

**Efecto de la adición de Multi-zyme[®] sobre la
digestibilidad *in vitro* de raciones totalmente
mezcladas para vacas lecheras en California, EUA.**

**Olman Fernando Rivera Gómez
Samuel David Zapata Raudales**

ZAMORANO

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria
Noviembre, 2006

**Efecto de la adición de Multi-zyme[®] sobre la
digestibilidad *in vitro* de raciones totalmente mezcladas
para vacas lecheras en California, EUA.**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por:

**Olman Fernando Rivera Gómez
Samuel David Zapata Raudales**

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2006

Los autores conceden a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos de los autores

Olman Fernando Rivera Gómez

Samuel David Zapata Raudales

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2006

Efecto de la adición de Multi-zyme® sobre la digestibilidad *in vitro* de raciones totalmente mezcladas para vacas lecheras en California, EUA

Presentado por:

Olman Fernando Rivera Gómez
Samuel David Zapata Raudales

Aprobado por:

Isidro Matamoros, Ph.D.
Asesor Principal

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Coordinador de Área Temática
Zootecnia

Miguel Vélez, Ph.D.
Asesor

Abelino Pitty, Ph.D.
Director Interino de la Carrera de
Ciencia y Producción
Agropecuaria

Mario Daccarett, M.S., P.A.S.
Asesor

George Pilz, Ph.D.
Decano Académico

Héctor Cuestas, B.Sc.
Asesor

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA
O.F.R.G

A Dios sobre todas las cosas por darme fortaleza y sabiduría para alcanzar mis metas.

A mis padres, Olman O. Rivera y Ángela Gómez de Rivera, por ser parte de mi inspiración para poder llevar a cabo todos mis planes y proyectos.

Al Ing. Mario Daccarett y al Ing. Héctor Cuestas por brindarnos su valioso apoyo y tiempo para que se llevara a cabo este estudio.

A toda mi familia y mis amigos de Zamorano, que siempre estuvieron para apoyarme en los momentos más difíciles de mi vida.

DEDICATORIA
S.D.Z.R

A toda mi familia, por siempre estar a mi lado y ayudarme en todo momento.

Al Ing. Daccarett y a Ing. Cuestas por ser las personas que tuvieron la iniciativa del proyecto y que los resultados obtenidos en este estudio les serán de mucha ayuda.

A todas las personas que leerán este estudio y que se beneficiarán con los resultados e información presente en él.

En general a todas las personas que siempre están dispuestas a dar lo mejor de sí en cada cosas que realizan.

AGRADECIMIENTOS

O.F.R.G

A Dios, por haberme permitido cumplir una de mis metas establecidas.

A mis señores padres, Olman O. Rivera y Ángela Gómez de Rivera, por su enorme esfuerzo y sacrificio que han hecho para ayudarme a alcanzar mis logros y metas.

Al Ing. Mario Daccarett, por darnos la oportunidad de realizar este proyecto.

Al Ing. Héctor Cuestas, por su incondicional apoyo y por sus valiosos consejos.

A los Drs. Isidro Matamoros y Miguel Vélez, por sus sabios consejos, y por todo el tiempo que nos brindaron.

A todos mis amigos y amigas, en especial a Samuel Zapata, Daniel Barragán, Margory Medina, Aníbal Ortiz, José Ponce, Alejandro Fermán y Álvaro Defas por haberme apoyado en mis momentos más difíciles y haberme demostrado el verdadero significado de la amistad.

AGRADECIMIENTOS

S.D.Z.R

En primer lugar a Dios, por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este proyecto y por darme el ánimo y fuerza necesaria para lograrlo.

A mi familia, en especial a mi madre por siempre tenerme en sus oraciones y darme las palabras de aliento en los momentos más difíciles.

A mi Ce, por apoyarme en todo momento y siempre estar presente.

Al Ing. Mario Daccarett, por su valiosa ayuda e iniciativa para llevar a cabo este proyecto.

Al Ing. Héctor Cuestas, por su colaboración y por enseñarme a hacer siempre lo mejor, pero sobre todo por sus valiosos consejos.

A los Drs. Vélez y Matamoros, por sus consejos y amistad.

A todos mis amigos en Zamorano y a todas las personas que siempre creyeron en mí, en especial a Olman Rivera, Alejandro Fermán y José Ponce.

RESUMEN

Rivera, O.; Zapata, S. 2006. Efecto de la adición de Multi-zyme[®] sobre la digestibilidad *in vitro* de raciones totalmente mezcladas para vacas lecheras en California, EUA. Proyecto especial del programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano. Honduras. 20 p.

La suplementación con enzimas exógenas representa una alternativa tecnológica capaz de estimular los mecanismos de degradación de la pared de los forrajes, cereales y otros alimentos usados. Se evaluó el efecto de la adición del complejo Multi-zyme[®] sobre la digestibilidad *in vitro* de la Fibra Neutro Detergente (dFND), de la Materia Orgánica (DIVMO), el contenido de Nutrientes Digeribles Totales (NDT) y la Energía Neta de Lactancia (EN_L) de diversas Raciones Totalmente Mezcladas (RTM) usadas para la alimentación de vacas lecheras en California. La investigación se llevo a cabo en el laboratorio de Agri-Link analytical, Turlock, CA, EUA, entre enero y marzo de 2006. Se utilizaron cuatro RTM, dos para vacas de alta producción y dos para vacas de baja producción, provenientes de las fincas lecheras Quaresma Dairy y T & M Dairy. Se usaron dos tratamientos, a) 0.04 g de enzimas por cada 100 g de alimento b) testigo, sin enzimas. El tamaño de las muestras fue de 250 mg. Las muestras fueron sometidas a una prueba de digestibilidad *in vitro* durante 30 horas. Se usó un diseño de BCA con dos repeticiones por tratamiento. Se encontró un aumento del 11.4% en la digestibilidad *in vitro* de la dFND, de 2.51% en la DIVMO, de 2.87% en la NDT y de 2.95% en la EN_L en las muestras tratadas con Multi-zyme[®], con respecto al testigo. Para condiciones *in vitro* la adición de Multi-zyme[®] a las dietas para vacas lecheras de alta y baja producción, aumentó dFND, DIVMO, NDT y EN_L.

Palabras clave: Energía neta de lactancia, enzimas, fibra neutro detergente, materia orgánica, nutrientes digeribles totales.

ABSTRACT

Rivera, O; Zapata, S.2006. Effect of the addition of Multi-zyme[®] over the *in vitro* digestibility on total mixed rations for dairy cows in California, USA. Special project of the Agronomical Engineering program, Zamorano, Honduras. 20 p.

The supplementation with exogenous enzymes represents a technological alternative able to stimulate the mechanisms of degradation of the wall of forages, used cereals and other foods. The effect of the addition of the Multi-zyme[®] complex was evaluated on the *in Vitro* digestibility of Neutral Detergent Fiber (dNDF), of the Organic Matter (OMIVD), the content of Total Digestible Nutrients (TDN), and the Net Milking Energy (NME) of several Total Mixed Rations (TMR) used on dairy cows feedings on California. The research took place on the Agri-Link analytical laboratory, Turlock, CA, USA between January and March of 2006. There were used four TMR, two for high production cows and two for low production cows coming from Quaresma Dairy and T & M Dairy. There were used two treatments, a) 0.04 g of enzymes per 100 g of feed b) without enzymes. The sizes of the samples were 250 mg. The samples were subject to a *in vitro* digestibility test during 30 hours. It was used a Completely Random Blocks (CRB) with two repetitions per treatments. It was found an increase of 11.4% on the *in vitro* digestibility of the dNDF, of 2.51% on the OMIVD, of 2.87% on the TDN and 2.95% on the NME on the samples treated with Multi-zyme[®] in relation with the control. Under *in vitro* conditions the addition of Multi-zyme[®] to high and low production milking cows increased dNDF, OMIVD, TDN and NME.

Key words: Enzymes, neutral detergent fiber, net milking energy, organic matter, total digestible nutrients.

CONTENIDO

Portadilla.....
Error! Bookmark not defined.	
Autoría.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatoria OFRG.....	iv
Dedicatoria SDZR.....	v
Agradecimientos OFRG.....	vi
Agradecimientos SDZR.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
Contenido.....	x
Índice de cuadros.....	xi
Índice de anexos.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
2.1 LOCALIZACIÓN.....	4
2.2 ALIMENTO.....	4
2.3 PROCEDIMIENTO EN LABORATORIO.....	5
2.4 METODOLOGÍA.....	5
2.4.1 Tratamientos experimentales.....	5
2.4.2 Muestreo de la dieta.....	5
2.4.3 Adición de Multi-zyme®.....	6
2.4.4 Variables Medidas.....	6
2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	6
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4. CONCLUSIONES.....	9
5. RECOMENDACIONES.....	10
6. LITERATURA CITADA.....	11
7. ANEXOS.....	15

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Raciones de alta y baja producción en Quaresma Dairy	4
2. Raciones de alta y baja producción en T & M Dairy	5
3. Efecto de Multi-zyme [®] sobre el porcentaje de Materia Seca (MS), Proteína Cruda (PC), Fibra Ácido Detergente (FAD), Fibra Neutro Detergente (FND), Materia Orgánica (MO) y grasa.....	7
4. Efecto de Multi-zyme [®] sobre la digestibilidad de la Fibra Neutro Detergente (dFND), Digestibilidad <i>in vitro</i> de la Materia Orgánica (DIVMO), Nutrientes Digeribles Totales (NDT) y la Energía Neta de Lactancia (ENL).	8

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Página
1. Composición del concentrado utilizado en la finca Quaresma Dairy	15
2. Composición del concentrado utilizado en la finca T & M Dairy	15
3. Composición nutricional de las dietas de Quaresma Dairy.....	16
4. Composición nutricional de las dietas de T & M Dairy	16
5. Procedimiento para calcular la Digestibilidad <i>in vitro</i> utilizando el incubador DAISYII Tecnología ANKOM.....	18

1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas son biocatalizadores naturales producidos por las células vivas para intervenir en reacciones bioquímicas específicas. Las enzimas son empleadas para catalizar las reacciones mediante las cuales los sustratos (p. ej. los alimentos) son degradados en sus componentes químicos (p. ej. azúcares simples, aminoácidos, ácidos grasos) que son utilizados por los microorganismos ruminales (González 2004).

La suplementación con enzimas exógenas representa una alternativa tecnológica capaz de estimular los mecanismos de degradación de la pared de los forrajes, cereales y otros alimentos usados en la alimentación de los rumiantes (González 2004).

Multi-zyme[®] es un complejo enzimático que contiene enzimas que digieren los principales grupos de compuestos presentes en el alimento (Dairy Technologies 2006):

- a. Alfa amilasa: hidroliza el almidón en dextrosas y glucosa.
- b. Celulasa: Participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos β -1,4 presentes en la celulosa y hemicelulosa liberando glucosa.
- c. Lipasa: actúa sobre las grasas produciendo ácido grasos libres y glicerina.
- d. β -glucanasa: Transforma los β -glucanos en azúcares simples y polisacáridos.
- e. Pectinasa: desdoblan sustancias pécticas en azúcares digeribles.
- f. Xilanasa: Actúa sobre la pared secundaria de las células vegetales que son ricas en cadenas de xilanos y los convierte en azúcares simples.
- g. Lactasa: desdobla la lactosa en glucosa y galactosa que son más fáciles de digerir.

Además contiene *Bacillus subtilis* y *Aspergillus oryzae*, los cuales sintetizan Amilasa, Hemicelulasa y Proteasa microbial la cual convierte la proteína en aminoácidos (Dairy Technologies 2006).

El factor primario limitante de la digestión de la celulosa es la disponibilidad de sitios específicos para hidrolizar el material vegetal más que una baja actividad celulolítica (Dehority y Tirabasso 1998). La aplicación de enzimas produce cambios estructurales en el alimento haciéndolo más susceptible a la degradación; la pared de las células se hidroliza en el rumen de manera erosiva, esto facilita la penetración y colonización de los microorganismos celulolíticos y sus respectivas enzimas (Morgavi *et al.* 2000).

Se han propuesto dos modelos para describir la organización del sistema de las enzimas fibrolíticas (celulasas y xilanasas) siguiendo los mecanismos de síntesis y secreción en células individuales (Caja *et al.* 2003). En el primer modelo, las enzimas actúan individualmente y en sinergia para efectuar la hidrólisis de la celulosa (Beguin y Aubert 1994), en el segundo, las enzimas individuales se acoplan formando un complejo multienzimático llamado celulosoma (Forsberg *et al.* 1993).

Añadir enzimas exógenas a la dieta aumenta la capacidad hidrolítica del rumen, ya que aumenta el efecto de las bacterias (Yang *et al.* 1999 ; Morgavi *et al.* 2000; Wang *et al.* 2001), estimula la población microbiana del rumen (Wang *et al.* 2001; Nsereko *et al.* 2002), y tiene un efecto sinérgico con los microorganismos hidrolíticos (Morgavi *et al.* 2000). Al aumentar la capacidad hidrolítica hay un incremento en la digestibilidad de los carbohidratos no fibrosos, lo que explica por que las enzimas son efectivas en dietas ricas en concentrados.

Stokes y Zheng (1995) observaron mejoras del valor nutritivo de raciones completas a base de heno de alfalfa y ensilados de alfalfa y trigo al tratarlas con un preparado de enzimas fibrolíticas (celulasas y xilanasas); el consumo de materia seca se incrementó cerca de un 11%, mientras la producción de leche lo hizo en un casi un 15% (Lewis *et al.* 1995).

Lewis *et al.* (1999), trataron un forraje con una mezcla de celulasas/xilanasas (1 ml / kg de TMR) y observaron un incremento de 6.3 kg /día (16%) de leche en vacas de lactancia temprana; resultados similares fueron encontrados por Rode *et al.* (1999) y Yang *et al.* (2000) con 3.6 kg / día y 2 kg /día respectivamente.

La degradación del almidón en el rumen es uno de los factores más importantes en el comportamiento productivo de los rumiantes alimentados con dietas altas en grano; las amilasas exógenas incrementan la digestibilidad inicial entre un 3 y un 6%, por lo que pueden ser útiles al interactuar con las enzimas sintetizadas por los microorganismos ruminales (Plata *et al.* 2004).

El efecto de las lipasas (lipólisis) se reduce cuando la dieta tiene más 30% de almidón; Van Nevel y Demeyer (1996) observaron que un descenso del pH desde 6.3 hasta 5.25 reducía linealmente la liberación de ácido linoleico a partir de aceite de soya hasta menos de un tercio. También se ha observado que la adición de antibióticos, especialmente ionóforos, reduce el grado de lipólisis *in vitro* (Van Nevel y Demeyer 1995).

Bauchemin *et al.* (2000) encontraron que el consumo de materia seca aumenta en un 7.5% después de que la ración fue tratada con una mezcla de β -glucanasa y xilanasas; que puede ser atribuido a un aumento en la palatabilidad del alimento o a una mayor tasa de pasaje a través del tracto digestivo; el contenido de proteína en la leche aumento en un 2.14%.

El suero de leche es un subproducto de la industria láctea, la lactosa constituye el 70% de los sólidos y es usada como fuente de energía de rápida disponibilidad para las bacterias del rumen. Esta puede ser mejor aprovechada si se aplica lactasa exógena en la dieta; vacas alimentadas con lactosa han presentado un aumento de 18% en la producción de butirato en el rumen (DeFrain *et al.* 2004).

Las pectinas son sustancias abundantes en los vegetales, constituyendo aproximadamente el 35% de la pared celular vegetal en dicotiledóneas, Baran y Kamet (1987) utilizaron un aditivo con acción celulasa/pectinasa y mejoraron la fermentación ruminal el corderos recién destetados; Kung *et al.* (2000) proponen una mayor utilidad del empleo de estos complejos enzimáticos en animales en crecimiento con sistemas enzimáticos no desarrollados completamente.

Las proteasas ayudan a remover proteínas estructurales de la pared celular lo permite un acceso más rápido de los microorganismos para degradar la fibra. Las proteasas pueden incrementar la digestibilidad de la dieta, incluyendo la de la fibra (Morgavi *et al.* 2000 y Colombatto *et al.* 2003).

El presente estudio tuvo como finalidad evaluar el efecto de la adición del complejo Multi-zyme[®] sobre la digestibilidad *in vitro* de la fibra neutro detergente, de la materia orgánica, el contenido de nutrientes digeribles totales, y la energía neta de lactancia de diversas Raciones Totalmente Mezcladas (RTM) usadas para la alimentación de vacas lecheras en California, EUA.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LOCALIZACIÓN

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio Agri-Link Analytical en 1232 South Ave, Turlock, CA, USA.

2.2 ALIMENTO

Se utilizaron cuatro Raciones Totalmente Mezcladas (RTM), dos de alta producción y dos de baja producción, provenientes de las fincas lecheras Quaresma Dairy y T & M Dairy, la composición de cada ración varía entre fincas (Cuadro 1 y 2)

Cuadro 1. Raciones de alta y baja producción en Quaresma Dairy

Ingredientes	kg MS/día			
	% MS	Alta	% MS	Baja
Heno de alfalfa	87.0	3.95	87.0	3.56
Ensilaje maíz nervadura de café	27.0	2.09	27.0	2.21
Ensilaje de maíz # 2	27.7	3.78	27.7	3.78
Harina de canola	92.0	2.09	92.0	1.38
Gluten de maíz húmedo	40.0	1.45	40.0	1.09
Suero fresco	27.0	1.10	27.0	0.98
Cáscara de almendra	86.8	2.76	86.8	1.97
Heno de ryegrass	88.0	1.00	88.0	1.40
Concentrado Quaresma ^A	90.4	9.04	90.4	6.37
Total	54.3	27.27	50.9	22.74

^A anexo 1

Cuadro 2. Raciones de alta y baja producción en T & M Dairy

Ingredientes	kg MS/día			
	% MS	Alta	% MS	Baja
Heno de alfalfa	91.0	4.76	91.0	3.72
Ensilaje de maíz	34.4	4.85	34.4	6.25
Cáscara de almendra	86.8	0.79	86.8	0.99
Ensilaje de alfalfa	43.8	1.31	43.8	1.10
Gluten de maíz húmedo	40.0	2.36	40.0	2.00
Grasa de sobrepaso	96.0	0.31	0.0	0.00
Vitaminas y minerales	96.4	0.95	96.4	0.67
Granos secos de destilería	96.4	0.28	96.4	0.20
Prolak	96.4	0.26	96.4	0.18
Maíz rolado	86.8	5.38	86.8	3.98
Cebada Rolada/Grasa 50-50	86.8	0.22	86.8	0.17
Concentrado ^A	91.7	5.13	91.7	3.75
Total	61.8	26.60	56.3	23.00

^Aanexo 2

2.3 PROCEDIMIENTO EN LABORATORIO

Para estimar la Digestibilidad *in vitro* de la Materia Orgánica (DIVMO) de los alimentos se utilizó la técnica de Goering y Van Soest (1970), modificada por Ankom Technology Corporation (Anexo 5).

La determinación de MS se realizó según A.O.A.C. (1990). El contenido de Fibra Neutro Detergente (FND) y Fibra Ácido detergente (FAD) se determinó según la metodología descrita por Goering y Van Soest (1970). La energía neta de lactancia se estimó según NRC (2001).

2.4 METODOLOGÍA

2.4.1 Tratamientos experimentales

A cada una de las Raciones Totalmente Mezcladas (RTM) se le aplicaron dos tratamientos: a) con enzimas y b) sin enzimas.

2.4.2 Muestreo de la dieta

De cada una de las raciones evaluadas se tomaron 10 sub-muestras de cada lote de producción que se combinaron para luego sacar una muestra representativa.

2.4.3 Adición de Multi-zyme®

La adición del complejo enzimático se llevó a cabo en el laboratorio, las muestras se secaron, molieron y posteriormente se les añadió 0.04 g de Multi-zyme® por cada 100 g de alimento. Esta premezcla se homogenizó y después se sacaron muestras de 250 mg que correspondieron a las unidades experimentales para el tratamiento con enzimas.

2.4.4 Variables Medidas

Digestibilidad *in vitro* de la Fibra Neutro Detergente (dFND)

Porcentaje de Nutrientes Digeribles Totales (NDT)

Digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO)

Energía Neta de Lactancia (EN_L)

2.5 ANALISIS ESTADÍSTICO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental utilizado fue el de Bloques Completamente al Azar (BCA). Se utilizaron cuatro bloques que equivalen a las cuatro raciones con que se trabajó con cuatro repeticiones.

Para el análisis de los datos se utilizó una separación de medias mediante la prueba Duncan y DMS (Diferencia Mínima Significativa). El nivel de significancia exigido fue 0.05. Los datos se analizaron usando el programa para análisis estadístico SAS® (2003).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de materia seca (MS), proteína cruda (PC), fibra ácido detergente (FAD), fibra neutra detergente (FND), materia orgánica (MO) y grasa de las diferentes raciones no cambio después de aplicar Multi-zyme[®] (Cuadro 3). Esto era de esperarse por que las enzimas no aumentan la cantidad total de nutrientes en una ración.

Cuadro 3. Efecto de Multi-zyme[®] sobre el porcentaje de Materia Seca (MS), proteína cruda (PC), fibra ácido detergente (FAD), fibra neutro detergente (FND), materia orgánica (MO) y grasa.

Raciones	Establo	TRT	MS	Total de Materia Seca				
				PC	FAD	FND	MO	Grasa
Alta Producción	1	a	57.85	19.75	20.10	33.55	90.60	3.50
Alta Producción	1	b	57.85	19.75	20.10	33.55	90.60	3.50
Baja Producción	1	a	52.75	17.85	20.95	33.65	91.80	3.65
Baja Producción	1	b	52.75	17.85	20.95	33.65	91.80	3.65
Alta Producción	2	a	53.20	17.45	20.35	36.60	91.55	4.60
Alta Producción	2	b	53.20	17.45	20.35	36.60	91.55	4.60
Baja Producción	2	a	49.45	17.65	20.05	36.50	91.65	4.15
Baja Producción	2	b	49.45	17.65	20.05	36.50	91.65	4.15

1= T & M Dairy
2= Quaresma Dairy

a= Enzima
b= Testigo

Se observó un incremento ($P < 0.05$) de 5.9 unidades en la digestibilidad de la FND de las muestras tratadas con el complejo enzimático lo que representó un aumento del 11.4% (Cuadro 4), esto pudo ser producto de un incremento en la actividad celulolítica asociado con las enzimas exógenas (Wiedmeier *et al.* 1987; Feng *et al.* 1996; Newbold *et al.* 1992; Yang *et al.* 1999; Wang *et al.* 2001) o el resultado de un estímulo en la colonización y digestión por parte de los microorganismos de la fracción fibrosa lentamente degradable (Lewis *et al.* 1996). Resultados similares fueron encontrados por Beauchemin *et al.* (1995) con un aumento de 17% en la digestibilidad de la fibra.

También se obtuvo un aumento ($P < 0.05$) de 2.1 unidades en la DIVMO en las muestras tratadas con Multi-zyme[®] lo que representó un incremento de 2.51% (Cuadro 4); este efecto puede atribuirse a que las enzimas mejoran la digestibilidad a través de diferentes mecanismos; hidrólisis directa, mejor contacto entre el alimento y los microorganismos, cambios en la viscosidad del rumen y acciones complementarias con enzimas ruminales (Beauchemin *et al.* 1998).

Siguiendo otros estudios también se encontró aumentos en digestibilidad de la MS de un 2.9% (Beauchemin y Rode 1996) y de 4.87% en la digestibilidad de la materia orgánica (Yang *et al.* 1999). Colombatto *et al.* (2003) encontraron que el 33% de la digestibilidad de la materia orgánica durante las primeras 18 horas puede atribuirse a la degradación de la fibra.

Las muestras tratadas con Multi-zyme[®] presentaron un incremento ($P < 0.05$) de 2.1 unidades en la cantidad de NDT, lo que representó un aumento de 2.87% (Cuadro 4); debido probablemente a que la adición de enzimas exógenas da como resultado una ataque inmediato al alimento a consumir, proporcionando con ello una disponibilidad adicional de carbohidratos que estimularía un crecimiento y actividad microbiana más rápido, disminuyendo por tanto el tiempo requerido para la colonización microbiana (González 2004), también las enzimas exógenas aumentan la cantidad de nutrientes disponibles a través de hidrólisis directa en el alimento, o en sinergia con los microorganismos ruminales para estimular digestión (McAllister *et al.* 2001).

La energía neta de lactancia (EN_L) incrementó ($P < 0.05$) en 0.047 mcal/kg en las dietas tratadas con Multi-zyme[®] con respecto al testigo, esto represento un aumento de 2.95% (Cuadro 4). Este aumento se puede atribuir a un incremento en la digestibilidad de las fibras y de la materia orgánica presentes en las raciones. Rode *et al.* (1999) encontraron un aumento de 20% en la dFND y un 10.5% en DIVMO lo que produjo 1.85% más de energía neta de lactancia (EN_L).

Cuadro 4. Efecto de Multi-zyme[®] sobre la digestibilidad de la Fibra Neutro Detergente (dFND), Digestibilidad *in vitro* de la Materia Orgánica (DIVMO), Nutrientes Digeribles Totales (NDT) y la Energía Neta de Lactancia (EN_L).

Tratamiento	dFND (%)	DIVMO (%)	NDT (%)	EN_L (mcal / kg)
Testigo, sin enzimas	52.1 ^a	83.2 ^a	72.8 ^a	1.59 ^a
Enzimas	58.0 ^b	85.3 ^b	74.9 ^b	1.63 ^b

^{ab} Medias en la misma columna con diferente letra difieren entre sí ($P < 0.05$)

4. CONCLUSIONES

Para condiciones *in Vitro*, la adición de Multi-zyme[®] a las dietas para vacas lecheras de alta y baja producción, aumentó:

- a. La digestibilidad *in vitro* de la fibra neutro detergente (dFND).
- b. La Digestibilidad *in vitro* de la Materia Orgánica (DIVMO).
- c. Los Nutrientes Digeribles Totales (NDT).
- d. La Energía Neta de Lactancia (EN_L).

5. RECOMENDACIONES

Evaluar con 5, 10 y 15 g / día de suplementación de Multi-zyme[®] por vaca.

Evaluar el efecto de Multi-zyme[®] en raciones para vacas lecheras utilizando alimentos comunes en regiones tropicales.

Evaluar Multi-zyme[®] en estudios *in vivo* observando su efecto tanto en variables productivas como económicas.

6. LITERATURA CITADA

Agri-Link Analytical. 2006. 1232 South Ave, Turlock, CA, USA.

A.O.A.C. 1990. Official methods of analysis. *In* Helrich, K. (ed.) 15th. ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, USA.

Baran, M. y Kamet, V. 1987. Effect of Pectinase on Rumen Fermentation in Sheep and Lambs. *Arch. Anim. Nutr. Berlin.*7/8:643-646.

Beauchemin, K.A.; Rode, L. y Sewalt, V. 1995. Fibrolytic enzyme increase fiber digestibility and growth rate of steer fed dry forages. *Can. Journal of Animal Science* 75: 641-644.

Beauchemin, K.A. y Rode, L.M. 1996. Use of feed enzyme in animal nutrition. *In: Animal Science Development Meeting Future Challenges. Proceeding of the Canadian Society of Animal Science Meeting.* Ed. L.M. Rode Lethbridge, Alberta, pp. 103-130.

Beauchemin, K.A., Rode, L.M. y Yang, W. 1998. Use of fed enzymes in ruminant nutrition. *Proceedings of the 33rd Pacific Northwest Nutrition Conference.* Vancouver, British Columbia, pp. 121-135.

Beauchemin, K. A., Rode, L. M., Maekawa, M., Morgavi, D. P. and Kampen, R 2000. Evaluation of a Nonstarch Polysaccharides Feed Enzyme in Dairy Cow Diets. *Journal of Dairy Science* 83: 543-553.

Beguin, P. y Augbert, J.P. 1994. The Biological Degradation of Cellulose. *FEMS. Microbial. Rev.* 13:25-28.

Caja, G., González, E., Flores, C., Carro, M. y Albanell, E. 2003. Alternativas a los Antibiótico de Uso Alimentario en Rumiantes: Prebióticos, Enzimas y Ácidos Orgánicos (en línea). Consultado en 28/01/06. disponible en:
http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/03CAP_IX.pdf

Colombatto, D., Hervás, G., Yang, W. y Beauchemin, K. 2003. Effects of enzyme supplementation of a total mixed ration on microbial fermentation in continuous culture, maintained at high and low pH (en línea). Consultado el 08/03/06. Disponible en:
<http://www.animal-science.org/cgi/content/full/81/10/2617>.

Dairy Technologies. 2006. Multi-zyme[®]. Madera, California, U.S.

DeFrain, J.M. 2004. Feeding Lactose Increases Ruminal Butyrate and Plasma B-hydroxybutyrate in Lactating Dairy Cows (en línea). Consultado el 11/02/2006, Disponible en: <http://www.dairy-science.org/cgi/content/full/87/8/2486>.

Dehoririty, B.A. y Tirabasso, P.A. 1998. Effect of ruminal cellulolytic bacterial concentration in situ digestion of forage cellulose. *Journal of Animal Science* 76: 2905-2911.

Feng, P., Hunt, C., Pritchard, G. y Julien, W. 1996. Effect of Enzyme Preparation on *in situ* and *in vitro* Digestive Characteristics of Mature Cool-season Grass Forage in Beef Steers. *J. Anim. Sci.* 74:1349-1357.

Fosberg, C.W., Cheng, K y Phillip, J.1993. Establishment of Rumen Microbial Gene Pools and Their Manipulation to Benefit Fiber Digestion by Domestic Animals. *Proceedings VII World Conference on Animal Production* pp.281-316. World Association for Animal Production. Edmonton.

Goering, H.K y VanSoest, P.J. 1970. Forage fiber analysis. Washington, DC: Agriculture Research Service, USDA. 19p. (Agriculture Handbook, No. 379).

González, E. 2004. Utilización de Enzimas Fibrolíticas en Cabras Lecheras. Evaluación de su Actividad y Características Fermentativas *in vitro* (en línea). Consultado el 12/02/06. Disponible en: http://www.tdx.cesca.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0207105-163721/egg1del.pdf.

Kung, L., Treacher, R. Y Nauman, G. 2000. The Effect of Treating Forages with Fibrolytic Enzymes on its Nutritive Value and Lactating Performance of Dairy Cows (en línea). Consultado el 25/02/06. Disponible en: <http://jds.fass.org/>

Lewis, G. E., Hunt, C. Sanchez, W. y Treacher, R. 1995, Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on lactational performance on midlactation Holstein cows. En: *Proceeding of Western Section American Society animal Science* 46:310.

Lewis, G. E., Hunt, C. Sanchez, W. y Treacher, R. 1996. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet feed to beef steers. *Journal of Animal Science* 74: 3020-3028.

Lewis, G. E., Hunt, C. Sanchez, W. y Treacher, R.. 1999. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. *Journal Dairy Science* 82:611-630.

McCallister, T.A., Hristov, A., Beauchemin, K.A. y Rode, L.M. 2001. Enzyme in ruminant diet. In: Bedford M., Partridge, G (Eds). *Enzyme in Farm Animal Nutrition* CABI. Publishing, Oxon, UK.

Morgavi, D. P., Beauchemin, K. A., Nsereko, V. L., Rode, L. M., Iwaasa, A. D., Yang, W. Z., McAllister, T. A and Wang, Y. 2000. Synergy between Ruminant Fibrolytic Enzymes and Enzymes from *Trichoderma Longibrachiatum*. Journal of Dairy Science 83: 1310-1321.

Newbold, C.J., Brock., R. y Wallace, R.. 1992. The Effect of *Aspergillus oryzae* Fermentation Extract on the Growth of Fungi and Ciliate Protozoa in the Rumen. Letters in Appl. Microb. 15:109-112.

NRC (National Research Council, US). 2001. Nutrient Requirement of Dairy Cattle: Energy. 7 ed. Washington, D.C., US. P 13-27.

Nsereko. V.L., Morgavi, D. P., Beauchemin, K. A. y Rode, L. M. 2002, Effects of fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. Can. Journal of Microbial Science 48. 14-20.

Plata, F., Velasco, R., Melgoza, L., Mendoza, J. y Franco, F. 2004. Efecto de la dosis de amilasa (*Bacillus licheniformis*), temperatura de solución y molido del grano de sorgo en la aglutinación del almidón y digestibilidad ruminal *in vitro* (en línea). Consultado el 30/01/06. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S037818442004001200006&script=sci_arttext&tlng=es.

Rode, L. M., Beauchemin, K.A. y Yang, W.Z. 1999. Fibrolytic Enzyme Supplement for Dairy Cows in Early Lactation (en línea). Consultado el 05/04/06. Disponible en: <http://jds.fass.org/cgi/reprint/82/10/2121.pdf>.

S.A.S. 2003. S.A.S User's guide: Statistics. S.A.S Inst. Inc. Cary, NC.

SPARTAN. 1992. SPARTAN ration evaluator/balancer. Version 2.0 Michigan State University.

Stokes, M.R. y Zheng, S. 1995. The use carbohydrolase enzymes as feed additives for early lactation cows. 23rd Biennial Conference on Rumen function, Chicago, Il.

Van Nevel, C.J. y Demeyer, D.I. 1995. Lipolysis and Biohydrogenation of Soybean Oil in the Rumen *in vitro*: Inhibition by Antimicrobials (en línea). Consultado el 23/02/06. Disponible en: http://jds.fass.org/cgi/reprint/78/12/2797?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=van+nevel&searchid=1&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&resource_type=HWCIT.

Van Nevel, C.J. y Demeyer, D.I. 1996. Reproduction, Nutrition, Development 36:53-63.

Wang Y., MacCallister T. A, Rode L.M., Beauchemin, K.A., Morgavi D.P, Nsereko, V. L., Iwaasa, A.D. y Yang, W., 2001. Effects of exogenous enzyme preparation on microbial protein synthesis, enzyme activity and attachments to feed in the Rumen Simulation Techniques (Rusitec). Br. S. Nut. 85:325-332.

Wiedmeier, R.D., Arambel, M. y Walters, J. 1987. Effects of Yeast Culture and *Aspergillus oryzae* Fermentation Extract on Ruminal Characteristics and Nutrients Digestibility. J. Dairy Sci. 70:2063-2070.

Yang, W. Z. Beauchemin, K. A. y Rode, L. M. 1999. Effects of an Enzyme Feed Additive on Extent of Digestion and Milk Production of Lactating Dairy Cows Journal of Dairy Science 82: 391-403.

Yang, W.Z., Beauchemin, K. A. y Rode, L. M.. 2000. A Comparison of Methods of Adding Fibrolytic Enzymes to Lactating Cow Diets. Journal of Dairy Science. 83:2512-2520.

7. ANEXOS

Anexo 1. Composición del concentrado utilizado en la finca Quaresma Dairy

<u>Ingredientes</u>	<u>Porcentaje</u>
Soyplus	4.6
Grasa animal	2.4
Cebada rolada	5.8
Harina de trigo	0.3
Maíz rolado	42.6
Vitaminas y minerales	7.2
Harina de soya	7.6
Harina de gluten de maíz	3.3
Semilla de algodón	23.3
Granos secos de destilería	2.9
Total	100.0

Anexo 2. Composición del concentrado utilizado en la finca T & M Dairy

<u>Ingredientes</u>	<u>Porcentaje</u>
Semilla de algodón	44.8
Harina de soya	20.9
Harina de canola	23.9
Cascarilla de soya	10.4
Total	100.0

Anexo 3. Composición nutricional de las dietas de alta y baja producción en
Quaresma Dairy

Nutrientes	Total (% MS)	
	Alta	Baja
Proteína Cruda (PC)	17.62	16.54
Proteína No Degradable (% PCPND)	31.83	31.36
Proteína Degradable (PD)	68.11	68.58
Proteína Soluble (PS)	29.04	29.27
Energía Neta de Lactancia (Mcal / kg)	1.67	1.65
Nutrientes Digeribles Totales (NDT)	73.04	72.32
Fibra Acido Detergente (FAD)	20.95	22.31
Fibra Neutro Detergente (FND)	32.57	34.45
Fibra Neutro detergente efectiva (FNDe)	73.74	78.71
Carbohidratos No Fibrosos	36.58	36.19
Almidón	24.03	23.32
Lípidos	5.00	4.64
Forraje en la dieta	49.80	56.80

Por cálculo (SPARTAN, 1992)

Anexo 4. Composición nutricional de las dietas de alta y baja producción en T & M Dairy

Nutrientes	Total (% MS)	
	Alta	Baja
Proteína Cruda (PC)	18.05	16.87
Proteína No Degradable (% PCPND)	31.86	31.17
Proteína Degradable (PD)	68.02	68.72
Proteína Soluble (PS)	34.13	35.71
Energía Neta de Lactancia (Mcal / kg)	1.72	1.63
Nutrientes Digeribles Totales (NDT)	73.69	71.77
Fibra Ácido Detergente (FAD)	19.16	20.31
Fibra Neutro Detergente (FND)	30.10	31.70
Fibra Neutro detergente efectiva (FNDe)	67.08	71.84
Carbohidratos No Fibrosos	36.70	38.19
Almidón	26.40	26.71
Lípidos	5.86	4.60
Forraje en la dieta	44.00	52.40

Por cálculo (SPARTAN, 1992)

Anexo 5. Procedimiento para calcular la Digestibilidad *in vitro* utilizando el incubador DAISYII Tecnología ANKOM (Agri-Link Analytical. 2006)

A. Reactivos

a) Solución Buffer A:	g / litro
KH ₂ PO ₄	10.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
NaCl	0.5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1
Urea (reactivo)	0.5

b) Solución Buffer B:	g / litro
Na ₂ CO ₃	15.0
Na ₂ S · 9H ₂ O	1.0

c) Inóculo de líquido ruminal

d) Reactivos neutro detergentes

B. Equipos

- Tecnología ANKOM – Incubador DAISY^{II}
- Mecanismo de filtración – Tecnología ANKOM – Filtro de bolsas F57
- Sellador de bolsa – Tecnología ANKOM – 1915/1920 sellador de calor
- Cilindros graduados – 1 l y 500ml
- Frascos térmicos – (2)
- Cobertor de queso para filtrar
- Analizador de fibra ANKOM^{200/220}

C. Procedimiento

Preparación de las muestras y filtro de bolsa

- Se le aplica un enjuague a los filtros de bolsa con acetona de 3 a 5 minutos y después se secan por completo. El enjuague de acetona remueve el surfactante que puede inhibir la digestión microbial. Se debe pesar cada filtro de bolsa F57 y anotar el peso (P₁). Colocar la balanza en cero y pesar 0.25 g de la muestra (P₂) directamente en el filtro de bolsa.

NOTA: Una muestra del tamaño de 0.5 g es aceptable para un estudio de digestión de 48 horas.

Sellar cada bolsa y colocarla en el frasco del incubador DAISY^{II} (se pueden colocar hasta 25 muestras en cada frasco).

Las muestras se deben distribuir uniformemente en ambos lados de la división del frasco. Incluir por lo menos una bolsa vacía, pesada y sellada, como factor de corrección (C₁).

Preparación de la Solución Buffer (combinada): (Para cada frasco)

- a) Se le debe hacer un pre-calentamiento a ambas soluciones (A y B) a una temperatura de 39°C. En un contenedor agregue aproximadamente 266 ml de la solución B a 1330 ml de la solución A (Debe de quedar una relación 5:1). La misma cantidad de A y B debe de ser ajustada para obtener un pH de 6.8 a una temperatura de 39°C. No es necesario hacer un ajuste en el pH. Agregue 1600 ml de la mezcla combinada A / B a cada frasco que contienen las muestras.
- b) Coloque los frascos con las muestras y la solución buffer en el incubador DAISY^{II} y active el interruptor de calor y agitación (la luz roja le indicará que están activados). Permita que la temperatura de los frascos se equilibre por lo menos unos 20 o 30 minutos. Este tiempo se puede utilizar para la recolección y preparación del inóculo ruminal.

Preparación del inóculo y la incubación:

Mantenga su cristalería a una temperatura de 39°C

- a) Realice un precalentamiento a los envases térmicos llenándolos con agua con una temperatura de 39°C. Vacíe los envases posteriormente a la recolección del inóculo ruminal. Utilizando un procedimiento apropiado de recolección, remueva por lo menos 2000 ml del inóculo ruminal y colóquelos en los envases térmicos. Incluya un poco de la materia fibrosa del rumen con su recolección del inóculo ruminal a uno de los envases térmicos. La recolección del inóculo se puede hacer a través de un animal fistulado o por un tubo esofagal.
- b) Se debe vaciar el inóculo ruminal del envase térmico a la batidora. Inyecte el contenedor de la batidora con CO₂ y se debe batir a una velocidad máxima por 30 segundos. La acción de la batidora sirve para desprender los microorganismos que se han quedado adheridos a la materia y así asegurarse de tener una población microbial representativa para la fermentación *in vitro*. Filtre la mezcla batida a través de las cuatro capas de los cobertores de queso a un frasco de 5 litros (precalentado a 39°C). Filtre el líquido ruminal restante a otro frasco térmico a través de otro cobertor de queso de cuatro capas al mismo frasco de cinco litros.

NOTA: Se permite adicionar otro cobertor de queso de cuatro capas alrededor de los bordes para facilitar la extracción del contenido de materia filtrada. El frasco se debe inyectar continuamente con CO₂ durante la transferencia del inóculo.

- c) Se debe medir 400 ml del inóculo ruminal en un cilindro graduado. Remueva uno de los frascos del incubador DAISY^{II} y agregue los 400 ml a la solución buffer y a las muestras. Inyecte el frasco con CO₂ por 30 segundos y asegure la tapa.
- d) Repita el procedimiento para todos los frascos utilizados. NOTA: No permita que el CO₂ haga burbujas a través del inóculo, mejor dicho utilice el CO₂ como una capa gaseosa sobre el contenido del frasco.

- e) Se debe incubar (asegure que el interruptor del calentador y agitador estén encendidos) por 30 horas determinar los resultados de la digestibilidad *in vitro*. El incubador DAISY^{II} mantendrá una temperatura de $39.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5$.
- f) Cuando la incubación este completa, remover los frascos y el líquido escurrido. Enjuagar los frascos minuciosamente con agua helada del grifo. Trate de no agitar los frascos.
- g) Se debe colocar las bolsas enjuagadas en el analizador de fibra ANKOM^{200/220} y continúe con el procedimiento para determinar FND. Anote el peso de la FND *in vitro* como (P_3) para la fórmula. El análisis de la FND remueve los escombros de los microorganismos y cualquier fracción soluble. NOTA: Las bolsas se pueden almacenar en el refrigerador hasta que los parámetros de la FND se puedan determinar.

D. Fórmula

$$\% \text{ DIVMO}_{\text{Recibida}} = 100 - \{(P_3 - (P_1 \times P_2)) \times 100 / P_3\}$$

$$\% \text{ DVIMO}_{\text{MS}} = \{(P_3 - (P_1 \times C_1)) \times 100 / P_2 \times \text{MS}\}$$

Donde P_1 = peso filtro de bolsa F57

P_2 = peso de la muestra

P_3 = peso de la FND *in vitro*

C_1 = peso de bolsa vacía