

Efecto de enzimas exógenas sobre la fermentación y calidad
nutricional de ensilaje de sorgo

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,
Área Producción Animal*

Leandro Sebastián Royo

Médico Veterinario - Universidad Nacional del Nordeste - 2009

Lugar de trabajo: Cátedra de Nutrición Animal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires e INTA Estación Experimental Agropecuaria Reconquista.



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Gustavo Jaurena

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
M.Sc. (Pontificia Universidad Católica de Chile)
Ph.D. (University of Wales)

Co-Director de tesis

Dario Colombatto

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
Ph.D. (University of Reading)

JURADO DE TESIS

Adriana Mabel Rodríguez

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)
M.Sc. (Universidad de Buenos Aires)
Doctora (Universidad de Buenos Aires)

Gustavo Depetris

Veterinario (Universidad de Mar del Plata)
M.Sc. (Universidad de Mar del Plata)

Gustavo Enrique Schrauf

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
Doctor (Universidad de Buenos Aires)

Dedicatoria

A mis padres, Olegario y Rita.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a las siguientes personas que me ayudaron durante la elaboración de esta tesis:

En primer lugar, al Ing. Agr. Gustavo Jaurena, por la confianza ofrecida, por los conocimientos transmitidos y la amistad brindada.

A los integrantes de la cátedra de Nutrición Animal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. A Marisa Wawrzkievicz por los conocimientos transmitidos en la evaluación nutricional de las muestras de esta tesis. Al personal del laboratorio, Susana, Lucía y Florencia por la ayuda, la paciencia y los conocimientos en el Laboratorio de Nutrición Animal. A las secretarias Patricia y Analía por la ayuda brindada durante toda la carrera.

A Marina Ciamza y Virginia Fernández de la Cátedra de Química de Biomoléculas por la ayuda y los conocimientos ofrecidos.

Al Ing. Agr. Dr. Pedro Tognetti por el asesoramiento con el análisis estadístico.

A mi familia y amigos.

Declaración

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.

INDICE GENERAL

1. Capítulo 1: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	10
1.1. INTRODUCCIÓN	10
1.1.1. La calidad del silaje de sorgo.....	11
1.1.1.1. Análisis de los componentes de la planta y sus proporciones	11
1.1.1.2. Análisis del avance del estado fenológico sobre la composición química de la planta de sorgo.....	12
1.1.1.3. Análisis del efecto del avance de los estadios fenológicos sobre la calidad nutricional del silaje de sorgo	13
1.1.1.4. Impacto de la composición de la planta de sorgo sobre la calidad fermentativa del silaje	13
1.1.2. Enzimas.....	14
1.1.2.1. Fibrolíticas	14
1.1.2.2. Proteasas	15
1.2. Hipótesis general.....	16
1.3. Objetivos	17
2. Capítulo 2: EFECTO DE DOS ENZIMAS EXOGENAS EN SILAJE DE PLANTA ENTERA DE SORGO	18
2.1. INTRODUCCIÓN	18
2.1.1. Hipótesis.....	20
2.1.2. Objetivos	21
2.2. MATERIALES y MÉTODOS	21
2.2.1. Sitio experimental.....	21
2.2.2. Tratamientos y diseño experimental	21
2.2.3. Análisis de laboratorio	23
2.2.4. Análisis estadístico	25
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
2.3.1. Caracterización del material original.....	27
2.3.1.1. Comparación entre los híbridos con baja y alta proporción de panoja.....	27
2.3.1.2. Comparación entre estados fenológicos	28
2.3.1.3. Análisis multivariado de los efectos de los híbridos y la fenología sobre las características químico-nutricionales del material original	32
2.3.2. Composición química, calidad nutricional y perfil fermentativo del silaje de planta entera de sorgo tratado con enzimas exógenas.....	33
2.3.2.1. Comparación entre los híbridos S1 y S2.....	33
2.3.2.2. Comparación de los estados fenológicos (ANOVA).....	34
2.3.2.3. Efecto de las enzimas PROT y FIBRO (ANOVA)	36
2.3.2.4. Efecto de los híbridos, la fenología y las enzimas sobre la composición química y calidad nutricional del silaje de planta entera de sorgo. Análisis multivariado.....	42
2.3.2.5. Evaluación del efecto de enzimas exógenas sobre la susceptibilidad a la digestión del forraje de planta entera de sorgo	46
2.4. CONCLUSIONES	48
3. Capítulo 3: EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ENZIMA PROTEASA EN SILAJE DE GRANO HÚMEDO DE SORGO (GHS)	50
3.1. INTRODUCCIÓN	50

3.1.1. Hipótesis	50
3.1.2. Objetivos.....	50
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.2.1. Tratamientos y diseño experimental	51
3.2.2. Análisis de Laboratorio.....	51
3.2.3. Análisis estadístico	52
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
3.3.1. Caracterización del material original	52
3.3.2. Composición química y nutricional del silaje de grano húmedo de sorgo tratado con enzimas proteasas	53
3.3.2.1. Efecto de la aplicación de enzimas: PROT contra CTRL	53
3.3.2.2. Análisis de componentes principales (ACP) del material original y en silaje de GHS tratado con PROT	57
3.4. CONCLUSIONES	59
4. Capítulo 4: CONCLUSIONES.....	60
4.1. CONCLUSIONES GENERALES.....	60
4.2. IMPLICANCIAS DEL TRABAJO	60
4.3. PERSPECTIVAS PARA FUTURAS INVESTIGACIONES	60
Bibliografía	61
Apéndice	66

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición de planta y rendimiento de biomasa de los dos híbridos evaluados, en estado de grano pastoso.	27
Cuadro 2. Composición química, digestibilidad <i>in vitro</i> , parámetros de la producción de gas <i>in vitro</i> y variables influyentes en la fermentación del material original de planta entera de sorgo, previo al proceso de ensilado.	30
Cuadro 3. Correlación de las variables originales del material original con los componentes principales del análisis multivariado.....	32
Cuadro 4. Composición química, digestibilidad <i>in vitro</i> , parámetros de la producción de gas <i>in vitro</i> y perfil fermentativo de los ensilajes de dos híbridos de sorgos, en dos estadios fenológicos y tratados con enzimas exógenas.	37
Cuadro 5. Correlación de las variables originales con los componentes principales (CP 1 y CP 2) de los ensilajes tratados con enzimas exógenas.	42
Cuadro 6. Residuos de los forrajes de planta entera de sorgo luego de ser incubados con enzimas exógenas.	46
Cuadro 7. Composición de los monosacáridos (mg g^{-1} de azúcares neutros totales) correspondientes a la digestión de los polisacáridos de los residuos.	48
Cuadro 8. Composición química, digestibilidad, cinética de degradación y variables influyentes en la fermentación del material original de grano húmedo de sorgo.	53
Cuadro 9. Composición química, digestibilidad, cinética de degradación y perfil fermentativo del ensilaje de grano húmedo de sorgo tratado con enzimas proteasas (PROT).	54
Cuadro 10. Correlación de las variables originales con los componentes principales (CP1 y CP2) de los ensilajes de grano húmedo de sorgo (GHS) tratados con enzimas proteasas exógenas.	58
Cuadro 11. Resumen de los efectos de la aplicación de enzimas fibrolíticas exógenas en forrajes de distintas especies (revisión bibliográfica).	66
Cuadro 12. Resumen de los efectos de la aplicación de enzimas exógenas proteasas en forrajes y ensilajes de grano húmedo de distintas especies (revisión bibliográfica).	70

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la disposición espacial de los 12 tratamientos del ensayo 1, compuesto por tres factores: híbridos (S1 y S2), estado fenológico (F1 y F2) y tratamientos enzimáticos (E1, E2 y E3), dispuestos en bloques (B1 a B4).	22
Figura 2. Esquema de la disposición espacial de las microparcels utilizadas para el ensayo 2. Híbridos de sorgo S1 y S2. Tratamientos enzimáticos con enzimas proteasas (TP), enzimas fibrolíticas (TXC) y tratamiento control (TC), dispuestos en bloques (B1 a B4).	23
Figura 3. Análisis de componentes principales (ACP) de la composición química y calidad nutricional del material original de los híbridos (S1 y S2) y de los estadios fenológicos (F1 y F2) evaluados. Los puntos corresponden a resultados: S1F1, círculos blancos; S1F2, triángulos negros; S2F1, círculos negros; S2F2, triángulos blancos invertidos.	33
Figura 4. Curvas de producción de gas acumulado de los ensilajes de planta entera de sorgo tratados con enzimas exógenas. Proteasas (E1, cuadrados), Fibrolíticas (E2, triángulos), Control (triángulos invertidos) y del material original (MOr, círculos).....	40
Figura 5. Curvas de tasa horaria de producción de gas de los ensilajes de planta entera de sorgo tratados con enzimas exógenas. Proteasas (E1, cuadrados), Fibrolíticas (E2, triángulos), Control (triángulos invertidos) y del material original (MOr, círculos).....	40
Figura 6. Análisis de componentes principales (APC) del efecto de la aplicación de enzimas exógenas sobre los materiales originales (círculos) de S1F1 arriba y S1F2 abajo. Proteasas (E1, cuadrado), Fibrolíticas (E2, triángulo), Control (triángulo invertido).....	44
Figura 7. Análisis de componentes principales (APC) del efecto de la aplicación de enzimas exógenas sobre los materiales originales (círculos) de S2F1 arriba y S2F2 abajo. Proteasas (E1, cuadrado), Fibrolíticas (E2, triángulo), Control (triángulo invertido).....	45
Figura 8. Efecto de enzimas exógenas sobre la susceptibilidad a la digestión del forraje de planta entera de los dos sorgos (S1 y S2). T0: material original, TC: tratamiento control, TP: tratamiento con enzima proteasa y TXC: tratamiento con enzimas fibrolíticas.....	47
Figura 9. Disposición espacial de las microparcels en el ensayo 2. Tratamientos enzimáticos con enzimas proteasas (PROT) y tratamiento control (CTRL), dispuestos en cuatro bloques (B1 a B4).....	51
Figura 10. Curva de producción de gas acumulado (PGA). Datos reales (figuras blancas) y datos de acuerdo con el modelo utilizado ($y = a + b(1 - e^{-ct})$, figuras negras) para los ensilajes de grano húmedo de sorgo (GHS). MOr (material original), E1 (ensilaje tratado con proteasas) y E3 (ensilaje tratamiento control).....	56
Figura 11. Curva de tasa horaria de producción de gas de los silajes de grano húmedo de sorgo (GHS) tratados con enzimas exógenas: material original (MOr, círculos), Proteasas (E1, cuadrados) y Control (E3, triángulos).	57
Figura 12. Análisis de componentes principales (PCA) del efecto de la aplicación de enzimas exógenas sobre granos húmedo de sorgo. Material original: círculos y línea continua. Ensilajes tratados con enzimas Proteasas (E1, cuadrado), Control (E3, triangulo) y material original (MOr, círculos).	58
Figura 13. Análisis de componentes principales (PCA) del efecto de la aplicación de enzimas exógenas sobre granos húmedo de sorgo. Material original: círculos y línea continua. Ensilajes tratados con enzimas Proteasas (E1, cuadrado), Control (E3, triangulo) y material original (MOr, círculos).	58

Abreviaturas

ACP	Análisis de componentes principales
aFDN_{mo}	Fibra insoluble en detergente neutro
ALM	Almidón
AT	Acidez total
BAL	Bacterias ácido lácticas
CB	Capacidad buffer
CEL	Celulosa
CEN	Cenizas
CG	Cromatografía gaseosa
CHOS	Carbohidratos solubles
CP	Componentes principales
CSA	Carbohidratos solubles en agua
CSAlc	Carbohidratos solubles en alcohol
DALM	Digestibilidad <i>in vitro</i> del almidón
DFDN	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la fibra insoluble en detergente neutro
DIVMS	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca.
DMO	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica
DMS	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca
ED	Energía digestible
FDA	Fibra insoluble en detergente ácido
GDP	Granífero doble propósito
GHM	Granos húmedos de maíz
GHS	Granos húmedos de sorgo
HEMI	Hemicelulosa
LDA	Lignina en detergente ácido
ME_n	Material ensilado
MF	Materia fresca
MO	Materia orgánica
MOr	Material original
MS	Materia seca
MS105	Materia seca a 105°C
MS65	Materia seca a 65°C
N-NH₃	Nitrógeno amoniacal
PB	Proteína bruta
PG	Producción de gas

PGA	Producción de gas acumulado
THPG	Tasa horaria de producción de gas
TMax	Tasa máxima de producción de gas
tTMax	Tiempo a tasa máxima de producción de gas

1. Capítulo 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. INTRODUCCIÓN

La ganadería del norte argentino se realiza dispersa en una gran diversidad de ecosistemas compuestos mayoritariamente por pastizales naturales, con una gran producción de biomasa primavera-estival de calidad nutricional altamente variable. La conservación de forrajes constituye una estrategia adecuada para equilibrar estos fuertes desbalances cuanti-cualitativos y consecuentemente proporcionar mayor previsibilidad a los sistemas de producción ganadera. Entre estos, la confección de ensilajes de gramíneas estivales de alta producción forrajera resulta una de las elecciones de preferencia.

En el norte de Argentina, la especie más usada para ensilar es el sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), debido a su buena adaptación a ambientes con limitaciones edáficas y climáticas (temperatura y precipitaciones). Durante la campaña 2014/2015 se sembraron 840.936 hectáreas de sorgo en todo el país (MAGYP, 2016), de las cuales 372.182 hectáreas aproximadamente fueron destinadas a ensilajes (CACF, 2016). En los sistemas ganaderos del norte argentino, este alimento se utiliza mayormente como insumo para realizar suplementación invernal en sistemas extensivos, siendo menos frecuente su uso como ingrediente en dietas totalmente mezcladas en sistemas intensivos de alimentación.

Sin embargo, y pese a que la demanda crece continuamente, la disponibilidad de maquinaria para la confección de ensilajes en esta zona del país es limitada, y generalmente no cuentan con el implemento para procesar granos de sorgo (“cracker”). Por este motivo, los granos permanecen casi intactos en el ensilaje de planta entera, y como consecuencia del tamaño pequeño y dureza, escapan cantidades significativas a la masticación. En el rumen, el almidón del grano intacto no es accesible para ser degradado por las bacterias, consecuentemente resulta escasamente aprovechado por el animal, y gran parte de estos aparecen en la materia fecal (Montiel *et al.*, 2011).

Consecuentemente, en muchas oportunidades el esfuerzo realizado en obtener un cultivo de sorgo óptimo con alta proporción de grano, puede que sea desaprovechado por la falta de un procesamiento adecuado durante la confección del ensilado. En estas circunstancias, el uso de aditivos que pudieran mejorar la accesibilidad y digestibilidad de los granos y paredes celulares del cultivo podría contribuir a su mejor aprovechamiento.

1.1.1. La calidad del ensilaje de sorgo

1.1.1.1. Análisis de los componentes de la planta y sus proporciones

La calidad nutricional del ensilaje de sorgo es altamente variable, y depende de factores relacionados con el material a ensilar y el proceso fermentativo. El material original está determinado fundamentalmente por la relación entre los componentes de la planta: hoja, tallo y panoja (Fernandes Perazzo *et al.*, 2014). Los diferentes niveles de participación de estos componentes en la planta de sorgo, permite clasificarlo en grupos (graníferos, doble propósito, sileros y forrajeros), los que difieren en sus valores nutricionales (De León y Giménez, 2008). Los tres componentes tienen diferentes composiciones químicas. El contenido de materia seca (**MS**) es mayor en la panoja (50%) que en las hojas (30%) y en el tallo (28%, Fernandes Perazzo *et al.*, 2014). La participación relativa de la panoja es el principal responsable de las diferencias en los tenores de MS del ensilaje de planta entera (Neumann *et al.*, 2002). El contenido de proteína bruta (**PB**) también varía entre los componentes, reduciéndose desde la panoja (7,62%) hacia las hojas y el tallo, con valores de 5,45% y 1,96% respectivamente (Neumann *et al.*, 2002). En cuanto a los componentes de la pared celular, Neumann *et al.* (2002) observó que el contenido de fibra detergente neutro (**FDN**) fue mayor en las hojas (71%), que en el tallo (64%) y en la panoja (31%) cuando evaluó híbridos forrajeros y doble propósito de sorgo. Los valores de fibra detergente ácido (**FDA**), hemicelulosa, celulosa y lignina son diferentes entre hojas y tallo, y mayores a los observados en la panoja (Neumann *et al.*, 2002). Esto determina que la digestibilidad *in vitro* de la MS (**DIVMS**) es mayor en la panoja (68%) que en las hojas (55%) y el tallo (57%). Por consiguiente, la participación relativa de la panoja es el principal responsable del aumento de los tenores de MS, PB y DIVMS del ensilaje de sorgo, así como de las disminuciones del contenido de FDN, FDA y lignina (Neumann *et al.*, 2002; Cabral *et al.*, 2003; De León y Giménez, 2008). Sin embargo, la existencia de una amplia gama de híbridos de sorgo con diferentes estructuras de planta, sumado a otras características (azucarados, *stay green*, nervadura marrón, etc.) hace difícil la extracción de conclusiones, incluso dentro de un mismo estadio fenológico.

El grano de sorgo está formado por el pericarpio y el endosperma (donde se halla el almidón), diferenciándose este último en blando y duro. El endosperma blando, también llamado opaco, se caracteriza por presentar grandes espacios de aire intergranulares. El almidón de estos gránulos se encuentra cubierto por una fina capa proteica, en la que se encuentran pocos cuerpos esféricos pequeños de proteínas, llamados prolaminas. Dicha matriz se va condensando a medida que avanzan los estadios fenológicos (Hale, 1973). Por otro lado, el almidón (**ALM**) duro (también llamado translúcido), presenta una estructura apretada sin espacios con aire, en el cual los gránulos de almidón

son poligonales y cubiertos por una fina capa proteica (Hoseney *et al.*, 1974; Waniska, 2000). El almidón es el principal carbohidrato del grano de sorgo, constituyendo *c.a.* el 79% del peso del grano seco, y estando compuesto por 70–80% de amilopectina y 20–30% de amilosa, y siendo influenciada esta relación por factores ambientales y genéticos (Bustos Vázquez *et al.*, 2010). Ambos polímeros están formados por unidades de glucosa unidos a través de enlaces α -1,4. La amilosa es un polímero lineal con un par de ramas unidas por enlaces α -1,6. La amilopectina, está altamente ramificada, se compone de cadenas de glucosa unidas entre sí principalmente por enlaces α -1,4 y con α -1,6 en los puntos de ramificación. Con el avance de los estadios fenológicos, el endosperma del grano se endurece, dificultando el acceso de las bacterias ruminales al almidón (Isaksen *et al.*, 2011).

1.1.1.2. Análisis del efecto del avance del estado fenológico sobre la composición química de la planta de sorgo

La composición de la planta varía con el avance de los estadios fenológicos (Black *et al.*, 1980; Synman and Joubert, 1996; Faria Júnior *et al.*, 2011). El contenido de MS aumenta a medida que avanzan los estadios fenológicos (Black *et al.*, 1980; Pires *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2007; Gul *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2012). Faria Júnior *et al.* (2011) a través de regresión lineal, reportaron aumentos de 3,7 unidades porcentuales en el contenido de MS entre los estadios fenológicos, con intervalos de una semana. El contenido de PB de la planta entera disminuye a medida que avanzan los estadios de madurez (Black *et al.*, 1980; Synman y Joubert, 1996; Pires *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2007; Abdelhadi and Tricarico, 2009). Sin embargo, otros autores (Gul *et al.* 2008; Faria Júnior *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2012) no encontraron variación en el contenido de PB a medida que avanzan los estadios fenológicos. Estas diferencias existen debido a, por un lado, la variación de la concentración de un nutriente determinado dentro de los tres componentes principales de una planta de sorgo (tallos, hojas y panoja, “Efecto Componente”). Por otro lado, la variación en la proporción de dichos componentes dentro de la planta (“Efecto Estructura”). Teniendo en cuenta que, a su vez, estos dos factores varían con el avance de los estadios fenológicos (“Efecto Fenología”).

Con respecto a los componentes fibrosos, existe variación en lo reportado por diferentes autores. Esmail *et al.* (1991) y Pires *et al.* (2006) observaron que el contenido de FDN disminuye con el avance de los estadios fenológicos atribuyendo dicha disminución al aumento de la participación del componente panoja y reducción del componente tallo y hojas. Por otra parte, Danley y Vetter (1973) registraron un aumento en el nivel de FDN en un sorgo forrajero siendo este resultado esperable, debido a que no existe el componente panoja. Estas afirmaciones fueron sustentadas a través de correlaciones, en las que se encontró que el tenor de FDN se relaciona positivamente con la proporción de hojas ($r^2= 0,66$) y tallo ($r^2= 0,48$) y negativamente con la proporción de panojas ($r^2= -$

0,78). En todos los trabajos citados los valores de FDA y celulosa siguen el mismo patrón que los tenores de FDN. En cuanto al contenido de lignina, Danley y Vetter (1973) y Pires *et al.* (2006) observaron un aumento, y Araújo *et al.* (2007), Faria Júnior *et al.* (2011) y Machado *et al.* (2012) no reportaron cambios con el avance de los estadios fenológicos. Estas diferencias se deberían a las situaciones mencionadas en el párrafo anterior.

1.1.1.3. Análisis del efecto del avance de los estadios fenológicos sobre la calidad nutricional del ensilaje de sorgo

El efecto del estadio de madurez sobre la digestibilidad es variable en diferentes materiales. Algunos autores (Black *et al.*, 1980; Snyman and Joubert, 1996; Farias Júnior *et al.*, 2011) observaron que a medida que avanzan los estadios fenológicos, la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (**DIVMS**) disminuye. Sin embargo, otros no encontraron relación entre DMS y estado de madurez (Araújo *et al.*, 2007), o la misma mostró un comportamiento variable en diferentes materiales (Pires *et al.*, 2006). Estas diferencias se deberían a la variación en la relación hoja:tallo:panoja. Además, varía la calidad nutricional de las diferentes fracciones, las que influyen en la calidad final del ensilaje de sorgo, como se explicó en el apartado anterior. Farias Júnior *et al.* (2011) observaron en sorgo doble propósito que la disminución de DMS más abrupta se produjo entre los estadios pastoso y duro. Por su parte, en sorgo forrajero, la calidad disminuye significativamente después de la floración temprana (Black *et al.*, 1980)

Por lo explicado anteriormente, se deduce que el momento óptimo de cosecha para ensilaje varía entre los diferentes materiales y se debe buscar un balance entre rendimiento (kg MS ha⁻¹) y calidad (especialmente digestibilidad de la MS, **DMS**). En materiales graníferos, en los que la participación del componente panoja es alto, la cosecha se debería realizar en estadio de grano pastoso, mientras que, en materiales forrajeros, en los que la participación del componente panoja es casi nulo, la cosecha se debería realizar en floración temprana. Este hecho, sumado a la casi nula participación del componente panoja, hace que el ensilaje de los materiales forrajeros tenga un contenido de materia seca menor respecto a los materiales graníferos doble propósito.

1.1.1.4. Impacto de la composición de la planta de sorgo sobre la calidad fermentativa del ensilaje

En el segundo grupo de características que determinan la calidad del ensilaje de sorgo se encuentra las del proceso fermentativo. En el trabajo de Snyman y Joubert (1996), el material original ensilado en el estadio maduro presentó un patrón de fermentación desfavorable, indicado por los altos valores de pH (4,5) y nitrógeno amoniacal (**N-NH₃**; 34,5 g./100 g.N), mientras que el ensilaje

confeccionado con sorgo en estado de floración presentó una fermentación más ácida (pH = 3,8) y con menor contenido de N-NH₃ (23 g./100 g.N). Esto concuerda con la tendencia reportada por Pires *et al.* (2006), quienes observaron que el pH aumentó con el avance del estadio de maduración en tres híbridos evaluados, en respuesta al contenido de humedad (la acidificación es inhibida por la falta de agua; correlación entre pH y contenido de MS, $r=0,86$; $p<0,01$).

El descenso del pH del proceso de fermentación para lograr una óptima conservación requiere de una población de bacterias ácido lácticas (**BAL**), de la disponibilidad de suficiente sustrato fermentable (fundamentalmente carbohidratos solubles en agua, **CSA**) y de un ambiente anaeróbico (Mc Donald *et al.*, 1991). Uno de los factores de la fermentación que más influye en la calidad del ensilaje es la tasa de descenso del pH en los estadios tempranos de la fermentación (Davies *et al.*, 1998). El descenso del pH está relacionado con la tasa de producción de ácido láctico, la cual a su vez está determinada por la actividad de la población de BAL naturales o inoculadas, y por el contenido y composición de los carbohidratos solubles (**CHOS**) del forraje. Los principales CHOS presentes en los forrajes son glucosa, fructosa, sucrosa y fructanos. Su concentración en la planta varía de acuerdo con los cultivares, estadio fenológico, momento del día, intensidad de luz, temperatura y aplicación de fertilizantes (McDonald *et al.*, 1991). La actividad bioquímica durante los primeros días de ensilado es intensa (Lundén Pettersson y Lindgren, 1990). Durante este periodo hay una intensa actividad proteolítica (hidrólisis) produciéndose compuestos nitrogenados como péptidos, aminoácidos, aminos y amoníaco Kemble (1956) demostró que la hidrólisis de la proteína es producida inicialmente por enzimas proteolíticas de la planta. Sin embargo, la subsecuente transformación de los aminoácidos en amoníaco es producido por enzimas de origen microbiano (Oshima y McDonald, 1978). Existe una relación entre el aumento de estos compuestos nitrogenados no proteicos en los ensilajes y la disminución de su valor nutricional (Wilkinson *et al.*, 1976). Cuanto mayor es la tasa de producción de ácido láctico y el descenso del pH, menor es la proteólisis que ocurre en el ensilaje.

1.1.2. Enzimas

Entre las alternativas disponibles para mejorar el valor nutricional del forraje a conservar y al mismo tiempo contribuir con mayor cantidad de sustrato fermentable para el proceso de fermentación del ensilaje, se encuentran las enzimas exógenas.

1.1.2.1. Fibrolíticas

Las enzimas son aditivos estimuladores de la fermentación ya que se usan para romper los carbohidratos complejos de los forrajes, liberando carbohidratos simples que facilitan el desarrollo

de las BAL, ya que éstas no pueden usar fibra como fuente energética (van Vuuren *et al.*, 1989; McDonald *et al.*, 1991; Weinberg *et al.*, 1995; Eun and Beauchemin, 2007; Beauchemin and Holtshausen, 2011; y Hristov *et al.* 1998). El empleo de enzimas fibrolíticas antes del proceso de fermentación favorece la desintegración de la pared celular, la cual podría aumentar la extensión y tasa de degradación en el rumen, y la digestibilidad de la materia seca (McHan, 1986; Yang *et al.*, 1999; Hristov *et al.*, 2000; Kung *et al.*, 2002; Colombatto *et al.*, 2003; Eun *et al.*, 2007). Los productos enzimáticos usados comúnmente en nutrición animal suelen ser mezclas de proteínas con variadas actividades enzimáticas (Vahjen y Simon 1999).

Las celulasas son un grupo de enzimas que hidrolizan la celulosa, y son producidas por varios microorganismos, entre ellos por *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* (Paloheimo *et al.*, 2011). Las xilanasas, por su parte, son producidas por microorganismos de vida libre y del intestino; y también se las ha aislado a partir de algas, protozoos, caracoles, crustáceos y semillas de plantas. En general, las xilanasas fúngicas son más tolerantes a la acidez, en comparación con las xilanasas bacterianas. La mayoría de las xilanasas microbianas son mesofílicas (óptimo 40-60°C), con un óptimo a pH neutro o ligeramente ácido (4,0-6,0). Estas enzimas rompen la cadena principal de xilano al azar, dando como resultado xilo-oligosacáridos. Sin embargo, para la hidrólisis completa de la estructura de xilano, se necesita la acción sinérgica de varias hemicelulasas (Beauchemin y Holtshausen, 2011).

1.1.2.2. Proteasas

Las enzimas proteasas son enzimas que degradan las estructuras proteicas. Las proteasas se encuentran naturalmente durante el proceso de ensilado, provenientes de las bacterias y del mismo forraje (Heron *et al.*, 1986). La adición de proteasas exógenas a plantas de maíz cosechadas podría mejorar la digestión del almidón (Young *et al.*, 2012; Windle *et al.*, 2014). Dichas enzimas deberían presentar buena actividad en las condiciones del ensilaje (temperatura de 25-40°C y pH 3,6-4,8). Se ha sugerido que las proteasas aumentan la degradación de la fibra atacando algunos de los componentes nitrogenados de la pared celular que actúan como barreras físicas a la degradación (Colombatto y Beauchemin., 2009).

El uso de aditivos enzimáticos en la alimentación animal podría contribuir a mejorar la productividad. Sin embargo, no siempre se obtienen respuestas positivas, y dado el costo de esta tecnología, la incertidumbre de la respuesta es una limitación importante. Se necesita mejorar la comprensión del modo de acción y las dosis requeridas, garantizando así un uso eficaz de estos aditivos. El valor potencial de las mezclas de enzimas usados en ensilajes de cereales no fue

extensamente estudiado, debido al hecho de que los ensilajes de cereales tienden a tener naturalmente altos contenidos de CHOS (Zahiroddini *et al.*, 2004). El uso de enzimas en la alimentación animal es una tecnología emergente que se muestra prometedora en términos de mejorar el uso de los forrajes en rumiantes.

Este trabajo de investigación busca responder el siguiente interrogante. ¿Cómo afecta la adición de enzimas exógenas a la calidad nutricional y fermentativa de ensilaje de sorgo? Existen escasos estudios sobre el uso de enzimas exógenas en ensilajes realizados en esta especie. Debido a esto y a la problemática local planteada inicialmente, evaluar el efecto de enzimas exógenas sobre el ensilaje de sorgo constituye un área de interés académico y comercial.

1.2. Hipótesis general

En este trabajo se hipotetiza que la aplicación de las enzimas exógenas (fibrolíticas y proteasas) contribuye con la degradación de estructuras vegetales en el material ensilado.

- a. Las enzimas fibrolíticas favorecen la degradación de los carbohidratos estructurales de la fracción vegetativa de la planta de sorgo, reduciéndolos a compuestos de menor peso molecular. Debido a lo antes señalado, se esperan los siguientes resultados como consecuencia de la aplicación de las enzimas fibrolíticas:
 - Aumento de la fracción de carbohidratos solubles y de mayor degradabilidad, que estarán disponibles para el proceso de ensilado.
 - El impacto de la aplicación de las enzimas fibrolíticas deberá ser mayor sobre los híbridos con mayor proporción de fracción vegetativa.
 - Además, es de esperar que el efecto será más marcado en los estadios fenológicos avanzados, al aumentar la pared celular y presentar una estructura más refractaria.
 - El aumento en el contenido de azúcares simples facilitará su aprovechamiento por parte de las BAL, y probablemente la reducción del pH de estabilización. Asimismo, la mayor velocidad de acidificación disminuirá el nivel de proteólisis durante el ensilado, determinando menores contenidos de proteína soluble y N-NH₃.
- b. Por su parte, las enzimas proteasas al hidrolizar las proteínas típicas del grano de sorgo aumentarán la disponibilidad del almidón contenido en los gránulos. Por este motivo, se espera:
 - Que la respuesta al agregado de proteasas habrá de ser mayor en híbridos con mayor proporción de panoja.

- Así también, el efecto será más marcado en estadios fenológicos avanzados, cuando la estructura de la matriz proteica y los gránulos de almidón sean más condensados, y por lo tanto menos degradables.

1.3. Objetivos

El objetivo general es analizar el efecto de la adición de enzimas exógenas sobre la fermentación y calidad nutricional de ensilaje de sorgo.

Los objetivos específicos son:

- Evaluar el efecto de dos enzimas exógenas (fibrolíticas y proteasas) sobre la fermentación y calidad nutricional de ensilaje de planta entera de dos sorgos diferentes en dos estadios fenológicos distintos (capítulo 2).
- Determinar el impacto de una enzima proteasa sobre ensilaje de grano húmedo de sorgo (capítulo 3).

2. Capítulo 2: EFECTO DE DOS ENZIMAS EXÓGENAS SOBRE EL ENSILAJE DE PLANTA ENTERA DE SORGO

2.1. INTRODUCCIÓN

La mayor parte de las investigaciones sobre el uso de enzimas en alimentación de rumiantes se ha centrado en el uso de las enzimas fibrolíticas para mejorar la digestibilidad de la fibra, debido a que el aumento de este parámetro aumentaría el consumo de materia seca y la energía digestible por el animal (Beauchemin y Holtshausen, 2011).

La aplicación de enzimas fibrolíticas al material original de varias especies antes del proceso de ensilado ha mostrado resultados inconsistentes (cuadro 10, Apéndice). Estas inconsistencias han sido atribuidas al tipo de enzima, a su concentración y actividad, al método de aplicación y al sustrato al que se aplicó. Dean *et al.* (2005) y Adesogan *et al.* (2007) encontraron que aplicando enzimas fibrolíticas a pasto bermuda (*Cynodon dactylon*) mejoraron la fermentación y el valor nutricional del ensilaje resultante, debido a la menor concentración de FDN y FDA, concordando con lo hallado por van Vuuren *et al.* (1989) en ensilaje de pasturas. McHan (1986) aplicó enzimas celulasas a un ensilaje de pasto bermuda y obtuvo una reducción del 35% de la celulosa y un aumento en el contenido de CSA. Adogla-Bessa *et al.* (1999) aplicaron enzimas celulasas y xilanasas a trigo antes del ensilado, y observaron una disminución del contenido de fibra (FDN, FDA y celulosa) y un aumento del contenido de CSA. El incremento en el contenido de CSA de los ensilajes tratados con enzimas también fue observado por Sheperd and Kung (1996), Nadeau *et al.* (2000) y Colombatto *et al.* (2003b). Dean *et al.* (2005) y McHan (1986) además hallaron un aumento en la digestibilidad *in vitro* a las 48 horas de la MS, FDN y FDA en los ensilajes tratados, lo que se contrapone a lo hallado por van Vuuren *et al.* (1989) quienes observaron que la materia orgánica (MO) digestible *in vitro* no fue afectada.

La aplicación de enzimas fibrolíticas al ensilar ha mejorado la fermentación del ensilaje de maíz, evidenciada por los más bajos valores de pH observados (Sheperd and Kung, 1996a, b; Colombatto *et al.*, 2003a,b y 2004a,b; Sun *et al.* 2009). Zhang *et al.* (2010) encontraron que el uso de enzimas celulasas tuvo efectos significativos en los parámetros del perfil fermentativo (pH, perfil de AGVs y N-NH₃). De igual forma la utilización de enzimas, mejoró la fermentación, ya que los valores de pH y N-NH₃ fueron menores en los ensilajes tratados con estas, (Vuuren *et al.* 1989); Adogla-Bessa *et al.* (1999) Dean *et al.*, 2005)

Sin embargo, en otros trabajos la aplicación de enzimas con actividad endoglucanasa, xilanasas, alfa-amilasa y beta-glucanasa a plantas de maíz antes de ser ensiladas, no generó diferencias en los parámetros de calidad nutricional y perfil fermentativo (Chen *et al.*, 1994) respecto a los ensilajes no tratados. Estos resultados se debieron posiblemente al alto contenido de MS (38%) y bajo contenido de CHOS en el forraje original (Chen *et al.*, 1994).

El incremento del nivel de agregado de xilanasas y celulasas al rastrojo de arroz aumentó la producción de gas (**PG**) acumulada, e incrementó la degradabilidad *in vitro* de la MS y de la FDN, siendo máximas con la aplicación de niveles medios de enzimas (Mao *et al.*, 2013).

Colombatto *et al.* (2004b) no encontraron diferencias en el contenido de FDN a los 60 días de ensilado, sin embargo, sí hubo diferencias en el contenido de FDA. El mismo equipo, en otro trabajo (2004a), observó que un complejo enzimático (Liquicell, complejo enzimático fibrolítico producida por *Trichoderma reesei*) redujo el contenido de fibra, mientras que otro (Depol40, complejo enzimático fibrolítico producido por *Aspergillus niger* y *Trichoderma ssp.*) lo aumentó, posiblemente debido a la disminución del contenido de almidón por la presencia de actividad amilolítica. Otros autores observaron diferencias significativas en el contenido de fibra con el aumento de las dosis (Spoelstra and Wikselaar 1992, Chen *et al.*, 1994; Sheperd and Kung 1996a, b; Sun *et al.* 2009). Colombatto *et al.* (2004a) aplicaron enzimas fibrolíticas a ensilaje de maíz y observaron que, en los ensilajes tratados con dichas enzimas, aumentó la tasa inicial de degradación, sin embargo, no hubo diferencias en la extensión de la PG y DMO de los ensilajes tratados. Sheperd y Kung (1996 a,b) no observaron diferencias en la digestibilidad *in vitro* de la MS y FDN entre los ensilajes tratados y no tratados con enzimas fibrolíticas.

La aplicación de enzimas fibrolíticas a ensilajes de híbridos de sorgo, redujo el contenido de FDN, (Xing *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2013). y aumentó la cinética de desaparición ruminal de la MS, FDN, FDA y PB, en el híbrido con mayor contenido de carbohidratos estructurales (Thomas *et al.*, 2013). Respecto al proceso fermentativo, la aplicación de enzimas fibrolíticas no disminuyó el pH en los ensilajes tratados y no tratados con enzimas (Xing *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2013).

Además del uso de enzimas fibrolíticas, también se han evaluado enzimas proteasas (cuadro 11, Apéndice), las cuales aplicadas en heno de alfalfa, ensilaje de maíz y grano de maíz rolado, aumentaron la digestibilidad *in vitro* de la MS, de la FDN y la desaparición de la hemicelulosa (HEMI), Colombatto y Beauchemin 2009). El efecto observado en el maíz rolado pudo deberse a la ruptura de la matriz proteica que rodea a los gránulos de almidón, permitiendo una colonización

bacteriana más rápida (McAllister *et al.*, 1993). La aplicación de proteasa alcalinas incremento la PG, DMS, y digestibilidad *in vitro* de la FDN (**DFDN**) de heno de alfalfa Eun *et al.* (2007) y de una ración totalmente mezclada (**TMR**) con bajo contenido de forrajes (Eun y Beauchemin, 2005). En un meta-análisis realizado por Eun y Beauchemin (2008) sobre experimentos *in vitro* obtuvieron una relación lineal entre la PG *in vitro* y el agregado de proteasas, pese a no haber hallado diferencias en la DMS y DFDN. En ensilaje de maíz, la adición de proteasas exógenas aumentó el nitrógeno soluble y el N-NH₃, lo que indicaría la existencia de proteólisis adicional al romper la matriz proteica en la que se encuentran los gránulos de almidón, lo que resulta en un aumento de la digestibilidad final del almidón y por ende del ensilaje de planta entera de maíz (Young *et al.*, 2012 y Windle *et al.* 2014).

2.1.1. Hipótesis

- a. Debido a lo señalado en la hipótesis general, se esperan los siguientes resultados como consecuencia de la aplicación de las enzimas fibrolíticas en forraje de planta entera de sorgo previo al proceso de ensilado:
 - Aumento de la fracción de carbohidratos solubles y de mayor degradabilidad, que estarán disponibles para el proceso de ensilaje.
 - El impacto de la aplicación de las enzimas fibrolíticas deberá ser mayor sobre los híbridos con mayor proporción de fracción vegetativa.
 - Así también, es de esperar que el efecto será más marcado en los estadios fenológicos avanzados, cuando aumenta la proporción de la pared celular y presenta una estructura más refractaria.
 - El aumento en el contenido de azúcares simples facilitará el aprovechamiento por parte de las BAL, y probablemente reduciendo el pH de estabilización. Asimismo, la mayor velocidad de acidificación disminuirá el nivel de proteólisis durante el ensilado, determinando menores contenidos de proteína soluble y N-NH₃.
- b. Por su parte, las proteasas al hidrolizar las proteínas típicas del grano de sorgo aumentarán la disponibilidad del almidón contenido en los gránulos. Por este motivo, se espera:
 - Que la respuesta al agregado de proteasas sea mayor en híbridos con mayor proporción de panoja.
 - Así también, el efecto será más marcado en estadios fenológicos avanzados, cuando la estructura de la matriz proteica y los gránulos de almidón sean más condensados, y por lo tanto menos degradables.

2.1.2. Objetivos

El objetivo general de este capítulo es evaluar el efecto de dos enzimas exógenas (fibrolíticas y proteasas) sobre la fermentación y calidad nutricional de ensilaje de planta entera de dos sorgos diferentes en dos estadios fenológicos distintos.

Los objetivos específicos son:

1. Determinar el impacto de dos híbridos diferentes sobre la fermentación y calidad nutricional del ensilaje de planta entera de sorgo.
2. Evaluar el efecto de dos estadios fenológicos distintos sobre la fermentación y calidad nutricional del ensilaje de planta entera de sorgo.
3. Describir el impacto de dos enzimas exógenas sobre la fermentación y calidad nutricional del ensilaje de planta entera de sorgo.

2.2. MATERIALES y MÉTODOS

2.2.1. Sitio experimental

El ensayo se localizó en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Estación Experimental Agropecuaria Reconquista (29°15´S 59°44´O), durante la campaña 2013/2014. El experimento se realizó sobre suelo agrícola en siembra directa (Argiudol acuértico, 0-20 cm suelo: 12,8 ppm de P; 1,77 % M.O., 27,3 ppm NO₃; 6,7 pH). El régimen pluviométrico de la campaña 2013/2014 en el sitio experimental fue levemente superior al promedio histórico durante los primeros meses del ciclo del cultivo, siendo las precipitaciones normales durante el llenado de los granos y la cosecha.

2.2.2. Tratamientos y diseño experimental

El experimento estuvo formado por dos ensayos. En el ensayo 1 se evaluaron dos híbridos de sorgo, uno con baja proporción de panoja (**S1**) y otro con alta proporción de panoja (**S2**). S1 correspondió a un híbrido silero (F1497 – Forratec), con alta relación tallo/hoja y tallos dulces, y S2 correspondió a un híbrido granífero doble propósito (F2490 – Forratec) con alta proporción de grano y de taninos. Cada variedad fue cosechada en dos estadios fenológicos: grano pastoso (**F1**) y grano duro (**F2**). La determinación del estadio fenológico se realizó teniendo en cuenta la consistencia del grano del tercio medio de la panoja. En F1 se evaluó el rendimiento de biomasa aérea total y sus componentes. Las plantas se cortaron a 30 cm de altura sobre el suelo y se picaron a 15 mm de longitud teórica de picado con una maquina picadora de forraje (JF2D, Berlato S.A., Buenos Aires, Argentina). El forraje de cada subparcela fue mezclado separadamente con un complejo enzimático:

proteasas (**PROT, E1**), fibrolíticas (**FIBRO, E2**) o control (**CTRL, E3**), usando un rociador para cada tratamiento a fin de evitar contaminaciones cruzadas.

Los tratamientos fueron distribuidos en un diseño en bloques completos con un arreglo de factores en parcelas divididas, donde la parcela principal correspondió a los dos híbridos, y las subparcelas surgieron del arreglo factorial entre dos estados fenológicos y tres complejos enzimáticos (total de 12 tratamientos, *i.e.* 2 híbridos, 2 estados fenológicos, 3 complejos enzimáticos asignados en 4 bloques). El siguiente esquema permite visualizar la organización espacial del ensayo general en el campo.

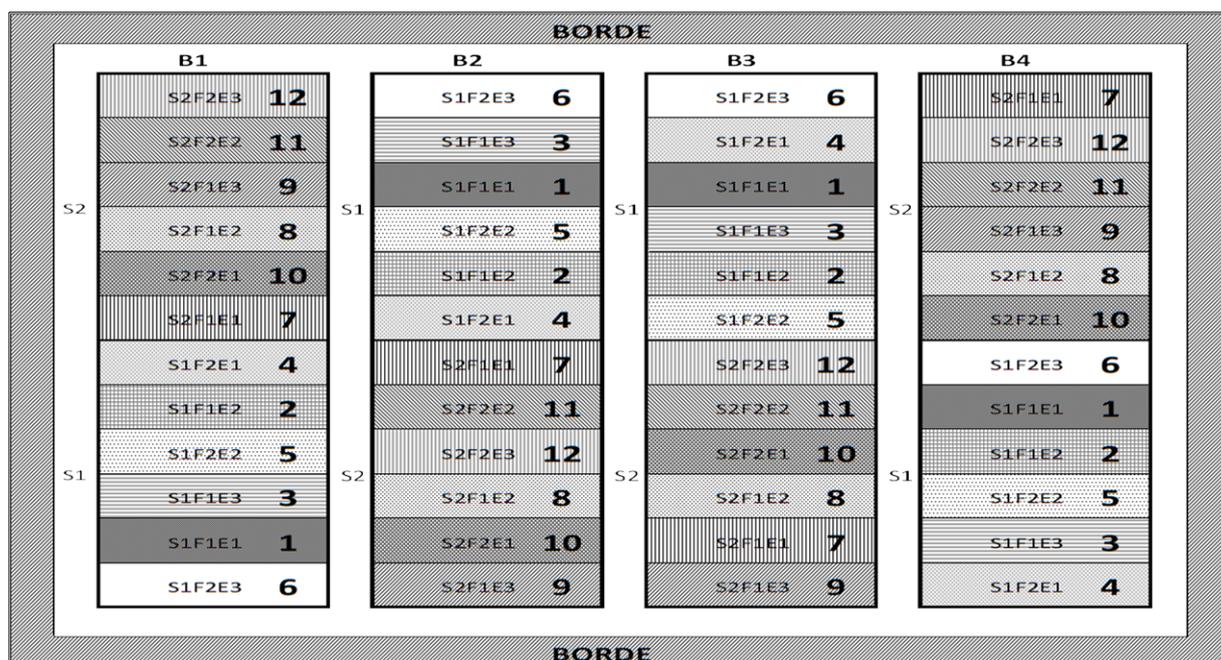


Figura 1. Esquema de la disposición espacial de los 12 tratamientos del ensayo 1, compuesto por tres factores: híbridos (S1 y S2), estado fenológico (F1 y F2) y tratamientos enzimáticos (E1, E2 y E3), dispuestos en bloques (B1 a B4).

El tratamiento PROT correspondió a una proteasa alcalina (Nº IUB 3.4.21.62) producida a partir de *Bacillus subtilis* y se aplicó a razón de 2 g de PROT kg⁻¹ de material fresco (MF). El tratamiento FIBRO fue una mezcla de 70% de Xilanasa (Dyadic Xylanase Plus E.C. 3.2.1.8) y 30% de Celulasa (Dyadic Cellulase CP CONC E.C. 3.2.1.4) y se aplicó a razón de 0,35 g de FIBRO kg⁻¹ de MF. El tratamiento CTRL consistió en agregar el mismo volumen de agua destilada utilizado en los dos tratamientos anteriores. Una vez aplicados los complejos enzimáticos el forraje mezclado con las enzimas fue colocado en microsilos de PVC de 49 cm de largo y 110 mm de diámetro, con igual nivel de compactación en todos los tratamientos (*c.a.* 260 kg MS m⁻³), y se dejó estacionar durante 65 días. Se tomaron muestras de forraje del material original (MOr) y del material resultante luego del proceso de ensilado (MEn). Las variables medidas en el ensayo 1 fueron: composición química (MS, CEN, PB, aFDN_{mo}, FDA, LDA, CEL, HEMI y CSAIc), digestibilidad in vitro (DMS, DMO y

DFNF), cinética de degradación por producción de gas *in vitro* (a, b, c, Tmax y tTmax) y perfil fermentativo: pH, N-NH3, AGVs, CB y AT.

El ensayo 2 llamado “Evaluación del efecto de enzimas exógenas sobre la susceptibilidad a la digestión del forraje de planta entera de sorgo” se llevó a cabo a partir de las muestras secas y molidas de material original (MOr) del ensayo 1. Se utilizaron las muestras de los dos híbridos de sorgo (S1 y S2), pero solamente en el estado fenológico (F2) por considerarse más refractaria a la acción de las enzimas. Los tratamientos enzimáticos fueron los mismos del ensayo 1: enzimas fibrolíticas (TxC), enzimas proteasas (TP) y tratamiento control (TC, figura 2), se usó la misma dosis enzimática que en el ensayo 1. Además, se realizó una caracterización de MOr previo a la incubación con las enzimas (T0).

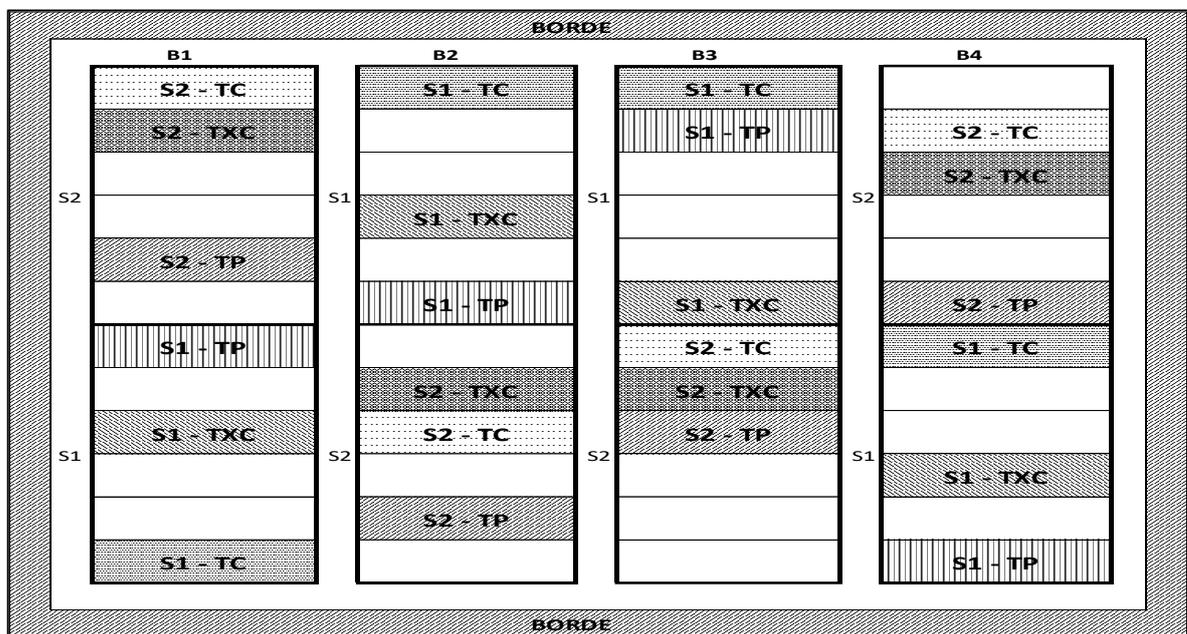


Figura 2. Esquema de la disposición espacial de las subparcelas utilizadas para el ensayo 2. Híbridos de sorgo S1 y S2. Tratamientos enzimáticos con enzimas proteasas (TP), enzimas fibrolíticas (TxC) y tratamiento control (TC), dispuestos en bloques (B1 a B4).

Las variables medidas en el ensayo 2 fueron: residuo, sobrenadante y perfil de monosacáridos (ramnosa, fucosa, arabinosa, xilosa, relación xil/ara, manosa, galactosa y glucosa). Se seleccionaron dichas variables ya que el objetivo del ensayo fue evaluar la susceptibilidad de los carbohidratos estructurales de la planta de sorgo a la acción de las enzimas exógenas agregadas bajo condiciones controladas.

2.2.3. Análisis de laboratorio

Las muestras de MOr y MEn del ensayo 1 fueron estabilizadas por secado en estufa a 65°C (MS65), y posteriormente fueron molidas con molino Wiley (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ,

USA) hasta que las partículas pasaron a través de una malla de 1 mm. Sobre las muestras molidas se determinó el contenido de materia seca a 105°C (**MS105**) utilizando estufas con circulación de aire durante 4 horas y posteriormente se determinó las cenizas (**CEN**) por ignición en mufla a 550°C por 4 horas (AOAC International, 1990). El contenido de fibra insoluble en detergente neutro (**aFDN_{mo}**), fibra insoluble en detergente ácido (**FDA**) y lignina insoluble en detergente ácido (**LDA**) fueron determinadas según Ankom (2005) y Goering and Van Soest (1970). El contenido de celulosa (**CEL**) y hemicelulosa (**HEMI**) fueron calculados por diferencias (Cel = FDA - LDA), Hemi = aFDN_{mo} - FDA). El nitrógeno (N) total se determinó por Kjeldhal, multiplicando luego por 6,25 para expresarlo como proteína bruta (**PB**). También se calculó el contenido de carbohidratos solubles en alcohol al 80 % v/v (**CSA_{lc}**) a través del método originalmente propuesto por McDonald and Henderson (1964). Las muestras se caracterizaron además por la digestibilidad *in vitro* a las 48 h de la MS (**DMS**), MO (**DMO**) y aFDN_{mo} (**DFDN**), así como por la cinética de producción de gas *in vitro* (**PG**, Theodorou *et al.*, 1994), ajustadas a un modelo del tipo $y = a + bx(1 - e^{-c(t-L)})$; donde y es el gas producido, a es la producción de gas de la fracción inmediatamente solubles, b es el gas producido a partir de la fracción insoluble pero lentamente fermentable, c es la tasa de producción de gas para la fracción insoluble, $a+b$ es la potencial producción de gas, t es el tiempo de incubación y L es el tiempo lag. El perfil fermentativo fue caracterizado a través del pH (Playne and McDonald, 1966), contenido de nitrógeno amoniacal (**N-NH₃**, AOAC International, 1990), y perfil de ácidos grasos volátiles (**AGVs**) por cromatografía. La capacidad buffer (**CB**) se determinó sobre las muestras originales, mientras que en los materiales fermentados se determinó la acidez total (**AT**) de acuerdo al método propuesto por Playne and McDonald (1966).

En el Ensayo 2 las muestras secas (1 g) fueron reconstituidas en agua destilada, la cual tenía disuelta la dosis enzimática (TP, TXC y TC), agregándose además 30 ml de agua destilada. Luego fueron dejadas a temperatura ambiente durante 24 horas con agitación magnética. Las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 15 minutos, luego se las separó en *residuo I* y *sobrenadante I*. Luego, las muestras *residuos I* fueron resuspendidas en 30 ml de agua destilada y se las sometió durante 3 horas a 90°C con agitación magnética. Posteriormente las muestras fueron nuevamente centrifugadas a 1500 rpm durante 15 min. Se separó el *residuo II* del *sobrenadante II*. Estos dos componentes (residuo y sobrenadante) fueron liofilizados para calcular su contenido de MS.

La composición de monosacáridos se determinó por hidrólisis y conversión de los monosacáridos a sus correspondientes acetatos de alditol. Las muestras (residuos II) se disolvieron en ácido trifluoroacético 13M (**TFA**, 37°C, 60 min), seguida por la dilución del ácido a 11,5M (100°, 60 min), y por último a 2M (120°, 90 min) para alcanzar las condiciones habituales de hidrólisis para

polisacáridos insolubles (Morrison, 1988). Luego los azúcares fueron reducidos a alditoles mediante tratamiento con borohidruro de sodio en NH_3 1M (24 hs, T° ambiente). Posteriormente se pasaron por una columna con resina de intercambio iónico Amberlite IR-120 (H+), eluyéndose con agua destilada. Luego de la evaporación del agua, el exceso de reactivo fue eliminado agregando metanol y llevando a seco. Este paso se repitió tres veces. Los alditoles recibidos fueron derivatizados por acetilación, mediante reacción con anhídrido acético y piridina (1:1; 100°C , 45 min). La mezcla de acetatos de alditol se extrajo con cloroformo y seguidamente se realizaron lavados con agua destilada y solución saturada de bicarbonato de sodio; para eliminar por último cualquier resto de agua presente en la fase clorofórmica con sulfato de sodio anhidro. Dicha fase fue llevada a seco y llevada a -20°C hasta ser analizada por cromatografía gaseosa (CG).

Las muestras fueron analizadas usando un cromatógrafo gas-líquido Agilent 7890A (Avondale PA, USA) equipado con detector de ionización de llama (FID), utilizado N_2 como gas portador y una columna capilar SP-2330 (Supelco, Bellefonte PA, USA) de 30m de longitud, 0,25 mm de diámetro y 0,20 μm de espesor de la fase líquida, con un flujo de 1,3 ml min^{-1} y una relación de split 25:1. La temperatura del inyector y del detector fue de 300°C y las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: (a) de 200°C a 240°C a 2°C min^{-1} seguido por 15-min sosteniendo esa temperatura. A partir de los cromatogramas obtenidos, se realizó la conversión de la información de áreas de pico a porcentajes molares de cada unidad. Los análisis se realizaron en los laboratorios de la Cátedra de Química de Biomoléculas de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

2.2.4. Análisis estadístico

Los resultados del ensayo 1 fueron analizados de acuerdo a un modelo de parcelas divididas donde las parcelas principales correspondieron a los híbridos de sorgo (S1 y S2), y las subparcelas surgieron de un arreglo factorial de Estado Fenológico \times Enzima. Los híbridos (Parcelas principales) fueron asignadas al azar dentro de bloques (b: 4), resultando el siguiente modelo:

$$Y_{ijkm}: \mu + \rho_i + \alpha_j + \gamma_{ij} + \beta_k + (\alpha\beta)_{jk} + \delta_m + (\alpha\delta)_{jm} + (\beta\delta)_{km} + (\alpha\beta\delta)_{jkm} + \epsilon_{ijkm}$$

Donde:

Y_{ijkm} : es la respuesta correspondiente a los cuatro bloques, al efecto de la combinación de los dos híbridos de sorgo en los dos estadios fenológicos y con los tres complejos enzimáticos.

μ : es el promedio general.

ρ_i : es el efecto de los cuatro bloques.

α_j : es el efecto de los dos híbridos de sorgo.

γ_{ij} : es el error aleatorio de la parcela principal, $\gamma_{ij} \sim \text{iid } N(0, \sigma_\gamma^2)$.

β_k : es el efecto de los dos estadios fenológicos.

$(\alpha\beta)_{jk}$: es el efecto de la interacción entre los híbridos y los estadios fenológicos.

δ_m : es el efecto de los tres complejos enzimáticos.

$(\alpha\delta)_{jm}$: es el efecto de la interacción entre los dos híbridos de sorgo y los dos complejos enzimáticos.

$(\beta\delta)_{km}$: es el efecto de la interacción entre los dos estadios fenológicos y tres complejos enzimáticos.

$(\alpha\beta\delta)_{jkm}$: es el efecto de la interacción entre los dos híbridos de sorgo, los dos estadios fenológicos y los tres complejos enzimáticos.

ε_{ijkm} : es el error aleatorio de la subparcela, $\varepsilon_{ijkm} \sim \text{iid } N(0, \sigma^2_\varepsilon)$.

γ_{ij} y ε_{ijkm} se distribuyen independientemente.

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico SAS. Los resultados de la aplicación de las enzimas se compararon contra el Control utilizando el test de Dunnett. Para todos los casos las diferencias se declararon significativas cuando $P \leq 0,05$.

Además, se realizó un análisis multivariado a través de un análisis de los componentes principales (CP), para lo cual se realizó una selección de las variables más importantes y en las que era esperable encontrar correlación. Se seleccionaron variables de composición química (MS, PB, CSAIc y componentes de la pared celular), variables de calidad nutricional (DMS y DFDN) y variables del perfil fermentativo (CB y pH).

Para el ensayo 2 “*Evaluación del efecto de enzimas exógenas sobre la susceptibilidad a la digestión del forraje de planta entera de sorgo*”, los resultados fueron analizados de acuerdo a un diseño en parcelas divididas. Siendo el modelo:

$$Y_{ijk}: \mu + \rho_i + \tau_j + \beta_k + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijkm} : es la respuesta correspondiente a los cuatro bloques y tres complejos enzimáticos.

μ : es el promedio general.

ρ_i : es el efecto de los híbridos de sorgo.

τ_j : es el efecto de los tres complejos enzimáticos.

β_k : es el efecto de los cuatro bloques.

ε_{ijk} : es el error aleatorio de los dos sorgos, los tres complejos enzimáticos y los cuatro boques.

ε_{ijk} se distribuyen independientemente.

El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico Infostat (2008). Los resultados de la aplicación de las enzimas se compararon contra el Control utilizando el test de Tukey. Para todos los casos las diferencias se declararon significativas cuando $p \leq 0,05$.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Caracterización del material original

2.3.1.1. Comparación entre los híbridos con baja y alta proporción de panoja

El análisis de composición de la planta se realizó en estado pastoso (F1) y en coincidencia con lo planteado inicialmente en el experimento, el S1 presentó menor proporción de panoja y de hojas que S2 (Cuadro 1; $p < 0,05$), concomitantemente se observó que S1 superó a S2 en altura, proporción de tallo y rendimiento de biomasa.

Cuadro 1. Composición de planta y rendimiento de biomasa de los dos híbridos evaluados, en estado de grano pastoso.

Variable	Híbridos ¹		SEM ²	gl ³	p-valor
	S1	S2			
Altura (m)	2,25 a	1,77 b	0,02	23	<0,0001
Composición (g kg⁻¹MS planta entera)					
Hoja	100 b	129 a	4,2	23	0,0001
Tallo	788 a	418 b	16,8	23	<0,0001
Panoja	112 b	451 a	14,7	23	<0,0001
Rendimiento (kg MS ha ⁻¹)	28829 a	20723 b	967	23	<0,0001

¹ S1 y S2 corresponden a sorgos con baja y alta proporción de panoja respectivamente.

² Error estándar de la media.

³ Grados de libertad.

La estructura de la planta tiene un alto efecto en la composición química (Cabral *et al.*, 2003; Fernández Perazzo *et al.*, 2014) por lo que constituye una descripción de relevancia para comprender los resultados de índole químico-nutricional. El análisis de la composición química de los materiales previos a ensilar mostró que en coincidencia con la mayor proporción de panoja en S2, se encontraron mayores contenidos de MS, aFDNmo, FDA y CEN ($p < 0,01$; Cuadro 2). Estos resultados fueron contrarios a lo esperado, dado que en S2, pese a su mayor proporción de panoja, se registraron mayores cantidades de las fracciones de fibra. Estos resultados son coincidentes con los hallados por Neumann *et al.* (2002), quienes evaluaron cuatro híbridos de sorgo, dos forrajeros y dos graníferos doble propósito (GDP), y encontraron que los tallos de los GDP tenían mayor proporción de aFDNmo y FDA que los forrajeros. Mientras que el contenido de la fracción fibrosa fue igual para el componente hojas de los híbridos forrajeros y GDP, la cantidad de aFDNmo y FDA de las panojas fue independiente del grupo y varió entre los híbridos. El hallazgo en el trabajo de Neumann *et al.* (2002) podría ser una explicación tentativa de lo ocurrido en el presente trabajo, quienes además observaron que los materiales precoces con mayor proporción de granos en la MS de la planta

tendieron a presentar mayor cantidad de aFDN_{mo} en el tallo. Si bien los resultados del presente trabajo son coincidentes con lo hallado por Neumann *et al.* (2002), es opuesto a lo reportado por varios trabajos que coinciden en que la concentración de aFDN_{mo} y FDA disminuye cuando aumenta la cantidad de panoja en la planta (Silva *et al.*, 1999 y Cabral *et al.*, 2003).

El análisis de los componentes de la pared celular no mostró diferencias entre los híbridos en el porcentaje de HEMI, pero la concentración de CEL fue mayor ($p < 0,0001$) en S2 que en S1. A su vez, la concentración de LDA no difirió entre estados fenológicos para S1 (S1F1 y S1F2, presentaron 55 g LDA kg⁻¹ MS), en cambio para S2 disminuyó entre S2F1 y S2F2 (interacción Híbrido × Fenología). Los valores de CSAIc también presentaron interacción Híbrido × Fenología, aumentando significativamente entre F1 y F2 para S2. El contenido de CEN fue mayor en el híbrido (S2) con mayor proporción de panoja ($< 0,0001$), lo que se contrapone a lo observado por Cabral *et al.* (2003), quienes registraron una disminución de esta con el incremento de la participación de panoja en la planta. Otros autores no encontraron diferencias en el contenido de CEN cuando compararon varios híbridos con diferentes composiciones de plantas (Cabral Filho *et al.*, 2005). Con relación a la concentración de PB no se detectaron diferencias entre los híbridos pese a las importantes variaciones en proporciones de hoja, tallo y panoja, lo que sugiere que pudo haber existido una compensación entre las partes de la planta y sus respectivas concentraciones de PB, o bien que la concentración de PB fue similar entre la parte vegetativa y reproductiva, resultados que coinciden con los reportados por Cabral Filho *et al.* (2005) y Chaugool *et al.* (2013) al comparar diferentes híbridos. Tampoco se encontraron diferencias en la CB, siendo los valores de 262 y 234 mEq/kg MS en S1 y S2 respectivamente.

En cuanto a los valores de digestibilidad *in vitro*, la DMS fue significativamente menor ($< 0,0001$) en S2 que en S1. Sin embargo, esto fue coherente con los resultados antes discutidos de concentración de cenizas, fracciones de fibra, LDA, todos mayores en S2 y con un efecto negativo sobre DMS. Efecto a su vez reforzado por la menor concentración de carbohidratos solubles en S2.

El estudio de la contribución de las distintas partes del cultivo (hoja, tallo y panojas) sería sumamente importante para comprender las variaciones en el valor nutritivo del material cosechado, aspecto que estuvo fuera de los alcances de esta tesis y que se espera poder abordar en el futuro.

2.3.1.2. Comparación entre estados fenológicos

La falta de interacción entre Híbridos y Fenología para la mayoría de las variables descriptivas de la composición química (excepto para LDA y CSAIc) permitió realizar la comparación directa de los estados fenológicos. Como era esperable, el avance del estado fenológico estuvo acompañado por

un aumento ($p < 0,0001$) de la MS y CEN, tal como lo reportaron con anterioridad otros autores para MS (Black *et al.*, 1980; Meeske *et al.*, 1993; Pires *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2007; Gul *et al.*, 2008 y Machado *et al.*, 2012). Este resultado es coherente con el mayor estado de madurez del cultivo y consecuente mayor proporción de panoja en el F2 respecto a F1.

El avance en el estado de madurez de los sorgos disminuyó el porcentaje de aFDNmo, FDA y PB ($p < 0,012$), así como la CB ($p = 0,028$). La fracción fibrosa disminuyó pese a no haberse detectado diferencias en la Hemicelulosa ($p > 0,10$) y Celulosa ($p = 0,063$). La reducción de la aFDNmo y FDA fue coincidente con lo reportado por Black *et al.* (1980), Pires *et al.* (2006) y por Gul *et al.* (2008), y resultaría de un efecto dilutorio, producto del aumento de la proporción de panoja en la materia seca total, con el concomitante aumento en carbohidratos no estructurales. Estos cambios, a su vez, redujeron la CB ($p = 0,028$) como resultado de aumento de la proporción de granos en la masa seca total que cuentan con menor CB que la fracción vegetativa (Playne and McDonald 1966). El pH del MOr de todas las muestras fue ácido y presentó interacción Híbrido \times Fenología ($p < 0,05$).

Los híbridos presentaron diferente respuesta según el estado fenológico (p Híbrido \times Fenología $< 0,005$) para LDA y CSAIc, como probable resultado de la notable diferencia de proporción de panoja para ambos Híbridos en F1 (S1F2= 112 y S2F2= 451 g de panoja kg⁻¹ MS de planta entera); esto podría explicar por qué en el S2 al pasar de F1 a F2 disminuyó el contenido de LDA y aumentó el de CSAIc. Por el contrario, para S1 al avanzar el estado fenológico, no se registraron cambios en LDA y disminuyó CSAIc como probable resultado de la migración de CSAIc desde la fracción vegetativa de las plantas hacia la panoja.

El avance de la fenología de ambos sorgos también estuvo acompañado por una disminución del contenido de PB ($p = 0,012$), resultados similares a los hallados por Johnson *et al.* (1971), Black *et al.* (1980) y Hassan Khan *et al.* (2011), y esperable en virtud del inicio de los procesos de senescencia de la fracción vegetativa y aumento de los órganos reproductivos que presentan menor contenido de proteína.

Por otro lado, el avance de la fenología redujo la DMS, la DMO y la DFDN ($p < 0,005$), similar a lo reportado por Johnson *et al.* (1971), Black *et al.* (1980), y Faria Junior *et al.* (2011). Sin embargo, cabe resaltar que si bien las reducciones en DMS y DMO fueron numéricamente pequeñas (respectivamente 15 y 14 g kg⁻¹), la disminución en DFDN fue de mayor magnitud, en concordancia con lo reportado por Black *et al.* (1980).

Cuadro 2. Composición química, digestibilidad *in vitro*, parámetros de la producción de gas *in vitro* y variables influyentes en la fermentación del material original de planta entera de sorgo, previo al proceso de ensilado.

Variables	Híbridos ¹					Fenología ²					Híbridos × Fenología ³						
	S1	S2	SEM ⁴	gl ⁵	p-valor	F1	F2	SEM ⁴	gl ⁵	p valor	S1F1	S1F2	S2F1	S2F2	SEM ⁴	gl ⁵	p-valor
MS, g kg ⁻¹ MV	275	341	88,9	6	0,002	274	343	7,0	10	<0,0001	245	306	302	380	10,0	12	NS
Composición Química, g kg⁻¹ MS																	
Cenizas	74	97	1,6	6	<0,0001	81	90	1,3	10	<0,0001	69	78	93	101	1,8	12	NS
Proteína bruta	66	66	4,2	6	NS	70	62	3,3	6	0,012	68	64	72	60	4,6	10	NS
aFDN _{mo}	446	499	5,7	6	<0,0001	483	462	5,7	8	0,006	455	437	510	488	7,6	20	NS
FDA	279	309	3,8	6	0,008	302	286	3,7	8	0,003	286	272	318	300	5,1	20	NS
Hemicelulosa	167	190	6,0	6	NS	181	176	5,0	8	NS	170	165	193	188	6,7	20	NS
Celulosa	224	248	3,2	6	<0,0001	240	231	3,2	8	0,063	231	217	249	246	4,5	20	NS
LDA	55	61	1,6	6	0,003	62	55	1,5	8	0,001	55	55	68	54	2,0	20	0,001
Carb. Sol. Alcohol	162	103	20,7	4	0,001	120	144	20,6	4	NS	173	150	67	138	23,3	8	0,005
pH inicial	5,28	5,40	0,02	4	0,0059	5,45	5,23	0,02	4	<0,0001	5,34	5,22	5,56	5,24	0,03	8	0,011
CB, meq kg ⁻¹ MS	262	234	14,8	6	NS	257	238	11,3	8	0,0283	271	253	244	223	16,0	8	NS
Digestibilidad <i>in vitro</i>																	
DMS, g kg ⁻¹ MS	633	565	3,2	10	<0,0001	607	591	3,1	10	0,0007	642	624	572	557	4,5	24	NS
DMO, g kg ⁻¹ MO	648	586	3,4	10	<0,0001	624	610	3,4	10	0,0053	655	641	593	579	4,8	24	NS
DFDN, g kg ⁻¹ FDN	455	459	9,6	6	NS	479	434	9,7	6	<0,0001	472	437	486	432	11,3	10	NS

Variables	Híbridos ¹					Fenología ²					Híbridos × Fenología ³						
	S1	S2	SEM ⁴	gl ⁵	p-valor	F1	F2	SEM ⁴	gl ⁵	p valor	S1F1	S1F2	S2F1	S2F2	SEM ⁴	gl ⁵	p-valor
Parámetros de producción de gas <i>in vitro</i>																	
a , ml g ⁻¹ MS	-5,5	-6,0	1,5	6	NS	-10,0	-1,5	1,4	6	<0,0001	-8,5	-2,5	-11,6	-0,5	1,8	10	0,035 ⁶
b , ml g ⁻¹ MS	261	237	3,7	6	0,0191	259,8	238,5	3,5	6	<0,0002	273,2	249,0	246,5	228,0	4,5	10	NS
c , h ⁻¹	0,06	0,04	0,001	6	<0,0001	0,05	0,05	0,001	6	NS	0,06	0,06	0,04	0,043	0,002	10	NS
a , ml g ⁻¹ MO	-3,8	-10,2	6,3	6	NS	-7,1	-6,9	4,7	6	NS	-4,9	-2,6	-9,2	-11,3	6,6	10	NS
b , ml g ⁻¹ MO	271	264	17,1	6	NS	268,6	266,5	12,8	6	NS	275,7	266,9	261,4	266,1	17,9	10	NS
c , h ⁻¹	0,17	0,04	0,09	6	NS	0,17	0,04	0,09	6	NS	0,29	0,05	0,04	0,041	0,1	10	NS
TMax , mlh ⁻¹	26,7	9,5	9,0	6	<0,0001	24,2	12,0	9,0	6	NS	39,4	13,9	9,0	10,0	12,0	10	NS
tTMax , h	2,7	2,5	0,4	6	NS	2,9	2,3	0,3	6	0,0287	2,7	2,7	3,1	1,8	0,4	10	NS

¹ S1 y S2 corresponden a sorgos con baja y alta proporción de panoja respectivamente.

² F1 y F2 corresponden a estadíos fenológicos, grano pastoso y grano maduro respectivamente.

³ Interacción Híbrido x Fenología.

⁴ Error estándar de la media.

⁵ Grados de libertad.

⁶ S1F1 vs S1F2, -8,5 vs -2,5, p= 0,0024, EE diferencia= 1,63; S2F1 vs S2F2, -11,6 vs -0,5, p< 0,0001; EE Diferencia= 1,59.

El análisis de las variables de producción de gas (cuadro 2) indicó que el avance en la fenología aumentó el valor del parámetro "a" como resultado de una disminución de la fase Lag del proceso de digestión, este cambio fue significativo para ambos sorgos, pero resultó de mayor magnitud para el S2 (S1F1 vs S1F2, -8,5 vs -2,5, $p=0,0024$, EE diferencia= 1,63; S2F1 vs S2F2, -11,6 vs -0,5, $p<0,0001$; EE Diferencia= 1,59.) y estaría justificado por la mayor disponibilidad de CSAIc en F2. Asimismo, la disminución en el parámetro "b" estaría asociada a la reducción en la disponibilidad para los microorganismos del rumen de los carbohidratos estructurales (reflejado en la menor DFDN en F2). En ambos estados fenológicos, "c" resultó invariable.

2.3.1.3. Análisis multivariado de los efectos de los híbridos y la fenología sobre las características químico-nutricionales del material original

En el análisis de componentes principales, el componente principal 1 (CP1) se relacionó positivamente con los componentes de la pared celular (aFDNmo y FDA, $r>0,7$. Cuadro 3) y negativamente con la DMS. El segundo componente principal (CP2) se relacionó positivamente con el contenido de materia seca total (MS, cuadro 3).

Cuadro 3. Correlación de las variables originales del material original con los componentes principales del análisis multivariado.

Correlaciones con las variables originales		
VARIABLES	CP 1 *	CP 2 **
aFDNmo	0,96	0,01
FDA	0,90	-0,02
Celulosa	0,77	0,21
Hemicelulosa	0,71	0,04
Lignina Detergente Acido	0,70	-0,53
pH	0,68	-0,42
Digestibilidad de la FDN	0,47	-0,69
Materia Seca	0,36	0,82
Proteína Bruta	0,16	-0,61
Capacidad Buffer	-0,43	-0,51
Carbohidratos Solubles Alcohol	-0,46	0,02
Digestibilidad Materia Seca	-0,72	-0,54

* Componente principal 1

** Componente principal 2

El primer eje del ordenamiento (eje x) separó a los dos híbridos (S1 y S2), mientras que el segundo eje (eje y) separó los estadios fenológicos (F1 y F2). El sorgo con alta proporción de panoja (S2) mostró una relación positiva con los componentes de la pared celular (FDN, FDA, Hemi y Cel, Cuadro 3), coincidente con lo hallado con el ANVA (Cuadro 2). Además, se observó una relación

negativa de este híbrido con el contenido de CSAIc y con la DMS (Cuadro 3). El segundo eje (CP2) mostró una alta relación del contenido de MS con el estadio fenológico más avanzado (F2, Cuadro 3 y Figura 3). El contenido de PB y la DFDN estuvieron positivamente relacionados con el primer estadio fenológico (F1, cuadro 3 y figura 3).

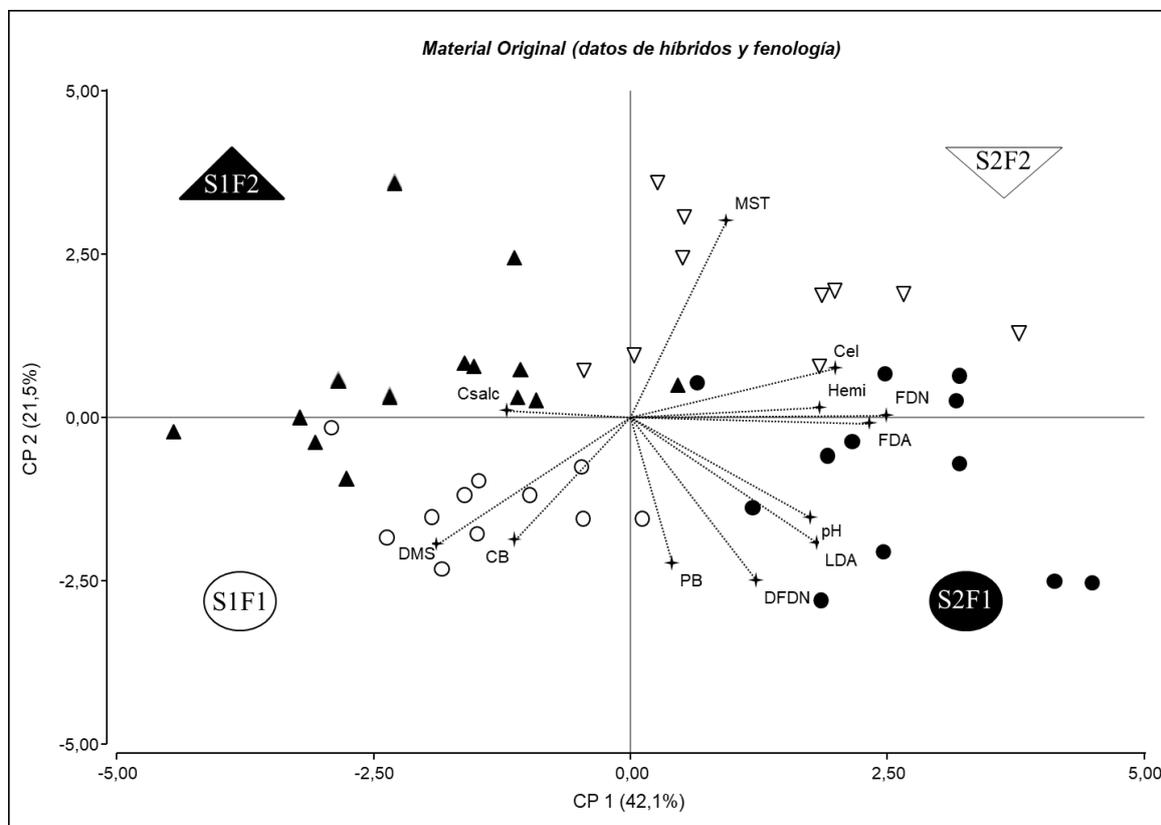


Figura 3. Análisis de componentes principales (ACP) de la composición química y calidad nutricional del material original de los híbridos (S1 y S2) y de los estadios fenológicos (F1 y F2) evaluados. Los puntos corresponden a resultados: S1F1, círculos blancos; S1F2, triángulos negros; S2F1, círculos negros; S2F2, triángulos blancos invertidos.

2.3.2. Composición química, calidad nutricional y perfil fermentativo del ensilaje de planta entera de sorgo tratado con enzimas exógenas

2.3.2.1. Comparación entre los híbridos S1 y S2

De acuerdo con lo planteado en el objetivo específico 1 de este capítulo, se determinó el impacto de dos híbridos diferentes sobre la composición química, calidad nutricional y perfil fermentativo de ensilaje de planta entera de sorgo (cuadro 4). Al igual que en el forraje original se observó mayor ($p=0,0009$) contenido de MS en el híbrido S2, diferencia debida a que S2 presentó una mayor proporción de panoja (451g contra 112 g de panoja kg MS de planta entera⁻¹), que es el componente con mayor contenido de MS (Fernández Perazzo *et al.*, 2014). La estructura de planta de S1 tuvo mayor

contenido de hojas y tallos (100 y 788 g de componente kg^{-1} MS de planta entera respectivamente) por lo que su contenido de MS fue menor (241 g kg^{-1} MH). El contenido de CEN fue mayor ($p=0,017$) en S2, diferencia análoga a la encontrada en el material original.

Las concentraciones de aFDN_{mo} y de FDA de los ensilajes de sorgo no difirieron entre ambos híbridos, a diferencia de lo observado en el material original, donde S2 supero a S1. Esta diferencia entre el material original y luego de la fermentación respondería a la hidrólisis de los carbohidratos de la pared celular (Jaurena and Pichard, 2001) y fermentación de sus productos, así como de otros compuestos (*e.g.* carbohidratos solubles), lo que modifica las proporciones entre las fracciones mencionadas. No hallándose diferencias significativas en el contenido de HEMI, CEL ni de LDA.

Los valores de DMS y DMO fueron mayores en S1 ($p<0,0001$), contrariamente a lo esperado, dado que fue el híbrido con menor proporción de panoja, sin embargo, el material original de S1 tuvo menos LDA que el híbrido S2, diferencia que desapareció luego del ensilado. Otros autores (Hart 1990; Andrade y Carvalho 1992 y Hunt *et al.* 1993) también reportaron que la DMS no aumentó con el incremento del contenido de granos en ensilajes de sorgo, lo que indicaría la existencia de otros factores que también afectan los valores de DMS. En cuanto a los valores de digestibilidad de la fibra insoluble en detergente neutro (DFDN), no se detectaron diferencias entre híbridos, al igual que en el material original, pero se notó una marcada reducción (valores medios, pre-ensilaje= 457 g FDN kg^{-1} FDN, post-ensilaje= 413), sugiriendo que el proceso fermentativo redujo la digestibilidad de la FDN como consecuencia de la pérdida de las fracciones más degradables de la FDN original. En correspondencia con la mayor DMS y DMO observada en S1, también se observó una mayor tasa de degradación (“c”; $p=0,04$) y mayor tasa máxima de producción de gas (**TM_{max}**; $p=0,029$; Figura 5).

El perfil fermentativo, considerando los valores de pH, N-NH₃, AGVT y Lac/AGVT indican que en todos los casos los materiales presentaron una buena fermentación láctica. No obstante, el pH y la AT de los ensilajes de S1 resultaron respectivamente más bajos y mayores ($p<0,0001$) que los de S2, en correspondencia con el mayor contenido de carbohidratos fácilmente fermentables del material original. Si bien, no hubo diferencias en la producción de AGVT ni de N-NH₃, la concentración de propiónico en S1 fue mayor ($p<0,02$).

2.3.2.2. Comparación de los estados fenológicos (ANOVA)

Evaluando el efecto de la fenología sobre la calidad nutricional y el perfil fermentativo del ensilaje de planta entera de sorgo (cuadro 4), planteado en el objetivo específico 2 se observó que el contenido de MS aumentó ($p=0,001$) en el estadio más avanzado con respecto al más temprano, efecto similar al observado en el material original. La fenología no tuvo efecto significativo en el contenido de CEN

y de PB de los ensilajes de sorgo, a pesar de que el contenido de PB fue significativamente diferente en el MO. Ciertos autores encontraron un descenso en el contenido de PB con el avance de los estadios fenológicos (Meeske *et al.*, 1993; Pires *et al.*, 2006 y Abdelhadi and Tricarico, 2009). Snyman and Joubert (1996) evaluaron ensilajes de sorgo y también observaron una disminución en el contenido de PB entre los estadios vegetativos y floración, sin embargo, esta diferencia no fue significativa entre la floración y la madurez. Analizando el contenido de PB de la planta entera en relación a los estadios de maduración de los granos de la panoja de sorgo, Araújo *et al.* (2007) observaron que el descenso en el contenido de PB se produjo entre los estadios lechoso y pastoso, luego de lo cual no se observaron diferencias entre los estadios pastoso, harinoso y duro, lo que concuerda con lo hallado en este trabajo. El contenido de CSAIc fue similar entre F1 y F2 en los ensilajes evaluados. Sin embargo, estos valores fueron considerablemente menores a los valores de CSAIc de F1 y F2 de los respectivos materiales originales como es de esperar, ya que estos CSAIc fueron utilizados por las BAL durante el proceso fermentativo.

Los componentes de la pared celular (aFDNmo, FDA, Hemi, CEL y LDA) de los ensilajes no fueron diferentes entre los dos estadios fenológicos evaluados (F1 y F2, Cuadro 4). Esto concuerda con lo hallado por Molina *et al.* (2002) y Araújo *et al.* (2007), y se diferencia de otros autores (Black *et al.*, 1980, Esmail *et al.*, 1991, Pires *et al.*, 2006 y Faria Junior *et al.*, 2011) quienes observaron una disminución del contenido de aFDNmo y FDA con el avance fenológico. Estos autores atribuyen dicha disminución al efecto de dilución por el aumento de la panoja en la planta a medida que avanza la madurez. Esta disminución se daría entre los estadios lechoso y pastoso (Esmail *et al.*, 1991; Pires *et al.*, 2006 y Faria Junior *et al.*, 2011) y no posteriormente entre pastoso y duro (Pires *et al.*, 2006 y Faria Junior *et al.*, 2011), estadios coincidentes con este trabajo. Como se mencionó anteriormente el contenido de LDA no difirió entre F1 y F2, tal como también reportaran otros autores (Araújo *et al.*, 2007; Faria Junior *et al.*, 2011 y Machado *et al.*, 2012).

Según Van Soest (1994), el contenido de LDA de una forrajera es el principal factor limitante de la digestibilidad, debido a la incrustación sobre los polisacáridos de la pared celular, volviéndolos menos accesibles a la acción de las bacterias y alterando tanto la tasa como la extensión de la digestión. En este trabajo, los valores de DMS y DMO no fueron afectados por los estadios fenológicos. Esto concuerda con los resultados hallados por Araújo *et al.* (2007) y Pires *et al.* (2006) quienes observaron un comportamiento variable de la DMS con el paso de los estadios fenológicos para diferentes híbridos (diferentes composiciones de planta). Sin embargo, otros autores (Black *et al.*, 1980; Snyman and Joubert, 1996; Farias Júnior *et al.*, 2011) observaron una disminución de la DMS con el avance fenológico de sorgos ensilados. El efecto del avance de los estadios fenológicos

sobre la DMS es variable entre diferentes materiales debido a variaciones en las proporciones de la planta (tallos, hojas y panoja) y a las diferencias en los valores nutricionales de esas fracciones, lo que interfiere en la calidad final de los ensilajes de sorgo. En el presente trabajo, la DFDN de F1 fue significativamente mayor ($p=0,005$), lo que concuerda con lo hallado por Black *et al.* (1980), quienes observaron una DFDN significativamente más alta en floración temprana, disminuyendo en grano pastoso y pastoso-duro. El análisis de la cinética de degradación indicó que con el avance en la fenología aumentó el valor del parámetro "a" como resultado de una disminución de la fase Lag del proceso de digestión, este cambio fue de mayor magnitud para el S2 (-8,2 y -2,1 ml g⁻¹ MS) y estaría en parte explicado por una mayor disponibilidad de CSAIc en F2. El parámetro "c" también fue mayor en F1, indicando la mayor tasa de degradación.

Respecto al proceso fermentativo, los valores de pH, AT y N-NH₃ no difirieron entre ambos estadios fenológicos, en correspondencia con las concentraciones similares de CSAIc de los MOOr en F1 y F2 (Cuadro 2). No obstante, los contenidos de ácido láctico y acético fueron mayores ($p=0,0102$) en los ensilajes en F1.

2.3.2.3. Efecto de las enzimas PROT y FIBRO (ANOVA)

La evaluación del agregado de las dos enzimas ensayadas (cuadro 4) no arrojó diferencia para ninguna de las variables analizadas sobre la composición química, calidad nutricional y perfil fermentativo del ensilaje de planta entera de sorgo (Objetivo específico 3). El contenido de PB no fue afectado por las enzimas aplicadas, concordando con lo hallado por Thomas *et al.* (2013) quienes no registraron efecto significativo de la aplicación de enzimas fibrolíticas sobre el contenido de PB en ensilajes de sorgo, utilizando una dosis de enzimas similar a la aplicada en este trabajo. En estudios realizados sobre silaje de otras especies (Henrique and Vieira Bose, 1992; Chen *et al.*, 1994; Sheperd and Kung, 1996b; Zahiroddini *et al.*, 2004; Dean *et al.*, 2005 y Young *et al.*, 2012) los autores tampoco observaron efectos de la aplicación de enzimas exógenas sobre el contenido de PB. En cambio, Xing *et al.* (2009) observaron un aumento del contenido de PB con la aplicación de enzimas celulasas y xilanasas en silaje de la parte forrajera de la planta de sorgo, a pesar de haber usado una dosis 10 veces menor a la del presente trabajo.

Cuadro 4. Composición química, digestibilidad *in vitro*, parámetros de la producción de gas *in vitro* y perfil fermentativo de los ensilajes de dos híbridos de sorgos, en dos estadios fenológicos y tratados con enzimas exógenas.

Variables	Híbridos ¹					Fenología ²					Enzimas ³					Contrastes		Interacciones ⁴				
	S1	S2	SEM ⁵	gl ⁶	p-valor	F1	F2	SEM ⁵	gl ⁶	P-valor	E1	E2	E3	SEM ⁵	gl ⁶	P-valor	E1+E2 vs E3	E1 vs E2	HxF	HxE	FxE	HxFxE
Composición Química																						
MS, g/kg MV	241	332	10,6	6	0,0009	269	304	9,0	12	0,001	286	283	291	10,1	18	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CEN, g/kg MS	86	100	2,2	6	0,017	92	94	2,1	8	NS	93	92	93	2,4	13	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PB, g/kg MS	68	65	2,9	6	NS	69	64	2,5	14	NS	68	69	63	3,0	23	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
aFDN _{mo} , g/kg MS	492	503	9,9	6	NS	494	501	8,1	5	NS	506	485	501	9,0	8	NS	NS	0,036	NS	NS	NS	NS
FDA, g/kg MS	295	284	6,2	6	NS	290	287	6,2	9	NS	294	284	288	7,5	16	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Hemi, g/kg MS	197	220	6,2	6	NS	203	214	6,2	42	NS	212	201	213	7,8	42	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cel, g/kg MS	239	235	6,0	6	NS	240	234	6,0	42	NS	246	229	236	7,4	42	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LDA, g/kg MS	56	48	4,0	5	NS	51	53	4,0	4	NS	49	55	52	4,0	5	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,024
CSA _{lc} , g/kg MS	87	65	15,0	6	NS	80	73	15,0	4	NS	84	76	68	16,0	6	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Digestibilidad <i>in vitro</i>																						
DMS, g/kg MS	563	512	7,7	42	<0,0001	547	528	7,7	42	NS	539	538	535	9,3	42	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DMO, g/kg MO	580	536	7,4	42	<0,0001	567	549	7,4	42	NS	560	560	555	9,1	42	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DFDN, g/kg FDN	408	419	19,5	6	NS	435	392	17,2	4	0,005	419	405	417	18,6	6	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Parámetros de la producción de gas <i>in vitro</i>																						
a, ml / g MS	-4,1	-6,3	2,2	8	NS	-8,2	-2,1	2,2	8	0,038	-6,3	-5,2	-4,0	2,6	14	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
b, ml / g MS	233,6	230,4	8,7	6	NS	234,9	229,2	8,0	16	NS	241,5	226,7	227,9	9,5	26	NS	NS	NS	0,009	NS	NS	NS
c, /h	0,037	0,033	0,001	6	0,0445	0,04	0,03	0,001	17	0,0029	0,03	0,03	0,03	0,001	27	NS	NS	NS	0,015	NS	NS	NS
a, ml/g MO	-11,6	-14,8	4,0	8	NS	-13,2	-13,2	4,0	8	NS	-14,7	-14,4	-10,4	4,6	13	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
b, ml/g MO	264,4	280,2	11,0	6	NS	275,2	269,4	10,6	7	NS	271,3	279,0	266,7	12,0	11	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
c, /h	0,04	0,04	0,003	6	NS	0,04	0,04	0,002	8	NS	0,04	0,04	0,04	0,003	11	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TMax, ml/h	8,6	7,5	0,3	6	0,029	7,9	8,1	0,3	15	NS	8,3	7,9	7,9	0,3	24	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
tTMax, h	2,4	2,4	0,5	5	NS	2,7	2,1	0,5	4	NS	2,3	2,2	2,7	0,5	6	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Variables	Híbridos ¹					Fenología ²					Enzimas ³					Contrastes		Interacciones ⁴					
	S1	S2	SEM ⁵	gl ⁶	p-valor	F1	F2	SEM ⁵	gl ⁶	P-valor	E1	E2	E3	SEM ⁵	gl ⁶	P-valor	E1+E2 vs E3	E1 vs E2	HxF	HxE	FxE	HxFxE	
Perfil Fermentativo																							
pH	3,76	3,93	0,01	6	<0,0001	3,84	3,85	0,01	40	NS	3,83	3,84	3,86	0,0	40	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
AT, (meq/kg MS)	1097	744	38,5	6	0,0005	930	911	36,0	17	NS	924	939	899	42,0	27	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
N-NH₃, % NT	4,99	4,83	0,7	4	NS	3,7	6,1	0,7	4	NS	5,5	4,6	4,6	0,7	5	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
Ác. Acético, %bs	1,2	1,1	0,1	6	NS	1,3	0,9	0,13	9	0,0148	1,2	12	1,0	0,14	12	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
Ác. Propiónico, %bs	0,8	0,4	0,1	32	0,0176	0,7	0,5	0,1	32	NS	0,7	0,6	0,6	0,1	32	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
Ác. Butírico, %bs	ND	ND	-	-	-	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ác. Láctico, %bs	5,6	4,7	0,3	10	NS	5,9	4,4	0,3	10	0,0102	5,4	5,0	5,1	0,4	10	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
AGVs Totales, %bs	3,2	3,3	1,3	6	NS	3,3	3,1	0,8	5	NS	4,1	3,0	2,7	0,9	11	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
Lác/AGVs totales, g/g	0,7	0,7	0,03	2	NS	0,7	0,7	0,0	4	NS	0,7	0,7	0,7	0,0	8	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
Prop/AGVs totales, g/g	0,3	0,2	0,04	6	0,06	0,2	0,2	0,0	5	NS	0,2	0,2	0,2	0,0	6	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
Lác/Acético, g/g	5,7	4,4	1,5	3	NS	4,9	5,2	1,5	3	NS	4,3	4,8	6,0	1,5	3	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	

¹ S1 y S2 corresponden a sorgos con baja y alta proporción de panoja respectivamente.

² F1 y F2 corresponden a estadios fenológicos, grano pastoso y grano maduro respectivamente.

³ E1, E2 y E3 corresponden a los tratamientos enzimáticos, PROT, FIBRO y CTRL respectivamente.

⁴ Interacciones

HxE: Híbridos x Enzimas

HxF: Híbridos x Fenología

FxE: Fenología x Enzimas

HxFxE: Híbridos x Fenología x Enzimas

⁵ Error estándar de la media.

⁶ Grados de libertad.

En el presente trabajo las enzimas aplicadas no afectaron el contenido de aFDNmo y de FDA del ensilaje de sorgo, al igual que otros autores (Sheperd and Kung, 1996a y Zahiroddini *et al.*, 2004) lo reportaron en ensilajes de otras especies cuando aplicaron enzimas exógenas a una dosis similar. Sin embargo, cuando se aplicaron dosis mayores de enzimas fibrolíticas se observó una reducción del contenido de aFDNmo y FDA, (Sun *et al.*, 2009; Adogla-Bessa *et al.*, 1999; Sheperd and Kung 1996b; Spoelstra and Wikselaar, 1992y McHan, 1986). Sin embargo, en este trabajo se observó diferencia significativa en el efecto de la enzima FIBRO (E2) con respecto a la enzima PROT (E1, contrastes en cuadro 4) sobre el contenido de aFDNmo. El contenido de HEMI no fue afectado por las enzimas contraponiéndose al resultado encontrado por Sheperd and Kung (1996b) quienes registraron una disminución de HEMI con el aumento de la dosis de enzimas fibrolíticas. El contenido de CEL no mostró diferencias significativas por la aplicación de enzimas. El contenido de lignina (LDA) presentó interacción entre los tres factores: híbridos, fenología y enzimas. El contenido de carbohidratos solubles en alcohol (CSAlc) del ensilaje de sorgo no fue afectado por el tratamiento enzimático, lo que concuerda con los resultados hallados por Chen *et al.*, 1994 en ensilaje de maíz, quien utilizó una dosis menor a la del presente trabajo. Sin embargo, los resultados hallados en este trabajo se contraponen a lo hallado por Thomas *et al.* (2013) en ensilaje de sorgo utilizando una dosis similar y por otros autores en varias especies ensiladas (McHan 1986; Adogla-Bessa *et al.*, 1999; Colombatto *et al.*, 2004a; Dean *et al.*, 2005; Xing *et al.*, 2008 y Sun *et al.*, 2009), quienes registraron un aumento del contenido de CSA con la aplicación de enzimas fibrolíticas.

La aplicación de enzimas exógenas no afectó los valores de digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DMS) y de la materia orgánica (DMO) de los ensilajes. Estos resultados concuerdan con los hallados por otros autores (van Vuuren *et al.*, 1989, Adogla-Bessa *et al.*, 1999, Sheperd and Kung 1996a) quienes también aplicaron enzimas fibrolíticas exógenas en ensilajes. De la misma manera, Eun and Beauchemin (2008) no encontraron diferencias significativas en los valores de DMS cuando aplicaron proteasas en ensilaje de maíz a una dosis mayor al tratamiento PROT del presente trabajo. Sin embargo, varios autores evidenciaron que la aplicación de enzimas exógenas previo al proceso de ensilado aumentó la DMS y DMO (McHan, 1986; Mao *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2009; Xing *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2013) en distintas especies, independientemente de la dosis utilizada.

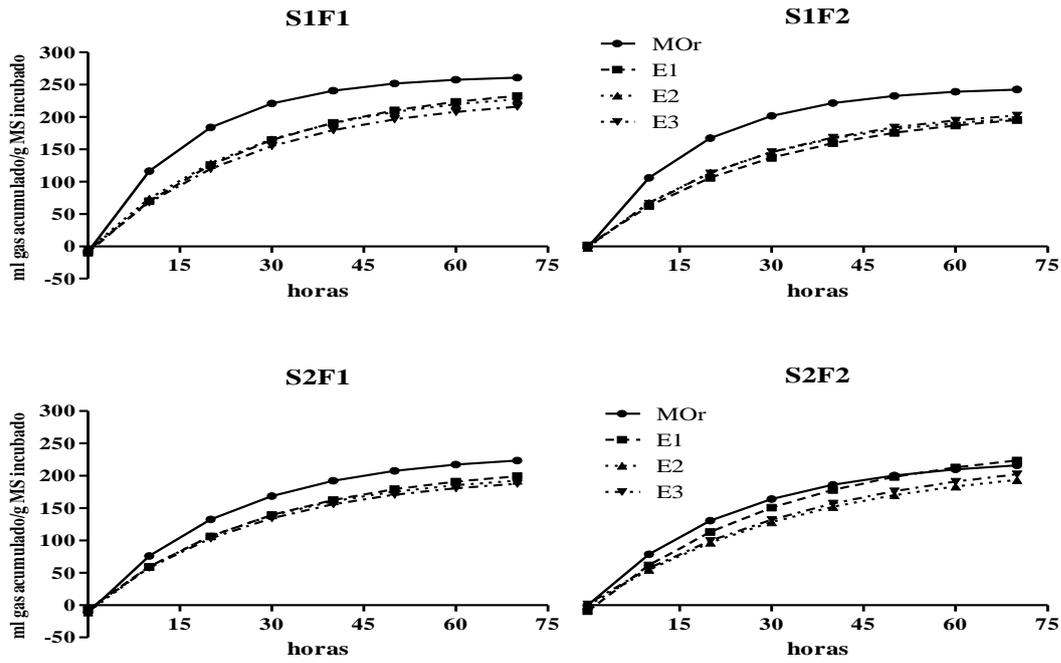


Figura 4. Curvas de producción de gas acumulado de los ensilajes de planta entera de sorgo tratados con enzimas exógenas. Proteasas (E1, cuadrados), Fibrolíticas (E2, triángulos), Control (triángulos invertidos) y del material original (MOr, círculos).

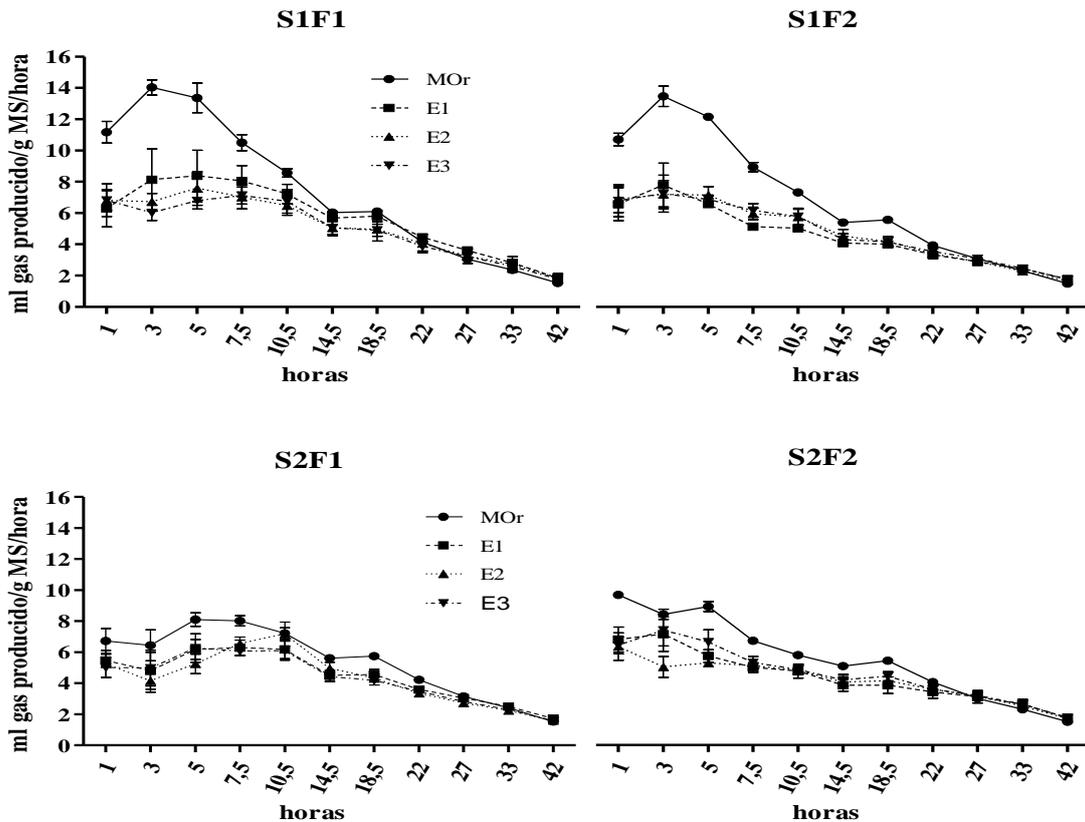


Figura 5. Curvas de tasa horaria de producción de gas de los ensilajes de planta entera de sorgo tratados con enzimas exógenas. Proteasas (E1, cuadrados), Fibrolíticas (E2, triángulos), Control (triángulos invertidos) y del material original (MOr, círculos).

La aplicación de enzimas exógenas (PROT y FIBRO) no tuvo efecto sobre la DFDN de los ensilajes tratados, en comparación con el CTRL. Resultados similares fueron hallados por otros autores (Gallardo *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2000 y Sheperd and Kung 1996a), quienes utilizaron dosis similares a la de este trabajo y tampoco registraron efecto de la aplicación de enzimas exógenas sobre la DFDN en diferentes especies. Por el contrario, existen trabajos que registraron aumentos en la DFDN cuando fueron agregadas enzimas fibrolíticas exógenas (Mao *et al.*, 2013 y Xing *et al.*, 2008) y enzimas proteasas exógenas (Eun *et al.*, 2007 y Eun and Beauchemin, 2008). Thomas *et al.* (2013) quienes usaron una dosis similar a la de este trabajo, observaron que la DFDN aumentó con la aplicación de enzimas fibrolíticas solamente en 2 de los 4 híbridos de sorgo evaluados, teniendo mayor efecto en los híbridos con mayor concentración de carbohidratos estructurales.

La aplicación de enzimas exógenas no tuvo efecto en la cinética de degradación del ensilaje de planta entera de sorgo (cuadro 4). El mayor efecto observado en la cinética de degradación fue el proceso de ensilado en sí, o sea la diferencia entre MOr y MEn, (MOr líneas continuas en figuras 4 y 5). Los otros factores que también afectaron la cinética de degradación fueron los híbridos y la fenología, los que modificaron el parámetro “c” (cuadro 4). El S1 (dos cuadros superiores en la figura 5) tuvo una tasa de degradación mayor respecto a S2, y F1 (dos cuadros de la izquierda en la figura 5) también se degradó a una velocidad mayor que F2.

No se observaron efectos significativos con la aplicación de dos enzimas exógenas a ensilaje de planta entera de sorgo. Este hecho puede deberse a que las condiciones ambientales (pH y temperatura) de fermentación no fueron las adecuadas para que las enzimas aplicadas expresaran su máxima actividad y mostrar un efecto diferencial frente al tratamiento control (agua destilada), en el cual ocurrió una hidrólisis natural a través de enzimas procedentes de la planta y los microorganismos. Esto es difícil de saberlo, ya que no se realizaron mediciones seriadas, de pH y temperatura durante el proceso de fermentación, sin embargo, el pH del ensilaje al momento de la apertura de los microsilos demostró que el proceso fermentativo fue óptimo.

La falta de efectos asociados con la aplicación de las enzimas pudo haberse debido a que las condiciones ambientales (fundamentalmente pH y temperatura) durante la fermentación no fueron las adecuadas para que las enzimas expresaran su actividad, diferenciándose del control (agua destilada) donde la hidrólisis fue causada por las enzimas procedentes de la planta y de los microorganismos nativos. En el caso particular de PROT, su principal sustrato potencial correspondía a la matriz proteica del grano, por lo cual las posibilidades de detección de su efecto estuvieron condicionadas por la participación relativa del grano en la masa de forraje ensilada.

2.3.2.4. Efecto de los híbridos, la fenología y las enzimas sobre la composición química y calidad nutricional del ensilaje de planta entera de sorgo. Análisis multivariado.

El cambio más importante en la composición química del material vegetal fue dado por el proceso de ensilado y no por la aplicación de las enzimas, que se evidencia en la posición en el primer eje del ordenamiento, que es el que explica la mayor proporción de la variación (figura 6 y figura 7). Además, mientras el material original es relativamente homogéneo para cada híbrido y estado fenológico (círculos de la derecha en figura 6 y figura 7) el proceso de ensilado aumentó la variabilidad en la composición química, independientemente del tratamiento enzimático aplicado (dispersión de puntos en el plano del ordenamiento). En este sentido, el cambio más consistente con el proceso de ensilado fue la disminución de la DMS y del CSAIc en todos los materiales.

Cuadro 5. Correlación de las variables originales con los componentes principales (CP 1 y CP 2) de los ensilajes tratados con enzimas exógenas.

Variables	S1F1 ¹		S1F2 ²		S2F1 ³		S2F2 ⁴	
	CP 1	CP 2						
Materia Seca	0,68	-0,51	0,91	-0,40	-0,26	-0,74	0,67	0,23
Cenizas	-0,97	0,13	-0,98	0,11	-0,92	-0,17	0,76	-0,61
Proteína Bruta	0,08	0,90	-0,42	0,55	0,36	0,86	-0,02	0,82
aFDNmo	-0,85	0,34	-0,96	-0,10	0,45	0,70	-0,50	-0,68
FDA	-0,80	-0,56	-0,78	-0,52	0,99	-0,02	0,78	-0,54
Hemicelulosa	-0,46	0,77	-0,86	0,13	-0,86	0,44	-0,86	-0,21
Celulosa	-0,74	-0,65	-0,68	-0,67	0,68	-0,46	0,56	-0,73
Lignina Detergente Ácido	0,26	0,71	-0,43	0,74	0,91	0,32	0,87	0,33
Carbohidratos Solubles Alcohol	0,80	-0,28	0,95	-0,18	0,69	-0,68	0,80	0,22
Digestibilidad de Materia Seca	0,98	-0,04	0,99	0,09	0,97	-0,14	0,97	0,12
Digestibilidad de la FDN	0,72	0,40	0,88	0,44	0,97	-0,01	0,81	-0,02
pH	0,99	-0,09	0,99	-0,12	0,98	0,07	0,98	0,07

¹ sorgo con baja proporción de panoja en estado fenológico grano pastoso.

² sorgo con baja proporción de panoja en estadio fenológico grano maduro.

³ sorgo con alta proporción de panoja en estadio fenológico grano maduro.

⁴ sorgo con alta proporción de panoja en estadio fenológico grano maduro.

En el híbrido con menor proporción de panoja y en el estadio fenológico de grano pastoso (S1F1, figura 6), los dos componentes explicaron el 83% de la variación total. El componente principal 1 se relacionó positivamente con el pH, los CSAIc, la DMS y la DFDN, y negativamente con CEN y los componentes de la pared celular FDN y FDA (cuadro 5). El componente principal 2 tuvo una alta relación positiva con PB, Hemi y LDA. El material original S1F1 tuvo mayor contenido de MS y

CSA1c que los ensilajes resultantes. Además, tuvo mayor DMS y DFDN (Cuadro 5). Luego del proceso de ensilado, este sorgo presentó mayor contenido de pared celular (FDN, FDA, Hemi y Cel), menor DMS y DFDN, al igual que menor pH que el material original. Esto fue esperable debido a que los CSA1c fueron fermentados por las bacterias con la producción de AGVs.

En el híbrido S1 en el estadio fenológico de grano duro (S1F2, figura 6, abajo), la CP1 tuvo una relación positiva con la MS, CSA1c, pH, DMS y DFDN; y una relación negativa con los componentes de la pared celular (FDN, FDA y Hemi) y la CEN (cuadro 5 y figura 6, abajo). La CP2 tuvo una relación positiva con la LDA y se relacionó negativamente con la Cel. Entre las dos componentes (CP1 y CP2), explicaron el 87,7% de la variación del total de datos analizados. Al igual que en el caso anterior, el material original se caracterizó por haber sido más homogéneo que los ensilajes resultantes tratados con enzimas (figura 6). El material original tuvo mayor contenido de MS y CSA1c, además presentó mayor DMS y DFDN que los ensilajes. Por otro lado, los ensilajes presentaron mayor contenido de los componentes de la pared celular (FDN, FDA, Hemi, Cel y FDA), además de un mayor contenido de CEN.

En el caso del sorgo con alta proporción de panoja en el estadio fenológico de grano pastoso (S2F1, figura 7, arriba), la CP1 tuvo una relación positiva con la FDA, LDA, pH, DMS, DFDN; y se relacionó negativamente con el contenido de CEN y la Hemi. El CP2 tuvo una relación positiva con la PB y la FDN; y una relación negativa con el contenido de MS. Entre los dos CP se explicó el 86,5% de la variación total de los datos analizados. Se observó que el material original tuvo más FDN, FDA, Cel y LDA que los ensilajes resultantes, y además esa FDN fue más digestible (DFDN) que en los ensilajes.

En el caso del sorgo S2 en el estadio fenológico F2 (S2F2, figura 7, abajo), la CP1 tuvo una relación positiva con DSM, DFDN, pH, LDA, CSA1c y FDA. El CP2 se relacionó positivamente con PB. Se observó que el material original fue muy homogéneo respecto a los ensilajes resultantes tratados con enzimas exógenas. Dicho material original tuvo mayor contenido de MS y de CSA1c que sus respectivos ensilajes. Los ensilajes tuvieron mayor contenido de FDN y Hemi, y valores de pH inferiores.

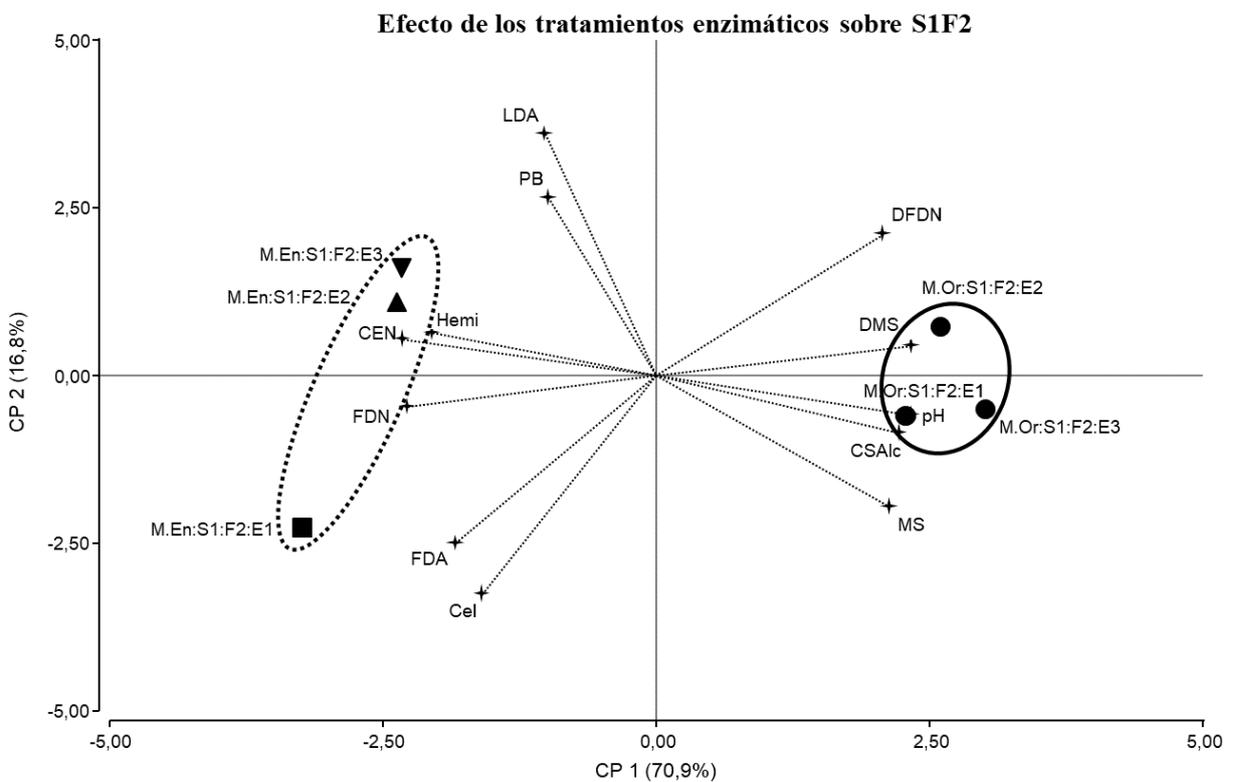
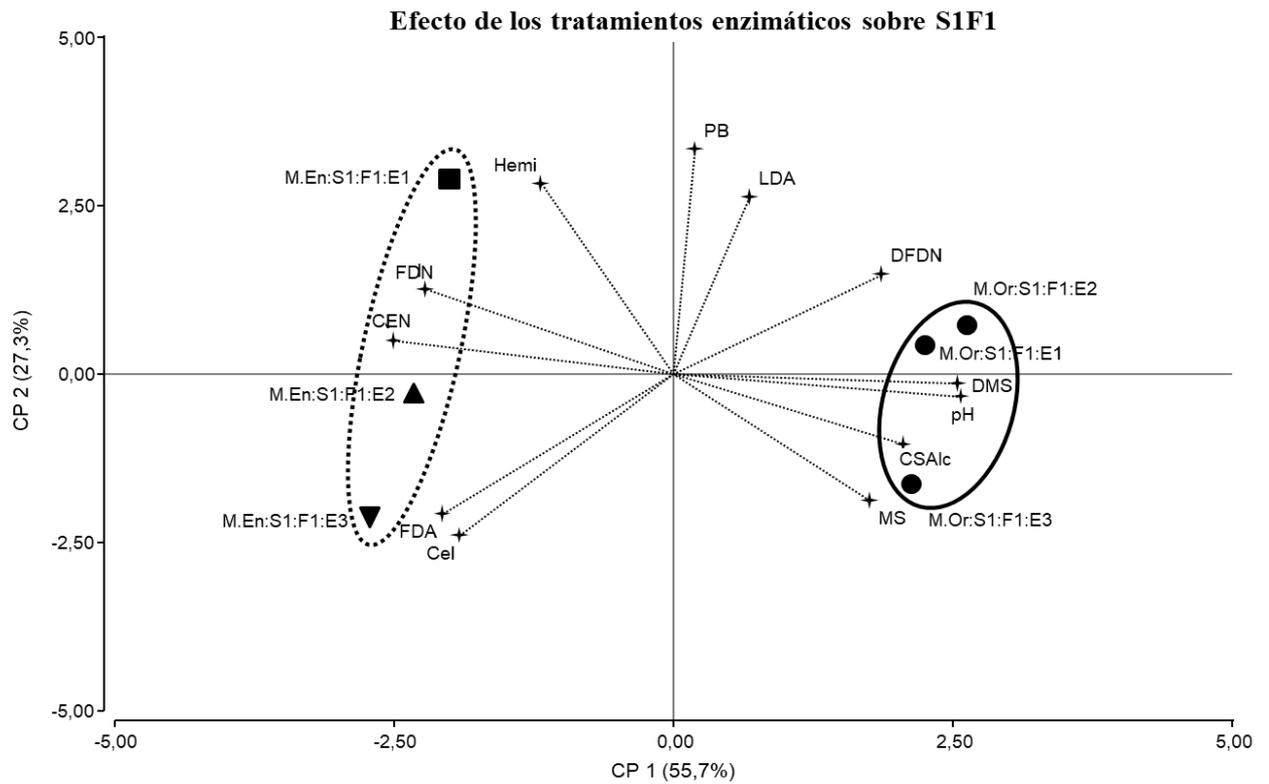


Figura 6. Análisis de componentes principales (APC) del efecto de la aplicación de enzimas exógenas sobre los materiales originales (círculos) de S1F1 arriba y S1F2 abajo. Proteasas (E1, cuadrado), Fibrolíticas (E2, triángulo), Control (triángulo invertido).

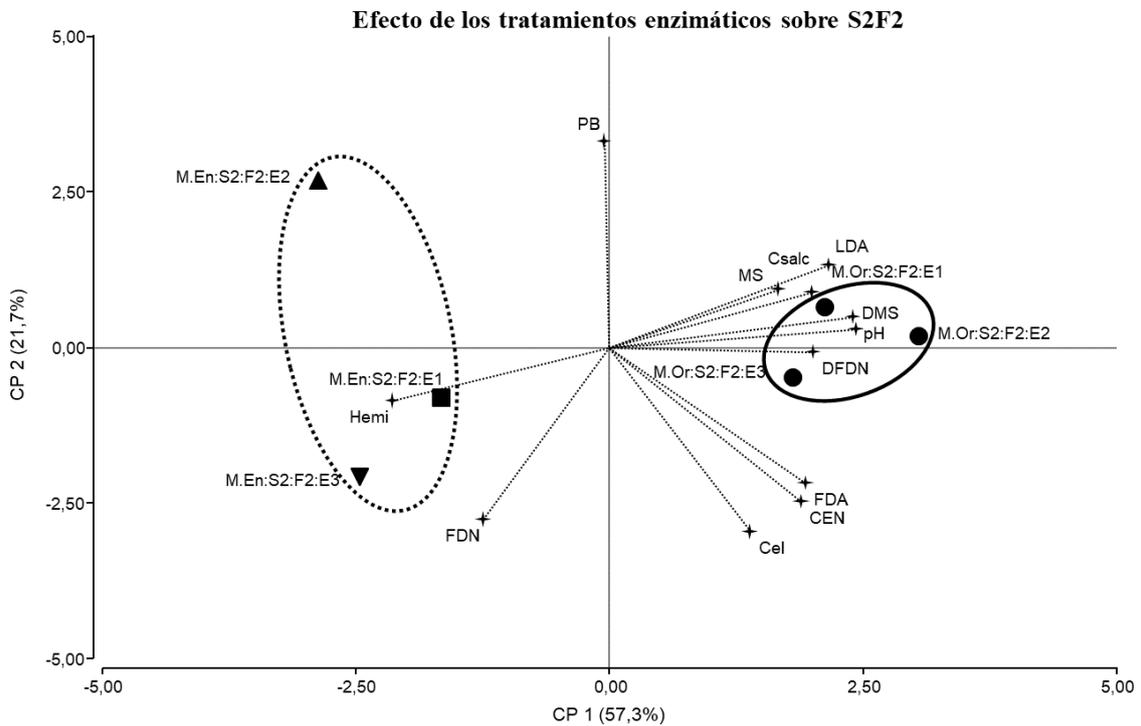
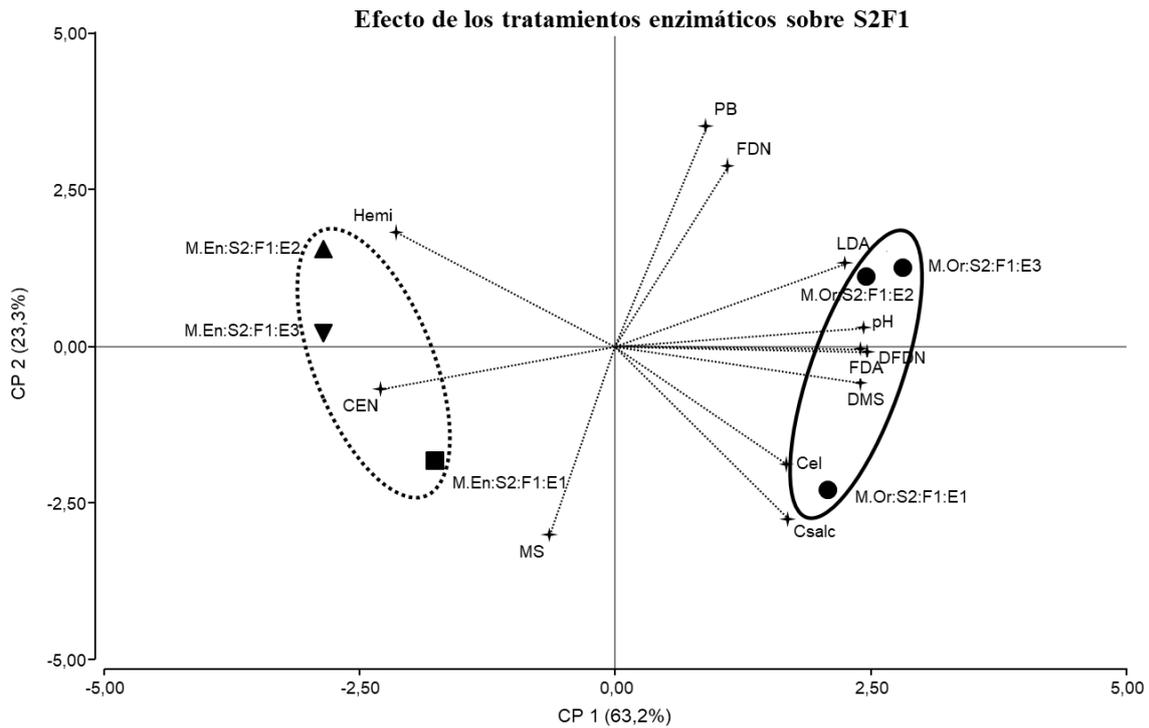


Figura 7. Análisis de componentes principales (APC) del efecto de la aplicación de enzimas exógenas sobre los materiales originales (círculos) de S2F1 arriba y S2F2 abajo. Proteasas (E1, cuadrado), Fibrolíticas (E2, triángulo), Control (triángulo invertido).

2.3.2.5. Evaluación del efecto de enzimas exógenas sobre la susceptibilidad a la digestión del forraje de planta entera de sorgo

El ensayo 2 tuvo como propósito analizar en condiciones estandarizadas (24 h) el efecto de las enzimas sobre la hidrólisis de ambos tipos de sorgo (S1 y S2) en estado F2 (por considerarse más refractario a la acción de las enzimas). El material original (T0) presentó mayor contenido de pared celular, y menor variación que los materiales tratados con enzimas (Figura 8). El tratamiento control (TC; material incubado solamente con agua destilada), presentó mayor residuo ($p=0,003$; Cuadro 6) que los materiales incubados con la proteasa (TP) y la enzima fibrolítica (TXC). Asimismo, los dos materiales tratados con enzimas fueron diferentes, ya que TP presentó mayor ($p=0,045$) contenido de pared celular que TXC (cuadro 6).

Cuadro 6. Residuos de los forrajes de planta entera de sorgo luego de ser incubados con enzimas exógenas.

Variable	Tratamientos ¹				SEM ²	Gl ³	P-valor	Contrastes		
	T0	TC	TP	TXC				T0 vs TC+TP+TXC	TC vs TP+TXC	TP vs TXC
Residuo, mg g ⁻¹ MS	647 ^a	606 ^b	577 ^b	543 ^c	11,6	27	<0,0001	<0,0001	0,003	0,045

¹ Tratamientos: T0 Materiales originales, TC tratamiento control, TP tratamiento con Proteasas, TXC tratamiento con Fibrolíticas.

² Error estándar de la media.

³ Grados de libertad.

Estos resultados se contraponen a lo hallado en el ensayo 1 donde no hubo diferencias entre los tratamientos enzimáticos. Consecuentemente, cabe preguntarse ¿Por qué las enzimas tuvieron efecto en el ensayo 2, pero no en el ensayo 1? Posiblemente las condiciones ambientales (pH y temperatura) durante el proceso de ensilado no fueron las óptimas para que las enzimas expresen su máxima actividad enzimática, mientras que en el ensayo 2 éstas fueron controladas (sobre todo temperatura y pH) que pudieron haber permitido una actividad más efectiva. Resultados anteriores (Colombatto y Beauchemin, 2003) hacen referencia a la influencia de las condiciones ambientales sobre la actividad enzimática.

La comparación entre los resultados de los ensayos 1 y 2 muestran que los “residuos” (Ensayo. 2) fueron mayores que los contenidos aFDN_{mo} (ensayo. 1), lo cual posiblemente se deba a que los residuos no pasaron por los 65 días de fermentación del Ensayo 1.

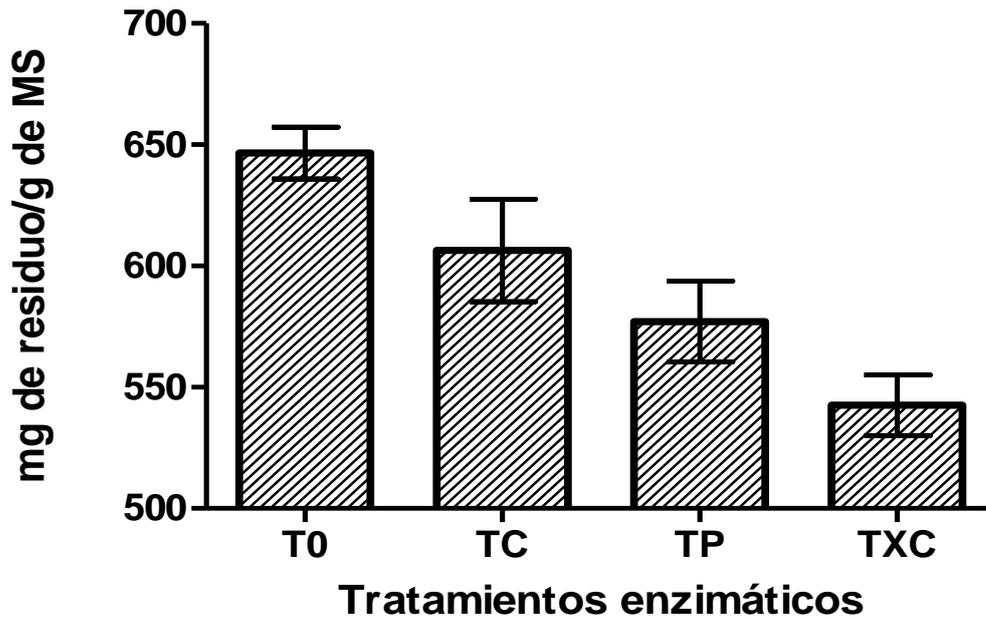


Figura 8. Efecto de enzimas exógenas sobre la susceptibilidad a la digestión del forraje de planta entera de los dos sorgos (S1 y S2). T0: material original, TC: tratamiento control, TP: tratamiento con enzima proteasa y TXC: tratamiento con enzimas fibrolíticas.

El análisis de los carbohidratos de la pared celular mostró escasos efectos asociados con los tratamientos con enzimas en el S1 y ninguno en S2. En S1, todos los materiales incubados (TC, TP y TXC) presentaron menores concentraciones de manosa que el material original (T0), lo que sugeriría una solubilización de estos compuestos desde la pared celular, posiblemente por efecto de las enzimas aplicadas o las propias de la planta (en TC), combinado con el calor (90°C) del tratamiento. Ambos tratamientos enzimáticos (TP y TXC) indujeron una reducción en la fracción de galactosa, sugiriendo que modificaron la composición de la pectina solubilizando parte de los galactanos, respecto al control (TC). Asimismo, la concentración de ramnosa en el material tratado con TXC fue superior a la del material tratado con TP, indicando un efecto diferencial del tratamiento enzimático TP sobre la fracción de pectina.

Cuadro 7. Composición de los monosacáridos (mg g⁻¹ de azúcares neutros totales) correspondientes a la digestión de los polisacáridos de los residuos.

Monosacáridos (mg g ⁻¹ azúcares totales)	Tratamientos ¹				SEM ²	Gr ³	p-valor	Contrastes ⁴		
	T0	TC	TP	TXC				Ct 1	Ct 2	Ct 3
S1										
Ramnosa	3,5	2,3	2,2	6,2	1,3	9	NS	NS	NS	0,05
Fucosa	5,1	2,7	0,2	6,1	3,8	9	NS	NS	NS	NS
Arabinosa	102,4	105,4	94,9	113,1	15,5	9	NS	NS	NS	NS
Xilosa	228,2	247,7	228,0	245,2	26,5	9	NS	NS	NS	NS
Xil/Ara	2,2	2,3	2,5	2,4	0,1	9	NS	NS	NS	NS
Manosa	9,4	5,9	6,6	5,7	1,2	9	NS	0,04	NS	NS
Galactosa	19,9	21,9	18,7	20,0	0,6	9	0,04	NS	0,01	NS
Glucosa	631,4	614,1	649,5	603,4	40,4	9	NS	NS	NS	NS
S2										
Ramnosa	3,9	3,7	5,5	3,8	0,9	9	NS	NS	NS	NS
Fucosa	0,8	1,7	8,0	0,4	3,4	9	NS	NS	NS	NS
Arabinosa	100,6	95,5	134,9	100,9	17,2	9	NS	NS	NS	NS
Xilosa	258,5	266,5	258,0	250,2	23,8	9	NS	NS	NS	NS
Xil/Ara	2,6	2,8	2,1	2,6	0,2	9	NS	NS	NS	NS
Manosa	11,5	11,3	11,2	9,2	1,3	9	NS	NS	NS	NS
Galactosa	22,2	19,6	26,4	19,1	3,3	9	NS	NS	NS	NS
Glucosa	602,5	601,6	555,7	616,3	37,1	9	NS	NS	NS	NS

¹ Tratamientos: T0 Materiales originales, TC tratamiento control, TP tratamiento con Proteasas, TXC tratamiento con Fibrolíticas.

² Error estándar de la media.

³ Grados de libertad.

⁴ Contrastes: *Contraste 1: T0 contra TC+TP+TXC, Contraste 2: TC contra TP+TXC, Contraste 3: TP contra TXC*

Los híbridos de sorgos utilizados en el ensayo fueron susceptibles de ser degradados por las enzimas, lo cual se evidenció por las diferencias significativas observadas en los residuos. Sin embargo, dichas enzimas no actuaron sobre ningún componente específico de la pared celular, sino que parecen haber actuado sobre la estructura general de la pared celular indiscriminadamente, habiendo resultado las pectinas, las más solubilizadas en el caso del S1.

2.4. CONCLUSIONES

En este capítulo se concluyó que la aplicación de enzimas exógenas fibrolíticas y proteasas (a las dosis evaluadas), no afectaron la composición química, la calidad nutricional y el perfil fermentativo del ensilaje de planta entera de sorgo.

El tipo de híbrido fue el factor con mayor gravitación sobre los parámetros evaluados dado que ambos sorgos difirieron en composición de las plantas (proporciones de hoja, tallo y panoja), lo que

determinó distintas composiciones iniciales (MOr), que también se manifestaron en los materiales ensilados de S1 y S2. El S1 presentó mayor altura, lo que hizo que su rendimiento sea mayor, con menor contenido de MS y de componentes fibrosos, pero mayor contenido de CSAIc. Esto último influyó en el proceso fermentativo e hizo que S1 tenga menor pH y mayor AT, o sea una mejor fermentación. El factor Fenología también tuvo efectos iniciales en la composición del MOr, sin embargo, varias de estas diferencias se perdieron durante el proceso de ensilado, como por ejemplo la DMS.

Con el ensayo 2 se llegó a la conclusión de que los materiales vegetales utilizados en el ensayo 1 fueron sensibles a la degradación por parte de las enzimas. Sin embargo, se debe prestar especial atención a las condiciones óptimas a la cual un complejo enzimático desarrolla su máxima actividad.

3. Capítulo 3: EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ENZIMA PROTEASA EN ENSILAJE DE GRANO HÚMEDO DE SORGO (GHS)

3.1. INTRODUCCIÓN

La aplicación de enzimas proteasas al material original de grano húmedo de maíz y sorgo antes del proceso de ensilado ha mostrado resultados inconsistentes (Cuadro 11, Apéndice). Kung *et al.* (2014) aplicaron una enzima proteasa a granos húmedos de maíz (**GHM**) previo al ensilaje y reportaron que el pH fue más bajo en los ensilajes tratados con la enzima, sin embargo, Windle *et al.* (2014) no observaron diferencias en el pH. En el trabajo de Kung *et al.* (2014) también se observó que en los ensilajes tratados con proteasas disminuyó el contenido de proteínas prolaminas, lo que sugiere que la actividad proteolítica es naturalmente limitada. Dicha proteólisis se evidenció por el aumento de la proteína soluble y el N-NH₃ en los ensilajes GHM tratados con la proteasa (Windle *et al.*, 2014 y Young *et al.*, 2012). Kung *et al.* (2014) afirmaron que la DMS aumentó con la aplicación de una proteasa. Mientras que Windle *et al.* (2014) y Young *et al.* (2012) reportaron un aumento en la digestibilidad *in vitro* del almidón (**DALM**) con una dosis de 2g/kg. Sin embargo, Colombatto *et al.* (2003c) reportaron que una enzima proteasa de *Bacillus licheniformis* no afectó la DALM.

3.1.1. Hipótesis

En este capítulo se hipotetizó que la aplicación de las enzimas proteasas contribuye con la degradación de estructuras del grano de sorgo ensilado al hidrolizar las proteínas típicas de la matriz del grano, aumentando la disponibilidad del almidón contenido en los gránulos. Por este motivo, se espera que el agregado de las proteasas aumente la tasa de degradabilidad y la cantidad de almidón y de materia seca degradada.

3.1.2. Objetivos

El objetivo general de este capítulo fue evaluar el efecto de una enzima proteasa sobre la fermentación y calidad nutricional de ensilaje de grano húmedo de sorgo.

Los objetivos específicos fueron:

1. Determinar el impacto de la aplicación de proteasa sobre la composición química del ensilaje de granos húmedos de sorgo (**GHS**).
2. Evaluar el efecto de aplicar una enzima proteasa sobre la calidad nutricional y cinética de degradación de ensilaje de GHS.
3. Describir el impacto de una enzima proteasa sobre la fermentación del ensilaje de GHS.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Tratamientos y diseño experimental

De las plantas del genotipo con alto contenido de panoja (S2) del capítulo 2 se cosecharon los granos con *c.a.* 40% de MS, para ser ensilados como granos húmedos. Para esto se cortaron las panojas en dicho estado, y se separaron los granos con una cosechadora estática (Pullman, Washington, Estados Unidos). Las muestras se pasaron por una moledora de granos (JF2D, Berlatto S.A., Buenos Aires, Argentina). Luego, el material molido fue mezclado con los tratamientos enzimáticos, proteasa alcalina (**PROT, E1**) N° IUB 3.4.21.62 a razón de 2g kg^{-1} de MF y agua (**CTRL, E3**) y se los ensiló en microsilos de PVC de 49 cm de largo y 110 mm de diámetro, a la misma densidad ($280\text{ kg de MS m}^{-3}$). Se tomaron muestras de los granos antes y después del proceso de ensilado (respectivamente **MOr** y **MEn**).

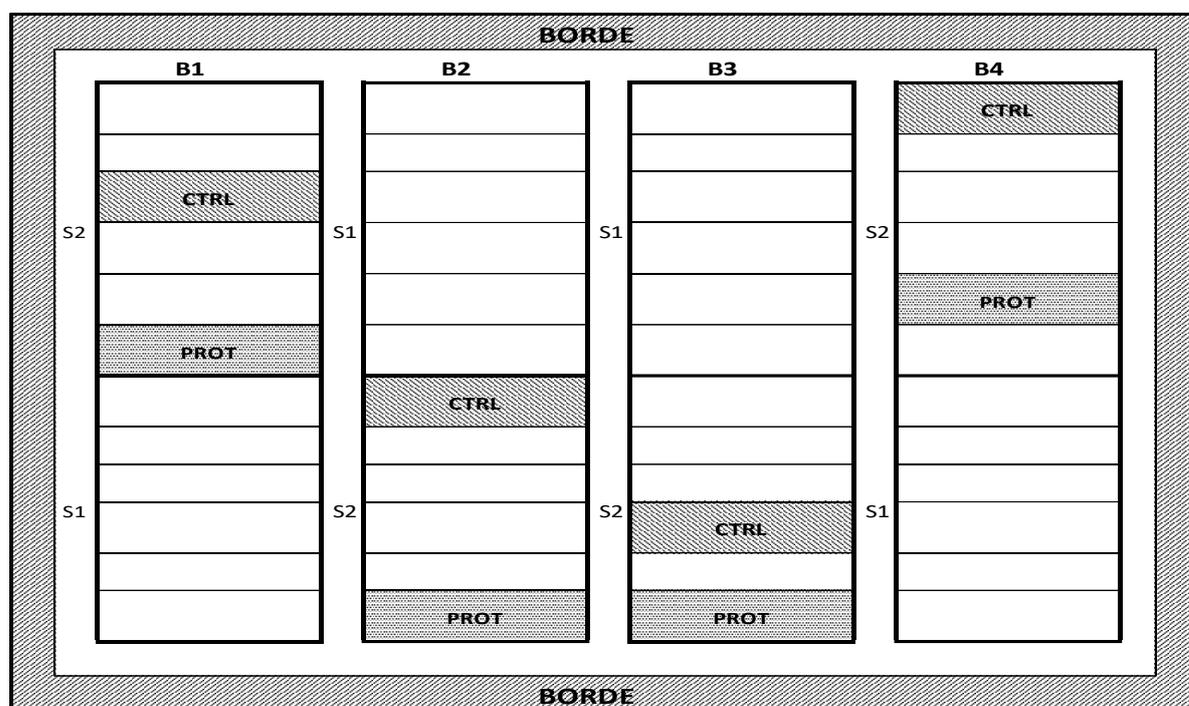


Figura 9. Disposición espacial de las subparcelas en el ensayo 2. Tratamientos enzimáticos con enzimas proteasas (PROT) y tratamiento control (CTRL), dispuestos en cuatro bloques (B1 a B4).

3.2.2. Análisis de Laboratorio

A las muestras del MOr se les realizó un análisis químico-nutricional en el que se determinó materia seca parcial (**MS65**) y total (**MS105**) utilizando estufas con circulación forzada de aire. Se determinó N total por la técnica de Kjeldahl, multiplicando luego por 6,25 para el cálculo del contenido de proteína bruta (**PB**). El contenido total de almidón (**ALM**) se midió con el kit enzimático Megazyme. También se calculó el contenido de carbohidratos solubles en alcohol (**CSA_{lc}**) a través

del método descrito por McDonald y Henderson (1964) el cual es una adaptación del método originalmente propuesto por Faichney y With (1994). Se determinó la cinética de degradación de la MS a través de la técnica de **PG**, el medio de incubación con el que se desarrolló la técnica es equivalente al que existe en el rumen, carbonato/bicarbonato que al estabilizarse en condiciones de anaerobiosis con una fase gaseosa tiene un pH de 6,8 (Theodorou *et al*, 1994). Se evaluó el perfil fermentativo a través de las siguientes determinaciones: pH, contenido de N amoniacal (**N-NH₃**), y perfil de ácidos grasos volátiles (**AGVs**) por cromatografía gaseosa. Se evaluó CB y AT de acuerdo al método propuesto por Playne y McDonald (1966). Los análisis se realizaron en los laboratorios de la Cátedra de Nutrición Animal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

3.2.3. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados de acuerdo a un diseño en bloques completos aleatorizados. Siendo el modelo:

$$Y_{ij}: \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} : es la respuesta correspondiente a los cuatro bloques y dos complejos enzimáticos.

μ : es el promedio general.

τ_i : es el efecto de los dos complejos enzimáticos.

β_j : es el efecto de los cuatro bloques.

ε_{ij} : es el error aleatorio de los cuatro bloques y los dos complejos enzimáticos.

ε_{ij} se distribuyen independientemente.

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico SAS. Los resultados de la aplicación de las enzimas se compararon contra el Control utilizando el test de Dunnett. Para todos los casos las diferencias se declararon significativas cuando $P \leq 0,05$.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Caracterización del material original

Los granos de sorgo cosechados para ensilar pertenecían al híbrido con alta proporción de panoja en estadio maduro (*c.a.* 40% de humedad, cuadro 8). El contenido de MS fue de 566 g kg⁻¹MF, valor más bajo a los utilizados por Kung *et al.* (2014) y Hoffman *et al.* (2011), quienes en utilizaron materiales con 728 y 744 g MS kg⁻¹MF respectivamente.

Cuadro 8. Composición química, digestibilidad, cinética de degradación y variables influyentes en la fermentación del material original de grano húmedo de sorgo.

Variable	S2F2 ¹	
	Media	SEM ²
Composición Química,		
Materia seca, g kg ⁻¹ MH	566	1,5
Cenizas, g kg ⁻¹ MS	19	0,4
Proteína bruta, g kg ⁻¹ MS	104	1,2
Carbohidratos Sol. Alcohol, g kg ⁻¹ MS	237	8,8
Almidón, g kg ⁻¹ MS	660	17,3
Digestibilidad <i>in vitro</i>		
DMS, g/kg MS	740	5,2
DMO, g/kg MO	747	4,9
Cinética de degradación		
a, ml / g MS	-43,9	1,5
b, ml / g MS	347,3	8,0
c, /h	0,041	0,0007
a, ml/g MO	-18,6	7,3
b, ml/g MO	295,3	24,0
c, /h	0,041	0,003
TMax, ml/h	12,7	0,2
tTMax, h	10,5	0,001
Variables influyentes en la fermentación		
pH inicial	6,3	0,02
CB, (meq kg ⁻¹ MS)	42	1

¹ Sorgo con alta proporción de panoja en estado fenológico maduro.

² Error estándar de la media.

La DMS y DMO del material previo al proceso de ensilado fue 740 y 747 g kg⁻¹ MS respectivamente. Otros autores trabajando con GHS (Aguerre *et al.*, 2015) reportaron valores de 850 gkg⁻¹MS. El pH inicial de los granos de sorgo fue de 6,3 y la CB de 42 meqkg⁻¹MS.

3.3.2. Composición química y nutricional del ensilaje de grano húmedo de sorgo tratado con enzimas proteasas

3.3.2.1. Efecto de la aplicación de enzimas: PROT contra CTRL

El tratamiento enzimático no tuvo efecto significativo sobre la composición química del ensilaje de GHS (objetivo específico 1, cuadro 9). El contenido de MS fue similar entre PROT y CTRL, al igual que lo reportado por Da Silva *et al.* (2010) y Kung *et al.* (2014) en ensilaje de GHM. En los trabajos realizados en GHS, los valores de MS reportados fueron de 689 g MS kg⁻¹ MF (Aguerre *et al.*, 2015). La aplicación de PROT tampoco modificó significativamente el contenido de PB ni de

CEN, resultado similar a lo hallado por Kung *et al.* (1993), Da Silva *et al.* (2010) y Kung *et al.* (2014) en ensilaje de GHM. Tal lo esperado, el contenido de CSAIc fue mayor en el material original que en el ensilaje. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los valores de CSAIc de PROT y CTRL, a pesar de que numéricamente PROT presentó mayor contenido de CSAIc. El contenido de ALM no fue afectado por la aplicación de enzimas exógenas proteasas, además fue similar al contenido de ALM en el MOr. Valores similares fueron hallados por Aguerre *et al.* (2015), quienes reconstituyeron (24 h) granos de sorgo y encontraron valores de ALM de 619 g kg⁻¹ MS, mientras que en GHS ensilados por 21 días encontraron 673 g ALM kg⁻¹ MS.

Se evaluó la calidad nutricional de los ensilajes de GHS tratados con enzimas proteasas (objetivo específico 2) y se observó que PROT no modificó la DMS y la DMO, y además fue similar a la DMS del MOr. Por lo que, ni el proceso de ensilado, ni la aplicación de una enzima exógena, modificaron la DMS. No se encontraron trabajos que hayan realizado el mismo análisis tanto en GHS como en GHM, sin embargo, Aguerre *et al.* (2015) evaluaron la degradabilidad ruminal a las 16 horas y observaron que el ensilaje de GHS presentó una degradabilidad de 689 gkg⁻¹MS, valor similar al hallado en este trabajo. Estos resultados se contraponen a lo hallado por Kung *et al.* (2014), quienes reportaron que la aplicación de una proteasa exógena al ensilaje de GHM aumentó la digestibilidad del ALM. El efecto significativo encontrado con Kung *et al.* (2014) posiblemente se debe al contenido de humedad que tenía el grano cuando fue cosechado (27%).

Según se observó en la curva producida por la cinética de degradación del ensilaje de GHS (Figura 10), el ensilaje tratado con enzimas proteasas (PROT), el ensilaje no tratado (CTRL) y el MOr tuvieron el mismo patrón, sin embargo, MOr produjo mayor cantidad de gas final. Los datos hallados son similares a los reportados por Cabral Filho *et al.* (2005) quienes encontraron valores de producción de gas acumulado a las 24 horas de 174,5 ml, mientras que el presente trabajo los valores de PGA a las 24 horas fueron de 184 ml y 183 ml para los ensilajes de GHS tratados (PROT) y no tratados (CTRL) respectivamente (figura 10).

Cuadro 9. Composición química, digestibilidad, cinética de degradación y perfil fermentativo del ensilaje de grano húmedo de sorgo tratado con enzimas proteasas (PROT).

Variable	PROT	CTRL	SEM ¹	gl ²	p-valor
Composición Química					
Materia Seca , g/kg MH	556	556	2,1	7	NS
Cenizas , g/kg MS	21	21	0,2	7	NS
Proteína Bruta , g/kg MS	107	105	0,5	7	NS
Carbohidratos Solubles Alc , g/kg MS	100	82	37,8	7	NS
Almidón , g/kg MS	722	649	28,3	7	NS

Variable	PROT	CTRL	SEM ¹	gl ²	p-valor
Digestibilidad <i>in vitro</i>					
Digestibilidad Materia Seca , g/kg MS	707	759	26,5	7	NS
Digestibilidad Materia Orgánica , g/kg MO	714	765	25,6	7	NS
Cinética de degradación					
a , ml / g MS	-36,3	-44,3	8,9	7	NS
b , ml / g MS	295,7	311,3	29,3	7	NS
c , /h	0,045	0,043	0,002	7	NS
a , ml/g MO	-31,3	-13,4	6,1	7	NS
b , ml/g MO	356,8	273,3	26,6	7	NS
c , /h	0,03	0,05	0,004	7	NS
Tasa Máxima de Producción de Gas , ml/h	13,9	12,5	0,3	7	NS
Tiempo a Tasa Máxima de Prod. Gas , h	10,5	12,0	0,7	7	NS
Perfil fermentativo					
pH	5,2	5,3	0,1	7	NS
Acidez Total, (meq/kg MS)	108	91	4,6	7	NS
N-NH ₃ , %NT	4,9	5,1	0,3	7	NS

¹ Error estándar de la media.

² Grados de libertad.

Al realizarse el análisis de la tasa horaria de producción de gas (**THPG**) se observó que al inicio la THPG fue baja para ambos ensilajes (Figura 11), luego de la hora 4 la tasa aumentó rápidamente hasta alcanzar una TMax de 13,9 y 12,5 ml gasgMShora⁻¹ para PROT y CTRL respectivamente. Ambos grupos llegan a la TMax en tiempos similares (**tTMax**), a las 10,5 horas en el caso de PROT y a las 12 horas en el caso de CTRL. Luego de este pico, la THPG comenzó a caer lentamente, para luego de las 27 horas descender hasta valores similares a los iniciales. Aguerre *et al.* (2015) reportaron que la TMax de los granos de sorgo reconstituidos por 24 horas fue de 17,9 ml.h⁻¹, mientras que la de grano de sorgo ensilado por 21 días fue de 19,4 ml.h⁻¹. Este último trabajo demuestra que el mismo proceso de ensilado mejoró la tasa de degradación del grano de sorgo, situación contraria a lo reportado en el presente trabajo. Además, en el trabajo de Aguerre *et al.* (2015) el tiempo en el que ocurrió la TMax disminuyó (p <0,01) con el proceso de ensilado, de 5,6 h que presentó el sorgo reconstituido, a 4,9 h que presentó el ensilaje de GHS. En el presente trabajo el parámetro tTMax tampoco varió entre MOr y MEn, ni entre PROT y CTRL (cuadro 8 y 9. Figura 11).

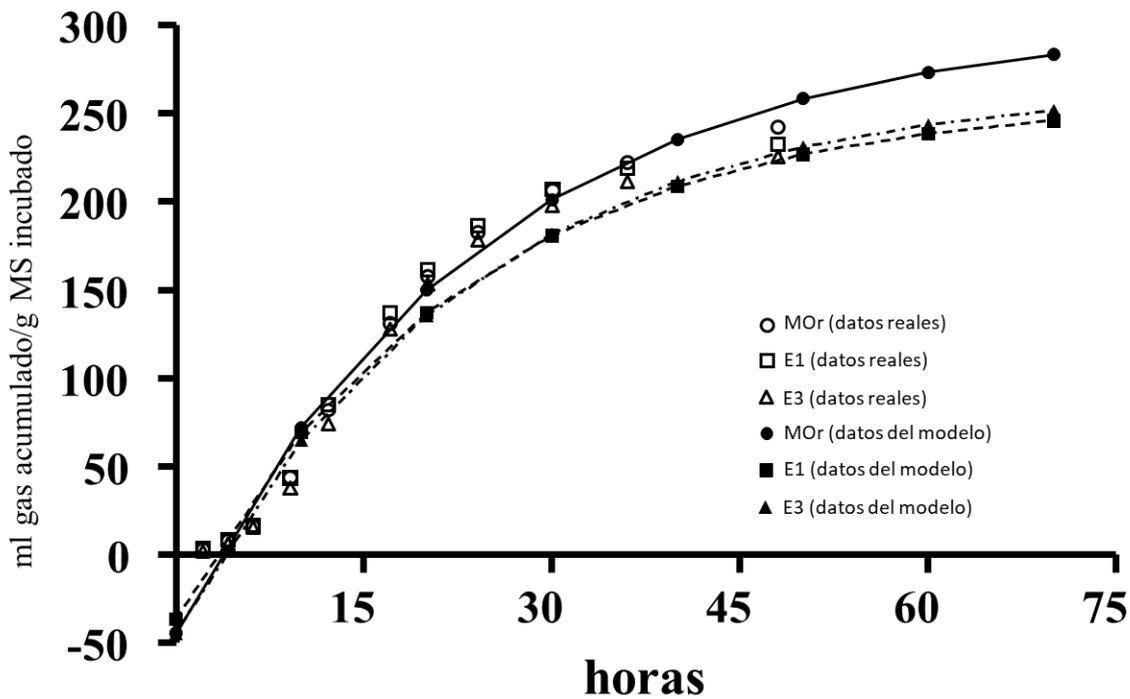


Figura 10. Curva de producción de gas acumulado (PGA). Datos reales (figuras blancas) y datos de acuerdo con el modelo utilizado ($y = a + b(1 - e^{-ct})$, figuras negras) para los ensilajes de grano húmedo de sorgo (GHS). MOr (material original), E1 (ensilaje tratado con proteasas) y E3 (ensilaje tratamiento control).

Se realizó una descripción del impacto de la aplicación de una proteasa en el perfil fermentativo de ensilaje GHS (objetivo específico 3). El pH descendió durante el proceso de ensilado. Sin embargo, éste no se diferenció entre tratamientos. Los valores de pH fueron mayores a los encontrados por Kung *et al.* (2014) en ensilaje de GHM, quienes reportaron que el agregado de una enzima exógena proteasa disminuyó el pH a 3,93 respecto al control que tuvo un pH de 4,12. En el mismo sentido, Da Silva *et al.* (2010) encontraron que la aplicación de un complejo enzimático redujo el pH de 3,85 a 3,78 en ensilaje de GHM. En el presente trabajo tampoco se observaron diferencias en la acidez total (AT) y en el contenido de N amoniacal (N-NH₃).

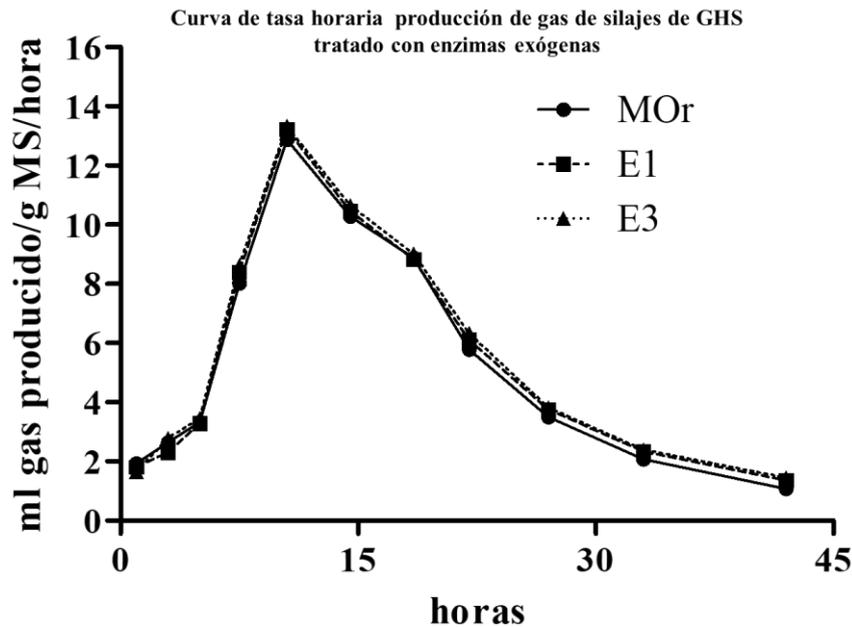


Figura 11. Curva de tasa horaria de producción de gas de los silajes de grano húmedo de sorgo (GHS) tratados con enzimas exógenas: material original (MOr, círculos), Proteasas (E1, cuadrados) y Control (E3, triángulos).

3.3.2.2. Análisis de componentes principales (ACP) del material original y ensilaje de GHS tratado con PROT

En forma similar a lo sucedido en el capítulo anterior con el ensilaje de planta entera, el cambio más importante en la composición química del material vegetal fue dado por el proceso de ensilado y no por la aplicación de la enzima (figura 12), que se detalla en la posición en el primer eje del ordenamiento, que es el que explica la mayor proporción de la variación (58,9%). Se observó que la CP1 se relacionó positivamente con el pH, contenido de MS y CSAIc y se relacionó negativamente con el contenido de PB y CEN. La CP2 tuvo relación positiva con el contenido de ALM y se relacionó negativamente con la DMS y DMO (cuadro 10).

Se observó que entre la CP1 y CP2 se explicó el 99% de la variación del total de los datos analizados (figura 12). Los materiales originales fueron más homogéneos, evidenciado por la dispersión de los puntos (círculos) en el eje del ordenamiento (Figura 12). La CP1 separó los materiales originales (círculos en la Figura 12) hacia la derecha y los ensilajes tratados con enzimas (cuadrado y triángulo en la figura 12) hacia la izquierda. Los materiales originales tuvieron mayor contenido de MS y CSAIc que los respectivos ensilajes, además de haber presentado valores de pH más elevados. La CP2 separó a los dos ensilajes tratados con enzimas (PROT vs CTRL), teniendo el

ensilaje PROT (cuadrado en la figura 12) mayor contenido de ALM y de PB que el ensilaje CTRL; sin embargo, esta diferencia no fue significativa en el ANOVA.

Cuadro 10. Correlación de las variables originales con los componentes principales (CP1 y CP2) de los ensilajes de grano húmedo de sorgo (GHS) tratados con enzimas proteasas exógenas.

Correlaciones con las variables originales		
Variables	CP1*	CP2**
pH	0,94	0,33
Materia Seca (%)	0,89	0,44
Carbohidratos Solubles Alc. (%)	0,88	0,48
Digestibilidad Mat. Org. (%)	0,58	-0,81
Digestibilidad Mt. Seca (%)	0,56	-0,82
Almidón (%)	-0,19	0,97
Proteína Bruta (%)	-0,88	0,46
Cenizas (%)	-0,89	-0,45

*CP1: Componente principal 1

**CP2: Componente principal 2

El ensilaje CTRL (triangulo, figura 12) tuvo mayores valores de DMS y DMO, respecto al ensilaje PROT, sin embargo, esta diferencia tampoco fue significativa en el ANOVA.

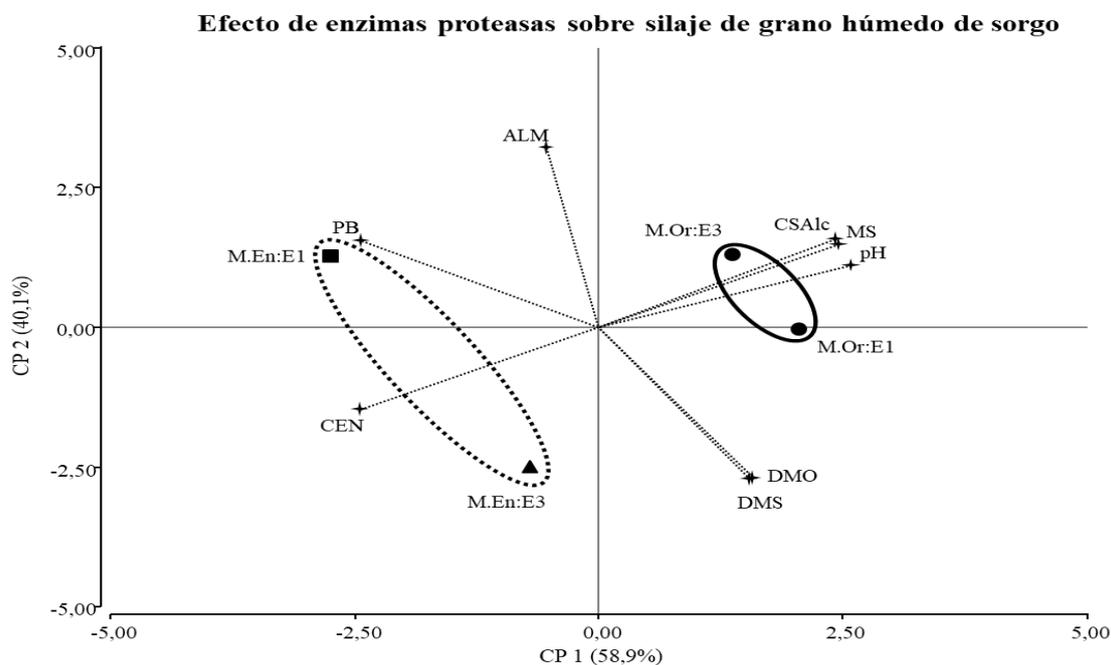


Figura 12. Análisis de componentes principales (PCA) del efecto de la aplicación de enzimas exógenas sobre granos húmedo de sorgo. Material original: círculos y línea continua. Ensilajes tratados con enzimas Proteasas (E1, cuadrado), Control (E3, triangulo) y material original (MOr, círculos).

3.4. CONCLUSIONES

En este capítulo se evaluó la hipótesis de que la aplicación de la enzima proteasa al hidrolizar las proteínas típicas de la matriz del grano contribuye con la degradación del grano de sorgo ensilado, aumentando la disponibilidad del almidón contenido en los gránulos. Sin embargo, los resultados obtenidos no hallaron ningún efecto sobre la calidad nutricional y fermentativa de ensilaje de grano húmedo de sorgo, por lo que la hipótesis resultó refutada.

El hecho de no haber encontrado efecto de la proteasa sobre el GHS, puede deberse a que la matriz proteica todavía no estaba completamente formada (Hale, 1973). Por lo que la misma se habría solubilizado por la proteólisis ocurrida durante el mismo proceso fermentativo y por lo tanto el acceso al almidón por las bacterias fue igual para todos. Baron *et al.* (1986) hallaron que a medida que el nivel de humedad del ensilaje se incrementa, aumenta la tasa y extensión de fermentación y proteólisis en el grano ensilado.

4. Capítulo 4: CONCLUSIONES

4.1. CONCLUSIONES GENERALES

El análisis de la bibliografía mostró que la aplicación de enzimas exógenas (fibrolíticas y proteasas) históricamente ha mostrado resultados inconsistentes (cuadro 10 y 11, Apéndice). A través de este trabajo se concluyó que las enzimas exógenas no contribuyeron con la degradación de las estructuras vegetales como se había señalado en la hipótesis general.

- a. Particularmente las enzimas fibrolíticas no degradaron los carbohidratos estructurales de la fracción vegetativa de la planta de sorgo, por lo cual su aplicación:
 - No aumentó el contenido de carbohidratos solubles ni mejoró el perfil fermentativo durante el ensilado.
 - No tuvo mayor efecto en el híbrido con mayor contenido de fracción vegetativa.
 - No demostró mayor efecto en estadios fenológicos avanzados.
- b. Por su parte, la aplicación de proteasas no hidrolizó las del grano de sorgo y no aumentó la disponibilidad de almidón, por lo que:
 - La respuesta no fue mayor en el híbrido con mayor proporción de panoja.
 - El efecto no fue más marcado en estadios fenológicos avanzados.

4.2. IMPLICANCIAS DEL TRABAJO

Los resultados hallados en esta tesis son de importancia debido a que es una tecnología emergente. Este trabajo es uno de los pocos trabajos realizados sobre la temática en ensilaje de planta entera de sorgo, siendo más escasos aún los trabajos de aplicación de enzimas en ensilaje de GHS. Como se dijo en el primer capítulo, con la aplicación de enzimas exógenas no siempre se obtienen respuestas positivas, y dado el costo de esta tecnología, la incertidumbre de la respuesta es una limitación importante. Se necesita mejorar la comprensión del modo de acción y las dosis requeridas, garantizando así un uso eficaz de estos aditivos.

4.3. PERSPECTIVAS PARA FUTURAS INVESTIGACIONES

Esta tesis deja preguntas abiertas relacionadas con cuál sería el ambiente (pH y temperatura) y las dosis óptimas en los ensilajes para lograr la máxima actividad de las enzimas exógenas aplicadas. Evaluando, además, como la aplicación de enzimas exógenas afecta a cada uno de los componentes de la planta, y el efecto de otras características del sorgo (azucarados, nervadura marrón, taninos condensados, etc.).

Bibliografía

- Abdalhadi, L.O. and Tricarico, J.M. 2009. Effects of stage of maturity and microbial inoculation at harvest on nutritive quality and degradability of grain sorghum whole-plant and head-chop silages. *Anim Feed Sci Technol.* 152: 175 - 185.
- Adesogan, A. T., Kim, S., Arriola, G., Dean, D. B. and Staples, R. 2007. Strategic Addition of Dietary Fibrolytic Enzymes for Improved Performance of Lactating Dairy Cows. Florida Ruminant Nutrition Symposium. January 30 - 31 2007. Gainesville, FL.
- Adogla-Bessa, T., Owen, E. and Adesogan A.T. 1999. Ensiling of whole crop wheat with cellulase-hemicellulase based enzymes 3. Comparing effects of urea or enzyme treatment on forage composition and stability. *Anim Feed Sci Technol.* 82: 51 - 61.
- Aguerre, M., Cajarville, C. and Repetto, J.L. 2015. Impact of water addition, germination, ensiling and their association on sorghum grain nutritive value. *Anim Feed Sci Technol.* 205: 75 - 81.
- Álvarez, G., Pinos-Rodríguez, J. M., Herrera, J. G., García, J. C., González, S. S. y Bárcena, R. 2009. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal digestibility in steers fed high fiber rations. *Livest Sci.* 121: 150 - 154.
- Andrade, J.B. y Carvalho, D.D. 1992. Estádio de maturação e qualidade da silagem de sorgo. II – Digestibilidade e consumo da silagem. *Boletim da Industria Animal, Nova Odessa* 49, Nº2, 101 – 106.
- AOAC International (formerly the Association of Official Analytical Chemists). *Official Methods of Analysis.* Arlington, VA: AOAC International, 1990. Nro. 942.05.
- Araújo, V.L., Rodrigues, N.M., Gonçalves, L.C., Rodrigues, J.A.S., Borges, A.L.C.C. y Saliba, E.O.S. 2007. Qualidade das silagens de três híbridos de sorgo ensilados em cinco diferentes estádios de maturação. *Arq Bras Med Vet Zoo.* 59 (1): 168 - 174.
- Baron, V.S., Stevenson, K.R. and Buchanan-Smith, J.G. 1986. Proteolysis and fermentation of grain-corn ensiled at several moisture levels and under several simulated storage methods. *Can J Anim Sci.* 66: 451 - 461.
- Beauchemin, K. A., and L. Holtshausen. 2011. Developments in enzyme usage in ruminants. In: M. R. Bedford and G. G. Partridge, editors. *Enzymes in farm animal nutrition.* 2nd ed. CAB International, Bodmin, UK. p. 206 - 230.
- Beauchemin, K. A., Colombatto, D., Morgavi, D. P. and Yang., W. Z. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J Anim Sci.* 81 (2): E37 - E47.
- Black, J.R., Ely, L.O., McCullough, M.E. and Sudweeks, E.M. 1980. Effect of stage of maturity and silage additives upon the yield of gross and digestible energy in sorghum silage. *J Anim Sci.* 50: 617 - 624.
- Bustos Vazquez, Z.G., Gomez Aldapa, C.A., Tellez Luis, S.J., Jonguitd Pratt, L.E., Trejo Ramírez, P.M., Ochoa Martínez, A. y Castro Rosas, J. 2010. Caracterización del almidón de dos variedades de sorgo del estado de Tamaulipas. XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Mayo 2010. Guanajuato, México.
- Cabral Filho, L.S., Abdalla, A.L., Bueno, I.C.S., Nozella, E.F. y Rodrigues, J.A.S. 2005. Ruminal fermentation and degradability of sorghum cultivar whole crop, and grains, using an in vitro gas production technique. *Anim Feed Sci Technol.* 123 -124: 329 - 339.
- Cabral Filho, L.S., Valadares Filho, S.C., Detmann, E., Zervoudakis, T., Pereira, O.G. y Veloso, R.G. 2003. Composição químico-bromatológica, produção de gás, digestibilidade in vitro da matéria seca e NDT estimado da silagem de sorgo com diferentes proporções de panícula. *Rev Bras Zootecn.* 32: 1250 - 1258.
- CACF, 2016. <http://www.ensiladores.com.ar/>. Fecha de la última actualización: 15/02/2016. Fecha de acceso: 05/03/2016.
- Carvalho, D.D., Andrade, J.B. y Biondi, P. 1992. Estádio da maturação na produção e qualidade da silagem de sorgo. 1. Produção do material seca e da proteína bruta. *Bol Ind Anim.* 49 (2): 91 - 99.
- Chen, J., Strokes, M.R. and Wallace, C.R. 1994. Effects of enzyme-inoculant systems on preservation and nutritive value of haycrop and corn silage. *J Dairy Sci.* 77: 501 - 512.
- Colombatto, D. and Beauchemin, K. 2003. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. *Can J Anim Sci.* 83: 559 - 568.
- Colombatto, D., & Beauchemin, K. 2009. A protease additive increases fermentation of alfalfa diets by mixed ruminal microorganisms in vitro. *J Anim Sci.* 87 (3): 1097 - 1105.

- Colombatto, D., Hervás, G., Yang, W.Z. and Beauchemin, K.A. 2003c. Effects of enzyme supplementation of a total mix ration on microbial fermentation in continuous culture, maintained at high and low pH. *J Anim Sci.* 81: 2617 - 2627.
- Colombatto, D., Morgavi, D. P., Furtado, A. F., and Beauchemin, K. A. 2003b. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: Relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation. *J Anim Sci.* 81: 2628 - 2638.
- Colombatto, D., Mould, F. L., Bhat, M. K., and Owen, E. 2003a. Use of fibrolytic enzymes to improve the nutritive value of ruminant diets. A biochemical and in vitro rumen degradation assessment. *Anim Feed Sci Technol.* 107: 201 - 209.
- Colombatto, D., Mould, F. L., Bhat, M. K., Morgavi, D. P., Beauchemin, K. A. and Owen, E. 2003b. Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentation of pure cellulose and xylan by mixed ruminal microorganisms in vitro. *J Anim Sci.* 81: 1040 - 1050.
- Colombatto, D., Mould, F. L., Bhat, M. K., Phipps, R. H., and Owen, E. 2004a. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage. I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level. *Anim Feed Sci Technol.* 111: 111 - 128.
- Colombatto, D., Mould, F. L., Bhat, M. K., Phipps, R. H., and Owen, E. 2004b. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage. II. Effects on rate of acidification, fibre degradation during ensiling and rumen fermentation. *Anim Feed Sci Technol.* 111: 129 - 143.
- Cummins, D.G. 1981. Yield and quality changes with maturity of silage-type sorghum fodder. *Agron J.* 73: 988 - 990.
- Da Silva, J.M., Paiva Carnauba, J., De Oliveira Silva, I., Guimaraes Tavares de Andrade, D.E., Carvalho de Miranda, E e Peixoto da Rocha Amorim, E. 2010. Influencia de inoculante bacteriano-enzimatico sobre a microbiota e qualidade nutricional de silagens de grãos úmidos de milho. *Ci Anim Bras Goiania* 11: 62 - 72.
- Danley, M.M. and Vetter, R.L. 1973. Changes in carbohydrate and nitrogen fractions and digestibility of forages: maturity and ensiling. *J Anim Sci* 37 (4): 994 - 999.
- Davies, D.R., Merry, R.J., Williams, A.P., Bakewell, E.L., Leeman, D.K. and Tweed J.K.S. 1998. Proteolysis during ensiling of forages varying in soluble sugar content. *J Dairy Sci.* 81: 444 - 453.
- De León, M y Giménez, R. 2008. Efecto del contenido de grano y del gen BMR en sorgos para silaje. *Rev Argent Prod Anim.* 28 (1): 349 - 543.
- Dean, D. B., Adesogan, a T., Krueger, N., and Littell, R. C. 2005. Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, aerobic stability, and digestibility of bermudagrass silage. *J Dairy Sci.* 88: 994 - 1003.
- Elwakeel, E. A, Titgemeyer, E. C., Johnson, B. J., Armendariz, C. K., and Shirley, J. E. 2007. Fibrolytic enzymes to increase the nutritive value of dairy feedstuffs. *J Dairy Sci.* 90: 5226 - 36.
- Esmail, S.H.M., Bolsen, K.K., Pfaff, F. 1991. Maturity effects on chemical composition, silage fermentation and digestibility of whole plant grain sorghum and soya-bean silage fed to beef cattle. *Anim Feed Sci Technol.* 33: 79 - 85.
- Eun, J.S. and Beauchemin, K.A. 2005. Effects of a proteolytic feed enzyme on intake, digestion, ruminal fermentation, and milk production. *J Dairy Sci.* 88: 2140 - 2153.
- Eun, J.-S., and Beauchemin, K. A. 2007. Enhancing in vitro degradation of alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. *J Dairy Sci.* 90: 2839 - 2851.
- Eun, J.-S., and Beauchemin, K. A. 2008. Relationship between enzymic activities and in vitro degradation of alfalfa hay and corn silage. *Anim Feed Sci Technol.* 145: 53 - 67.
- Faichney, G.F. y White, G.A. 1994. Methods for the analysis of feeds eaten by ruminants. CSIRO. Australia. ADSRI – Jan 1988.
- Faria Júnior, W.G., Gonçalves, L.C., Ribeiro Júnior, G.O., Carvalho, W.T.V., Maurício, R.M., Rodrigues, J.A.S., Faria, W.G., Saliba, E.O.S., Rodrigues, N.M. and Borges, A.L.C.C. 2011. Effect of grain maturity stage on the quality of sorghum BRS-610 silages. *Arq Bras Med Vet Zoo.* 63 (5): 1215 - 1223.
- Fernandes Perazzo, A., Pinto de Carvalho, G.G., Santos, E.M., Araujo Pinho, R.M., Sena Campos, F., Oliveira Macedo, C.H., Gomes Azevedo, J.A. y Tabosa, J.N. 2014. Agronomic evaluation of 32 sorghum cultivars in the Brazilian semi-arid region. *Rev Bras Zootec.* 43 (5): 232 - 237.
- Gallardo, I., Bárcena, R., Pinos-Rodriguez, J.M., Cobos, M., Carreón, L. y Ortega, M.E. 2010. Influence of exogenous fibrolytic enzymes on in vitro and in sacco degradation of forages for ruminants. *Ital J Anim Sci.* 9 (8): 34 – 38.
- Goering, H. K. and Van Soest, P. J. 1970. Forage fiber analyses. *Agric. Handbook No 379.* ARS, USDA.

- Gul, I., Demirel, R., Kilicalp, N., Sumeri, M. and Kilic, H. 2008. Effect of crop maturity stages on yield, silage chemical composition and in vivo digestibilities of the maize, sorghum and sorghum-sudangrass hybrids grown in semi-arid conditions. *J Anim Vet Adv.* 7 (8): 1021 - 1028.
- Hale, W.H. 1973. Influence of processing on the utilization of grains (starch) by ruminants. *J Anim Sci.* 37: 1075 - 1080.
- Hart, S.P. 1990. Effects of altering the grain content of sorghum silage on its nutritive value. *J Anim Sci.* 68 (11): 3832 - 3842.
- Hassan Khan; S., Azim, A., Sarwar, M. and Ghafar Khan, A. 2011. Effect of maturity in comparative nutritive value and fermentation characteristics of maize, sorghum and millet silages. *Pak J Bot.* 43 (6): 2967 - 2970.
- Heron, S.J.E., Edwards, R.A. and McDonald, P. 1986. Changes in the nitrogenous components of gamma-irradiated and inoculated ensiled ryegrass. *J Sci Food Agric.* 37: 979 - 985.
- Hoseney, R.C., Davis, A.B., and Herbers, L.H. 1974. Pericarp and endosperm structure of sorghum grain shown by scanning electron microscopy. *Cereal Chem.* 51: 552 - 558.
- Hristov, A.N., T.A. McAllister and K.J. Cheng. 1998. Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharide-degrading enzymes on rumen fermentation and nutrient digestibility. *J Anim Sci.* 76: 3146 - 3156.
- Hunt, C.W., Kezar, W., Hinman, D.D., Comes, J.J., Loesche, J.A., Moen, T. 1993. Effects of hybrid and ensiling with and without microbial inoculant on the nutritional characteristics of whole-plant corn. *J Anim Sci.* 71 (1): 38 - 43.
- Isaksen, M.F., Cowieson, A.J. and Kragh, K.M. 2011. Starch- and Protein-degrading Enzymes: Biochemistry, Enzymology and Characteristics Relevant to Animal Feed Use. In Bradford, M.R. and Partridge, G.G. *Enzymes in farm animal nutrition* 2nd edition. Wallingford, UK: 85 - 95.
- Johnson, R.R.; De Faria, V.P. and McClure, K.E. 1971. Effects of maturity on chemical composition and digestibility of bird resistant sorghum plants when fed to sheep as silage. *J. Anim. Sci.* 33: 1102 - 1109.
- Kemble, A.R. 1956. Studies on the nitrogen metabolism of the ensiled process. *J Sci Food Agric.* 7: 125 - 130.
- Kung, L., Chen, J.H. and Kreck, E.M. 1993. Effect of microbial inoculants on the nutritive value of corn silage for lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 76: 3763 - 3770.
- Kung, L., Treacher, R. J., Nauman, G. a, Smagala, a M., Endres, K. M., & Cohen, M. A. 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *J Dairy Sci.* 83: 115 - 22.
- Kung, L., Windle, M. C., & Walker, N. 2014. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high-moisture corn. *J Dairy Sci.* 97: 1707 - 1712.
- Lundén Pettersson, K.L. and Lindgren, S. 1990. The influence of the carbohydrate fraction and additives on silage quality. *Grass Forage Sci.* 45: 223 - 233.
- Machado, F.S., Rodrigues, N.M., Rodrigues, J.A.S., Ribas, M.N., Teixeira, A.M., Ribeiro Junior, G.O., Velasco, F.O., Gonçalves, L.C., Guimaraes Júnior, R. y Pereira, L.G.R. 2012. Qualidade da silagem de híbridos de sorgo em diferentes estádios de maturação. *Arq Bras Med Vet Zoo.* 64 (3):711 - 720.
- MAGYP, 2016. <https://datos.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>. Fecha de la última actualización 01/01/2016. Fecha de acceso: 05/03/2016.
- Mao, H. L., Wu, C. H., Wang, J. K., Liu, J. X., and Synergistic, J. X. 2007. Synergistic effect of cellulase and xylanase on In Vitro Rumen Fermentation and Microbial Population with Rice Straw as Substrate. *Anim Nutr Feed Techn.* 13: 477-487.
- McAallister, T. A., Phillippe, R. C., Rode, L. M., and Cheng, K. 1993. Effect of the Protein Matrix on the Digestion of Cereal Grains by Ruminant Microorganisms. *J Anim Sci.* 71: 205-212.
- McDonald, P. and Henderson, A.R. 1964. Determination of water-soluble carbohydrates in grass. *J Sci Food Agric.* 15: 395-398.
- McDonald, P.; Henderson, A.R.; Heron, S.J.E. 1991. *The biochemistry of silage.* 2. ed. Marlow: Chalcombe Publications, 1991. 340.
- McHan, F. 1986. Cellulase-Treated Coastal Bermudagrass Silage and Production of Soluble Carbohydrates, Silage Acids, and Digestibility. *J Dairy Sci.* 69: 431 - 438.
- Meeske, R., Ashbell, G., Weinberg, Z.G. and Kipnis, T. 1993. Ensiling forage sorghum at two stage of maturity with the addition of lactic acid bacterial inoculants. *Anim Feed Sci Technol.* 43: 165 - 175.
- Miron, J., D. Ben-Ghedalia and M. Morrison. 2001. Invited review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *J Dairy Sci.* 84: 1294 - 1309.

- Molina, L.R., Gonçalves, L.C. y Rodriguez, N.M. 2002. Qualidade das silagens de seis genótipos de sorgo colhidos em tres estádios de maturação. *Arq Bras Med Vet Zoo.* 54: 159 - 168.
- Montiel, M.D., Elizalde, J.C., Santini, F. y Giorda, L. 2011. Características físicas y químicas del grano de sorgo. Relación con la degradabilidad ruminal en bovinos. *Arch Zootec.* 60 (231): 533 - 541.
- 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 ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. *J Dairy Sci.* 83: 1310-1321.
- Morgavi, D. P., K. A. Beauchemin, V. L. Nsereko, L. M. Rode, T. McAllister, and Y. Wang. 2004. *Trichoderma* enzymes promotes *Fibrobacter succinogenes* S85 adhesion to, and degradation of, complex substrates but not pure cellulose. *J Sci Food Agric.* 84:1083–1090.
- Morgavi, D.P., Beauchemin, K.A., Nsereko, V.L., Rode, L.M., McAllister, T.A., Iwaasa, A.D., Wang, Y. and Yang, W.Z. 2001. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen micro-organisms and gastrointestinal proteases. *J Anim Sci.* 79: 1621- 1630.
- Morrison, I.M. 1988. Hydrolysis of plant cell walls with trifluoroacetic acid. *Phytochemistry.* 27: 1097 - 1100.
- Nadeau, E.M., Rusell, J.R. and Buxton, D.R. 2000. Intake, digestibility, and composition of orchardgrass and alfalfa silages treated with cellulase, inoculant and formic acid fed to lambs. *J Anim Sci.* 78: 2980 - 2989.
- Neumann, M., Restle, J., Alves Filho, D.C., Bernardes, R.A.C., Arboite, M.Z., Cerdótes, L. and Peixoto, L.a. 2002. Avaliação de diferentes híbridos de sorgo quanto aos componentes da planta e silagem produzida. *Rev Bras Zootéc.* 31: 302 - 312.
- Nsereko, V. L., Morgavi, D. P., Rode, L. M., Beauchemin, K. A. and McAllister, T. A. 2000. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro. *Anim Feed Sci Technol.* 88: 153 - 170.
- Oshima, M. and McDonald, P. 1978. A review of the changes in nitrogen compounds in herbage during ensiling. *J Sci Food Agric.* 29: 497 - 505.
- Paloheimo, M., J. Piironen, and J. Vehmaanperä. 2011. Xylanases and cellulases as feed additives. In: M. R. Bedford and G. G. Partridge, editors, *Enzymes in farm animal nutrition*. 2nd ed. CABI (CAB International), London, UK. p. 12–53.
- Pereira, O.G., Obeid, J.A., Gomide, J.A. and Queiroz, A.C. 1993. Productividade de uma variedade de milho (*Zea mays* L.) e de três variedades de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e o valor nutritivo de suas silagens. *Rev Bras Zootec.* 22 (1): 31 – 38.
- Pires, D.A.A., Guimaraes Jr.R., Jayme, D.G. 2006. Qualidade e valor nutritivo das silagens de três híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) colhidos em diferentes estádios de maturação. *Rev Bras Milho Sorgo.* 5: 241 - 256.
- Playne, M.J. and McDonald, P. 1966. The buffering constituents of herbage and of silage. *J Sci Food Agric.* 17: 215 - 220
- Sheperd, a C., & Kung, L. 1996a. An enzyme additive for corn silage: effects on silage composition and animal performance. *J Dairy Sci.* 79: 1760 - 1766.
- Sheperd, a C., and Kung, L. 1996b. Effects of an enzyme additive on composition of corn silage ensiled at various stages of maturity. *J Dairy Sci.* 79: 1767 - 1773.
- Snyman, L. D., & Joubert, H. W. 1996. Effect of maturity stage and method of preservation on the yield and quality of forage sorghum. *Anim Feed Sci Technol.* 57: 63 - 73.
- Spoelstra, S.F. and van Wikselaar, P.G. 1992. The effects of ensiling whole crop maize with a multi-enzyme preparation on the chemical composition of the resulting silages. *J Sci Food Agric.* 60: 223 - 228.
- Sun, Z.H., Liu, S.M., Tayo, G.O., Tang, S.X., Tan, Z.L., Lin, B., He, Z.X., Hang, X.F., Zhou, Z.S. and Wang, M. 2009. Effects of cellulase or lactic acid bacteria on silage fermentation and in vitro gas production of several morphological fractions of maize stover. *Anim Feed Sci Technol.* 152: 219 - 231.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B. y France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185-197.
- Thomas, M.E., Foster, J.L., McCuiston, K.C., Redmon, L.A. and Jessup, R.W. 2013. Nutritive value, fermentation characteristics, and in situ disappearance kinetics of sorghum silage treated with inoculants. *J Dairy Sci.* 96: 7120 - 7131.
- Tilley, J.M.A. and Terry, R.A. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J Br Grassl Soc.* 18: 104-111.

- Vahjen, W. and Simon, O. 1999. Biochemical characteristics of non-starch polysaccharide hydrolysing enzyme preparations designed as feed additives for poultry and piglet nutrition. *Arch Anim Nutr.* 52: 1 - 14.
- Van der Vyver, W.F. 2011. Fibrolytic enzymes in ruminant nutrition and their effect on forage cell wall integrity. Dissertation presented for the degree of Doctor of Philosophy in Agriculture. Stellenbosch University. South Africa.
- Van Soest, P.J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant.* 2ed. Ithaca, New York: Cornell University.
- Van Vuuren, A.M., Bergsma, K., Frol-Kramer, F. and Van Beers, J.A.C. 1989. Effects of addition of cell wall degrading enzymes on the chemical composition and the in sacco degradation of grass silage. *Grass Forage Sci.* 44: 223–230.
- Wang, Y., McAllister, T., Rode, L., Beauchemin, K., Morgavi, D., Nsereko and V., Iwaasa, A. 2002. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on epiphytic microbial populations and in vitro digestion of silage. *J Sci Food and Agriculture* 82: 760 - 768.
- Waniska, R.D. 2000. Structure, phenolic compounds, and antifungal proteins of sorghum caryopses. Pp 72-106
- Weinberg, Z.G., Ashbell, G., Yaira, H. and Azrieli, H. 1995. The effect of cellulase plus pectinase on the aerobic stability and fiber analysis of peas and wheat silages. *Anim Feed Sci Technol.* 55: 287 - 293.
- Wilkinson, J.K., Huber, J.T. and Henderson, H.E. 1976. Acidity and proteolysis as factors affecting the nutritive value of corn silage. *J Anim Sci.* 42: 208 - 218.
- Windle, M. C., Walker, N., and Kung, L. 2014. Effects of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of corn silage harvested at different dry matter contents and ensiled for various lengths of time. *J Dairy Sci.* 97: 3053 - 3060.
- Xing, L., Chen, L.J. and Han, L.J. 2009. The effect of an inoculant and enzymes on fermentation and nutritive value of sorghum straw silages. *Bioresource Technology* 100: 488 - 491.
- Yang, W. Z., Beauchemin, K. a, and Rode, L. M. 1999. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 82: 391 - 403.
- Young, K. M., Lim, J. M., Der Bedrosian, M. C., and Kung, L. 2012. Effect of exogenous protease enzymes on the fermentation and nutritive value of corn silage. *J Dairy Sci.* 95: 6687 - 6694.
- Zahiroddini, H., Baah, J., Absalom, W., and McAllister, T. A. 2004. Effect of an inoculant and hydrolytic enzymes on fermentation and nutritive value of whole crop barley silage. *Anim Feed Sci Technol.* 117: 317 - 330.

Apéndice

Cuadro 11. Resumen de los efectos de la aplicación de enzimas fibrolíticas exógenas en forrajes de distintas especies (revisión bibliográfica).

Autor/es	Alimento/ Sustrato	Actividad/des enzimática/as declarada/as	Producto/Fabricante	Dosis	Tiempo contacto enz-sustrato	Composición Química- Nutricional	Cinética de degradación y Digestibilidad	Características Fermentativa
Colombatto et. al., 2003a	Heno de alfalfa	Xilanasa y celulasa	Liquicell 2500 (L, Speciality Enzymes and Biochemicals, Fresno, CA, USA) y Depol 40 (D, Biocatalyst Ltd., Pontypridd, UK).	0,48; 1,2; 2,5 y 5,6 µl/g MS de Depol y 0,49; 0,7; 8,7 y 0,51 µl/g MS de Liquicell.	20 h antes de la alimentación.	SD	Ambos complejos enzimáticos incrementaron la tasa inicial (12 h.) de degradación de materia orgánica de ambas fracciones, y aumentaron la extensión final de la digestión de las hojas de alfalfa.	SD
Álvarez et. al., 2009	TMR (fibrosa)	Xilanasa y celulasa	Fibrozyme (Alltech Inc., Nicholasville, KY, USA) y Promote (Cargill Crop., Minneapolis, MN, USA)	Fibrozyme 2 g/kg MS y Promote 3 ml/kg MS.	24 h antes de la alimentación.	SD	Las enzimas aumentaron la fracción soluble de la MS, pero no aumentaron la degradación in situ de la MS, FDN y FDA.	SD
Elwakeel et. al., 2007	TMR	Xilanasa y celulasa	Saf Agri (Milwaukee, WI, USA)	1, 5, 15 y 30 g/d en 25 kg de MS	18 horas	SD	Las enzimas evaluadas aumentaron la DIVMS.	SD
Gallardo et. al., 2010	Heno de alfalfa, silaje de maíz y rastrojo de avena.	Xilanasa y celulasa	Fibrozyme (Alltech Inc., Nicholasville, KY, USA)	0, 1, 2, 3 o 4 g/kg MS	24 horas.	SD	No aumentó la fracción soluble, potencialmente soluble, ni la digestibilidad in vitro de MS, FDN y FDA.	SD
Yang et. al., 2000	TMR	Xilanasa y celulasa	Pro-Mote, Biovance Technologies Inc., Omaha, NE, USA.	50 mg/kg MS = 0,05 g/kg MS	14 días.	SD	No se observaron diferencias significativas en la degradación ruminal de FDN y FDA de las dietas tratadas con enzimas respecto al control.	SD
Kung et. al., 2000	TMR	Xilanasa y celulasa	Finnfeeds International, Marlborough, UK.	Año 1: EA2 (2l/tn MS) y EA5 (5 l/tn MS). Año 2: EA2 (2l/tn MS) y EB1.2 (1,2l/tn MS).	10 minutos	Año 1: el forraje tratado con EA5 tuvo mayor cantidad de hemicelulosa que el control y EA2. Año 2: EB1.2 aumentó el contenido de FDA.	Año 1: EA5 disminuyó la degradación de la FDN a las 48 horas. Año 2: No hubo diferencias.	SD
Eun y Beuchamin 2008	Silaje de maíz	fibrolíticas	Dyadic International Inc. Jupiter, FL, USA.	0,5 mg/g MS	17 h pre alimentación.	SD	Aumentó la DIVMS	SD

Autor/es	Alimento/Sustrato	Actividad/desenzimática/as declarada/as	Producto/Fabricante	Dosis	Tiempo contacto enz-sustrato	Composición Química-Nutricional	Cinética de degradación y Digestibilidad	Características Fermentativa
van Vuuren et. al., 1989	Silaje de Pastura (Raigrass +trebol)	Xilanasa y celulasa	Clampzyme, Finnfeeds Limited, Redhill, UK	1 ml/kg MS	90 días	Disminuyó el contenido de FDN y FDA.	DMO no fue afectada.	El contenido de N-NH ₃ disminuyó.
McHan 1986	Silaje de Pastura (Bermuda grass)	Celulasa	Miles laboratories. Elkhart, IN, USA	10 g./kg. MF	30 y 60 días.	Aumentó el contenido de CSA. El contenido de celulosa disminuyó un 35%. El contenido de FDN y FDA disminuyó 18 y 19% respectivamente, después de 60 días.	Aumentó la DIVMS.	Aumento el contenido de ácido acético y fórmico.
Zhang et. al., 2010	Silaje de cebada y Guineagrass	celulasa	Meiji Seika Kaisha Ltd, Tokyo, Japan.	0,1; 0,2; 0,4 y 0,8 g/kg MF	50 días.	SD	SD	Reducción del pH y del contenido de N-NH ₃ .
Zahiroddini et. al., 2004	Silaje de cebada	Xilanasa y celulasa	SD	SD (cantidad apropiada)	0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14 y 112 días.	No hubo diferencias en el contenido de FDN y FDA. El contenido de ALM disminuyó.	SD	Sin diferencias significativas.
Mao et. al., 2013	Rastrojo de arroz	Xilanasa y celulasa	Sunhy Animal Pharmacy Co., Ltd., Wuhan, China.	CEL 0; 7,5 y 15 unidades/g sustrato. XYL 0; 15 y 30 unidades/g sustrato.	24 horas.	SD	La PG, DIVMS y DIVFDN aumento con el incremento de los niveles de enzimas.	SD
Adogla-Bessa et. al., 1999	Silaje de trigo	Xilanasa y celulasa	FSO2, Finnish Sugar, Helsinki, Finland.	0, 1750, 3500 y 15503 ml/Tn MS	42 días.	El aumento de los niveles de enzimas, incremento el contenido de CHOS y disminuyó el contenido de FDN, FDA y celulosa.	El aumento de los niveles de enzimas no afectó la DIVMO.	El aumento de los niveles de enzimas, disminuyó el pH y el contenido de N-NH ₃ .
Sun et. al., 2009	Silaje de maíz (parte forrajera)	Celulasa	Multifect CL, Genecor International, Inc., Rochester, NY, USA.	0, 10 y 20 ml/kg MF	60 días	Con el aumento de las dosis, se redujo el contenido de FDN y FDA. Asimismo aumentó el contenido de CHOS.	Con el aumento de las dosis, aumentó la desaparición in vitro de la MS a las 56 hs y aumentó la tasa de producción de gas.	La aplicación de celulasa aumentó el contenido de ác. láctico y disminuyó el pH.
Sheperd and Kung 1996b	Silaje de maíz planta entera	Xilanasa y celulasa	Cornzyme®. Finnfeeds International Ltd., Schaumburg, IL, USA.	0,22; 2,2 y 22 l./Tn MF	60 días	El efecto principal del aumento de la dosis de enzima fue la disminución del contenido de FDN, FDA y hemicelulosa. El contenido de PB no se vio afectado.	No hubo efecto en la extensión de la digestión <i>in vitro</i> de la FDN.	El tratamiento enzimático no afectó el contenido de ácido láctico, ácidoacético y N-NH ₃ .

Autor/es	Alimento/Sustrato	Actividad/des enzimática/as declarada/as	Producto/Fabricante	Dosis	Tiempo contacto enz-sustrato	Composición Química-Nutricional	Cinética de degradación y Digestibilidad	Características Fermentativa
Sheperd and Kung 1996a	Silaje de maíz planta entera	Xilanasa y celulasa	Cornzyme®. Finnfeeds International Ltd., Schaumburg, IL, USA.	220 ml./Tn MF	56, 105 y 196 días.	No hubo efecto del tratamiento enzimático sobre el contenido de FDN y FDA.	No hubo efecto del tratamiento enzimático sobre la digestibilidad de la MO y FDN.	Solamente hubo una reducción del pH a los 196 días y de N-NH ₃ a los 56 días.
Colombatto et. al. 2004a	Silaje de maíz planta entera	Xilanasa y celulasa	Liquicell 2500 (L, Speciality Enzymes and Biochemicals, Fresno, CA, USA) y Depol 40 (D, Biocatalyst Ltd., Pontypridd, UK).	0,4; 0,8 y 1,6 ml/kg MS de Liquicell2500. 5,1; 10,2 y 20,4 ml/kg MS de Depol40.	120 días.	Liquecell redujo en contenido de fibra, sin embargo Depol la aumento, debito posiblemente a la reducción en el contenido de almidón. Depol aumento el contenido de CHOS.	Liquicell mostro una PG mas alta en estadíos tempranos de la fermentación, pero sin modificaciones en la PG final. Depol tuvo una PG menor.	La aplicación de enzimas disminuyó el pH en todos los casos, respecto al control.
Colombatto et. al. 2004b	Silaje de maíz planta entera	Xilanasa y celulasa	Liquicell 2500 (L, Speciality Enzymes and Biochemicals, Fresno, CA, USA) y un extracto derivado de T. aurantiacus (Ta).	0,4 y 0,8 ml de L/kg MS y 1,5 y 3,1 ml de Ta/kg MS	2, 4, 8, 15 y 60 días.	A los 60 días no hubo diferencias en el contenido de FDN, pero los dos tratamientos enzimáticos redujeron el contenido de FDA.	L tuvo una PG mayor que el control a las 48 horas, mientras que Ta tuvo una PG mayor que el control a las 24 horas. A las 96 horas los dos tratamientos enzimáticos no tuvieron diferencias con el control.	Los silajes tratados con enzimas tuvieron pH mas bajos durante todo el tiempo de ensilado.
Spoelstra and Wikselaar 1992	Silaje de maíz	Celulasa y hemicelulasa	Celulasa (Maxazym CL2000, Gist-brocades, Delft, The Netherlands) y Hemicelulasa (Hemicellulase Reg2, Gist-brocades, Delft, The Netherlands).	0,2 y 1 g/kg	Exp 1: 90 días. Exp 2: 0, 5, 10, 19, 40, 100 y 150.	Se observó una reducción de hasta el 25% de la FDN con la aplicación de enzimas en (150 días). La degradación del almidón fue mayor que la degradación de los componentes de la pared celular en el mismo silaje.	SD	No hubo diferencias en los valores de pH entre los silajes tratados y no tratados.
Chen et. al., 1994	Silaje de maíz	Celulasa y hemicelulasa	Alfazyme (Farmline International Inc., Schaumburg, IL, USA)	220 ml/tn	45 días.	La aplicación del tratamiento enzimático no modificó el contenido de fibra ni de CHOS del silaje de maíz.	La aplicación del tratamiento enzimático no modificó la cinética de degradación ruminal del silaje de maíz.	El tratamiento enzimático produjo un leve descenso (no significativo) del pH y una reducción (significativa) del contenido de N-NH ₃ .
Xing et. al. 2009	Silaje de sorgo (parte forrajera)	Celulasa y hemicelulasa	Snow Brand Seed Ltd., Sapporo, Japan.	90 FPU/ml y 6000 IU/ml. 0,033 mg/g MF	3, 7, 11, 15, 30 y 60 días.	En los silos tratados se redujo el contenido de FDN y FDA. También se redujo el contenido de CSA.	En los silos tratados aumentó la DIVMS y DIVFDN.	Los silos tratados tuvieron menor N-NH ₃ y mayor contenido de ácido láctico. El pH no tuvo diferencias.

Autor/es	Alimento/ Sustrato	Actividad/des enzimática/as declarada/as	Producto/Fabricante	Dosis	Tiempo contacto enz-sustrato	Composición Química- Nutricional	Cinética de degradación y Digestibilidad	Características Fermentativa
Thomas et. al. 2013	Silaje de sorgo	Celulada y hemicelilasa	50:50 Cellulase Plus (Dyadic, Juniper, FL) y Xylanase Plus (Dyadic, Juniper, FL).	1,34 mL/5 kg fresco.	120 días.	Los silajes de sorgo tratados con la enzima, presentaron valores de FDN y FDA significativamente menores a los no tratados. Además el tratamiento aumento el contenido de CHOS solubles en agua en 2 de los 4 híbridos de sorgo evaluados.	El tratamiento enzimático mejoro la cinética de desaparición de la MS, FDA, FDA y PB en 2 de los 4 cultivares. Siendo el efecto mayor en el cultivar con mayor concentración de carbohidratos estructurales.	El tratamiento enzimático disminuyo el pH en 1 de los 4 sorgos evaluados, en comparación con los controles. El N- NH3 no fue afectado por el tratamiento enzimático en ningún híbrido.

Cuadro 12. Resumen de los efectos de la aplicación de enzimas exógenas proteasas en forrajes y ensilajes de grano húmedo de distintas especies (revisión bibliográfica).

Autor/es	Alimento/Sustrato	Actividades enzimáticas declaradas	Producto/Fabricante	Dosis	Tiempo contacto enz-sustrato	Composición Química-Nutricional	Cinética de degradación y Digestibilidad	Características Fermentativas
Kung et al., 2014	Silaje de maíz grano húmedo	Proteasas	AB Vista, Wiltshire, UK.	2000 mg/Kg MF	70 y 140 días.	El tratamiento disminuyó en contenido de prolaminas y aumentó el contenido de proteína soluble a los 70 y 140 días.	DIVMS fue mayor en los silos tratados con proteasas a los 70 y 140 días.	El pH fue mas alto en los silos tratados con la enzima. El contenido de ác. lactico y etanol fue mayor en los silos tratados a los 70 días, pero no hubo diferencias a los 140 días.
Windle et al., 2014	Silaje de maíz planta entera	Proteasas	AB Vista, Wiltshire, UK.	20 y 2000 mg/kg (LO y HI respectivamente).	45, 90 y 150 días.	HI aumentó el contenido de proteína soluble. El contenido de ALM fue menor con HI a los 150 días.	DIVALM fue mayor en HI que en LO a los 45 y 90 días, pero no a los 150 días.	LO y HI no tuvieron efecto en el pH. La concentración de ác láctico y el conteido de N-NH3 fue mayor en HI.
Young et al., 2012	Silaje de maíz planta entera	Proteasas	AB Vista, Wiltshire, UK.	20 y 2000 mg/kg de E85 y E86.	45 y 150 días.	La aplicación de enzimas no modifíco el contenido de ALM, pero aumento el contenido de proteína soluble.	Aumento de DIVALM con dosis altas.	La aplicación de enzimas, no modifíco el pH, pero aumentó el contenido de N-NH ₃ en altas dosis.
Colombatto et al., 2009	Heno de alfalfa, silaje de maíz, grano de maíz y TMR	Proteasas	Protex 6L, Genecor Int. Rochester, NY, USA.	1,5 µl/g MS	22 horas.	SD	La adición de enzimas incremento la desaparición de MS del heno de alfalfa (+13%), silaje de maíz (+8%), grano de maíz rolado (+7%), y TMR (+2%).	SD
Eun and Beauchemin, 2005	Heno de alfalfa, silaje de cebada y TMR	Proteasas	Protex 6L, Genecor Int. Rochester, NY, USA.	1,25 µl/g de MS	18 horas	SD	La adición de enzimas tendió a incrementar la PG de ambos forrajes. Además, incrementó la PG del concentrado de la TMR con bajo forraje.	SD
Eun et al., 2007	Heno de alfalfa	Proteasas	P1 y P2. Genecor Int. Rochester, NY, USA.	1,5 mg/g MS	20 horas	SD	P1 aumento un 6,5% la PG a las 24 horas, dicho incremento fue evidente a todas las mediciones. Además, aumento 3,4% la degradabilidad in vitro de la MS. P1 aumentó la degradación de la FDN y FDA a las 18 horas.	SD
Eun and Beauchemin, 2008	Heno de alfalfa y silaje de maíz	Proteasas	SD	0,12 - 3,66 mg/g MS	17 horas	SD	La aplicación de proteasas aumeté la PG, pero no aumentó la DIVMS y DIVFDN.	SD

