littell, 2005. Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, aerobic stability, and digestibility of bermuda-grass silage. *J. Dairy Sci.* 88:994-1003.
- Feng, P., C. W. Hunt, G. T. Pritchard y W. E. Julien, 1996. Effect of enzyme preparations on in situ and in vitro degradation and in vivo digestive characteristics of mature cool season grass forage in beef steers. *J. Anim. Sci.* 74:1349-1357.
- Krause, M., K. A. Beauchemin, L. M. Rode, B. I. Farr y P. Nørgaard, 1998. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. *J. Anim. Sci.* 76:2912-2920.
- Kung, L., Jr., R. J. Treacher, G. A. Nauman, A. M. Smagala, K. M. Endres y M. A. Cohen, 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on nutritive value and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:115-133.
- Lewis, G. E., C. W. Hunt, W. K. Sanchez, R. Treacher, G. T. Pritchard y P. Feng, 1996. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage based diet fed to beef steers. *J. Anim. Sci.* 74:3020-3028.
- McDougall, E. J., 1948. Studies of ruminal saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43:49.
- Morgavi, D. P., K. A. Beauchemin, V. L. Nsereko, L. M. Rode, A. D. Iwaasa, W. Z. Yang, T. A. McAllister y Y. Wang, 2000. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes from *Trichoderma longibratum*. *J. Dairy Sci.* 83:1310-1321.
- Nadeau, E. M. G., J. R. Russell y D. R. Buxton, 2000. Intake, digestibility, and composition of orchardgrass and alfalfa silages treated with cellulose, inoculant, and formic acid fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 78:2980-2989.
- Oba, M. y M. S. Allen, 1999. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: Effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:589-596.
- Ørskov, E. R., 2005. Plant factors limiting roughage intake in ruminants. Tropical feeds and feeding systems. Elsevier, Amsterdam, p. 55-70.
- Pinos-Rodríguez, J. M., S. S. González, G. D. Mendoza, R. Barcena, M. A. Cobos, A. Hernández y M. E. Ortega, 2002. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 80:3016-3020.
- Rode, L. M. y K. A. Beauchemin, 1998. Enzymes to enhance utilization of feed in dairy cows. Western Canadian Dairy Seminar Proc. Volume 10. p. 167.
- SAS Inst., 1990. SAS/STAT® User's Guide (Release 6.12). SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Sheperd, A. L. y L. Kung, Jr., 1996. An enzyme additive for corn silage: Effects on silage composition and animal performance. *J. Dairy Sci.* 79:1760-1766.
- Szasz, J. I., T. M. McCalmant, C. W. Hunt, A. V. Grove y L. R. Kennington, 2002. Effect of a fibrolytic enzyme preparation on intake and digestibility of bluegrass seed straw fed to beef cattle. Proceedings, Western Section, American Society of Anim. Sci. Vol. 53.
- Teller, E., M. Vanbelle, P. Kamatali, G. Collignon, B. Page y B. Matatu, 1990. Effects of chewing behaviour and ruminal digestion processes on voluntary intake of grass silages by lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 68:3897-3904.
- Titi, H. H. y M. J. Tabbaa, 2004. Efficacy of exogenous cellulase on digestibility in lambs and growth of dairy calves. *Livest. Prod. Sci.* 87:207-214.
- Van Soest, P. J., 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant (2nd. Ed.). Cornell University Press. Ithaca, NY.

- Van Soest, P. J., J. B. Robertson y B. A. Lewis, 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Wallace, R. J., S. J. A. Wallace, N. McKain, V. L. Nsereko y G. F. Hartnell, 2001. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms in vitro. *J. Anim. Sci.* 79:1905-1916.
- Whetsell, M. S., E. C. Prigge y E. L. Nestor, 2004. Influence of mass of ruminal contents on voluntary intake and digesta passage in steers fed a forage and a concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 82:1806-1817.