



Agrociencia

ISSN: 1405-3195

agrocien@colpos.mx

Colegio de Postgraduados

México

Mora Jaimes, Gerardo; Bárcena Gama, Ricardo; Mendoza Martínez, Germán D.; González Muñoz, Sergio S.; Herrera Haro, José G.

Respuesta productiva y fermentación ruminal en borregos alimentados con grano de sorgo tratado con amilasas

Agrociencia, vol. 36, núm. 1, enero-febrero, 2002, pp. 31-39

Colegio de Postgraduados

Texcoco, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30236104>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

RESPUESTA PRODUCTIVA Y FERMENTACIÓN RUMINAL EN BORREGOS ALIMENTADOS CON GRANO DE SORGO TRATADO CON AMILASAS

PERFORMANCE AND RUMINAL FERMENTATION IN LAMBS FED SORGHUM GRAIN TREATED WITH AMYLASES

Gerardo Mora-Jaimes, Ricardo Bárcena-Gama, Germán D. Mendoza-Martínez,
Sergio S. González-Muñoz y José G. Herrera-Haro

Especialidad de Ganadería. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Postgraduados.
56230. Montecillo, Estado de México. (rbarcena@colpos.mx)

RESUMEN

Algunas enzimas amilolíticas industriales pueden incrementar la digestibilidad *in vitro* del almidón y es posible usarlas como aditivos en dietas con una concentración mediana o alta de granos para rumiantes. Esta investigación se hizo para evaluar cambios en la respuesta productiva y la fermentación ruminal en borregos alimentados con grano de sorgo tratado con amilasas industriales. La dieta tenía 50% de grano de sorgo, 30% rastrojo de maíz, 9% pasta de soya, 9% melaza, 1% urea y 1% de minerales. Los tratamientos fueron los siguientes: Dieta con sorgo sin enzima (T), dieta con 54 mL α -amilasa del *Bacillus licheniformis* kg⁻¹ sorgo (BI), y dieta con 10 mL glucoamilasa del *Aspergillus niger* kg⁻¹ sorgo (An). El diseño fue completamente al azar, en cada tratamiento se usaron siete borregos cruzados (26.05±2.95 kg, PV) alojados en jaulas metabólicas, y se midió la ganancia diaria de peso (GDP), consumo de materia seca (CMS) y conversión alimenticia (CA). Además, se hizo un ensayo metabólico con tres borregos cruzados adultos (68±3.05 kg, PV) fistulados en rumen y duodeno; el diseño fue un cuadro latino 3x3 replicado. Se evaluó la digestibilidad ruminal (DiRMS) y total de la MS (DiTMS), de la MO (DiRMO; DiTMO), del almidón (DiRALM; DiTALM), y digestibilidad total de FDN (DiTFDN), así como el pH, N-NH₃ y AGV en líquido ruminal. No hubo diferencias ($p>0.05$) entre T, BI y An para CMS (1164.5, 1290.5 y 1199.1 g), GDP (211.5, 231.3 y 209.9 g) y CA (5.5, 5.7 y 5.5). Hubo diferencia ($p<0.05$) en DiTMS entre An (68.18%) y BI (76.55%), y en DiTMO entre An (70.60%) y BI (78.19%). En DiRALM, An (87.23%) y BI (82.95%) fueron superiores ($p<0.05$) a T (75.13%). No se encontraron diferencias ($p>0.05$) en pH, N-NH₃ y AGV. Estos resultados sugieren que sería posible usar la α -amilasa del *Bacillus licheniformis* y la glucoamilasa del *Aspergillus niger* como aditivos para mejorar la digestibilidad ruminal del almidón del grano de sorgo.

Palabras clave: α -amilasa, almidón, digestibilidad, enzimas, glucoamilasa, ovinos.

ABSTRACT

Some industrial amylolytic enzymes may increase *in vitro* starch digestibility and could be used as additives for diets with medium to high level of grain concentration for ruminants. The objective of this study was to evaluate changes in productive performance and ruminal fermentation in sheep fed sorghum grain treated with industrial amylases. Diet had 50% sorghum grain, 30% corn stover, 9% soybean meal, 9% molasses, 1% urea and 1% minerals. Treatments were as follows: sorghum diet without enzyme (T), diet with 54 mL α -amylase from *Bacillus licheniformis* kg⁻¹ sorghum (BI), and diet with 10 mL glucoamylase from the *Aspergillus niger* kg⁻¹ sorghum (An). Seven crossbred lambs (26.05±2.95 kg, BW) were housed in individual metabolic pens and randomly assigned to each treatment. Daily weight gain (DWG), dry matter intake (DMI) and feed conversion (FC) were measured. Besides, a metabolic trial was carried out using three crossbred wethers (68±3.05 kg, BW) fitted with ruminal and duodenal cannulae, in a replicated 3x3 latin square design. Variables were ruminal and total digestibility for DM (DiRDM; DiTDM), OM (DiROM; DiTOM), starch (DiRSTA; DiTSTA), and NDF total digestibility (DiTNDF), as well as ruminal pH, N-NH₃ and VFA. There were no differences ($p>0.05$) among T, BI and An for DMI (1164.5, 1290.5 and 1199.1 g), ADG (211.5, 231.3 and 209.9 g) and FC (5.5, 5.7 and 5.5). There were differences ($p<0.05$) for DiTDM between An (68.18% and BI (76.55%), and for DiTOM between An (70.60% and BI (78.19%). DiRSTA was higher in An (87.23%) and BI (82.95%) ($p<0.05$) than T (75.13%). No differences were found ($p>0.05$) for pH, N-NH₃ and VFA. These results suggest that α -amylase from *Bacillus licheniformis* and glucoamylase from *Aspergillus niger* could be used as additives to improve ruminal digestibility of sorghum grain starch.

Key words: α -amylase, starch, digestibility, enzymes, glucoamylase, lambs.

INTRODUCTION

Ruminal starch digestion determines performance of ruminants fed high grain diets (Britton and Stock, 1986; Huntington, 1997). Strategies such

Recibido: Enero, 2001. Aprobado: Enero, 2002.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 36: 31-39. 2002.

INTRODUCCIÓN

La digestión ruminal del almidón determina el comportamiento productivo de los rumiantes alimentados con dietas altas en granos (Britton y Stock, 1986; Huntington, 1997). Así, para incrementar la tasa de digestión del almidón y el valor energético de los granos, se han desarrollado estrategias como rolado en seco, rolado a vapor, etc. y otros procesamiento de los granos (Owens *et al.*, 1997).

Las enzimas amilolíticas exógenas provienen de la fermentación controlada de bacterias u hongos (Declerk *et al.*, 1997) y se utilizan en la industria alimentaria para la hidrólisis del almidón (Reilly, 1985). Sin embargo, su uso como tratamiento para los granos o aditivo alimenticio en rumiantes ha recibido poca atención (Frumholtz y Beauchemin, 1999; Kung, 1999), aunque, aparentemente, pueden incrementar la digestibilidad ruminal del almidón (Rojo *et al.*, 2000) y mejorar el comportamiento productivo de ovinos (Romero *et al.*, 1992).

Bacillus licheniformis y *Aspergillus niger* son los microorganismos más estudiados para producir amilasas industriales (Declerk *et al.*, 1997), y se podrían usar para incrementar la digestión ruminal del almidón. Entonces, el grano de sorgo tratado con amilasas causaría cambios positivos en la digestibilidad del almidón, en otras variables de fermentación ruminal, y en la productividad de los rumiantes. Para probar esta hipótesis se estableció este experimento, cuyo objetivo fue evaluar la respuesta productiva y fermentación ruminal en borregos alimentados con grano de sorgo tratado con α -amilasa del *B. licheniformis* y con la glucoamilasa del *A. niger*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación, efectuada en la unidad metabólica y en el laboratorio de nutrición animal del Colegio de Postgraduados, consistió en una prueba de comportamiento productivo (experimento 1) de 60 d, y un ensayo metabólico (experimento 2) que duró 45 d.

Experimento 1

Se usaron 21 borregos machos cruzados (26.05 $\pm$ 2.95 kg, PV) alojados en jaulas metabólicas individuales, los cuales fueron desparasitados (Ivermectina; 1 mL/50 kg PV), vacunados (bacterina triple) y se les aplicó una inyección de vitaminas (Vigantol ADE; 1 mL animal⁻¹). La adaptación a las dietas experimentales duró 20 d, el alimento se proporcionó a las 08:00 y 18:00 h. Los tratamientos fueron los siguientes: 1) dieta con sorgo sin enzima (T, testigo); 2) dieta con sorgo con α -amilasa de *B. licheniformis* (BI); 3) dieta con sorgo con glucoamilasa de *A. niger* (An). Las dietas (Cuadro 1) se prepararon cada semana, asperjando 54 mL de α -amilasa o 10 mL de glucoamilasa por kg de sorgo, 24 h antes de mezclar los ingredientes.

as dry rolled, steam rolled, etc., and other grain treatments have been developed to increase starch digestion rate and grain energetic value (Owens *et al.*, 1997).

Exogenous amilolytic enzymes are obtained from controlled fermentation of bacteria or fungi (Declerk *et al.*, 1997) and they are used in the food industry for starch hydrolysis (Reilly, 1985). However, its use as a treatment for grain or food additive in ruminants has been given little attention (Frumholtz and Beauchemin, 1999; Kung, 1999). Apparently, they may increase starch ruminal digestibility (Rojo *et al.*, 2000) and improve sheep performance (Romero *et al.*, 1992).

The most studied microorganisms for producing industrial amylases are *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* (Declerk *et al.*, 1997). They could be used to increase starch ruminal digestion. Thus, amylase treated sorghum grain might induce positive changes in starch digestibility, in other variables of ruminal fermentation and in ruminant productivity. This experiment was carried out to test this hypothesis. Its objective was to evaluate productive response and ruminal fermentation in lambs fed sorghum treated with either α -amylase from *B. licheniformis* or glucoamylases from *A. niger*.

MATERIALS AND METHODS

A 60-day performance trial (experiment 1) and a 45-day metabolic trial (experiment 2) were carried out at the metabolic unit and the animal nutrition laboratory of the Colegio de Postgraduados.

Experiment 1

Twenty one crossbred male lambs were housed in individual metabolic pens (26.05 $\pm$ 2.95 kg, BW). They were treated against parasites (Ivermectina; 1 mL/50 kg BW), vaccinated (triple bacterine) and injected vitamins (Vigantol ADE; 1 mL animal⁻¹). Adaptation to experimental diets lasted 20 days. Food was given at 08:00 and 18:00 h. Treatments were as follows: 1) sorghum diet without enzyme (C, control); 2) sorghum diet with α -amylase from *B. licheniformis* (BI), 3) sorghum diet with glucoamylases from *A. niger* (An). Diets were prepared weekly (Table 1), sprinkling 54 mL of α -amylase or 10 mL of glucoamylase per kg of sorghum 24 h before preparing the mixture.

Concentration of α -amylase (Termozyme®) in the product is 4.0%, while for glucoamylase (Glucozyme®) it is 21.5%. These values were used to calculate that 2.1 g of enzyme kg⁻¹ of sorghum should be used; which agrees with the amount reported by Rojo *et al.* (2000). The enzymatic product was diluted in water at a rate of 1:3 (product:water) to facilitate its manual aspersion in the ground sorghum grain.

Diet samples were analyzed for DM, ashes and total nitrogen (NT) according to AOAC (1990), neutral fiber detergent (NFD) (Van Soest *et al.*, 1991) and starch (Herrera *et al.*, 1990). Response variables were: 1) dry matter intake (DMI) recorded daily as the difference

La concentración de la α -amilasa (Termozyme®) en el producto es de 4.0 %; mientras que para la glucoamilasa (Glucozyme®) es de 21.5 %, con lo cual se calculó que se debía usar 2.1 g de enzima kg^{-1} , cantidad que está de acuerdo con la recomendada por Rojo *et al.* (2000). El producto enzimático fue diluido en agua en una relación 1:3 (producto:agua) para facilitar su aspersión manual en el grano de sorgo molido.

En las muestras de las dietas se midió MS, cenizas y nitrógeno total (NT) de acuerdo a AOAC (1990), fibra detergente neutro (FDN) (Van Soest *et al.*, 1991) y almidón (Herrera *et al.*, 1990). Las variables de respuesta fueron las siguientes: 1) consumo de alimento (CMS) registrado diariamente como la diferencia entre el alimento ofrecido y el rechazado (se reporta en periodos de 14 d); 2) ganancia diaria promedio de peso (GDP) calculada por diferencia del peso vivo (PV) final y PV inicial dividido entre el número de días, y los pesajes se hicieron cada 14 d antes del alimento de la mañana; 3) conversión alimenticia (CA) que se obtuvo al dividir CMS entre GDP para periodos de 14 d.

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos y siete repeticiones, considerando a cada animal como la unidad experimental. Los datos se analizaron con SAS (1998) usando el PV inicial como covariable y la comparación de medias fue por el procedimiento de Tukey (Steel y Torrie, 1996). Se empleó el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + b(X_{ij} - \bar{X}_{..}) + \varepsilon_{ij},$$

donde Y_{ij} = variable respuesta; μ = media general; τ_i = efecto del i -ésimo tratamiento; b = coeficiente de regresión; X_{ij} = covariable (peso vivo inicial) y ε_{ij} = error experimental.

Experimento 2

Se utilizaron tres borregos machos adultos (68 ± 3.05 kg), fistulados en rumen y duodeno, alojados en jaulas metabólicas individuales, y asignados al azar a los tratamientos descritos en el experimento 1. El consumo de alimento se registró durante 10 d para estandarizarlo a 90%; el alimento se ofreció a las 07:00 y 19:00 h. Se tuvieron tres periodos (15 d cada uno): 1) 10 d para adaptación; 2) 5 d para tomar muestras: del día 1 al 4 se colectaron heces y quimo duodenal en intervalos de 8 h y un intervalo de 10 h entre la última muestra del día y la primera del día siguiente (Stock *et al.*, 1987); las muestras fueron congeladas inmediatamente para su análisis posterior. Durante el quinto día se tomaron muestras de líquido ruminal cada 4 h durante 24 h; se midió el pH de inmediato y se congelaron 50 mL de cada muestra, en las que posteriormente se midió la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno amoniacal (N-NH_3).

Las variables de respuesta fueron las siguientes: 1) pH ruminal medido con un potenciómetro cada 4 h durante 24 h, y se calculó el pH-horas que indica la cantidad de tiempo que el pH fue inferior a 6.2 en un periodo de 24 h (Plata *et al.*, 1994); 2) N-NH_3 analizado en muestras tomadas 4 y 8 h después de cada alimentación (McCullough, 1967); 3) AGV (mmol L^{-1} de líquido ruminal) medidos en un cromatógrafo de gas (Erwin *et al.*, 1961), en las mismas

Cuadro 1. Dietas experimentales y composición química.
Table 1. Experimental diets and chemical composition.

Ingrediente	Testigo	α -amilasa	Glucoamilasa
Sorgo molido (%)	50	50	50
Rastrojo de maíz molido (%)	30	30	30
Pasta de soya (%)	9	9	9
Melaza (%)	9	9	9
Urea (%)	1	1	1
Minerales (%) [†]	1	1	1
α -amilasa (mL kg^{-1} sorgo)	-	54	-
Glucoamilasa (mL kg^{-1} sorgo)	-	-	10
Composición química [‡]			
MS (%)	89.79	90.97	90.95
MO (%)	93.03	92.79	92.85
EM (Mcal) [§]	2.62	2.62	2.62
PC (%)	14.52	14.66	14.48
FDN (%)	28.78	27.33	28.48
Almidón dieta (%)	37.54	37.33	38.44
Almidón sorgo (%)	70.24	69.24	70.12

[†] Rumisal Plus® (cada kg contiene: 130, 50, 109, 200, 4.3 y 3.33 g de Ca, P, Na, Cl, Fe y Mg; 200, 80, 66.6, 4, 80 y 70 mg de Mn, Cu, Co, I, Zn y Se, respectivamente) ♦ Rumisal® Plus (each kilogram contains: 130, 50, 109, 200, 4.3 and 3.3 g of Ca, P, Na, Cl, Fe and Mg; 200, 80, 66.6, 4, 80 and 70 mg of Mn, Cu, Co, I, Zn and Se, respectively).

[‡] Análisis hechos en el laboratorio de nutrición animal (base seca) ♦ Analysis made in the animal nutrition lab (dry basis).

[§] Calculado de tablas del NRC (1985) ♦ Calculated from NRC tables (1985).

between the feed offered and rejected (it is reported in 14 d periods); 2) average daily weight gain (ADG) calculated as the difference between final and initial body weight (BW) divided by the number of days; weighings were made every 14 d before the morning meal; 3) feed conversion (FC) was obtained by dividing DMI by ADG for 14 d periods.

A completely randomized design with three treatments and seven repetitions was used, considering each animal as the experimental unit. Data were analyzed with SAS (1998) using initial BW as covariable and means comparisons were done using Tukey's test (Steel and Torrie, 1996). The following statistical model was used:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + b(X_{ij} - \bar{X}_{..}) + \varepsilon_{ij},$$

where Y_{ij} = response variable; μ = mean; τ_i = effect of the i -th treatment; b = regression coefficient; X_{ij} = covariable (initial breed weight) and ε_{ij} = experimental error.

Experiment 2

Three adult wethers (68 ± 3.05 kg) were fitted with ruminal and duodenal cannulae, housed in individual metabolic pens and randomly assigned to the treatments described in experiment 1. Feed intake was recorded for 10 days to standardize it at 90%. Feed was offered at 07.00 and 19.00 h. There were three periods (15 d each): 1) 10 d for adaptation; 2) 5 d for sampling: between day 1-5 duodenal and fecal samples were collected at 8 h intervals, besides a 10 h interval between the last sample of the day and the first one of the

muestras usadas para N-NH₃; 4) digestibilidad ruminal y total de MS (DiRMS; DiTMS), MO (DiRMO; DiTMO), almidón (ALM; DiRALM; DiTALM) y digestibilidad total de FDN (DiTFDN). Las muestras de heces y quimo duodenal fueron descongeladas, secadas en estufa (55 °C), y se hizo una sola muestra compuesta por tratamiento y por periodo, la cual fue molida en un molino con una criba de 1 mm. Para calcular la digestibilidad, se midió MS, MO, ALM, FDN, y cenizas ácido insolubles (CAI) como marcador interno.

Los datos se analizaron para un diseño experimental de cuadrado latino 3x3 replicado, con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = M + H_i + C_j + T_k + E_{ijk}$$

donde Y_{ijk} = variable respuesta; M = media general; H_i = efecto de la hilera i (periodo); C_j = efecto de la columna j (animal); T_k = efecto del tratamiento k (tratamiento) y, E_{ijk} = error experimental.

Las medias de los tratamientos se compararon mediante el procedimiento de Tukey (Steel y Torrie, 1996). Los valores de pH, N-NH₃ y AGV se analizaron por el procedimiento de mediciones repetidas del SAS (Wilcox *et al.*, 1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Consumo de alimento

No hubo diferencia ($p > 0.05$) para el consumo total ni para el consumo promedio por periodos (Cuadro 2). Al respecto, Rojo *et al.* (2000) encontraron un CMS de 1.07 kg para el testigo, 1.01 kg para la α -amilasa y 1.01 kg para la glucoamilasa ($p > 0.05$) utilizando una dieta con 70% de grano de sorgo y 2.9 g de enzima kg⁻¹ de sorgo. Estos valores son menores a los de la presente investigación, posiblemente por diferencias en composición de la dieta y la concentración de enzima. La adición de enzimas en dietas (40 y 60% de sorgo) para borregos pelibuey no cambió ($p > 0.05$) el CMS: 1.22 y 1.18 kg para 40 y 60% de sorgo con enzima; 1.42 y 1.53 kg para

Cuadro 2. Consumo de alimento por periodos y total en borregos alimentados con sorgo sin tratar, o tratado con α -amilasa y con glucoamilasa.

Table 2. Feed intake by period and total in lambs fed untreated sorghum or treated with α -amylase and glucoamylases.

Periodo	Consumo de MS (g MS d ⁻¹)			
	Testigo	α -amilasa	Glucoamilasa	EE [†]
1	1072.32	1174.95	1116.24	156.96
2	1151.13	1295.21	1170.49	148.40
3	1220.46	1345.35	1244.12	170.53
4	1214.22	1346.79	1265.68	174.91
Total	1164.53	1290.58	1199.13	136.78
g kg ⁻¹ PV ⁷⁵	77.07	81.68	78.80	6.73

[†] Error estándar de la media ♦ Mean standard error.

following day (Stock *et al.*, 1987). Samples were immediately frozen to be analyzed later. On the fifth day Ruminal liquid samples were taken every 4 h for 24 h on day 5; pH was immediately measured and 50 mL of each sample was frozen where concentration of volatile fat acids (VFA) and ammoniac nitrogen (N-NH₃) were measured later on.

Response variables were as follows: 1) ruminal pH measured with a pH-meter every 4 h for 24 h and pH-hours, which indicate the amount of time when pH was lower than 6.2 in a period of 24 h, was calculated (Plata *et al.*, 1994); 2) N-NH₃ analyzed in samples taken 4 and 8 h after each feeding (McCullough, 1967); 3) VFA (mmol L⁻¹ of ruminal fluid) measured in a gas chromatograph (Erwin *et al.*, 1961), in the same samples used for N-NH₃; 4) total and ruminal digestibility of DM (DiRDM; DiTDM), OM (DiROM; DiTOM), starch (STA; DiRSTA; DiTSTA) and total digestibility of NFD (DiTNFD). Fecal and duodenal samples were thawed, oven dried (55 °C) and mixed in a single sample per treatment and by period, which was ground in a mill with a 1 mm sieve. To calculate digestibility, DM, OM, ALM, NFD, and insoluble acid ashes (IAA) as internal marker, were measured.

Data were analyzed for a replicated 3x3 latin square experimental design, with the following statistical model:

$$Y_{ijk} = M + H_i + C_j + T_k + E_{ijk}$$

where Y_{ijk} = response variable; M = general mean; H_i = effect of row i (period); C_j = effect of column j (animal); T_k = effect of treatment k (treatment), and E_{ijk} = experimental error.

Treatment means were compared using Tukey's test (Steel and Torrie, 1996). pH, N-NH₃ and VFA data were analyzed using SAS repeated measurements procedure (Wilcox *et al.*, 1990).

RESULTS AND DISCUSSION

Feed intake

There was no difference ($p > 0.05$) for total and average DM intake by period (Table 2). Rojo *et al.*, (2000) found a DMI of 1.07 kg for the control treatment, 1.01 kg for the α -amylase and 1.01 kg for glucoamylase ($p > 0.05$) using a diet with 70% of sorghum grain and 2.9 g of enzyme kg⁻¹ of sorghum. These values are lower than the ones in this research, maybe due to differences in diet composition and enzyme concentration. The addition of enzymes to the diets (40 and 60% of sorghum) for pelibuey lambs did not change ($p > 0.05$) the DMI: 1.22 and 1.18 kg for 40 and 60% of sorghum with enzyme; 1.42 and 1.53 kg for 40 and 60% of sorghum without enzyme (Romero *et al.*, 1992). These values of DMI for the treatments with enzymes are similar to the ones of this research except that in this case the DMI for the control treatment tends to be lower than with enzymes. Romero *et al.* (1992) observed that the treatment of

40 y 60% de sorgo sin enzima (Romero *et al.*, 1992). Estos valores de CMS para los tratamientos con enzimas son similares a los de la presente investigación, con la diferencia que, en este caso, el CMS para el tratamiento testigo tiende a ser menor que con enzimas. Romero *et al.* (1992) observaron que el tratamiento de sorgo con enzimas no cambia el CMS, pero sí incrementa la GDP y mejora la CA.

Ganancia diaria promedio de peso

La GDP por periodos y total (Cuadro 3) no fue diferente ($p>0.05$) entre tratamientos aunque, en promedio, el tratamiento con α -amilasa fue numéricamente superior al testigo (231.31 vs 211.55 g d⁻¹). La GDP fue similar: 291.80, 172.47, 185.37 y 238.77 g d⁻¹ para los periodos 1, 2, 3 y 4. Estos resultados son menores a los de Rojo *et al.* (2000) quienes observaron GDP ($p>0.05$) de 237.9, 270.2 y 257.6 g d⁻¹, para el tratamiento con sorgo sin enzima, con α -amilasa y con glucoamilasa. En la literatura revisada no se encontraron más estudios al respecto, por lo que las comparaciones resultan insuficientes para extraer conclusiones específicas.

Conversión alimenticia

La CA en cada periodo y total (Cuadro 4) no fue diferente ($p>0.05$) entre tratamientos, lo cual es similar a lo encontrado por Rojo *et al.* (2000): 4.59, 3.93 y 4.01 para el tratamiento sin enzima, con α -amilasa y con glucoamilasa. La falta de respuesta a las enzimas amilolíticas podría deberse a varias razones como el potencial genético de los animales, a la limitación de proteína metabolizable y no a la energía derivada de la fermentación del almidón, o bien a que las bacterias ruminales, al recibir la enzima por periodos prolongados, hayan desarrollado la capacidad para degradar la enzima. Los resultados *in vitro* o *in situ* con estas enzimas muestran resultados benéficos (Mendoza *et al.*,

sorghum with enzymes does not change the DMI but does increase the ADG and improve FC.

Average daily weight gain

ADG, total and by period (Table 3), was not different ($p>0.05$) among treatments. On average, though, the treatment with α -amylase was numerically higher compared to the control (231.31 vs 211.55 g d⁻¹). ADG was similar: 291.80, 172.47, 185.37 and 238.77 g d⁻¹ for periods 1, 2, 3 and 4. These results are lower to those from Rojo *et al.* (2000) who found ADG ($p>0.05$) of 237.9, 270.2 and 257.6 g d⁻¹, for the treatment with sorghum without enzyme, with α -amylase and glucoamylases. In the literature reviewed, no other studies were found on the subject; therefore, comparisons are not enough to obtain specific conclusions.

Feed conversion

FC, total and by period (Table 4), was not different ($p>0.05$) among treatments, which is similar to results reported by Rojo *et al.* (2000): 4.59, 3.93 and 4.01 for the treatment without enzyme, with α -amylase and glucoamylases. The lack of response to amilolytic enzymes could be due to several reasons: animals' genetic potential, limiting metabolizable protein but not the energy derived from starch fermentation; besides, ruminal bacteria may have developed the ability to degrade the enzyme after receiving it for long periods. *In vitro* or *in situ* results with these enzymes show beneficial results (Mendoza *et al.*, 1998) and factors limiting *in vivo* response must be identified.

Data for DMI, ADG and FC in this research agree with that reported by Rojo *et al.* (2000), as there were no differences ($p>0.05$) among treatments with and without enzymes. This could be due to doses of enzymes, time of action of the enzyme on the substrate and changes that the enzyme might induce in the rumen.

Cuadro 3. Ganancia diaria de peso por periodos y total en borregos alimentados con sorgo sin tratar, o tratado con α -amilasa y con glucoamilasa.

Table 3. Daily weight gain by period and total in lambs fed untreated sorghum or treated with α -amylase and glucoamylases.

Periodo	Ganancia diaria de peso (g d ⁻¹)			
	Testigo	α -amilasa	Glucoamilasa	EE [†]
1	288.43	296.42	290.56	94.44
2	186.73	161.25	169.45	52.40
3	156.16	203.02	196.94	65.20
4	239.91	260.99	215.41	58.53
Total	211.55	231.31	209.92	42.06

[†] Error estándar de la media ♦ Mean standard error.

Cuadro 4. Conversión alimenticia por periodos y total en borregos alimentados con sorgo sin tratar, o tratado con α -amilasa y con glucoamilasa.

Table 4. Feed conversion by period and total in lambs fed with untreated sorghum or treated with α -amylase and glucoamylases.

Periodo	Conversión alimenticia			
	Testigo	α -amilasa	Glucoamilasa	EE [†]
1	4.88	4.10	4.32	2.28
2	6.38	8.74	7.15	1.81
3	8.57	7.33	7.02	3.09
4	5.59	5.25	6.00	1.22
Total	5.50	5.70	5.55	0.67

[†] Error estándar de la media ♦ Mean standard error.

1998) y se deben identificar los factores que limitan la respuesta *in vivo*.

Los datos para CMS, GDP y CA en esta investigación concuerdan con los reportados por Rojo *et al.* (2000), dado que no hubo diferencias ($p>0.05$) entre tratamientos con y sin enzimas. Esto puede ser consecuencia de las dosis de enzimas, del tiempo de acción de la enzima en el sustrato y de los cambios que ésta pudiera tener en el rumen.

Digestibilidad ruminal y total

La digestibilidad ruminal y total de la MS, MO, almidón y FDN se presentan en el Cuadro 5. La DiTMS y DiTMO de glucoamilasa (68.18 y 70.60%) fue inferior ($p<0.05$) que para α -amilasa (76.55 y 78.19%). No hubo diferencias ($p>0.05$) entre tratamientos para DIRMS, DIRMO, DiFDN y DiTALM; además, prácticamente todo el almidón consumido fue digerido en el tubo digestivo.

La DiRALM de glucoamilasa (87.23%) y α -amilasa (82.95%) fue superior ($p<0.05$) a la del testigo (75.13%), es decir, las enzimas del *B. licheniformis* y *A. niger* incrementaron significativamente la digestibilidad ruminal del almidón; además, 83.8 y 88.4% (α -amilasa y glucoamilasa) de la DiTALM ocurrió en el rumen. Ello coincide con otros resultados (Mendoza *et al.*, 1998; Rojo *et al.*, 1999; Rojo *et al.*, 2000) en pruebas de digestibilidad *in vitro* e *in situ* con granos de sorgo y maíz. Estos datos sugieren que la acción de las enzimas exógenas tiene sinergismo con las enzimas de los microorganismos ruminales (Frumholtz y Beauchemin, 1999), favoreciendo una mayor degradación del almidón, lo cual pudo aumentar la DiTMS y DiTMO de las dietas.

Cuadro 5. Digestibilidad ruminal y total de MS, MO, almidón y FDN en borregos alimentados con sorgo sin tratar, o tratado con α -amilasa y con glucoamilasa[†].

Table 5. Ruminal and total digestibility of DM, OM, starch and NFD in lambs fed sorghum untreated or treated with α -amylase and glucoamylases[†].

Digestibilidad	Testigo	α -amilasa	Glucoamilasa	EE [¶]
DIRMS (%)	46.06 (62.5)	56.27 (73.5)	45.27 (66.4)	5.79
DiTMS (%)	73.68 ^{ab}	76.55 ^a	68.18 ^b	1.31
DIRMO (%)	51.81 (68.1)	60.65 (77.5)	50.90 (72.1)	5.13
DiTMO (%)	76.02 ^{ab}	78.19 ^a	70.60 ^b	1.44
DiRALM (%)	75.13 ^a (76.5)	82.95 ^b (83.8)	87.23 ^b (88.4)	1.57
DiTALM (%)	98.24	99.00	98.69	0.64
DiTFDN (%)	48.09	51.49	43.90	3.78

^{a, b} Medias con distinta literal dentro de hileras son diferentes ($p<0.05$)

[¶] Means with different literal within rows are different ($p<0.05$).

[†] Valor entre paréntesis en cada tratamiento es el % respecto a la digestibilidad total [¶] Value in brackets for each treatment is the % according to total digestibility.

[¶] Error estándar de la media [¶] Mean standard error.

Ruminal and total digestibility

Ruminal and total digestibility of DM, OM, starch and NDF are shown in Table 5. The DiTSM and DiTOM of glucoamylases (68.18 and 70.60%) were lower ($p<0.05$) than for α -amylase (76.55 and 78.19%). There were no differences ($p>0.05$) among treatments for DiRDM, DiROM, DiNDF and DiTSTA; besides, almost all the ingested starch was digested in the digestive tract.

Glucoamylases DiRSTA (87.23%) and α -amylase (82.95%) were higher ($p<0.05$) than control (75.13%). In other words, enzymes from *B. licheniformis* and *A. niger* significantly increased starch ruminal digestibility; besides, 83.8 and 88.4% (α -amylase and glucoamylases) of the DiTSTA took place in the rumen. This agrees with other results (Mendoza *et al.*, 1998; Rojo *et al.*, 1999; Rojo *et al.*, 2000) from *in vitro* and *in situ* digestibility trials with sorghum and maize grains. These data suggest that the action of exogenous enzymes has synergy with enzymes of ruminal microorganisms (Frumholtz and Beauchemin, 1999), which results in a higher starch degradation and could play a role in the increase of the DiTMS and DiTOM of the diets.

Ruminal pH

Ruminal pH was not different ($p>0.05$) among treatments (Table 6). This means that these amylolytic enzymes only react in the starch of the sorghum grain, apparently before it is ingested by the animal. Thus, its ruminal activity would be reduced and hence not enough to change pH.

Ammonium nitrogen

Concentration of ammonium nitrogen (Table 7) in the rumen was not different ($p>0.05$) among treatments. This shows, like pH data, that the enzymes do not affect ruminal N-NH₃ with the doses and concentration of grain used in the diet.

Volatile fatty acids

Concentrations of VFA (Table 8) were not different ($p>0.05$) among treatments, except at 12 h, when the treatment with glucoamylases showed the lowest ($p<0.05$) total concentration of VFA. It was expected that treatments with enzymes would have a higher propionic acid concentration due to the higher starch ruminal digestibility. It did not happen, maybe because the effect of the enzymes in the rumen was too fast to be detected with the sampling system used in this trial, or maybe

pH ruminal

El pH ruminal no fue diferente ($p>0.05$) entre tratamientos (Cuadro 6), es decir, estas enzimas amilolíticas sólo actúan en el almidón del grano de sorgo, al parecer, antes de que sea ingerido por el animal, por lo cual su actividad ruminal se reduciría y no sería suficiente para cambiar el pH.

Nitrógeno amoniacal

La concentración de nitrógeno amoniacal (Cuadro 7) en el rumen no fue diferente ($p>0.05$) entre tratamientos. Esto refleja, al igual que los datos de pH, que las enzimas no tienen efecto en el $N-NH_3$, ruminal con la dosis y concentración de grano usado en la dieta.

Ácidos grasos volátiles

Las concentraciones de los AGV (Cuadro 8) no fueron diferentes ($p>0.05$) entre tratamientos, excepto a las 12 h cuando el tratamiento con glucoamilasa presentó la menor ($p<0.05$) concentración total de AGV. Se esperaba que los tratamientos con enzimas tuvieran mayor concentración de ácido propiónico dada la mayor digestibilidad ruminal del almidón; sin embargo, esto no sucedió, posiblemente porque el tiempo de efecto de las enzimas en el rumen fue demasiado rápido para ser detectado con el sistema de toma de muestras usado en esta prueba, o bien, el principal efecto de las enzimas en el fraccionamiento de las cadenas de almidón ocurre antes de llegar al rumen.

En el ensayo metabólico, el efecto más importante de las enzimas fue el aumento en la digestibilidad ruminal del almidón sin cambios en el pH; sin embargo, no siempre se mejora el comportamiento productivo cuando se incrementa la digestibilidad en rumiantes (Tjardes *et al.*,

because enzymes' main effect of cleaving the starch chains takes place before they enter the rumen.

The most important effect of the enzymes in the metabolic trial was the increase in starch ruminal digestibility without changing pH. In ruminant's, however, an increase in digestibility is not always followed by an improvement in productivity (Tjardes *et al.*, 2000). In this study, sorghum grain (50%) and the level (30%) of low quality forage in the diet might not have allowed the higher rumen starch digestibility to have an impact on production variables. It is possible that diets with a higher proportion of sorghum grain treated with these enzymes, may cause significant differences due to the higher amount of starch degraded in the rumen, as it was shown by Rojo *et al.* (2000).

Addition of exogenous enzymes did not change ruminal fermentation variables (pH; $N-NH_3$ and VFA) but did increase starch ruminal digestibility, though it was not reflected in ADG. These results suggest that the enzymatic action takes place when sprinkling enzymes over the sorghum grain and in the 24 h rest period. It is possible that enzymes cleave starch chains to its simpler form (monomer) and ruminal endogenous enzymes activity would be faster and more efficient. Besides, enzyme doses, enzymatic degradation, calcium concentration in the diet, interaction with carbohydrates or minerals, relationship with other enzymes, pH, and temperature affect enzymatic activity (Bose and Das, 1996; Frumholtz and Beauchemin, 1999) and the interactions inside and outside the rumen, and all of these, may change the experimental results; however, this has not yet been evaluated.

CONCLUSIONS

Glucoamilases from *Aspergillus niger* and α -amylase from *Bacillus licheniformis* increase starch ruminal digestibility of sorghum grain without changing other ruminal fermentation variables. Feed intake weight gain

Cuadro 6. pH ruminal en borregos alimentados con sorgo sin tratar, o tratado con α -amilasa y con glucoamilasa.

Table 6. Ruminal pH in lambs fed untreated sorghum or treated with α -amylase and glucoamylases.

Hora	pH ruminal			
	Testigo	α -amilasa	Glucoamilasa	EE [†]
00	6.25	6.16	6.32	0.41
04	6.01	5.84	5.73	0.23
08	6.00	6.08	5.83	0.20
12	6.33	6.59	6.36	0.32
16	5.50	5.57	5.75	0.05
18	5.87	5.92	6.05	0.24
24	6.52	6.61	6.71	0.18
Media	6.07	6.11	6.10	0.41
pH horas (<6.2)	4.35	4.91	5.50	0.52

[†] Error estándar de la media $\diamond$ Mean standard error.

Cuadro 7. Nitrógeno amoniacal en borregos alimentados con sorgo sin tratar, o tratado con α -amilasa y con glucoamilasa.

Table 7. Ammonia nitrogen in lambs fed untreated sorghum or treated with α -amylase and glucoamylases.

Hora	Nitrógeno amoniacal, mg dL ⁻¹			
	Testigo	α -amilasa	Glucoamilasa	EE [†]
04	9.47	15.17	16.50	5.04
08	10.32	10.51	6.84	4.49
12	12.55	21.41	15.30	5.52
16	8.56	12.52	6.17	3.10
Media	12.41	14.91	14.21	7.75

[†] Error estándar de la media $\diamond$ Mean standard error.

Cuadro 8. Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) en borregos alimentados con sorgo sin enzimas, o tratado con α -amilasa y con glucoamilasa.**Table 8. Volatile fatty acids concentration (VFA) in lambs fed untreated sorghum or treated with α -amylase and glucoamylases.**

Hora	Concentración AGV (mmol)				Acético (%)				Propiónico (%)				Butírico (%)				Acético:Propiónico			
	T	Bl	An	EE	T	Bl	An	EE	T	Bl	An	EE	T	Bl	An	EE	T	Bl	An	EE
04	81.93	80.40	87.40	30.7	56.80	54.30	55.20	2.04	29.70	30.80	27.80	6.94	13.30	14.80	16.90	5.64	2.07	1.81	2.08	0.58
08	86.22	82.61	83.90	7.5	57.20	54.70	55.70	2.40	30.10	31.20	27.92	7.37	12.60	14.00	16.20	6.66	2.05	1.85	2.22	0.53
12	115.4 ^a	117.3 ^a	95.70 ^b	3.3	56.10	53.50	53.80	2.93	30.80	32.10	28.13	7.93	13.00	14.30	18.00	7.37	1.98	1.71	2.04	0.58
16	99.42	95.26	72.60	22.1	56.10	53.40	58.40	5.74	31.20	30.50	26.63	7.72	12.50	15.90	14.50	5.45	2.01	1.86	2.43	0.67
M	94.74	93.90	84.90	15.9	56.60	54.00	55.80	3.27	30.40	31.20	27.62	7.49	12.88	14.70	16.40	6.28	2.02	1.80	2.19	0.59

T = Testigo, Bl = α -amilasa, An = Glucoamilasa, M = Media general, EE = Error estándar de la media $\diamond$ T = Control, Bl = α -amylase, An = Glucoamylase, M = General mean, EE = Mean standard error.

2000). En esta investigación, el contenido de grano de sorgo (50%) y el nivel de forraje de baja calidad (30%) en la dieta, pueden ser factores que no permitieron que la mayor digestibilidad del almidón en el rumen se reflejara en las variables de producción. Es posible que dietas con una mayor proporción de grano de sorgo tratado con estas enzimas puedan causar diferencias significativas debido a la mayor proporción de almidón que se degrade en rumen, como fue demostrado por Rojo *et al.* (2000).

La inclusión de enzimas exógenas no cambió las variables de fermentación ruminal (pH, N-NH₃ y AGV) pero aumentó la digestibilidad ruminal del almidón, aunque no se reflejó en la GDP. Estos resultados sugieren que la acción enzimática ocurre al asperjar las enzimas sobre el grano de sorgo y en las 24 h de reposo. Es posible que las enzimas fraccionen las cadenas de almidón a sus formas más simples (monómeros), por la cual la acción de las enzimas endógenas ruminales sería más rápida y eficiente. Además, las dosis de enzima, la degradación enzimática, la concentración de calcio en la dieta, la interacción con carbohidratos o minerales, la relación con otras enzimas, las condiciones de pH y temperatura afectan la actividad enzimática (Bose y Das, 1996; Frumholtz y Beauchemin, 1999), y las interacciones dentro y fuera del rumen, lo que puede cambiar los resultados experimentales; sin embargo, esto todavía no se ha evaluado.

CONCLUSIONES

La glucoamilasa del *Aspergillus niger* y la α -amilasa del *Bacillus licheniformis* aumentan la digestibilidad ruminal del almidón del grano de sorgo, sin cambiar las demás variables de fermentación ruminal. El consumo de alimento, ganancia de peso y conversión alimenticia tampoco son afectados por los tratamientos con enzimas, en la proporción de sorgo en la dieta y dosis enzimática utilizados en este experimento.

and feed conversion are not affected by treatments with enzymes, in the proportion of sorghum in the diet and enzymatic doses used in this experiment.

—End of the English version—



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado en el proyecto 27923B.

LITERATURA CITADA

- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Vol. 1. 15th Ed. Asso. Offic. Anal. Chem. Washington, D. C. pp: 69-88.
- Bose, K., and D. Das. 1996. Thermostable alpha-amylase production using *Bacillus licheniformis* NRRL B14368. Indian J. Exp. Biol. 34:1279-1282.
- Britton, R. A., and R. A. Stock. 1986. Acidosis, rate of starch digestion and intake. In: Agricultural Experiment Station Oklahoma State University (ed.). Symposium Proceedings: Feed Intake by Beef Cattle. pp: 125-136.
- Declerk, N., M. Machius, R. Chambert, G. Wiegand, R. Huber and C. Gallardin. 1997. Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase: Thermodynamic studies and structural interpretation. Prot. Engin. 10: 541-549.
- Erwin, E. S., G. J. Marco and E. Emery. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. J. Dairy Sci. 44: 1768-1776.
- Frumholtz, P., y K. Beauchemin, 1999. El uso de enzimas en rumiantes. In: Biotecnología para la Alimentación Animal. AMENA. México, D.F. 153 p.
- Herrera, S. R. E., J. T. Huber and M. H. Poore. 1990. Dry matter, crude protein and degradability of five cereal grains. J. Dairy Sci. 73: 2386-2393.
- Huntington, G. B. 1997. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. J. Anim. Sci. 75:852-867.
- Kung, L. 1999. Productos microbianos para la alimentación directa y enzimas en la nutrición de rumiantes. In: Biotecnología para la Alimentación Animal. AMENA. México, D.F. 153 p.

- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clin. Chem. Acta.* 17: 297-304.
- Mendoza M. G. D., M. M. Crosby G., S. González M., R. Bárcena G., y R. Rojo R. 1998. Uso de amilasas termoestables de *B. licheniformis* en la digestibilidad *in vitro* del almidón. XXXIV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Qro, Qro. p:138.
- NRC. 1985. Nutrient Requirements of Sheep. Sixth Revised Edition. National Academy Press. Washington, D.C. 104 p.
- Owens, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill, and D. R. Gill. 1997. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 75:868-879.
- Plata, P. F., G.D. Mendoza M., J. R. Bárcena G., and S. González M. 1994. Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on neutral detergent fiber digestion in steers fed oat straw based diets. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 49:203-210.
- Reilly, P. J. 1985. Enzymic degradation of starch. *In: Starch Conversion Technology.* Van Beyunm G. M. and J. A. Roels (eds.) Macel Dekker, Inc. N.Y. 345 p.
- Rojo R. R., G. D. Mendoza M., S. González M., y L. Landois P. 1999. Uso potencial de amilasas exógenas de *Bacillus licheniformis* y *Aspergillus niger* para incrementar la digestibilidad *in vitro* del grano de maíz. IX Congreso Nacional AMENA. pp: 29.
- Rojo, R. R., G. D. Mendoza M., S. González M., M. E. Suárez O., R. Bárcena G, y L. Landois P. 2000. Digestibilidad *in situ* y respuesta productiva de borregos alimentados con dietas basadas en grano de sorgo tratado con amilasas. Asociación Mexicana de Producción Animal. Tapachula, Chis. México. pp: 205-208.
- Romero, B. M. A., D. J. M. Lopez, y A. R. A. Gómez. 1992. Digestibilidad de dietas de engorda tratadas con enzimas para grano de sorgo. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Chihuahua, Chih. pp: 181.
- SAS. 1998. User's Guide Statistics, SAS Inst. Inc. Cary. North Carolina. U.S.A. 558 p.
- Steel, R. G. D. y J.H. Torrie. 1996. Bioestadística: Principios y Procedimientos. Segunda edición. McGraw-Hill. México, D.F. 622 p.
- Stock, R. A., D. R. Brink, R. A. Britton, F. K. Goedeken, M. H. Sindt, K. K. Kreikemeier, M. L. Bauer and K. K. Smith. 1987. Feeding combinations of high moisture corn and dry-rolled grain sorghum to finishing steers. *J. Anim. Sci.* 65:290-302.
- Tjardes, K. E., D. D. Kuskirk, M. S. Allen, N. K. Ames, L. D. Bourquin, and S. R. Rust. 2000. Brown midrib-3 corn silage improves digestion but not performance of growing beef steers. *J. Anim. Sci.* 78:2957-2965.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Symposium: Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 74:3583-3597.
- Wilcox, C. J., W. W. Thalcher, and F. G. Martin. 1990. Statistical analysis of repeated measurements in physiology experiments. *In: Proc Final Research Coordination Meeting of the FAO/IAEA/ARCAI. III Regional Network for improving the Reproductive Management of Meat and Milk Producing Livestock in Latin America with the Aid of Radioimmunoassay Int.* Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. pp: 141-155.