



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
CENTRO UNIVERSITARIO UAEM AMECAMECA

LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DESAPARICIÓN *IN SACCO* DE INSUMOS Y DIETA PARA RUMIANTES
ADICIONADAS CON ENZIMAS FIBROLITICAS EXOGENAS**

TESIS

PRESENTA:

KAREM DÍAZ FRAGOSO

DIRECTOR

DR. PEDRO ABEL HERNÁNDEZ GARCÍA

ASESOR

DR. ENRIQUE ESPINOSA AYALA

Amecameca, Estado de México a Septiembre de 2021

CONTENIDO

DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTOS.....	VII
RESUMEN	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Características de la producción rumiantes en México	4
2.2. Sistemas productivos de rumiantes y sus características	5
2.3. Estructura y composición de las paredes celulares de los forrajes	12
2.3.1. Pared celular de las plantas	12
2.4. Componentes de la pared celular	14
2.4.1. Celulosa.....	14
2.4.2. Pectinas.....	15
2.4.3. Hemicelulosa	16
2.4.4. Proteínas	17
2.4.5. Lignina	18
2.4.6. Sílice.....	19
2.5. Fermentación de alimentos en los rumiantes.....	19
2.5.1. Carbohidratos energéticos y estructurales de los vegetales.....	19
2.5.2. Microorganismos ruminales y su papel en la fermentación	20
2.5.3. Ácidos grasos volátiles	23
2.6. Uso de los cereales para producción de pequeños rumiantes.....	24
2.7. Importancia de los forrajes en la alimentación de rumiantes.....	25

2.8.	Disponibilidad de los forrajes para alimentación de rumiantes.....	25
2.9.	Factores que afectan la digestibilidad de la fibra	26
2.10.	Aditivos que mejoran digestibilidad de forrajes	28
2.10.1.	Prebióticos y Probióticos	28
2.10.2.	Antibióticos en rumiantes alimentados con forrajes	29
2.10.3.	Enzimas.....	30
2.10.3.1.	Concentración de sustrato y la reacción enzimática	32
2.10.3.2.	Relación del pH	33
2.10.3.3.	Temperatura.....	33
2.10.4.	Inhibidores de enzima	33
2.10.5.	Celulasas y xilanasas.....	34
2.11.	Especificidad de sustratos para celulasas y xilanasas.....	35
2.11.1.	Modo de acción de celulasas y xilanasas.....	35
2.12.	Actividad enzimática en pruebas <i>in vitro</i>	37
2.13.	Actividad enzimática en pruebas de digestibilidad <i>in vitro</i>	39
2.14.	Producción de gas <i>in vitro</i> con enzimas fibrolíticas exógenas	43
2.15.	Enzimas fibrolíticas exógenas en dietas para rumiantes	50
3.	JUSTIFICACIÓN	54
4.	OBJETIVOS	55
4.1.	Objetivo general	55
4.2.	Objetivos específicos	55
5.	HIPÓTESIS.....	56
6.	MATERIALES Y METODOS	57
6.1.	Desaparición <i>in sacco</i> de la dieta e ingredientes	57
6.2.	Recolección del fluido ruminal.....	60

6.3. Concentración de Ácidos grasos volátiles (AGV)	61
6.4. Análisis estadístico.....	61
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
7.1 Degradabilidad <i>in sacco</i> de FDN y FDA de la dieta e ingredientes.....	61
7.2. pH ruminal.....	65
7.3. Ácidos grasos volátiles.....	67
8. CONCLUSIÓN.....	69
9. BIBLIOGRAFIA.....	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Equivalencias de unidad animal para diferentes especies.....	9
Cuadro 2. Contenido de PC y FDN y la degradación de la MS de forrajes templados y tropicales.....	10
Cuadro 3. Principales microorganismos ruminales degradadores de fibra.....	21
Cuadro 4. Dieta experimental y composición química.....	59
Cuadro 5. Digestibilidad <i>in sacco</i> de la FDN con adición extracto enzimático xilanolítico comercial (%).....	63
Cuadro 6. Digestibilidad <i>in sacco</i> de la FDA con adición extracto enzimático xilanolítico comercial (%).....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regiones de la pared celular	13
Figura 2. Estructura de celulosa	15
Figura 3. Representación de los puentes de hidrógeno	17
Figura 4. Conformación de la pared celular con la lignina	18
Figura 5. pH del fluido ruminal en bovinos a las 12 horas de incubación post alimentación con dietas adicionada con la enzima exógena xilanolítica comercial.	66
Figura 6. Porcentaje de AGV en el líquido ruminal al adicionar la enzima exógena xilanolítica comercial.	68

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la adición de una enzima fibrolítica exógena comercial con principal actividad xilanólica sobre la desaparición *in sacco* de sorgo alfalfa, rastrojo y una dieta integral para finalización de rumiantes y la adición de 0.0, 2.0 y 3.0 g kg⁻¹ de la enzima. Se empleó una vaca Holstein canulada en rumen la cual, fue alimentada con una dieta constituida con 75 % de forraje y 25 % de concentrado, sorgo, alfalfa y rastrojo de maíz. El análisis de datos se realizó mediante un diseño completamente al azar. La desaparición *in sacco* de sorgo alfalfa, rastrojo y una dieta integral no se afectó por la acción del extracto enzimático exógeno xilanólico comercial ($p>0.05$). De la misma forma, no se encontraron cambios significativos ($p>0.05$) en el pH ruminal a las 12 horas de incubación. La concentración de ácido acético mostro mayor cantidad con la adición de 3 g de extracto enzimático xilanólico en comparación con la dosis de 0 g de inclusión (58.44 vs 49.95), el ácido propiónico y butírico no tienen diferencias estadísticas ($p>0.05$). Con lo cual se puede concluir, que la desaparición *in sacco* de la FDN y FDA no se afectó por la acción del extracto enzimático exógeno xilanólico comercial, además, no se afectó el pH, concentraciones de ácidos grasos volátiles, en dietas en finalización de rumiantes.

1. INTRODUCCIÓN

La demanda de alimentos con alto valor biológico de origen animal como leche y carne para consumo humano, ha ido en incremento debido al crecimiento exponencial de la población, por lo cual, se busca un mejor abastecimiento y que éste sea de calidad y producido de forma sustentable, esta situación aunado a la competencia indirecta (humano-animal) por los granos; por otra parte la disponibilidad de granos y forrajes de buena calidad para el ganado es deficitaria, por lo cual, los productores y especialistas en rumiantes deben optimizar el empleo de los recursos disponibles y mejorar la alimentación con el propósito de incrementar la eficiencia en la producción animal. Ya que los sistemas de producción de rumiantes se han visto afectados por los incrementos en el precio de insumos para la elaboración de alimentos, ya que en confinamientos se les proporciona una dieta, elaborada con forraje y granos (rastrojo de maíz, melaza, maíz, sorgo, entre otros; (Macedo y Castellanos, 2004).

El incremento en costo de los insumos empleados en la alimentación de rumiantes ha hecho que las ganancias económicas para los productores sean reducidas, lo que ocasiona la disminución y cierre de unidades de producción (FAO, 2010). Ya que en condiciones de producción intensiva los rumiantes son alimentados con dietas altas en concentrados (granos) que van del 60 a 95 %, donde los principales cereales para la finalización son maíz y sorgo (Mendoza y Ricalde, 1995).

En el caso de los rumiantes que son capaces de aprovechar los nutrimentos de la fibra de los forrajes, debido a los microorganismos existentes en el retículo-rumen que producen enzimas degradadoras de los componentes de la pared celular, fermentándolos a carbohidratos fácilmente disponibles (van Soest, 1994; Zinn y Ware, 2002, Sánchez *et al.*, 2012). Dentro de estas fibras, se encuentran los esquilmos o subproductos agrícolas que son el remanente vegetal post cosecha (SAGARPA, 2012; Mendoza y Ricalde, 2015), siendo un insumo con

poco valor nutritivo, debido a su baja digestibilidad de la materia seca, contenido de nitrógeno y minerales (Fuentes *et al.*, 2001, Mendoza *et al.*, 2008).

Por lo cual estos subproductos agrícolas tienen el potencial para la alimentación de rumiantes, aunque existe la desventaja que estos productos son altamente lignificados, lo cual impide o limita el que se ofrezca en altas cantidades en la ración debido a la baja degradación en condiciones ruminales, motivo por el cual es necesario buscar alternativas de alimentación animal, implementar técnicas que ayuden a disminuir los costos de producción, y mejoraren las condiciones nutricionales de los rumiantes (Mejía *et al.*, 2011). Una alternativa importante puede ser el empleo de enzimas fibrolíticas exógenas que incrementen el aprovechamiento de los forrajes, estas enzimas son productos de microorganismos como bacterias (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum* y *Streptococcus faecium*) y hongos (*Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei* y *Saccharomyces cerevisiae*) (McAllister *et al.*, 2001).

Existen pocas investigaciones con el uso de forrajes de baja calidad como el rastrojo de maíz y la adición de enzimas fibrolíticas, las cuales observan resultados diversos en las variables estudiadas (Tirado-Estrada *et al.*, 2001; Yescas *et al.* 2004). Aunque al emplear forrajes de calidad como los ensilados de maíz, cebada, alfalfa y caña de azúcar, incrementa la digestibilidad de la fibra por la adición de enzimas fibrolíticas (Krause *et al.*, 1998; Lewis *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1999; Pinos, 1999; Gómez, 2003; Wallas *et al.*, 2001; Valdés *et al.*, 2014).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Características de la producción rumiantes en México

Los pequeños rumiantes como los ovinos tienen una alta capacidad de adaptación a diferentes altitudes, climas y relieves, por lo que su crianza se encuentra presente en todo el mundo (Garibaldi, 2018). Esta actividad es de relevancia e importancia para los países subdesarrollados ya que infiere en la generación de empleos, además de ser fuente de ingresos y abastecen a las comunidades (Herrero *et al.*, 2013). Sin embargo, la mayoría de los sistemas productivos de carne de pequeños rumiantes en México se encuentran restringidos al sector social de medianos o bajos ingresos; además de considerarse como una actividad secundaria, por lo que el mercado nacional tiende a ser abasteciendo de forma insuficiente y con animales de muy baja calidad (desecho), presentando deficiencias competitivas con países industrializados (Duarte *et al.*, 1996; de la Peña *et al.*, 2009).

Es por ello que se han buscado estrategias gubernamentales cuya intención es mejorar los ciclos de producción de rumiantes mediante el posicionarse en una actividad competitiva y rentable (Chauvet, 1999; Castillo *et al.*, 2014), obteniéndose un incremento en la producción de carne de rumiante de hasta 13 veces en 10 años (2007-2017; SIAP, 2017) siendo la carne de res la que presenta una tasa de crecimiento mayor a las demás (1.8% anual; FIRA, 2017).

Con la implementación de estas estrategias y el incremento de la producción de carne de rumiantes en México han logrado reducir la importación de carne de bovino (del Moral y Murillo, 2015) y cordero (Partida *et al.*, 2013), aunque todavía se reporta importación de estas carnes impactando de forma negativa la balanza económica nacional (SAGARPA, 2008) y a los ovinocultores nacionales ya que la carne de cordero importada tiende a ser más barata que la carne nacional (Martínez *et al.*, 2010; del Moral y Murillo, 2015). En este sentido, las estimaciones hacia 2021 señalan un crecimiento de la ganadería bovina nacional pero con un

crecimiento mayor de las importaciones, situación que puede trasladarse también a la carne de ovinos (Carrera *et al.*, 2015).

Por lo cual, es importante mejorar los sistemas de producción para así poder hacerle frente al déficit de carne nacional (Góngora *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2011), dentro de estas mejoras, las tecnologías nutricionales pueden incrementar el rendimiento productivo animal, disminuyendo los ciclos de producción o los costos (Bouwman *et al.*, 2005).

2.2. **Sistemas productivos de rumiantes y sus características**

La clasificación de los sistemas productivos de rumiantes son dadas en relación al producto final, la extensión de la cual son dependientes para realizar la producción, la zona en la que se encuentra la unidad de producción y su nivel productivo (Valerio *et al.*, 2009; Carrera *et al.*, 2015). En cuanto al producto final, para pequeños rumiantes como los ovinos, existen los sistemas productores de lana (Purvis y Franklin, 2005), los asociados a producción de leche (Barillet *et al.*, 2005; Marnet y Komara, 2008) y los productores de carne (Chauvet, 1999; Mendoza *et al.*, 2007).

En cuanto a la extensión necesaria para mantener la producción y el nivel de producción, por lo cual o han clasificado en extensivos, semi-intensivos e intensivos (Cuadro 1; Hernández *et al.*, 2011).

Los sistemas intensivos no necesitan de una extensión de territorio grande ya que existe la posibilidad de estabular a los corderos reduciendo el espacio necesario y disminuyendo impactos ambientales. A cargo de los sistemas intensivos la engorda de corderos para carne tiene un tiempo de finalización corto y tiene la ventaja de mantener a los corderos confinados donde no tienen que gastar energía para obtener su alimento por lo que tienen un rápido retorno económico (Joy & Bernue, 2014).

En cuanto a su tecnificación, algunos de estos sistemas han optado por invertir en instalaciones adecuadas, tecnologías reproductivas y nutricionales para incrementar la producción, se han caracterizado por una alta inversión en infraestructura y equipo (Muñoz-Osorio *et al.*, 2007). En cuanto a su alimentación, se utilizan bajos porcentajes de fibra y cantidades elevadas de cereales con el objetivo de incrementar el nivel productivo y acelerar el retorno económico (Mendoza *et al.*, 2017). La base de esta intensidad productiva se encuentra en estrecha relación con la composición de la dieta ya que, este aumento en la inclusión de almidones elevan los niveles de energía y se obtiene ganancias de peso mayores que sistemas asociados a forrajes (Seré y Steinfeld, 1996), finalizando los animales es este tipo de sistema en aproximadamente 90 días (Armero & Falagán 2015).

Algunos sistemas productivos que utilizan forrajes como principal alimento han buscado suplementar con cereales o concentrados a los corderos con los que cuentan, buscando incrementar la producción sin embargo, en la mayoría de los casos no está formulados de forma correcta (Corona *et al.*, 2014). Esta estrategia de optimizar los forrajes y administrar raciones que suplementen las deficiencias energéticas, podrían mejorar la producción de ovinos (Góngora-Pérez *et al.*, 2010). A pesar de los beneficios económicos del sistema intensivo, la mayoría de los ganaderos no ingresan a este sistema de producción debido a los costos en instalaciones y alimentación necesarios y optan por producir dentro de sistemas de producción con menor inversión.

Los sistemas extensivos son aplicados a praderas en las que los rumiantes suelen alimentarse durante un periodo de tiempo prolongado y en donde la mayoría del forraje nativo puede ser de regular a mala calidad nutricional teniendo aportes nutricionales variables durante las diferentes épocas del año (Dunn *et al.*, 2010). Estos sistemas necesitan en la mayoría de los casos una amplia extensión de terreno y derivado de la baja inversión en alimento son los más utilizados a nivel global (Golding *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2011), además de que no

requieren una inversión elevada en infraestructura y maquinaria (Beker *et al.*, 2009).

De forma semejante al mundo, en México, los sistemas de producción de ovinos utilizan de forma mayoritaria el sistema extensivo. Sin embargo, una de las grandes desventajas de estos sistemas es el elevado gasto de energía de los ovinos que representa el caminar durante largos periodos y la baja biodisponibilidad energética que aportan los forrajes que consumen, lo cual lo encasilla como el sistema más bajo en cuanto a productividad comparado con los sistemas intensivos y con el pastoreo rotativo (Rojas *et al.*, 2011; Carrera *et al.*, 2015). La práctica de este sistema suele realizarse sin controles de carga animal y sin utilizar limitaciones de espacio de las praderas por lo que, se alteran las condiciones de la pradera, impactando de forma negativa la regeneración del forraje (Molina *et al.*, 2013).

Una de las principales causas del agotamiento de los pastizales es la homogenización de las especies vegetales que no son preferidas por los corderos (Dunn *et al.*, 2010) y el agotamiento de las especies que suelen elegir sin permitirles un tiempo de reproducción y recuperación (Cingolani *et al.*, 2005). Existen reportes donde se confirma que el sobrepastoreo reduce la biomasa disponible afectando los aportes de los forrajes a la dieta de los corderos (Herrera *et al.*, 2011). Por lo cual, la búsqueda de controles de las praderas que eviten la pérdida de biomasa vegetal y disminuyan el impacto ambiental secundario a la producción son de amplio interés.

El pastoreo rotativo puede disminuir el deterioro de la pradera y optimiza el forraje disponible en ella (Taboada & Micucci, 2009), ya que, utiliza un medio controlado donde se permite recuperar el forraje de una pradera, es utilizado en unidades de producción que cuentan con poco espacio por lo que, el terreno es dividido en praderas pequeñas que son sembradas con pastos forrajeros en los que los corderos son rotados de forma continua en cada pradera cada

determinado tiempo, lo cual depende de la carga animal y el tipo de forraje sembrado, obteniendo un tiempo de reposos en el cual la pradera puede recuperarse (Briske *et al.*, 2008;Taboada & Micucci, 2009).

El uso de tecnologías forrajeras puede incrementar el rendimiento productivo de la pradera y aportar mayor cantidad y calidad de nutrientes para los corderos que se encuentran pastoreando (Pearce *et al.*, 2008). Existen evidencias donde praderas mejoradas sembradas con rye grass perene (*Lolium perenne*) y trébol blanco (*Trifolium repens*) tienen mayor rendimiento productivo, un mayor crecimiento estacional y más tolerancia al pastoreo (Waghorn y Clark, 2004; Grace *et al.*, 2018). Se ha comprobado que el mejoramiento de las praderas con pastos forrajeros y leguminosas ha incrementado el rendimiento de corderos destetados (Golding *et al.*, 2011) y se calculan incrementos en la producción de carne y leche por la gestión de forrajes mejorados (Argel, 2006).

Los factores que afectan el desarrollo de la biomasa y promueven la homogenización de especies son de forma principal la carga animal y la intensidad de pastoreo (Barth *et al.*, 2014). La biomasa es la cantidad total de especies vegetales en una pradera en tiempo determinado la cual está influenciada por el crecimiento de la planta, la precipitación pluvial o riego, el clima en donde se encuentra la pradera y la tolerancia al pastoreo que tiene cada forraje (Wise & Abrahamson, 2007). En la mayoría de las situaciones donde se utiliza pastoreo extensivo o trashumante se ha reportado disminución de la biodiversidad y pérdida de especies vegetales hasta causar desertificación (Ji *et al.*, 2005). Algunos de los motivos reportados que podrían ser causa de desertificación secundaria al pastoreo son una gran cantidad de animales pastoriles alimentándose en las praderas y compactando el suelo mediante el pisoteo, defoliación excesiva y deposiciones de heces y orina que afecta los microorganismos del suelo alterando los nutrientes (Devi *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015).

Por otra parte, la defoliación excesiva de las plantas y vegetales en las praderas afecta fisiológicamente las plantas por la disminución de tejido vegetal presente en cada planta, circunstancia que disminuye la fotosíntesis activándose el proceso de regeneración de tejido y por consecuente la planta se adecua a un ambiente de estrés y de adaptación a la defoliación (Peng *et al.*, 2007). Por estas razones, la carga animal es uno de los factores más importantes a controlar para obtener un buen manejo de la pradera, esto con el fin de que los recursos forrajeros no se deterioren y el sistema pueda perdurar (Guzmán *et al.*, 2017). En sistemas donde la intensidad del pastoreo es alta han observado afectaciones en el comportamiento reproductivo de las plantas, lo cual ha afectado la biomasa de la pradera y disminuye la cantidad de forraje en la próxima estación de pastoreo (Barth *et al.*, 2014); sin embargo, en ocasiones donde las praderas son manejadas correctamente el pastoreo aumenta la cantidad de biomasa debido a un mayor aporte de materia orgánica proveniente de las heces de los borregos (Jerrentrup *et al.*, 2015).

Para esto se debe establecer el número de animales que pueden alimentar una pradera sin afectar sus condiciones de regeneración (Animut *et al.*, 2005). Una de las formas de determinar la carga animal de una pradera, se ha categorizado las especies pastoriles en unidades animales, cada unidad animal equivale a un bovino de 450 kg y su cría por hectárea de pradera, como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Equivalencias de unidad animal para diferentes especies.

Ganado	Unidad Animal
Bovino 450 kg y su cría	1.00
Toro adulto mayor de 2 años	1.25
Oveja con cría	0.20
Cabra con cría	0.17
Semental	0.12

(Adaptado: Villalta *et al.*, 2016; Guaman *et al.*, 2017)

El caso de los ovinos, son cinco ovejas con su cría los que representa una carga animal.

La calidad de los forrajes se relaciona con el contenido de nutrientes y su digestibilidad. Asimismo, la cantidad y la calidad de los forrajes se pueden ver afectado por las fluctuaciones ambientales que pueden modificar la morfología y tasa de desarrollo (Ramírez, 2003). Han encontrado que los forrajes templados tienen un mayor contenido de PC, FDN y mayor degradación que los forrajes tropicales (Cuadro 2).

Cuadro 2. Contenido de PC y FDN y la degradación de la MS de forrajes templados y tropicales.

Forrajes	PC	FDN	DMS	Referencia
	%			
<i>Templados</i>				
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> var. Moapa)	20.86	45.82	75.80	Pinos <i>et al.</i> (2002)
Pasto Ballico (<i>Lolium perenne</i> var. American tetraploid)	14.81	64.22	74.00	Pinos <i>et al.</i> (2002)
<i>Tropicales</i>				
Leucaena (<i>Leucaena leucocephala</i>)	18.60	34.60	73.23	Ku <i>et al.</i> (1999)
Pasto Estrella (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)	8.98	77.04	-	Gómez (2003)
Pasto Estrella (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)	-	-	63.80	Ku <i>et al.</i> (1999)
Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	2.50	47.14	66.50	Gómez (2003)
Taiwán (<i>Pennisetum purpureum</i>)	6.79	70.90	67.30	Gómez (2003)

En el caso del nitrógeno (proteína cruda), es el nutriente que puede influir más en la calidad del forraje y la respuesta está afectada por la especie, dosis y modo de aplicación del N, edad de rebrote y factores climáticos entre otros (Herrera, 1985). Cuando los suelos van de baja a mediana fertilidad la carga

animal posible es de 0.2 a 2.0 animales por ha⁻¹ para pastos nativos y para gramíneas introducidas las cargas animales pueden ir de 1 a 2 animales ha⁻¹; asimismo al ser fertilizados pueden mantener de 2 a 4 animales por ha⁻¹ y con altas dosis de fertilizante y riego de 4 a 8 animales por ha⁻¹ (Trujillo, 1980).

Uno de los factores para establecer el adecuado manejo del pastizal lo constituye la carga animal, es decir el número de animales por hectárea que soporta un pastizal en un periodo de tiempo. Para definir la tasa de carga optima deben tomarse en cuenta parámetros entre los cuales están la tasa de crecimiento de los forrajes, la accesibilidad del forraje para el animal, el valor nutritivo y la composición botánica. La carga animal afecta la cobertura, persistencia y estabilidad de la pastura; el adecuado manejo de la pastura no solo preserva al pastizal de la degradación, sino que también puede considerarse un factor determinante para incrementar la producción primaria y consecuentemente incrementar la producción animal. El incremento de carga es beneficioso siempre y cuando se esté pastoreando dentro de la óptima presión de pastoreo (Entrena *et al.*, 1998).

En las regiones tropicales han realizado diversos estudios sobre la carga animal con forrajes; donde han observado que, si existe una alta disponibilidad de MS del pasto cuando son fertilizados y mantenidos bajo riego durante todo el año, las ganancias de peso pueden ser mantenidas, aunque se incremente la carga animal de 4 a 8 animales ha⁻¹, con ganancia de peso de 560 y 570 g día⁻¹ en novillas pastoreadas en pasto pangola (*Digitaria decumbes* Stent) (Zamora *et al.*, 1985). En la producción de leche en vacas de doble propósito manejadas en pasturas asociadas de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) con matarratón (*Gliricidia sepium*) y leucaena (*Leucaena leucocephala*), bajo un sistema de pastoreo rotativo, en unidades de 0.25 ha, delimitadas mediante cercas electrificadas, con un tiempo de ocupación de 2 días y 74 días de descanso. La carga animal fue de 2.15 UA ha⁻¹. La producción de leche de 1.42 ± 0.517 kg lactancia⁻¹ o 2656.20 kg ha⁻¹ año⁻¹ de leche (Ruíz-Silvera *et al.*, 1999).

En las regiones templadas de México, han observado que en praderas de ballico perenne se puede tener una carga animal de 11 a 13 bovinos (2,100 kg de peso vivo inicial) durante las épocas de primavera y verano; las ganancias diarias de peso por animal con estas cargas animal han sido de 0.648 a 1.00 kg día⁻¹. En otoño-invierno, la carga animal que se puede reducirse alrededor de 50 %, debido a la disminución en la producción de forraje en estas estaciones del año. Estudios con vacas lecheras Holstein en áreas templadas de México, indican que se pueden obtener de 3,843 a 4,400 kg de leche por vaca por año y de 19,000 a 22,000 litros de leche por hectárea por año, con una carga animal de cinco vacas por hectárea. Estas producciones se obtuvieron con una utilización mínima de granos en la alimentación diaria de las vacas (2 kg día⁻¹) (Núñez *et al.*, 2002).

2.3. Estructura y composición de las paredes celulares de los forrajes

Los rumiantes dependen para su alimentación de materiales vegetales fibrosos (gramíneas, leguminosas) como caña de azúcar y rastrojo de maíz, los cuales son capaces de utilizar, mediante microorganismos ruminales como bacterias, protozoarios y hongos anaeróbicos, esenciales para la digestión y fermentación de alimentos fibrosos que de otra manera no podrían ser aprovechadas (Church, 1993).

2.3.1. Pared celular de las plantas

La pared celular de las plantas superiores está constituida por tres capas: lámina media, pared primaria y pared secundaria (Figura 1); los integrantes químicos de la pared celular primaria, de la secundaria y la lámina media tienen una determinada organización en el espacio, lo que origina dos fases denominadas, microfibrilar y amorfa, ambas difieren en organización de los polímeros y otros compuestos de menor tamaño (iones y agua principalmente) que la integran. Las

paredes celulares son químicamente complejas, pues están constituidas por una mezcla de carbohidratos, proteínas, lignina, agua, algunos iones y moléculas inorgánicas y en algunos casos están presentes otras moléculas como cutina y suberina (García y Peña, 1995; Taiz y Zeiger, 2007).

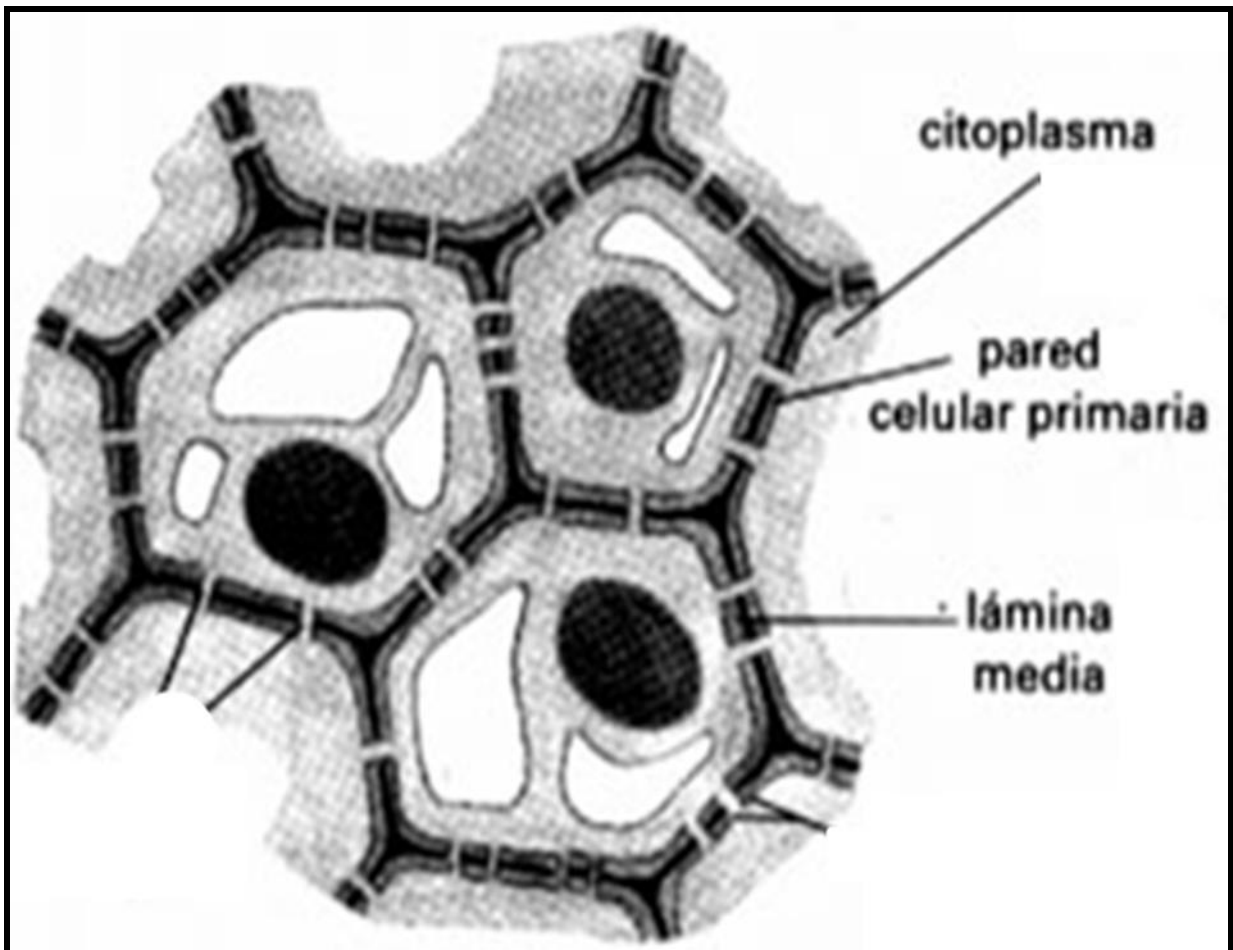


Figura 1. Regiones de la pared celular (PP: pared primaria, PS: pared secundaria y LM: lámina media (Brett y Waldro, 1990).

2.4. Componentes de la pared celular

2.4.1. Celulosa

La fase microfibrilar está formada por cadenas de celulosa que es un polímero lineal de unidades de glucosa con enlaces glucosídicos β -1,4 (Figura 2) llamado glucana. En la pared celular un número variable de cadenas, o moléculas individuales, de celulosa se unen y forman agregados, dando origen a las microfibrillas (fase microfibrilar de la pared celular). Las microfibrillas de la celulosa tienen dos formas de organización, la primera es en regiones donde los grupos hidroxilo (-OH) de los azúcares que las constituyen tienen un arreglo simétrico preciso (región cristalina; Figura 2) que le da una resistencia a la tensión, y en regiones menos ordenadas (región para-cristalina, no cristalina o amorfa), compuesta por moléculas de agua y residuos de polisacáridos no hemicelulósicos, ubicados en el exterior del eje de simetría de las microfibrillas (Figura 2; García y Peña, 1995). En la naturaleza la celulosa se encuentra unida con otros polisacáridos como xilosa o lignina.

La estructura cristalina de la celulosa está formada por fibras que son cadenas apretadas juntas en compactos agregados rodeados por una matriz de otros constituyentes celulares. Las cadenas de glucosa se unen por enlaces de hidrógeno entre unidades de azúcar y enlaces adyacentes. La conformación de la celulosa favorece la formación de enlaces y explica la unión fuerte de la celulosa con otros componentes celulares que son resistentes a la degradación biológica y la hidrólisis ácida. La digestión de la celulosa depende de la cristalinidad y la asociación fisicoquímica con otros compuestos celulares como la lignina que son resistentes a la digestión (Chaudhry, 1998). La fase amorfa está formada por dos grupos de polisacáridos: las sustancias pécticas y las hemicelulosas; además de proteínas estructurales y catalíticas, compuestos fenólicos, agua y minerales (García y Peña, 1995; Taiz y Zeiger, 2007).

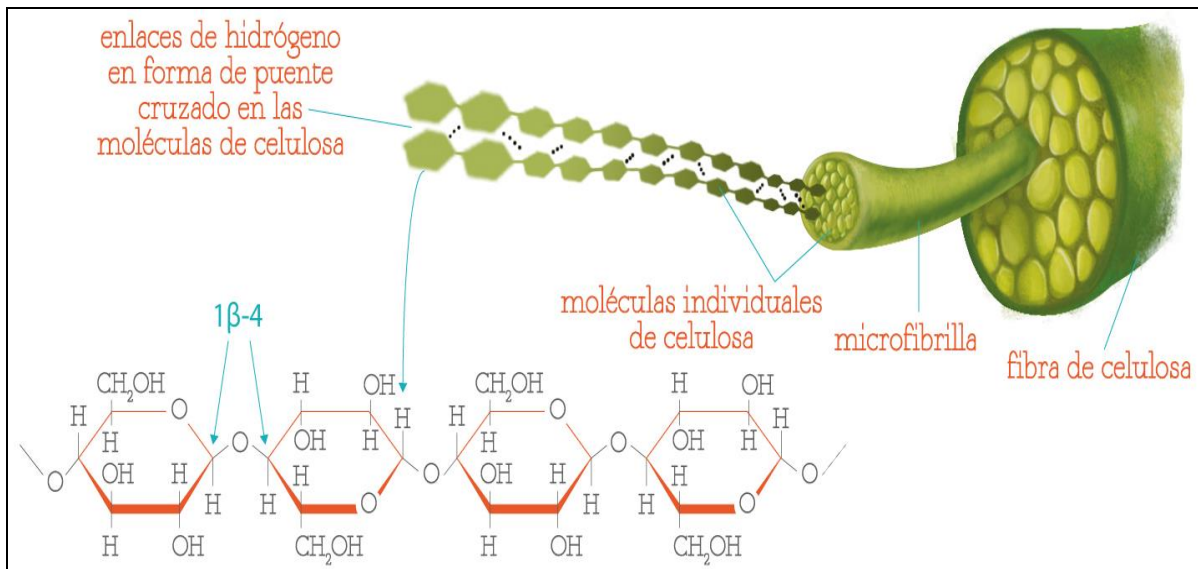


Figura 2. Estructura de celulosa. (a) Fragmento de una cadena de celulosa (Sjostrom, 1981) y (b) representa la región cristalina (micelar) y no cristalina de las fibrillas de celulosa (Brett y Waldron, 1990).

2.4.2. Pectinas

Son macromoléculas de composición compleja, con base a la conformación de su cadena principal se clasifican en seis tipos de estructura. Esta cadena de las sustancias pécticas de la pared primaria puede ser un polímero de ácido poliurónico, y por la abundancia relativa de los residuos de ramnosa, arabinosa y galactosa en algunas regiones de esta cadena se identifican tres estructuras químicas denominadas: ramnogalacturonanas tipo I y II y homogalacturonanas. También pueden estar presentes otros tres polímeros: arabinanas, galactanas y arabinogalactanas, caracterizado por algún tipo de monosacárido (García y Peña, 1995; Taiz y Zeiger, 2007).

2.4.3. Hemicelulosa

La hemicelulosa es un carbohidrato de estructura compleja y heterogénea, formada por diferentes azúcares, dentro de los cuales destacan la glucosa, xilosa, manosa, arabinosa, galactosa y ácido galacturónico. Las hemicelulosas pueden clasificarse en tres grupos de acuerdo con el monosacárido más abundante como la xilanasas, que incluye a las arabinoxilanas y a las xiloglucanas, la mananas que incluyen a las glucomananas, glucuromananas, entre otras y galactanas en las que se encuentran las galactomananas y arabinogalactananas (García y Peña, 1995; Chaudhry, 1998;).

Las hemicelulosas contribuyen a la plasticidad y porosidad de las paredes celulares, lo que es relevante para el intercambio de metabolitos y agua entre las células. Respecto a su interacción con las otras moléculas de la pared celular las evidencias experimentales indican que existen complejos pectinas-hemicelulosas, pectinas-hemicelulosas-proteínas, pectinas-hemicelulosas-proteína-polifenoles y celulosa-hemicelulosa. Estos complejos pueden ser estabilizadas por diversos tipos de interacciones químicas, pero parece que los puentes de hidrógeno juegan un papel importante, ya que se ha demostrado que algunas clases de hemicelulosas forman extensas redes de puentes de hidrógeno entre ellas mismas, con las sustancias pépticas y con las regiones externas, no cristalina, de las microfibrillas de celulosa, lo que podría repercutir en la plasticidad de las paredes celulares (Figura 3; García y Peña, 1995). La digestibilidad de la hemicelulosa puede estar reducida por lignina. Esto se presenta en plantas en estado de madurez que contiene ácido urónico de la hemicelulosa y compuestos fenólicos de lignina (Chaudhry, 1998).

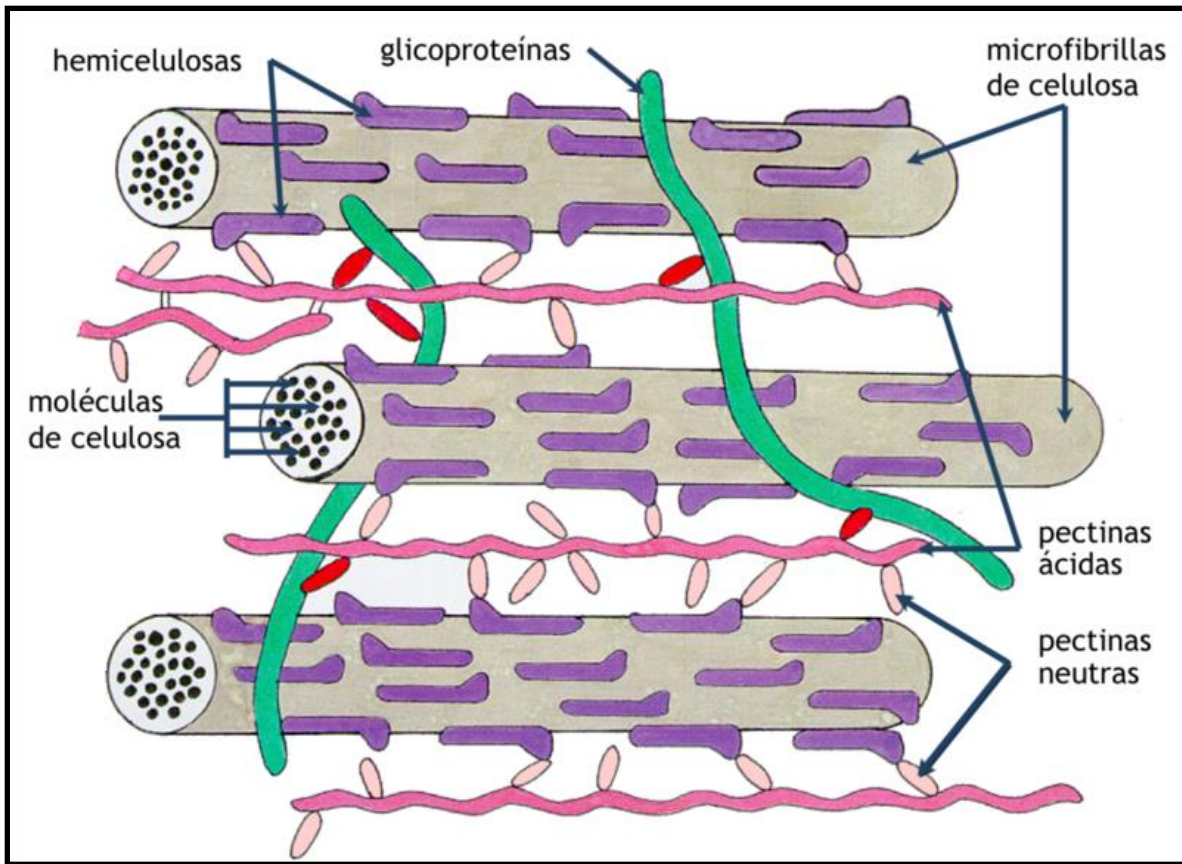


Figura 3. Representación de los puentes de hidrógeno entre las hemicelulosas y entre ellas y las microfibrillas de celulosa (García y Peña, 1995).

2.4.4. Proteínas

La pared celular tiene por lo menos seis tipos de proteínas estructurales y un gran número de proteínas catalíticas o enzimas. Entre las proteínas presentes en la pared celular están las extensinas, proteínas ricas en glicina, prolina, arabinogalactanas, lectinas, tioninas y cisteína. Además, existen otras menos estudiadas como la histidina-triptofano; por otro lado, entre las proteínas catalíticas se han identificado: peroxidasas, invertasas, α y β -manosidasas, β -glucanasas (celulasas), arabinosidasas, α y β -galactosidasas, fosfatasas, pectinasas, pectin-metil-esterasas y malato-deshidrogenasa (García y Peña, 1995).

2.4.5. Lignina

Polímero amorfo, formado por monómeros del fenil-propano; los precursores de la lignina son tres alcoholes aromáticos: cumarol, coniferol y sinapol. La lignina se distribuye entre las microfibrillas de celulosa (Figura 4), incrementando la resistencia a la tensión y la fuerza de compresión de la pared (García y Peña, 1995). La lignina es compuesta de alto peso molecular que le da rigidez a la pared celular de las plantas y limita la disponibilidad de carbohidratos estructurales a la acción de microorganismos ruminales (van Soest, 1994). Un factor importante es que la madurez de plantas incrementa el contenido de lignina dando como resultado una baja digestibilidad. Además de la lignina pueden estar presentes otros compuestos fenólicos, entre los que se destacan con mayor frecuencia están el ácido ferúlico, el cual se esterifica con la arabinosa y la galactosa constituyendo parte de los denominados fenoles hidrolizables (García y Peña, 1995).

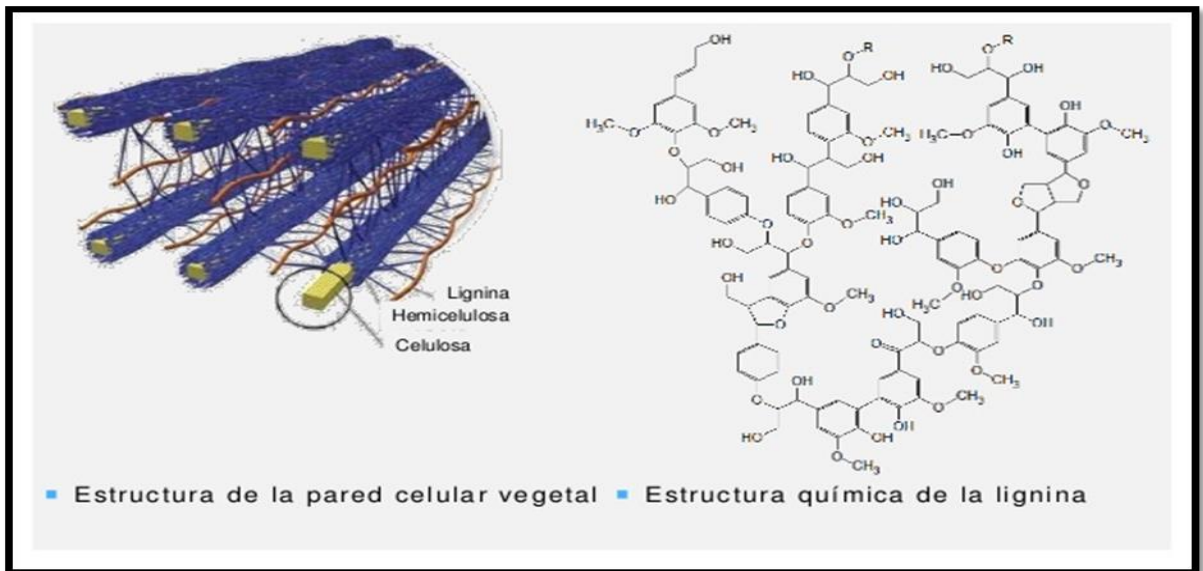


Figura 4. Conformación de la pared celular con la lignina

2.4.6. Sílice

El sílice es un compuesto que complementa a la lignina fortaleciendo la rigidez de la pared celular. Este tiene influencias en el metabolismo de los carbohidratos promueve la acumulación de azúcar y baja el contenido de proteína y lignina. En los pastos el contenido de sílice va a depender de la concentración en el suelo y su disponibilidad, además de la transpiración y especie de planta. En ocasiones se presenta una inhibición en la digestibilidad de la pared celular en algunos forrajes. En forrajes templados puede disminuir la digestibilidad de la MS de 2 a 3 unidades por unidad de sílice. Asimismo, la digestibilidad de la materia orgánica disminuye de 0.5 a 1.5 unidades. Existe una hipótesis que señala que el sílice puede formar complejos con los componentes de la pared celular y mediante este mecanismo disminuir la digestibilidad de la pared celular y afectar la palatabilidad de los forrajes al ser abrasivos (Van Soest, 1994).

2.5. Fermentación de alimentos en los rumiantes

2.5.1. Carbohidratos energéticos y estructurales de los vegetales

Dependiente del sistema de producción en el que estén establecidos, la dieta de los rumiantes se ha basado en pastos, forrajes y cereales (Argel, 2006). Dentro de los granos se encuentra presente un carbohidrato que es estrictamente de reserva energética para el desarrollo de las plantas post germinación. Este es el almidón, el cual puede ser utilizado como energía por las bacterias rumiantes y dependiendo de la especie de cereal del que provenga presenta diferentes tasas de digestibilidad ruminal (Allen, 2000; NRC, 2001) y por las características de sus enlaces es más digestible que los carbohidratos que forman parte de la estructura vegetal (Avellaneda *et al.*, 2009).

Como ya se mencionó la estructuralmente, estos vegetales están formados por cadenas de glucosa y enlaces glucosídicos que forman celulosa, una

agrupación de polímeros de xilosa llamada hemicelulosa (Avellaneda *et al.*, 2009) y si son jóvenes o maduros (edad fenológica) la lignina (Xinxin *et al.*, 2015). Estas fracciones de fibra son indispensables para que los rumiantes ya que puedan mantener una salud adecuada (Lu *et al.*, 2005). Al ser ingeridos por los rumiantes, estos alimentos pasan por un proceso fermentativo que ayuda a digerir forrajes toscos que no son de importancia para otras especies de mamíferos (Agrawal *et al.*, 2014). En este proceso, los carbohidratos son degradados a sus respectivos monómeros y la energía liberada es ocupada por los microorganismos ruminales los cuales, derivado del proceso de fermentación generan ácidos grasos volátiles y proteína microbiana de los que se pueden nutrir directamente al rumiante (Church, 1993).

La cámara fermentativa donde se da este proceso es el rumen, el cual es indispensable para la degradabilidad de la fibra; el proceso fermentativo se da en el retículo-rumen que cuenta con el 75 % de tracto gástrico del rumiante (Church, 1993), donde la degradación mecánica de los forrajes es fundamental para incrementar el volumen donde actúa la microbiota (Guerin *et al.*, 2006). Además, son involucradas otras tres estructuras (retículo, rumen y omaso) que fermentan los alimentos a través de procesos complejos (Romero, 2012). El omaso recibe el bolo alimenticio proveniente del rumen y lo compacta para extraer el agua y reabsorberla para llevarlo al abomaso que tiene actividad glandular liberando enzimas digestivas y absorber los nutrientes de sobrepaso en el duodeno (Clauss *et al.*, 2016).

2.5.2. Microorganismos ruminales y su papel en la fermentación

El rumen por sí solo, no cuenta con enzimas que puedan hidrolizar las uniones de glucositos β 1,4 y 1,6 que contienen los carbohidratos estructurales (Galindo *et al.*, 2017). La degradación de estos enlaces lo realizan las bacterias, hongos y protozoarios ruminales (Cuadro 3; Agrawal *et al.*, 2014), que de forma simbiótica utilizan las fracciones indigestibles de la fibra para obtener energía y genera productos de desecho que utilizan los rumiantes como nutrientes (Bravo & Wall,

2016). La adhesión correcta de estos microorganismos a los sustratos beneficia la hidrólisis de las paredes vegetales y así la degradación de los alimentos (Flint *et al.*, 2012; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2015).

Cuadro 3. Principales microorganismos ruminales degradadores de fibra.

Genero	Microorganismos
Bacterias	<i>Butyrivivrio fibrisolves</i>
	<i>Fibrobacter succinogenes</i>
	Ruminococcus albus
	<i>Ruminococcus flavefasie</i>
Hongos	<i>Neocallimastix</i>
	Piromyces
	<i>Orpinomyces</i>
Protozoarios	<i>Epidinium</i>
	Diplodinium

Adaptado de White *et al* (1993)

De los microorganismos presentes en el ambiente ruminal, las bacterias son la población más abundante, al agrupar el mayor porcentaje del microbioma (Hungate, 2013). Algunas de estas bacterias son específicas en la degradación de componentes y por ello pueden clasificarse (Louis y Flint, 2009). Como es el caso de las bacterias celulolíticas, las cuales son de importancia para romper los enlaces de celulosa (Kamra, 2005) sin embargo, algunas de estas bacterias no pueden romper estructuras de xilano, por lo que pueden hacer sinergia con otros microorganismos que tienen disponibles hemicelulasas y pectinasas (Flint *et al.*, 2012). Por su parte, las bacterias amilolíticas como *Ruminobacter amylophilus*, son las más encargadas de la desaparición del almidón (Pereira *et al.*, 2016). Para que el proceso de degradación del almidón se realice se necesita primero de la acción de enzimas celulolíticas para poder liberar el almidón presente en la capsula de los granos. Estas bacterias también aportan proteína que puede ser

utilizada por los rumiantes, situación que puede disminuir la inclusión de ingredientes proteicos en las raciones (Wright y Klieve, 2011).

Otros microorganismos importantes en el funcionamiento ruminal son hongos y levaduras, los cuales, son principales productores de enzimas fibrolíticas, por lo que suelen predominar en el rumen de animales que consumen raciones con alto porcentaje de fibra (Belanche *et al.*, 2012). Estos, tienen una elevada proporción de enzimas y además, por su rizoide se adhieren con gran fuerza al sustrato acelerando la digestión de partículas fibrosas (Lee *et al.*, 2000). Los organismos fibrolíticos necesitan del funcionamiento digestivo de protozoarios y arqueas metanogénicas, las cuales en una relación simbiótica utilizan el hidrógeno que es liberado de la degradación de paredes ruminales y lo eliminan junto a otros productos de desecho (Ishaq *et al.*, 2017). Por esta razón, se suele afectar la población de estas bacterias cuando se hacen cambios bruscos de ración (Morgavi *et al.*, 1994), sin embargo, existen reportes de bacterias fibrolíticas que pueden resistir pH ácidos que generan dietas alcalinas, los géneros *Alternaria ssp* y *Mucor spp* han sido reportados en cereales y en inóculos ruminales de animales que consumen concentrados (Lee *et al.*, 2015). Se ha reportado que el incremento de protozoarios ruminales ayuda a la depredación de bacterias fibrolíticas alterando su desarrollo (Morgavi *et al.*, 1994).

Dependiendo del porcentaje de carbohidratos energéticos de las raciones, los protozoos pueden representar hasta el 50 % de la microbiota ya que están implicados en la digestión del almidón (Wright y Klieve, 2011). Con este porcentaje la población bacteriana del rumen puede disminuir afectando el aporte de proteína microbiana, por lo que es importante considerar este aspecto al balancear raciones para finalización (Abreu *et al.*, 2004). Existen algunas técnicas encargadas de defaunar de protozoarios a rumiantes con el objetivo de incrementar la digestibilidad y así optimizar el aporte de energía y mejorar la ganancia de peso (Bello y Escobar, 1997). Algunos protozoarios como las arqueas, a través de unas estructuras con las que cuentan (hidrogenosomas)

utilizan el hidrogeno y el CO₂ liberados del proceso de fermentación ruminal y forman CH₄ como desecho, en un proceso de transferencia de hidrógenos que es determinante para que no se acumule en rumen y tenga consecuencias desfavorables (Castillo-González *et al.*, 2014).

De acuerdo con Pickering *et al.* (2015) como resultado de este proceso fermentativo se obtienen principalmente ácidos grasos volátiles (AGV; acetato, propionato y butirato), importantes ya que estos pueden ser transformados en energía en el hígado de los rumiantes y gases secundarios de nula importancia nutricional como metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂).

2.5.3. Ácidos grasos volátiles

Derivado del proceso de digestión de los carbohidratos estructurales, se obtienen gases de deshecho provenientes del proceso fermentativo. Algunos de estos gases son amoníaco, ácidos orgánicos (succinato, formato, lactato), algunos productos de desecho como etanol, dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y se obtienen ácidos grasos volátiles (Posada y Noguera, 2005). Los ácidos grasos volátiles (AGV) principales son acetato, propionato y butirato y representan hasta el 80 % de la energía metabolizable del rumiante (Siciliano-Jones y Murphy, 1989), siendo el propionato el principal precursor de glucosa (DeFrain *et al.*, 2005). Por su parte, mucho del porcentaje de butirato que se produce es transformado de forma inmediata en β-hidroxibutirato y es almacenado como energía de reserva en forma de grasa y algunas células ruminales lo utilizan para obtener energía (Tagang *et al.*, 2010). Mientras tanto, el ácido acético tiene funciones fisiológicas ya que algunos autores le adjudican propiedades procinéticas gastrointestinales y además puede aportar una parte de la grasa de la leche (Scheppach, 1994).

Cada uno de estos ácidos tiene proporciones molares las cuales pueden variar dependiendo de la ración administrada por ejemplo, se estima que los corderos que consumen raciones formuladas con alta inclusión de forrajes aportan

70 % de butirato, 20 % de propionato y 10 % de butirato y los corderos que consumen concentrados con altos porcentajes de granos 50:35:15, respectivamente (Remond *et al.*, 1995). La absorción de estos se da 90 % en rumen y 10 % en omaso e intestino (France y Dijkstra, 2005).

2.6. Uso de los cereales para producción de pequeños rumiantes

La utilización de cereales en la alimentación de pequeños rumiantes es de importancia cuando se busca mejorar los rendimientos productivos. En la actualidad a nivel mundial la demanda de los cereales es ocupada principalmente por el uso de la industria pecuaria, seguido del consumo humano que es casi igualado por la industria de producción de biodiesel (FIRA, 2014a). Además de la saturación en la utilización de los cereales como maíz, se ha reportado una disminución en el cultivo de este cereal provocado por el cambio climático, ya que se ha disminuido la cantidad y calidad de este cereal por ser susceptible a temperaturas extremas (Gutiérrez *et al.*, 2018). Por lo que el mercado de granos puede ser afectado por demanda, disponibilidad del producto y estacionalidad del cultivo.

Además del impacto en el precio de los cereales, la saturación del uso de estos y el incremento en el costo de producción y venta (Romero, 2012), se ha incrementado la crisis alimentaria (FAO, 2015), lo cual incrementa la cantidad de hambruna en el mundo (Katz *et al.*, 2008). Además, el incremento exponencial de la población, el cambio de uso de suelo de agrícola a habitacional, la competencia humana-animal y la producción de bioetanol agravan la crisis alimentaria (Hochman *et al.*, 2014). Por esto, de forma anual se agotan las reservas mundiales de cereales y se reportan incrementos en los precios (FIRA, 2015).

Aunque su utilización mejora la digestibilidad y el aporte de energía mejorando los rendimientos productivos de bovinos, caprinos y ovinos, es importante buscar alternativas y estrategias tecnológicas que puedan reducir la

inclusión de cereales y tengan la capacidad de mantener o mejorar la producción (Bargo *et al.*, 2002). En este sentido, la utilización de estrategias que mejoren la digestibilidad de forrajes o incrementen sus aportes de energía podría ayudar a reducir las inclusiones de maíz, sorgo y otros cereales ya que, los rumiantes pueden obtener nutrientes de los forrajes (Beker *et al.*, 2009; Meale *et al.*, 2013).

2.7. Importancia de los forrajes en la alimentación de rumiantes

Los forrajes son las partes vegetativas de las gramíneas o de las leguminosas que contienen una alta proporción de fibra (más de 30 % de FDN). Los forrajes son requeridos en la dieta de rumiantes en forma física tosca (partículas de 1 a 2 mm de longitud). Una fuente de fibra en las dietas de rumiantes son los residuos de cosechas y subproductos agroindustriales de baja calidad nutritiva, estos residuos son las partes de las plantas que quedan en el campo después de cosechar el cultivo principal (rastrajo de maíz, paja de cereales, bagazo de caña de azúcar entre otros). La forma de ofrecer los forrajes ó residuos de cosechas puede ser pastoreo, cosechados ó preservados (ensilados) y tratados (con productos químicos, enzimas fibrolíticas exógenas entre otros) (Wattiaux y Howard, 2001).

La fibra contenida en los forrajes es un nutriente que contribuye al mantenimiento del funcionamiento ruminal (llenado y estímulo de las contracciones ruminales) y de las condiciones ruminales (pH), lo cual está en función de la composición de la fibra, la degradación y la forma de presentación al ofrecerla (Calsamiglia, 1997).

2.8. Disponibilidad de los forrajes para alimentación de rumiantes

Las estaciones del año y las variaciones en el ambiente relacionadas con la localización geográfica alteran la calidad de forraje, aun cuando los forrajes se cosechen en estados morfológicos similares (Ramírez, 2003). Las gramíneas contienen un mayor contenido de proteína en primavera y al principio de verano,

épocas en que el crecimiento es más activo que en el otoño y el invierno (Morrison, 1985).

Los forrajes son usados extensivamente en las regiones tropicales de México para la alimentación del ganado lechero y carne o de doble propósito. Éstos se caracterizan por contener un alto porcentaje de fibra detergente neutra (FDN) y un bajo contenido de proteína cruda (PC). Estas características químicas determinan que los pastos tengan baja digestibilidad y por lo tanto menor consumo voluntario de la materia seca (MS), y bajo aporte de nitrógeno para la síntesis microbiana en el rumen. Este problema se agrava en el período de secas, donde se refleja en una baja producción de los animales y, en algunos casos, éstos ni siquiera pueden cubrir los requerimientos de energía para el mantenimiento del peso vivo (Ku *et al.*, 1999). En la región templada en México las mayores producciones de forrajes se obtienen en la primavera y verano, disminuyendo en otoño e invierno (Núñez *et al.*, 2002).

2.9. Factores que afectan la digestibilidad de la fibra

La digestibilidad de la fibra (potencial de fermentación), se encuentra en función de la velocidad con la cual la fibra es fermentada y el tiempo de retención en el rumen. La tasa de digestión (fibra digerida por unidad de tiempo), depende de las características fisicoquímicas de la fibra (Allen y Mertens, 1988). La tasa de pasaje también tiene un efecto sobre la digestibilidad de la fibra, cuando la tasa de pasaje se incrementa la digestibilidad baja. La tasa de pasaje está en función del tiempo de retención el cual va a depender del tipo de dieta, edad del animal, tamaño de partícula entre otros (Allen y Mertens, 1988).

La fracción indigestible de la fibra tiene efecto sobre el consumo y digestibilidad de la MS de los forrajes, esta fracción se relaciona con el contenido de lignina presente. La lignina puede ser solubilizada durante la fermentación dependiendo de la planta y el estado de madurez. El contenido de lignina va de 5

a 25 % del contenido celular de la planta con valores altos para leguminosas que para pastos (Allen y Mertens, 1988). La lignina de los pastos es considerada más soluble en álcalis que la lignina contenida en las leguminosas. El problema de la lignificación es que la digestibilidad está regulada por las características intrínsecas de la celulosa vegetal, que de los componentes y la proporción de estas fracciones bioquímicas (FDA y FDN). Las leguminosas generalmente muestran grandes uniones de lignina con celulosa y pequeñas uniones de hemicelulosa y los pastos presentan unas mayores uniones de lignina con la hemicelulosa.

Los taninos están presentes en árboles forrajeros, leguminosas, cereales y granos y son una limitante para la utilización de los alimentos. El efecto antinutricional está asociado con su habilidad para combinarse con las proteínas, polímeros como la celulosa, hemicelulosa y pectina, y minerales afectando su digestibilidad (McSweeney *et al.*, 2001).

El tamaño de partícula juega un papel importante en la digestibilidad de la fibra cuando se tienen partículas pequeñas se incrementa el flujo hacia retículo-omaso con un menor tiempo de retención en el rumen, disminuyendo la digestibilidad con un mayor consumo y cuando las partículas son grandes existe un incremento en la rumia y un mayor tiempo de retención en rumen (Allen y Mertens, 1988). Por tanto, la digestibilidad de la fibra está directamente relacionada con la acción de los microorganismos ruminales que depende del número de microorganismo, la disponibilidad de sitios para colonizar, la cantidad de fibra, las especies presentes y la habilidad de estas para colonizar la fibra.

Así mismo la acción de los microorganismos va a estar afectada por la presencia de sustrato, tasa de dilución y depredación de bacterias por los protozoarios. Biológicamente puede estar afectada por afinidad al sustrato, mecanismos que regulan el catabolismo, requerimientos para mantenimiento y un máximo crecimiento microbiano. Los factores fisicoquímicos del ambiente ruminal

como el pH, potencial de oxido-reducción, temperatura, presión osmótica, presión hidrostática y viscosidad, así como la disponibilidad de N-NH₃ afectan la digestibilidad de la fibra por microorganismos ruminales (Allen y Mertens, 1988).

2.10. Aditivos que mejoran digestibilidad de forrajes

Debido a la demanda de alimentos, la problemática mundial en la utilización de cereales y el necesario incremento de la producción pecuaria es necesaria la búsqueda de tecnologías y estrategias que puedan mejorar la digestibilidad de compuestos fibrosos y así disminuir la inclusión de granos en las raciones (Eckard *et al.*, 2010). Dentro de las alternativas más utilizadas para el mejoramiento productivo, se encuentra el uso de aditivos alimentarios.

Algunas características de los aditivos son mejorar la palatabilidad y la calidad bioquímica de las raciones, satisfacer algunas necesidades alimenticias de los animales, disminuir el impacto ambiental secundario a las actividades ganaderas mediante modificaciones de la microbiota ruminal, tener efecto sobre la disminución parasitaria y mejorar las variables productivas (Durmic *et al.*, 2014). En este sentido, Plascencia (2015) menciona que tienen la capacidad de mejorar el comportamiento productivo o las características de los productos finales por medio del mejoramiento de las raciones.

2.10.1. Prebióticos y Probióticos

La utilización de probióticos y prebióticos en raciones para rumiantes podría tener efectos positivos en su salud digestiva ya que se incrementa el porcentaje de bacterias anaerobias y celulolíticas ruminales lo cual causa un incremento en su actividad y disminuye el sustrato para bacterias patógenas o que no tienen importancia en la producción de ácidos grasos volátiles (Martínez y Rodríguez, 2018). Otro de los beneficios reportados es la competencia con bacterias ácido-lácticas por los azúcares disponibles, disminuyendo la incidencia de acidosis

ruminales y manteniendo el pH adecuado para que se realice la fermentación (Razo, 2018). Estas mejoras podrían traducirse en mejoras para la degradación de fibra y en la producción de ácidos grasos volátiles lo que mejoraría la producción.

2.10.2. Antibióticos en rumiantes alimentados con forrajes

Una de las cualidades de los promotores del crecimiento es la disminución de bacterias Gram positivas ruminales siendo uno de los métodos de incremento en el comportamiento productivo y la disminución de gases de efecto invernadero (McAllister y Newbold, 2008). La desventaja mayor de su utilización es el impacto negativo a la salud pública por el riesgo que implica la resistencia bacteriana a los antibióticos por lo que la Unión Europea ha prohibido su utilización (Anadón *et al.*, 2006; Jouany y Morgavi, 2007; Thrune *et al.*, 2009).

Los químicos más utilizados son monensina y lasalocida, los cuales se encuentran dentro del grupo de los ionóforos y fueron descubiertos buscando un tratamiento para las coccidiosis sin embargo, se encontraron incrementos en propionato ruminal y mejor relación acético:propiónico en los animales que recibían tratamiento (Martineau *et al.*, 2007; Takahashi, 2011). De esta misma forma, la utilización de antibióticos como aditivos nutricionales ha sido parte del incremento del ácido propiónico sin reportarse acidosis ruminales, disminuciones en las emisiones de gases de efecto invernadero y mejor utilización de la proteína (Jouany y Morgavi, 2007; Kobayashi, 2010), beneficios que mejoran el rendimiento productivo (Russell & Houlihan, 2003). Existe evidencia de que los ionóforos han generado resistencia bacteriana cuando se utilizan a largo plazo por lo que, también disminuye su efecto productivo (Kobayashi, 2010).

2.10.3. Enzimas

Como ya se mencionó anteriormente, la pared celular de las plantas está constituida por celulosa, hemicelulosa y lignina que para su degradación, las enzimas de microorganismos ruminales hidrolizan para degradar celulosa y hemicelulosa, pero la red conformada por compuestos fenólicos es altamente indigestible y no aprovechable en nutrición de rumiantes (Giraldo *et al.*, 2008). La mayoría de los forrajes ofrecidos a los rumiantes sobre todo a los de sistemas extensivos, son bajos en digestibilidad por el estado de lignificación de la planta (Rojo-Rubio *et al.*, 2007), por lo que se han buscado alternativas para incrementar la digestibilidad.

Las enzimas son catalizadores proteínicos que regulan la velocidad a la cual se realizan procesos biológicos. Se encuentran en las más notables de las biomoléculas conocidas debido a su extraordinaria especificidad y a su poder catalítico (Lenninger, 1993). La catálisis es un incremento de la velocidad de reacción química con un incremento en la temperatura. El término de sustrato se describe como la sustancia con la cual la enzima es activada. Algunas reacciones enzimáticas requieren además de enzima y sustrato, una estructura no proteica o cofactor para la eficiencia en la reacción de catálisis enzimática. Así mismo el término de inhibidor es usado para describir el rango de compuestos que reducen la tasa de reacción enzimática. El uso de estas enzimas ha tomado fuerza después de que se prohibiera el uso de promotores de crecimiento en la alimentación animal por la unión Europea en el 2006 y debido al desarrollo biotecnológico se ha facilitado su obtención y disminuido los costos de su producción (Inal *et al.*, 2010).

Para la caracterización precisa de una enzima es importante estandarizar las unidades en que se exprese su actividad. La Comisión Internacional de Enzimas recomiendan la siguiente definición: unidad internacional (UI) de una enzima es definido como la cantidad con la cual se puede catalizar la

transformación de 1 micromol de sustrato por minuto, o donde más de una ligadura de cada molécula de sustrato es atacada, 1 microequivalente del grupo interesado por minuto bajo condiciones definidas. La actividad específica se expresa como unidades de enzima por miligramo de proteína. La actividad molecular es definida como unidades por micromol de enzima a una concentración óptima de sustrato, que es el número de moléculas de sustrato transformado por minuto por molécula de enzima (Hall *et al.*, 1982).

Esta clasificación depende de los sustratos en los que actúe la enzima por ejemplo, las fibrolíticas (celulolíticas o xilanasas) responsables de la degradación de los compuestos fibrosos. Las celulasas son enzimas capaces de degradar celulosa en la pared celular de los forrajes, mientras que las xilanasas permiten descomponer los xilanos en oligosacáridos, los cuales pueden ser utilizados como energía (Rojo-Rubio *et al.*, 2007). La obtención de estas enzimas exógenas es mediante algunas especies bacterianas (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus faecium*), hongos y levaduras (*Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei* y *Saccharomyces cerevisiae*), siendo *Saccharomyces* la levadura enzima más utilizada en nutrición de rumiantes (Throne *et al.*, 2009).

Al adicionar enzimas fibrolíticas se ha reportado aumento de la digestión ruminal de la fibra, lo cual, también ha mejorado la producción. Para adicionar los compuestos enzimáticos se ha probado adicionarlos de forma directa a los concentrados o aplicarlo de forma previa a los forrajes antes de ser consumidos por el animal (Dean *et al.*, 2008; Ranilla *et al.*, 2008). Por lo cual, son atractivas en raciones que incluyen alto porcentaje de inclusión de forrajes de buena calidad como alfalfa o forrajes conservados como ensilado de maíz para mejorar la digestibilidad (Giraldo *et al.*, 2008). Al incrementarse la digestión de las paredes celulares también han mostrado incremento en el aporte de energía de las raciones al incrementar la disposición de los azúcares contenida en los enlaces de la fibra tosca (Muwalla *et al.*, 2007; Avellaneda *et al.*, 2009). En este sentido, Valdes *et al.* (2014) reportaron aumento del consumo voluntario, mayor ganancia

diaria de peso y por lo tanto mayor conversión alimenticia al utilizar enzimas fibrolíticas en una ración para corderos con forraje como ingrediente principal.

La actividad enzimática es afectada por diversos factores de los cuales los más importantes son concentración de sustrato, cofactor, enzima, pH y temperatura con la cual la reacción es procesada.

2.10.3.1. Concentración de sustrato y su influencia en la reacción enzimática

En la concentración de sustrato, mientras no hay catálisis la reacción química muestra una relación lineal con respecto a la concentración de sustrato. La tasa de catálisis de la reacción de la enzima muestra un efecto de saturación con un incremento en la concentración de sustrato. A una baja concentración la velocidad de la reacción es directamente proporcional a la concentración de sustrato, pero como la concentración se incrementa, la velocidad de la reacción declina dando como resultado una hipérbola.

La ecuación de Michaelis-Menten describe la relación entre la velocidad de reacción de la enzima y la concentración de sustrato.

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_s + S}$$

Cuando S es igual a K_s, V es igual a ½ V_{max}. La concentración del sustrato se encuentra al dar la velocidad media es conocida como la constante de Michaelis (K_m), bajo esta condición K_m = K_s. En una reacción enzimática, la relación entre la disociación constante y la velocidad constante pueden ser más compleja y el K_m puede no igualar la disociación constante del complejo enzima sustrato. El K_m es definido como la concentración de sustrato la cual da la velocidad media máxima y normalmente se mide en moles /litro (Hall *et al.*, 1982).

2.10.3.2. Relación del pH

El pH puede influir de diferentes maneras en el sustrato y la enzima. Los valores extremos de pH pueden dar cambios en la estructura de la proteína de la enzima que son irreversibles alterando la estabilidad de la enzima. Los cambios iónicos del sustrato pueden afectar la unión de sustrato con la enzima. Así mismo los cambios iónicos en la molécula de la enzima pueden afectar la afinidad con el sustrato, al modificar el K_m y la V_{max} (Hall *et al.* 1982).

2.10.3.3. Temperatura

En general al elevarse la temperatura se incrementa la velocidad de la reacción enzimática. Este efecto es un resultado de la interacción de dos factores. El primero es un efecto directo de una cinética en la velocidad de reacción y resulta en un incremento en la velocidad. El segundo efecto se relaciona con la estabilidad de la enzima y envuelve una inactivación de la enzima o desnaturalización de la proteína de la enzima (Hall *et al.*, 1982).

2.10.4. Inhibidores de enzima

Los inhibidores de enzima se clasifican como competitivos y no competitivos. Los inhibidores competitivos afectan al sustrato, y su efecto se puede reducir al incrementar el sustrato. El inhibidor no competitivo se combina con la enzima en algunos casos puede reducir su actividad, pero no son afectados cuando se incrementa la concentración de sustrato. La inhibición de la enzima puede ser reversible (Hall *et al.*, 1982).

2.10.5. Celulasas y xilanasas

Las celulasas y xilanasas son producidas por bacterias y hongos aerobios, anaerobios, mesófilos, termofilos y extramofilos. Los hongos y bacterias aerobios generalmente producen celulasas y hemicelulas extracelulares. Las bacterias (*Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Acetivibrio cellulolyticus*) y hongos anaerobios (*Neocallimastix frontales*, *N. patriciarum*, *Piromyces equi*) producen celulasas en forma de un complejo multienzimático (Bhat y Hazlewood, 2001). Los sistemas de celulasas contienen endoglucanasa (1, 4- β -D-glucan glucanohidrolasa), exoglucanasa o celobiohidrolasa (1, 4- β -D-glucan celobiohidrolasa) y β -glucosidasa o celobiasa (β -D-glucosida glucohidrolasa) (Bhat y Hazlewood, 2001).

Para determinar la actividad de celulasas se utiliza la carboximetil celulosa, asimismo se ha encontrado que algunas endoglucanasas actúan en sinergismo con celobiohidrolasas durante la solubilización de celulosas cristalina. La actividad de la celobiohidrolasa es determinada por medio de la producción de azúcares reductores utilizando como sustrato el Avicel (celulosa cristalina). La actividad de la β -D-glucosida se determina por la producción de glucosa y *o-l-p*-nitrofenol para celobiosa y *o-l-p*-nitrofenil para β -D-glucosa. La actividad total de las celulasas comprende la actividad de la endoglucanasa, la exoglucanasa y la β -glucosidasa, esta actividad enzimática está determinada por la solubilización de la fibra de algodón, papel filtro ó Avicel los cuales contienen un alto porcentaje de celulosa cristalina. La actividad de la xilanasas generalmente se determina por la producción de azúcares reductores relacionados con la hidrólisis de xilan (Bhat y Hazlewood, 2001).

Los ensayos cualitativos se realizan para seleccionar microorganismos por tinción que produzcan niveles altos de celulasas y xilanasas o para identificar y caracterizar estas enzimas. Dentro de los sustratos utilizados para los ensayos cualitativos de enzimas están el xilan insoluble y el remazol brillante azul-xilan que

son los ideales para seleccionar microorganismos productores de xilanasa en un medio de agar sólido. Similares métodos usan remazol brillante azul -carboximetil-celulosa o carboximetil-celulosa pueden ser utilizados para seleccionar microorganismos productores de endoglucanasa, los cuales son teñidos con congo rojo (Bhat y Hazlewood, 2001).

2.11. Especificidad de sustratos para celulasas y xilanasas

Las endoglucanasas son específicas para separar ligaduras β -1, 4-glucosídico de celulosa amorfa, aumentan y sustituyen celulosa y celuolisacáridos. Algunas endoglucanasas son inactivas sobre celulosa cristalina y celobiosa, pero pueden actuar sobre los enlaces β -1, 3 y β -1, 4 de la glucosa de la cebada. Las celobiohidrolasas y exaglucanasas son altamente activas sobre la celulosa amorfa, pero también degradan celulosa cristalina y celuolisacáridos pero es baja la degradación. Estas enzimas actúan sobre uniones β -1, 4 de cadenas de celulosa, pero son inactivas sobre celobiosa, carboximetil y hidroxietil celulosa. Las β -glucosidasas se pueden clasificar como aril β -D-glucosidasas (hidrolizan exclusivamente aril- β -D-glucosídico), celobiosas (hidrolizan diglucosídicos y celuoligosacáridos) y β -glucosidasas que se caracterizan por hidrolizar aril y alfil β -D-glucosídico y β - 1,1-, β - 1,2-, β - 1,3-, β - 1,4-, y β - 1,6- ligado a diglucosídico, además substituye o no celuolisacáridos (Bhat y Hazlewood, 2001).

2.11.1. Modo de acción de celulasas y xilanasas

Todas las endoglucanasas actúan aumentando y sustituyendo las regiones amorfas de la celulosa al azar y relacionándose con glucosa, celobiosa y celuolisacáridos. Las celobiohidrolasas hidrolizan H_3PO_4 - aumentando celulosa y Avicel secuencialmente por remoción de unidades de celobiosa de reducción o no reducción final de la cadena de celulosa. Las endoglucoanasa y celobiohidrolasa actúan juntas sobre la hidrólisis de celulosa cristalina. Posteriormente la β -

glucosidasa completa la hidrólisis al separar los celuloligosacáridos y celobiosa ha glucosa (Bhat y Hazlewood, 2001).

Algunos hongos como el *Penicillium pinophilum* y *Talaromyces emersonii*, producen una exoglucanasa que cataliza la remoción de glucosa de la no reducción final de celudextrinas, pero no interactúan con endoglucanasas durante la hidrólisis de celulosa cristalina. Hongos anaerobios como el *Neocallimastix frontalis*, *Neocallimastix patriciarum*, usan diferentes mecanismos para degradar celulosa comparados con los hongos aerobios. El *Neocallimastix frontalis* produce un componente de enzimas denominado factor de solubilización de celulosa cristalina. El factor de solubilización de celulosa cristalina del *Neocallimastix frontalis* está formado por endoglucanasa, β -glucosidasa y probablemente celobiohidrolasa (Bhat y Hazlewood, 2001).

Las celulasas de origen bacteriano adoptan diferentes mecanismos para la hidrólisis de celulosa. Los hongos aerobios *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Thermoactinomyces*, *Thermobifida fusca* y *Microbispora* y el anaerobio *Clostridium stercorarium* produce un sistema de celulasas similar a los hongos aerobios y degradan celulosa por la cooperativa interacción del sistema de celulasas. En contraste las bacterias termofilicas anaerobias como la *Clostridium thermocellum* degradan celulosa cristalina efectivamente por medio de una alta masa molecular multienzimática llamada celulosoma (Bhat y Hazlewood, 2001).

El modo de acción de las endoxilanasas de origen fungal y bacteriano, es separando el enlace β -1, 4 del xilan relacionados con xilobiosa, xilotriosa y sustitución de oligomeros que tienen dos a cuatro residuos. La hidrólisis completa del xilan requiere del sinergismo de varias enzimas con diferentes sitios de acción. Existen tres tipos de sinergismo entre las enzimas para la hidrólisis del xilan, el homosinergismo de la *Neurospora crassa*, *Talaromyces byssochlamydoides* y *Trichoderma barziamon*, donde las endoxilanasas de varias especies, o mezcla de endoxilanasas y β -xilosidasas, cooperan en la hidrólisis del xilan. El

heterosinergismo se ha reportado entre ácido ferulico esterasas y endoxilanasas, α -L-arabinofuranosidasas y endoxilanasas, acetil xilan esterasas y endoxilanasas, ó entre α -glucoronidasas y endoxilanasas. El anti sinergismo ocurre cuando la acción de un tipo de enzima evita la acción de una segunda enzima (Bhat y Hazlewood, 2001).

2.12. Actividad enzimática en pruebas *in vitro*

Existen diversos trabajos *in vitro*, para determinar la actividad de enzimas fibrolíticas, con el objetivo de evaluar si pueden ser utilizados como aditivos para incrementar la degradabilidad de la fibra en dietas para rumiantes. Algunos de esos trabajos son como los aportado por Nsereko *et al.* (2000) quienes realizaron un ensayo con sustratos puros para determinar la actividad enzimática de enzimas fibrolítica comerciales como: Sumizyme X (SX), Multifect xilanasa (MX), Liquicell 2500 (LQ), Depol 40 (DP) y unas mezclas de enzimas (B y PB), las enzimas se originan de *Trichoderma spp.* A pesar de que las enzimas se originan de *Trichoderma spp* su actividad es diferentes con respecto a los sustratos. La actividad celulolítica (celulosa y celulosa 1, 4- β celobiosidasa) de la β -glucanasa y la 1,3, (4)- β -glucanasa, fueron altas para SX (496 y 257 μmol de glucosa por g de enzima min^{-1} respectivamente), LQ (503 y 116 μmol de glucosa respectivamente) y bajo para MX (101 y 20.80 μmol de glucosa por g de enzima min^{-1} respectivamente). Así mismo, SX (198 y 137 μmol de glucosa por g de enzima min^{-1}) contiene altos niveles de actividad endo-1,4- β -xilanasa y α -amilasa, pero ambas actividades fueron bajas en LQ (90.5 y 7.37 μmol de glucosa por g de enzima min^{-1} respectivamente). En la MX la actividad predominante fue la actividad xilanásica (130 μmol de glucosa por g de enzima min^{-1}) y bajas actividad celulolítica, β -glucanasa y endo-1, 3, (4)- β -glucanasa (101 y 20.80 μmol de glucosa por g de enzima min^{-1} respectivamente). La SX y LQ contienen altos niveles de actividad de β -glucosidasa (7595 y 4118 μmol de glucosa respectivamente), varían entre 5 y 20 puntos que las preparaciones de las otras enzimas.

La actividad de la β -D-xilolasidasa y la α -L-arabinofuranosidasa fueron altas para MX (4300 y 478 μmol de glucosa por g de enzima min^{-1} respectivamente) y PB (843 y 1832 μmol de glucosa por g de enzima min^{-1} respectivamente); β -galactosidasa fue alta para DP (3006 μmol de glucosa por g de enzima min^{-1} respectivamente) y baja para PB (55.40 μmol de glucosa por g de enzima min^{-1} respectivamente), pero tuvieron baja actividad en los otros sustratos. La MX y SX contenían alta actividad del acetil xilan esterasa (38253 y 53575 μmol de glucosa por g de enzima min^{-1} respectivamente) de 7 a 10 puntos más que las otras preparaciones (Nsereko *et al.*, 2000).

Por su parte, Morgavi *et al.* (2001) determinaron la actividad enzimática de cuatro preparaciones comerciales de *Trichoderma longibrachiatum* (A, B, C, y D) y una preparación E de origen fungal. La actividad celulolítica fue de 337, 468, 243, 396 y 316 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ (micromoles de azúcares reductores por minuto por gramo de producto enzimático) para las preparaciones A, B, C, D y E respectivamente, y de 2736, 1200, 2120, 342 y 600 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ para actividad xilanásica de las preparaciones A, B, C, D y E respectivamente.

Al igual que Colombatto *et al.* (2003b) evaluaron la hidrólisis de celulosa (C), xilan (X) y una mezcla de celulosa con xilanolítica (CX), con diferentes niveles de enzima (0.51, 2.55 y 5.1 $\mu\text{L g}^{-1}$ de MS), encontraron un incremento significativo de azúcares reductores para X y CX después de 20 h de incubación a 20 °C. Con C solo el nivel más alto de enzima incrementó la relación de azúcares reductores. Posteriormente Colombatto *et al.* (2003c) determinaron la actividad enzimática de dos productos enzimáticos observando actividad xilanásica de 28 a 3228 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$, endoglucosidasa de 0 a 1047 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$, exoglucanasa de 0 a 181 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ y xilosidasa de 0 a 20 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$.

Sin embargo, Krause *et al.* (1998), determinaron la actividad enzimática de un producto comercial (Promote), que contenía actividad celulolítica, xilanásica y bajos niveles de amilasa; la actividad enzimática fue 31.0 y 43.4 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$

para celulasas y xilanasas respectivamente (incubados a 50 °C a un pH 5.5). Al respecto Rode *et al.* (1998) reportaron la actividad del Promote de 25.9 UI ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$), 51.4 UI para actividad celulolítica y xilanásica respectivamente (incubados a 39°C a un pH 6.5).

Por su parte, Yang *et al.* (2000) observaron que la actividad celulolítica y xilanásica fue de 1168 ± 17 UI (nanomoles de azúcares reductores por miligramo de producto enzimático por minuto) y 138 ± 13 UI respectivamente, donde el producto enzimático se originó de *Trichoderma longibrachiatum* (incubados a 39°C a pH 6.5 por 1 h).

2.13. Actividad enzimática en pruebas de digestibilidad *in vitro*

Existen varios reportes en donde obtienen la efectividad del extracto enzimático sobre la digestibilidad empleando técnicas *in vitro*, tal como lo realizado por Morgavi *et al.* (2000a) reportan que la β -1,4-endoglucanasa con preparación de carboximetilcelulosa en presencia de líquido ruminal fue estable por 6, 2 y 4 horas, para *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* y *Irpex lacteus* respectivamente. La actividad con xilanasas fue más estable que con la carboximetilcelulosa, excepto para *Irpex lacteus* el cual perdió el 60% de la actividad xilanásica después de 2 horas de incubación. La xilanasas de *Aspergillus niger* no fue afectada por la incubación y la xilanasas de *Trichoderma viride* mantuvo el 75 % de la actividad inicial hasta las 6 horas de incubación. La actividad de la carboximetilcelulosa se mantuvo estable hasta las 6 horas, para el *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* y *Irpex lacteus*, mantuvieron el 100, 60 y 50 % respectivamente al final de la incubación. Así mismo al adicionar albúmina de suero de bovino (0.5 g l^{-1}) a la incubación se incrementó la vida media de la β -glucosidasa (*Trichoderma viride*) de 0.5 a 3 horas.

Por otra parte, se realizó un estudio para determinar la resistencia de dos preparaciones de *Trichoderma longibrachiatum* (B y D), incubadas durante 6 h con líquido ruminal obtenido 2 h antes y 2 h después de la alimentación. La actividad

enzimática fue menos estable cuando se utilizó el líquido ruminal tomado antes de la alimentación, disminuyendo la actividad celulolítica en un 25 % (B baja concentración) y 40 % (B alta concentración). Al utilizar líquido ruminal obtenido después de la alimentación la actividad celulolítica solo disminuyó 18 % (B baja concentración) y B concentración alta la actividad celulolítica no fue afectada. La preparación D fue menos estable con el líquido ruminal tomando antes de la alimentación. La estabilidad de las enzimas ruminales después de la alimentación puede ser el resultado de algunos factores como reducción en la actividad proteolítica del rumen por la disminución en el pH y por tanto una reducción en la población proteolítica ruminal y las proteínas solubles liberadas por el alimento pueden contribuir a la estabilidad de las enzimas (Morgavi *et al.*, 2001).

De igual manera, Morgavi *et al.* (2000b) estudiaron las interacciones entre la actividad de enzimas exógenas (*Trichoderma longibrachiatum*) y enzimas de microorganismos ruminales (obtenidas de animales alimentados con dietas altas en fibra y bajas en fibra) en un rango de pH 4.5 a 6.5 incubadas a 39 °C. Donde la máxima actividad celulolítica fue a pH 6.0 para las enzimas ruminales fue de 131 ± 13 y 141 ± 8 nmol (nanomoles de glucosa por minuto por miligramo de producto enzimático) para la dieta alta en fibra (AF) y baja en fibra (BF) respectivamente. La actividad AF disminuye rápidamente debajo de pH 6.0, pero la fracción BF mantiene una relativa alta actividad a pH bajo.

Las enzimas exógenas fueron más activas a pH 4.5. La mezcla de celulasa y xilanasa (CX) liberó 370 ± 3.2 nmol y la celulasa (C) liberó 500 ± 41 nmol. La actividad celulolítica disminuyó con el aumento de pH, a pH 6.5 la actividad de la CX y C fue de 40 % y la xilanasa (X) no pudo ser cuantificada cuando se incubó con carboximetilcelulosa. La actividad xilanolítica fue alta para las enzimas ruminales a pH 6.0 a 6.5 comparadas con las enzimas exógenas donde el pH óptimo fue de 5.0. Las combinaciones de AF y BF con C incrementaron la liberación de azúcares reductores en un 35 % mientras que con CX fue de 20 %. Sin embargo, el sinergismo con C fue más evidente a pH bajo (4.5 a 5.0), con CX

fue mayor a pH 5.0 y con X la actividad celulolítica fue baja y no se pudo cuantificar (Morgavi *et al.*, 2000b). La combinación de enzimas ruminales con la xilanasa exógena incrementó marcadamente arriba del 100 % la liberación de azúcares reductores cuando se incubó con xilan. Al combinar con M la extensión de la degradación fue menor y con C no presentó sinergismo. Cuando se combinaron las enzimas ruminales con enzimas exógenas para degradar FDN de ensilado de maíz se presentó sinergismo. El incremento más evidente fue a pH 5.0 a 6.0 (Morgavi *et al.*, 2000b).

Colombatto *et al.* (2003c) determinaron el efecto de enzimas en ensayos *in vitro* sobre la fracción líquida y las partículas asociadas con el alimento. Utilizaron como sustratos celulosa (CE), xilanásica (XYL) y una combinación de celulosa xilan (CEXYL). La adición de enzima fue de 0, 0.51 y 2.55 $\mu\text{L g}^{-1}$ de MS de sustrato (testigo, 1x y 5x respectivamente), adicionando líquido ruminal. La adición de enzima del nivel 5x incrementó ($P<0.05$) la actividad xilanásica a las 0 y 6 h de incubación para todos los sustratos. Al final de la incubación (48 h) la actividad xilanásica fue alta con el nivel de enzima 1x con CE, pero disminuyó con CEXYL.

La adición del nivel de enzima 5x incrementó ($P<0.05$) la actividad inicial (0 h) de la endoglucanasa en el XYL y CEXYL, pero no en CE. La actividad de la β -D-glucosidasa después de la hora cero se incrementó ($P<0.05$), con ambos niveles de enzima en presencia de XYL y CEXYL, donde la actividad en CE fue incrementada ($P<0.05$) por el nivel de enzima 5x. En XYL y CEXYL se observaron diferencias ($P<0.05$) después de las 6 h de incubación con el nivel de enzima 5x. A las 48 h de incubación la adición de enzima disminuyó ($P<0.05$) la actividad β -D-glucosidasa en CEXYL. Al final de la incubación la adición de enzima disminuyó la actividad enzimática de la β -D-xilosidasa con CEXYL (Colombatto *et al.*, 2003c).

A las 6 h de incubación la actividad de la α -L-arabinofuranosidasa fue incrementada ($P<0.05$) al nivel de enzima 5x con XYL y este efecto fue mantenido por 48 h de incubación. No se encontraron diferencias ($P>0.05$) en CE y CEXYL

durante las primeras 6 h de incubación. Consistente con los resultados para β -D-glucosidasa y β -D-xilosidasa, al final α -L-arabinofuranosidasa fue reducidos ($P<0.05$) por la adición de enzima en CEXYL. En la fracción asociada a partículas de alimento, la adición del bajo nivel de enzima incrementó ($P<0.05$) la actividad xilanásica a las 6 h de incubación con CE, pero produce una disminución ($P<0.05$) en XYL y CEXYL (Colombatto *et al.*, 2003c).

En contraste la actividad xilanásica se incrementó ($P<0.05$) por el alto nivel de enzima después de las 18 h de incubación en todos los sustratos. La actividad enzimática de la endoglucanasa tuvo la misma tendencia que la actividad xilanásica, excepto que no hay diferencias entre el XYL tratado con enzima y el testigo después de las 18 h de incubación. La actividad de la β -D-glucosidasa se incrementó ($P<0.05$) a las 6 h de incubación con CE tratado con enzima, pero disminuyó ($P<0.05$) en CEXYL tratada con enzima. A las 18 h de incubación, el XYL tratado con alto nivel de enzima disminuyó ($P<0.05$) la actividad de la β -D-glucosidasa. La actividad de la α -L-arabinofuranosidasa se incrementó ($P<0.05$) a las 6 h de incubación con XYL tratado con 5x, pero con el CEXYL disminuyó la actividad de la α -L-arabinofuranosidasa, con la adición de la enzima (Colombatto *et al.*, 2003c).

Colombatto *et al.* (2003b) determinaron el efecto del pH y la adición de enzima *in vitro*. La adición de enzima no afectó la degradación verdadera de MS y MO. La degradación de la FDN y FDA fue incrementada a bajo pH ($P<0.004$). La degradación de la hemicelulosa fue incrementada ($P<0.001$) como resultado de la adición de enzima, pero la celulosa no fue afectada. Los AGV disminuyeron su concentración a pH bajo, pero la adición de enzima no afectó la concentración molar de AGV. La concentración de gas disminuyó a pH bajos, encontrándose una proporción de CO_2 alta ($P<0.04$) a pH alto. El total de bacterias fue alto a bajo pH en comparación del pH alto. Cuando se estimó la actividad enzimática en la fase líquida del contenido fermentado, la actividad de endoglucanasa y β -D-xilosidasa fueron bajas ($P<0.04$) a pH bajo. Por otra parte, la actividad proteolítica fue alta

($P < 0.001$) a bajos pH. La adición de enzimas exógenas incrementó la actividad ($P < 0.06$) de exoglucanasas ($P < 0.11$). Se presentó interacción ($P < 0.01$) pH X enzima para β -D-xilosidasa, incrementando la actividad a pH alto.

2.14. Producción de gas *in vitro* con adición de enzimas fibrolíticas exógenas

Los métodos *in vitro* e *in situ* han sido utilizados para estimar la degradabilidad de la materia orgánica (MO) de los alimentos para rumiantes (Tilley y Terry, 1963; Orskov *et al.*, 1980). Estos métodos estiman la desaparición de sustratos en el rumen (*in situ*) ó líquido ruminal con buffer (*in vitro*). La cinética de degradación puede determinar la diferencia en el residuo después de varios tiempos de incubación. Sin embargo, no siempre puede utilizarse estas técnicas como es el caso de la fermentación de sustratos solubles que no pueden ser cuantificados (Pell y Schofield, 1993).

Sin embargo, existe una alternativa para determinar la cinética de degradación del alimento, por medio de la producción de gas, en la cual la cantidad de gas producida se relaciona directamente con la fermentación ruminal (Menke *et al.*, 1979; Theodorou *et al.*, 1994; Rymer y Givens, 2002). La cinética de producción de gas depende de una secuencia de procesos. Los sustratos tienen una parte soluble que fermenta rápidamente después de la incubación. Posteriormente ocurre una fermentación gradual de la parte insoluble del sustrato, la cual debe estar hidratada y colonizada por microorganismos ruminales antes de que ellos puedan fermentar (Van Milgen y Murphy, 1993).

El comportamiento de la tasa de producción de gas va a depender de la concentración inicial de microorganismos ruminales, así como de su habilidad para fermentar y utilizar los productos de la fermentación para crecimiento (Hidayat *et al.*, 1993). Los sustratos y sus componentes pueden ser resistentes a estos

procesos a diferentes tiempos de incubación, dando como resultado diferencias sustanciales en la producción de gas (Groot *et al.*, 1996).

Matemáticamente la descripción de los perfiles de la producción de gas permite el análisis de datos y la comparación de sustratos o características del medioambiente de la fermentación, lo cual puede dar información de la composición y la fermentación (rápida y lenta) de los sustratos (Groot *et al.*, 1996).

La técnica de producción de gas es fácil de reproducir mediante jeringas largas de vidrio (Hidayat *et al.*, 1993; Khazaal y Orskov, 1994), o un sistema manométrico (Garg y Gupta, 1992; Waghorn y Stafford, 1993), lo que permite obtener una tasa de producción de gas la cual puede describirse con una cinética de primer orden, asumiendo una tasa constante fraccional de fermentación (Orskov y McDonald, 1979).

En Alemania, la prueba de gas *in vitro* es extensivamente usada para la estimación de la digestibilidad *in vivo* y la energía metabolizable en rumiantes (Menke *et al.*, 1979; Menke y Steingass, 1988). A nivel mundial la prueba de gas *in vitro* ha incrementado el interés debido a la posibilidad de estimar la tasa y extensión de la degradación en una muestra por una serie de mediciones a diferente tiempo, obteniendo el volumen de gas acumulado (Blümmel *et al.*, 1990; Khazaal *et al.*, 1994).

En la técnica de Menke y Steingass (1988) la producción de gas es medida por la conducción del gas producido por fermentación en un medio hermético, dentro de jeringas y determinando la evolución del gas con el tiempo, del ascenso estimado del émbolo de la jeringa. Sin embargo, la técnica de Menke y Steingass (1988) ha sido modificada por el sistema de transductor de presión.

Pell y Shofield (1993) modificaron el sistema de transductor de producción de gas, con un sensor de presión y un programa de computación. Observaron que la producción de gas *in vitro* puede estimar la fermentación de la fracción soluble e insoluble de los sustratos, asimismo encontraron que las tasas de producción de gas varían para la fracción soluble e insoluble del sustrato. También señalan que los análisis de producción de gas consideran todas las fuentes de energía metabolizable y estiman las diferencias entre ellas (monosacáridos, polisacáridos, pectinas, almidón, celulasa y hemicelulasa), por medio de su conversión a CO₂ y CH₄.

Hidayat *et al.* (1993) estimaron mediante la producción de gas *in vitro* el efecto de incrementar la densidad bacteriana, lo que dio como resultando un aumento en la tasa de fermentación. Al adicionar nuevamente bacterias no hubo efecto sobre la tasa de fermentación. Así mismo al adicionar protozoarios a una suspensión de bacterias (óptima concentración) la fermentación no se incrementó.

Theodorou *et al.* (1994) desarrollaron una técnica simple de producción de gas, usando un transductor de presión, para evaluar la cinética de fermentación de pastos incubados *in vitro* con microorganismos ruminales, esta técnica tiene potencial para evaluar las características de fermentación del rumen de un gran número de muestras a un tiempo dado.

Khazzal y Orskov (1994) señalan que la técnica de gas *in vitro* tiene ventajas comparada con la técnica *in situ*, el efecto de factores antinutricionales es menos concentrado en el medio y menos claro de observar. Comparada con la técnica de digestibilidad *in vitro*, la técnica de gas *in vitro* permite el monitoreo de la cinética de fermentación del alimento sobre un largo período de incubación, utilizando un gran número de tubos por tratamiento después de diferentes periodos de incubación. Lo cual permite que en la técnica de producción de gas de una idea de la velocidad y volumen de la respuesta biológica mediante la producción de gas.

Zinash *et al.* (1996) determinaron que la desaparición de materia seca *in situ* de forrajes, pueden ser predecibles con la producción de gas *in vitro*, análisis químicos (N y FDN) o digestibilidad *in vitro*. Sin embargo, la técnica de producción de gas permite determinar un mayor número de muestras a un costo menor por muestra.

Groot *et al.* (1996) utilizaron un sistema de análisis multifase para la cinética de producción de gas en la fermentación *in vitro* de alimentos para rumiantes. El valor de los parámetros del modelo y la estimación de la tasa máxima de fermentación para cada fase en la caracterización de la composición y degradabilidad de los alimentos. Ellos señalan tres fases la primera es la digestión de carbohidratos solubles y proteínas con una tasa de digestión rápida, la segunda fase se relaciona con la fracción insoluble potencialmente digestible y la fase final de los componentes de sustratos con baja digestibilidad o un cambio brusco en la población microbiana.

Rymer *et al.* (1999) evaluaron el incremento de líquido ruminal de 5 a 30 %, dando como resultado una disminución del pH final y un incremento en la producción de gas total, disminuyendo el tiempo *Lag* y el tiempo medio de la máxima producción de gas. La producción de gas de los alimentos está en función de los mismos, la naturaleza del inóculo con el cual es fermentado y las condiciones en las que la fermentación es realizada. Así mismo los autores sugieren que la tasa de fermentación de los componentes soluble del alimento, está limitada por la actividad de la población microbiana en el inóculo.

En relación al consumo voluntario de materia seca y la digestibilidad de la materia seca consumida estos pueden ser predecibles con las constantes de producción de gas *in vitro*, con un adecuado modelo que describa la cinética de fermentación, con un análisis de regresión. La bifase de la ecuación de Michaelis-Merten explica el 60 % de la variación del consumo de materia seca y el 94 % de la variación de la digestibilidad de la materia seca consumida (producción

continua, asimismo la producción de gas a las 8 h explica el 76 y 48 % de la variación para el consumo de materia seca y la digestibilidad de la materia seca respectivamente (Rodrigues *et al.*, 2002).

Se ha observado que la adición de almidón, celulosa y pectina a paja tratada con amoníaco afecta la producción de gas; cuando se adiciona pectina la producción de gas fue mayor en relación a la adición de almidón y celulosa, además la adición del almidón y la celulosa disminuyeron la producción de gas en relación a la paja tratada con amoníaco cuando se incubó sola (Fondevilla *et al.*, 2002).

Algunos autores han reportado que la técnica de producción de gas *in vitro* también puede estimar la dinámica de fermentación de los alimentos y predecir el modelo de fermentación ruminal (perfil de AGV) (Brown *et al.*, 2002; Rymer y Givens, 2002).

La técnica de producción de gas *in vitro* es una técnica simple y sensible que se ha desarrollado para proveer información precisa sobre la cinética de la digestión de alimentos utilizados en rumiantes. Theodorou *et al.* (1994) concluyeron que la determinación de los perfiles de producción de gas usando un transductor de presión es un sencillo adelanto y un procedimiento barato. La técnica provee información precisa la cual puede ser utilizada para predecir las tasas de digestión de las fracciones solubles e insolubles, pero potencialmente digestibles, determinar donde los compuestos del alimento inhiben el crecimiento microbiano, el consumo de materia seca, digestibilidad de la materia seca, así como el perfil de AGV, de los alimentos con respecto a su fermentabilidad (valor nutritivo) *in vitro*.

Entre las desventajas que presenta el método de análisis de la fermentación *in vitro*, es que esta es en función de la naturaleza de los alimentos y del inóculo con el cual es fermentado y las condiciones en las que la fermentación es realizada, por lo tanto, una limitante de la técnica es el inóculo (Rymer *et al.*, 1999).

Hidayat *et al.* (1993) estimaron la contribución de bacterias en la degradación de heno y paja de cebada mediante la producción de gas como medición de la actividad fermentativa. El aumento en la densidad de bacterias (0.067, 0.1, 0.2 y 1 de volumen original) incrementó la tasa de producción de gas (26.7^a, 32^b, 32.3^{bc} y 28.8^{ab}) para la degradación del heno, los resultados con la paja no presentaron diferencias al incrementar la densidad de bacterias a las 72 h de incubación.

La técnica de producción de gas *in vitro* se ha utilizado para evaluar el efecto de productos enzimáticos en dietas para rumiantes. Yang *et al.* (2000) evaluaron un producto enzimático (*Trichoderma longibrachiatum*), la dosis utilizada cuando se aplicó al forraje fue de 50 mg de enzima disueltos en 20 ml de agua para un kilogramo de MS y 50 mg por cada kilogramo de concentrado, la dieta utilizada consistió en 62 % concentrado y 32 % forraje para vacas lactantes, los tratamientos fueron testigo (T), tratamiento en el cual las enzimas fueron adicionadas en el forraje (TEF) y la adición de enzima en el concentrado (TEC); el líquido ruminal fue obtenido de borregos alimentados con concentrado y ensilado de cebada, la incubación fue por 48 h a 39 °C, la producción de gas (9.36, 9.38, y 9.01 ml/100 mg de MS para T, TEF y TEC respectivamente) y la tasa de producción de gas (0.130, 0.140 y 0.140 h⁻¹ para T, TEF y TEC respectivamente), no fueron afectados por la adición de enzima (Yang *et al.*, 2000).

Sin embargo el TEC disminuyó el tiempo Lag (0.14^b en relación a 0.81^a y 0.82^a para T y TEF respectivamente), lo que indicó que la adición de las enzimas al concentrado favorecen la iniciación de la digestión. La desaparición de MS no presentó diferencias entre los tratamientos, no así la concentración total de AGV donde la concentración fue mayor para TEC con respecto al T (50.5^a y 46.4^b), este resultado puede estar relacionado con la teoría de que la aplicación de enzimas en el concentrado da como resultado una mayor digestión ruminal; sin embargo los resultados de producción de gas y desaparición de MS no lo confirmaron, asimismo los valores del total de AGV *in vitro* son menores que los que se

presentan en ensayos *in vivo*, lo que podría explicar que los efectos de la adición de enzimas *in vitro* sean mínimos o imperceptibles (Yang *et al.*, 2000).

Wallace *et al.* (2001) señalan que la actividad enzimática puede ser una limitante de la digestión de la fibra a nivel ruminal; al evaluar dos productos enzimáticos A y B (*Trichoderma longibrachiatum*) ambos tuvieron una respuesta lineal ($P < 0.001$) en la tasa de producción de gas en las primeras 8 h al incubar ensilado y forraje de maíz, disminuyendo conforme bajaba la concentración de enzima, lo que se atribuye al modo de acción de A y B; la producción de gas se incrementó con la enzima A, observándose una producción de gas a las 48 h de 122 ml (líquido ruminal + enzima + ensilado de maíz 0.2 g), 84 ml (líquido ruminal + enzima), 57 ml (líquido ruminal + ensilado de maíz 0.2 g) y 5 ml (líquido ruminal) con una dosis 1 ml enzima (esta dosis es mayor a la recomendada por el fabricante) diluido en 30 ml solución enzimática.

Sin embargo cuando la dosis fue de 0.012 ml por 30 ml la producción de gas disminuyó presentando valores de 57 ml (líquido ruminal + enzima + ensilado de maíz 0.2 g), 8 ml (líquido ruminal + enzima), 55 ml (líquido ruminal + ensilado de maíz 0.2 g) y 5 ml (líquido ruminal), la enzima B tuvo similar comportamiento que la enzima A, lo que sugiere que una limitante del uso de las enzimas como aditivos en la alimentación de rumiantes es la tasa de fermentación ruminal del ensilaje (Wallace *et al.*, 2001).

Al incubarse sustratos puros como xilan, celulosa y xilan-celulosa con diferentes niveles (0, 0.5, 2.55 y 5.1 $\mu\text{L/g MS}$) de enzima (derivado de *Trichoderma reesei*) que contenía actividades celulolíticas y xilanasicas; la adición de enzima incrementó la producción de gas (mL/ g de MO a las 96 h de incubación) sin embargo no se encontraron diferencias entre el nivel bajo y alto de adición de enzima para los tres sustratos, esta respuesta posiblemente se debe a que el producto enzimático compitió con *Fibrobacter succinogenes* por la disponibilidad del sitio de unión en la celulosa o una respuesta cuadrática en el número de bacterias viables. En relación a la presentación de la máxima tasa de producción de gas en los diferentes sustratos, la celulosa presentó su máxima tasa de

producción de gas entre las 30 y 36 h de incubación, para el xilan fue a las 10 h de incubación. La combinación de xilan–celulosa se encontraron dos tasas de producción de gas la primera de 4 a 10 h y la segunda de 24 a 36 h de incubación y el tratamiento testigo presentó dos tasas de producción de gas a las 10 y 19 h de incubación (Colombatto *et al.*, 2003a).

Un punto importante es identificar la actividad enzimática del producto para tener una aproximación de la respuesta del mismo en la fermentación ruminal, lo cual puede realizarse al estimar la producción de gas y poder desarrollar un producto enzimático para una determinada dieta. Indirectamente debe de tomarse en cuenta los requerimientos de los microorganismos ruminales para poder promover la degradación de la fibra nivel ruminal. Se han observado coeficientes de correlación entre la actividad enzimática de polisacáridasas y la producción de gas en extractos enzimáticos (*A. Níger*, *P. funiculosum*, *T. reesei* y *T. viride*) con incubación de celulosa cristalina presente en el ensilado ($r^2 = 0.79$) y forraje ($r^2 = 0.88$) de maíz; sin embargo, está respuesta en términos de producción de gas no fue proporcional a la concentración y actividad de la enzima (Wallace *et al.* 2001).

2.15. Enzimas fibrolíticas exógenas en dietas para rumiantes

Las enzimas son productos de microorganismos como bacterias (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum* y *Streptococcus faecium*) y hongos (*Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei* y *Saccharomyces cerevisiae*), estas enzimas son utilizadas en la alimentación de rumiantes (McAllister *et al.*, 2001).

Las enzimas son biocatalizadores producidos por células vivas que actúan en reacciones específicas. Las enzimas en la alimentación de rumiantes tienen la función de catalizadores sobre sustratos que son digeridos en compuestos simples (azúcares, aminoácidos o ácidos grasos). La preparación de enzimas para rumiantes se basa principalmente en su capacidad para degradar la fibra de las

plantas. La degradación de celulosa y hemicelulosa requiere de diversas enzimas, las cuales difieren en proporción y actividad. El comportamiento de una sola enzima y una mezcla de enzimas tienen diferente impacto sobre la degradación de la fibra de las plantas. La diversidad de actividad enzimática que tienen los productos comerciales enzimáticos es una ventaja, ya que pueden actuar sobre diferentes sustratos (McAllister *et al.*, 2001).

Las enzimas fibrolíticas exógenas han sido utilizadas como aditivos en ensilados. La aplicación de celulasas y xilanasas promueven el potencial de degradación en un 10 % de rastrojo ensilado. Asimismo, Feng *et al.* (1996) adicionaron enzimas en dosis baja (2.10 ml/kg de MS) y alta (5.26 ml/kg de MS), los tratamientos fueron 4 el testigo (sin enzima), celulasas, xilanasas y una combinación de celulasas y xilanasas en heno, heno hidratado y pasto fresco, observando la digestibilidad *in vitro* (43.5 %) e *in situ* (31.1 %) de la MS del heno con la combinación de celulasas y xilanasas (dosis alta) fue mayor con respecto a los demás tratamientos.

Meesk *et al.* (2002) observaron un incremento en la producción diaria de leche de 16.7 a 17.7 kg, con una dieta a base de ensilado de avena y ensilado de avena adicionado con enzimas. Sin embargo, no hubo efecto sobre la ganancia de peso o la condición corporal de los animales.

Yang *et al.* (2000) al adicionar al concentrado enzimas fibrolíticas exógenas en vacas lecheras, encontraron que la producción de leche diaria se incrementó de 35.3 a 37.4 kg. Sin embargo, al adicionar las enzimas a los forrajes no hubo efecto (35.2 kg). Así mismo, las enzimas no modificaron la composición de la leche.

En ganado de carne se ha observado que la ganancia de peso en novillos se incrementó en un 7 % con el uso de enzimas fibrolíticas exógenas (Burroughs *et al.* 1960). Al respecto Beauchermin *et al.* (1995) reportaron un incremento del 10 % en consumo voluntario y 30% en ganancia de peso en novillos con la adición de enzimas fibrolíticas. Por su parte Lewis *et al.* (1996), utilizaron una combinación

de celulasas y xilanasas en novillos alimentados con una dieta 70 % forraje y 30 % heno de cebada. El consumo de MS y FDN no se incrementó, pero la digestibilidad de la MS, FDN y FDA se incrementó con la adición de enzimas. Cuando se aplicaron las enzimas directamente al rumen la digestibilidad del forraje disminuyó comparada con la aplicación de enzima al heno. Al respecto Hristov *et al.* (2000) al suministrar intraruminalmente enzimas fibrolíticas (carbometilcelulasa, xilanasas, β -glucanasa y amilasa) a 0, 100, 200 y 400 g/d, a vaquillas alimentadas con ensilado (14 %) y grano roloado (85.5 %) de sorgo, encontraron que la adición de enzimas disminuye el pH ruminal e incrementa la concentración de NH_3 y la digestibilidad *in situ* de MS.

Se han realizado varios trabajos sobre el efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en el comportamiento animal. Cano *et al.*, (2003) no encontró efecto sobre la ganancia de peso en toretes en pastoreo con la adición de enzima, observando valores de 584 kg con adición de enzima (caña de azúcar + urea) y 580 kg sin enzima (caña de azúcar + urea). Resultados similares encontró Carreón, (2003) con novillos en crecimiento alimentado con una dieta a base de rastrojo de maíz (picado o molido) y heno de alfalfa, suplementado con sorgo, pollinaza y pasta de soya, la ganancia de peso no presentó diferencia entre tratamientos (rastrojo de maíz picado (0.800 kg), rastrojo de maíz picado + enzima (1.3 kg), rastrojo de maíz molido (1.1 kg), rastrojo de maíz molido + enzima (1.2 kg).

Por otra parte, Gómez, (2003) observó un efecto positivo en la ganancia de peso y conversión alimenticia, cuando adiciono 0, 15 y 30 g de enzimas fibrolíticas por animal/día (Fibrozyme), en novillos en pastoreo (estrella de África) suplementados con caña de azúcar integral. En un segundo trabajo con novillos en pastoreo (estrella de África) suplementados con caña de azúcar enriquecida (Saccharina), la ganancia de peso mejoró con la adición de 15 g de Fibrozyme (0.634 kg) y 30 g de Fibrozyme (1.059 kg) en relación al testigo (0.488 kg). La ganancia de peso tuvo una respuesta lineal, debido a que la enzima mejoró el

consumo de nutrientes digestibles de la caña de azúcar y la caña de azúcar enriquecida (Saccharina).

Las enzimas fibrolíticas también tiene efecto en dietas altas en granos utilizadas en bovinos de carne, Krause *et al.*, (1998) encontró que al adicionar enzimas fibrolíticas (celulasas y xilanasas), en dietas altas en grano (cebada) se incrementó la digestibilidad total del tracto digestivo de la fibra detergente ácida (FDA) en un 28 %.

Los resultados del uso de enzimas fibrolíticas en el comportamiento de animales son muy variados debido a factores propios de la enzima como pueden ser origen, actividad enzimática, pH óptimo, temperatura óptima, método de aplicación, así como las características fisicoquímicas de la fibra de los sustratos. Debido a estas variaciones en los resultados del uso de enzimas fibrolíticas, no se puede hacer recomendación general para el uso de enzimas, esto va a depender del producto enzimático de que se trate.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido al crecimiento exponencial de la población y al interés de incrementar la calidad en la alimentación humana, existe la necesidad de disminuir o eliminar la posible competencia por cereales entre la alimentación humana y animal, para esto es importante que los especialistas y profesionales (MVZ, zootecnistas, nutriólogos, entre otros) de la producción animal, se enfoquen en la búsqueda y evaluación de alternativas en donde se incremente la utilización de hidratos de carbono estructurales, con la finalidad de disminuir la inclusión de granos en la alimentación de rumiantes, debido a su naturaleza del sistema digestivo del rumiante, dentro de estos se encuentra las enzimas fibrolíticas exógenas, las cuales en investigaciones previas han observado que incrementa la digestibilidad de la fibra al emplear forraje de calidad (ensilados de maíz, cebada, alfalfa y caña de azúcar), aunque al emplear subproductos o esquilmos agrícolas, los resultados son variables. Por usos y costumbre, además de su disponibilidad y bajo costo en el centro del país, se emplean insumos de baja calidad como el rastrojo de maíz, el cual contiene aproximadamente 4.20 Kcal g^{-1} de energía, cantidad similar a la que presenta el grano de maíz (4.45 Kcal g^{-1}), con la única desventaja que este último se conforma por carbohidrato no estructurales y el rastrojo está clasificado como estructural (celulosa, hemicelulosa) y abundante lignina por ser un insumo fenológicamente maduro. Por lo cual, es de importancia conocer y conducir esta investigación, en donde se empleen la incorporación de un complejo enzimático fibrolítico comercial en una dieta para rumiantes con rastrojo de maíz, esto para poder aprovechar los aportes energéticos, aunado a que estos tipos de forrajes se obtienen relativamente a bajos costos en la zona, por lo cual se favorecería la rentabilidad de las unidades de producción de rumiantes.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar el efecto de la adición de una enzima fibrolítica exógena comercial con principal actividad xilanolítica sobre la digestibilidad *in sacco* de sorgo alfalfa, rastrojo y una dieta integral para finalización de rumiantes

4.2. Objetivos específicos

Obtener la digestibilidad *in sacco* de grano de sorgo y forrajes (alfalfa y rastrojo de maíz), además de una dieta integral para finalización con la adición de una enzima xilanolítica exógena comercial.

Conocer el efecto de la adición de una enzima fibrolítica (xilanolítica) exógena comercial sobre las variables ruminales de pH y ácidos grasos volátiles

5. HIPÓTESIS

La adición de un producto enzimático fibrolítico exógeno comercial en alimentos (sorgo, alfalfa y rastrojo de maíz) y dieta integral incrementa la desaparición de la fibra detergente neutro y ácido empleando la técnica *in sacco*, y condiciones ruminales mejorando así el aprovechamiento de los insumos empleados en la formulación de raciones para rumiantes.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Desaparición *in sacco* de la dieta e ingredientes

La investigación se llevó a cabo en la Posta Zootécnica y en el Laboratorio Multidisciplinario de Investigación del Centro Universitario UAEM Amecameca de la Universidad Autónoma de Estado de México, localizada en el municipio de Amecameca, ubicado al sur del oriente del Estado de México, sus coordenadas geográficas son longitud 98°37'34" y 98°49'10"; latitud 19°3'12" y 19°11'2". Se encuentra a una altura sobre el nivel del mar de 2420 m. Los límites del municipio son: al norte, con el municipio de Tlalmanalco; al este el estado de Puebla; al sur, los municipios de Atlautla y Ozumba; y al oeste, los municipios de Ayapango y Juchitepec.

La superficie del municipio es de 181.72 km², además ocupa el lugar 44 por su extensión y representa el 0.8 % del territorio estatal. El clima predominante es templado subhúmedo cb (w2) con régimen de lluvias de mayo a octubre, la temperatura media anual es de 14.1°C; presentando el mes más frío en enero con 2.4 °C promedio, pero en febrero o diciembre la temperatura puede descender hasta - 8°C. El mes más caluroso es abril con 24 °C en promedio, pero la máxima temperatura extrema puede llegar hasta 34°C en mayo o de 32 °C en octubre y diciembre. La precipitación anual es de 935.6 milímetros, febrero es el mes más seco (6.2 mm), seguido por diciembre (6.5 mm) y marzo (7.0 mm) julio es el más lluvioso (341 mm), le sigue agosto (338 mm) y junio (321.4 mm) (INEGI, 2009).

Para determinar la desaparición *in sacco* se empleó una vaca Holstein, con cánula ruminal (PV de 480 ± 30 kg), la cual fue alimentada por mañana y tarde (8:00 y 19:00 h) con acceso *ad libitum* de agua. Al inicio del experimento se determinó el peso del bovino mediante una cinta para medir el diámetro del torax,

desparasitados con Ivermectina® (1 mL 50 kg⁻¹ vía subcutánea) y vitaminados con Vigantol ADE® (3 mL animal⁻¹). La alimentación se le proporciono aproximadamente 25 días al bovino, considerando los primeros 7 días de adaptación a la dieta, 7 días de muestreo para desaparición *in sacco* y 21 días para medir el pH y la concentración de ácidos grasos volátiles, empleando una dieta constituida con 75 % de forraje y 25 % de concentrado, y balanceada de acuerdo con los requerimientos nutricionales para bovinos en finalización (NRC, 2000). Los forrajes fueron picados a un tamaño de partícula aproximado de 4 cm. A la dieta integral (Cuadro 4) se le determino el contenido de materia seca (MS), y proteína cruda (PC) (AOAC, 1990), y fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) por la técnica de Van Soest *et al.* (1991).

El extracto enzimático fibrolítico comercial con actividad xilanolítica se aplicó en dosis de 0.0, 2.0 y 3.0 g kg⁻¹ de dieta, el complejo enzimático fue disueltos en 500 mL de agua potable, y se mezclaron con la dieta correspondiente 24 h antes de ofrecérselo al bovino. El bovino fistulado se empleó únicamente como incubador, para desarrollar la técnica de desaparición *in sacco*, descrita por Vanzant *et al.* (1998). Para lo cual se emplearon bolsas de poliseda de 10 x 20 cm (Ø poro de 52 ± 10 µm), selladas con un termosellador para bolsas de 20 cm de la marca Dill®. Las bolsas fueron identificadas con marcador indeleble para posteriormente secadas a 60 °C por 24 h, trascurrido el tiempo fueron estabilizadas en un desecador y pesadas. Posteriormente se llenaron por duplicado con aproximadamente 5 g de dieta experimental e ingredientes (sorgo, alfalfa y rastrojo de maíz), previamente molidos, con un molino marca Thomas Willey®, y una malla de 2 mm, tanto la dieta experimental como los ingredientes fueron asperjados con el extracto enzimático xilanolítica comercial 24 h antes. Una vez pesado el contenido dentro de las bolsas, fueron selladas para evitar fugas de la muestra.

Cuadro 4. Dieta experimental y composición química

Ingredientes	MS (%)
Sorgo	69.00
Pasta de soya	4.00
Minerales ¹	2.00
Heno de alfalfa	15.00
Rastrojo de Maíz	10.00
<i>Composición química de dieta experimental</i>	
PC	14.72
FDN	28.23
FDA	17.95
EM (Mcal kg ⁻¹)	2.66
ENm (Mcal kg ⁻¹)	1.74
ENg (Mcal kg ⁻¹)	1.13

¹ Ruminsal plus por cada kg contiene: Ca, 130 g; P 50 g; Na, 109 g; Cl, 200 g; Fe, 4.30 g; Mg, 3.33 mg; Cu, 80 mg; Co, 66.6 mg; I, 4 mg; Se, 70 mg; Zn, 80 mg a valores de NRC (2000).

Posteriormente fueron introducidas en el rumen por 6, 12, 24, 48 y 72 h de incubación. Las bolsas se retiraron del rumen transcurrido el tiempo correspondiente, se lavaron con agua hasta quedar limpias, posteriormente fueron secadas a temperatura ambiente por 48 horas, luego deshidratadas en una estufa de aire forzado a 55 °C por 24 h y pesadas para calcular el contenido de MS. Los duplicados de cada muestra se mezclaron en forma homogénea para obtener una sola. Se determinó la cantidad de FDN y FDA de acuerdo con Van Soest *et al.* (1991). Todos los procedimientos antes mencionados, para determinar la desaparición *in sacco* se realizaron por duplicado en dos corridas, para obtener un resultado confiable en el análisis estadístico.

6.2. Recolección del fluido ruminal

La semana siguiente al periodo de incubación inicio el proceso para recolección de líquido ruminal. Durante 3 semanas (21 días) se alimentó al bovino con la ración basal (F:C 75:25) y se fue adicionando por semana la enzima fibrolítica comercial semana uno (0 g kg⁻¹), semana dos (2 g kg⁻¹) y semana tres (3 g kg⁻¹). La toma de líquido ruminal se realizó los días 7, 14 y 24 a las 12 h post alimentación. Se tomaron 50 mL de líquido ruminal el cual, fue filtrado con doble gasa y se tomó la lectura del pH con un potenciómetro portátil (ORION modelo SA 210) además, de cada muestra se guardaron 3 mL en alícuotas plásticas (3 alícuotas por tratamiento), a los cuales se les adicionó 0.8 mL de ácido metafosfórico al 25 % (v/v) y se conservaron en congelación (-4°C) para posteriormente, medir la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV).

6.3. Concentración de Ácidos grasos volátiles (AGV)

Se colectaron las muestras de líquido ruminal conservadas en congelación y fueron centrifugadas a 12,000 G durante 10 min; el sobrenadante se colocó en viales de vidrio de 1 mL y fueron procesadas para obtener la concentración de AGV mediante la técnica de Erwin *et al.* (1961) utilizando 2 µL de muestra inyectada a un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer Clarus 580, utilizando una columna capilar de 30 m x 0.25mm x 0.25µm (Agilent Technologies, modelo HP-FFAP) y nitrógeno como gas acarreador.

6.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un diseño completamente al azar generalizado, con tres tratamientos (dosis: 0.0, 2.0 y 3.0 g kg⁻¹ de dieta, del complejo enzimático) y dos corridas como repeticiones, para esto se utilizó el procedimiento GLM de SAS (SAS, 2002) y se realizaron polinomios ortogonales para determinar efectos lineales y cuadráticos con un nivel de significancia de $P < 0.05$.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Degradabilidad *in sacco* de FDN y FDA de la dieta e ingredientes

En la fibra detergente neutro (FDN) no se observaron efectos por la adición del extracto enzimático xilanolítico comercial, no encontrando diferencias ($p > 0.05$) en la degradabilidad de las dietas experimentales e ingredientes (Cuadros 5). Estos resultados coinciden con los reportados por Kung *et al.* (1991); Sheperd y Kung (1996); Teacher *et al.* (1996); Hristov *et al.* (1998); McAllister *et al.* (1999); McAllister *et al.* (2000) y Yescas *et al.* (2004). También resultados similares presentaron Lewis *et al.* (1996), Yang *et al.* (1998), Beauchemin *et al.* (1999),

Rode *et al.* (1999), Yang *et al.* (2000), quienes, al mezclar extracto enzimático, tanto xilanolíticos como celulíticos, 24 h antes de ofrecer el alimento, como se realizó en este experimento, de igual manera no se encontraron cambios significativos. Por su parte Krause *et al.* (1998) al alimentar a novillos con 95 % concentrado y 5 % forraje (ensilado de cebada o paja de cebada) adicionada con extracto enzimático xilanolítico y celulolítico comercial, no encontraron diferencias ($p>0.05$); sin embargo, observaron un incremento numérico en la digestibilidad de la FDN con la paja de cebada (1.7 %) con respecto al testigo, y comparado con el ensilado de cebada (4 %).

En el caso de los forrajes, alfalfa y rastrojo de maíz, de igual manera no se encontraron diferencias en los efectos lineales ni cuadráticos ($p>0.05$) únicamente en el sorgo a las 12 h de incubación presentando además de un efecto lineal ($p<0.05$), destacando en la con mayor digestibilidad al adicionar 3 g del extracto enzimático xilanolítico (Cuadro 5).

De igual manera la degradabilidad de la fibra detergente ácido (FDA), tampoco no se observaron efectos por la adición del extracto enzimático xilanolítico comercial ya que al ser adicionado a la dieta integral y forrajes alfalfa y rastrojo de maíz, no se observaron diferencias ($p>0.05$) en los contrastes, ni respuesta lineal o cuadrática (Cuadros 6). Estos resultados coinciden con los publicado por Beauchemin *et al.* (1995), Feng *et al.* (1996), Lewis *et al.* (1996), Krause *et al.* (1998), McAllister *et al.* (2000), Beauchemin *et al.* (2000), Rode *et al.* (1999), Meneses *et al.* (2001), Tirado-Estrada. (2001) y Yescas *et al.*, (2004). Por su parte Lewis *et al.* (1996), observaron que la aplicación de los extractos enzimáticos fibrolíticos a los forrajes, antes de la alimentación de novillos aumenta el consumo y la digestibilidad de FDA favoreciendo el aprovechamiento de la fibra.

Cuadro 5. Digestibilidad *in sacco* de la FDN con adición extracto enzimático xilanolítico comercial (%)

Horas de incubación	-EEX	+2EEX	+3EEX	EEM	P	
					Lineal	Cuadrático
Heno de alfalfa						
6	13.44	12.26	12.55	0.87	0.53	0.55
12	27.07	27.43	26.28	1.08	0.53	0.96
24	30.92	31.90	30.34	1.18	0.51	0.63
48	37.16	36.36	36.39	1.49	0.49	0.22
72	42.09	42.48	41.20	1.26	0.20	0.75
Rastrojo de maíz						
6	13.44	12.26	11.75	1.00	0.28	0.33
12	23.07	23.83	21.48	2.63	0.63	0.77
24	30.92	31.90	30.34	1.18	0.51	0.63
48	37.10	36.36	36.39	1.49	0.49	0.22
72	42.91	42.69	42.91	1.03	0.60	0.93
Sorgo						
6	22.57	22.23	21.72	2.51	0.15	0.23
12	36.75	38.36	38.89	3.05	**	0.19
24	46.34	47.51	50.38	2.73	0.17	0.24
48	60.77	57.87	58.58	2.37	0.96	0.15
72	73.20	71.75	71.04	1.54	0.57	0.08
Dieta integral						
6	25.11	28.90	23.26	3.04	0.78	0.85
12	35.40	36.14	31.24	6.12	0.51	0.67
24	49.66	45.25	46.44	6.65	0.53	0.66
48	56.34	54.93	56.51	4.48	0.73	0.87
72	57.06	60.83	55.81	6.49	0.93	0.77

-EEX = Testigo; +2EEX = 2 g⁻¹ kg de dieta de FZ; +3EEX = 3 g⁻¹ kg de dieta de FZ

EEM: Error estándar de la media; ³Efectos: lineal y cuadrático; *** (p<0.01), **

(p<0.05).

Es posible que el principal factor limitante, de la actividad del extracto enzimático xilanolítico comercial, sobre la degradabilidad de la FDN y FDA en este experimento sería la composición de la misma dieta integral (75 % forraje y 25 % concentrado), ya que en teoría la población de bacterias amilolíticas son las que predominarían en el ambiente ruminal, aunado a esto puede tenerse en consideración la disminución del pH debido a la presencia de *Streptococcus bovis*, generador de lactato y bajo este ambiente ruminal inhibe la proliferación de bacterias fibrolíticas (Mendoza y Rojo 2002), además que el pH bajos inhiben las actividades de los extractos enzimáticos exógenos fibrolíticos (Zinn *et al.*, 2002).

Por otra parte, el posible crecimiento de bacterias degradadoras de almidón (amilolíticas), haga que las enzimas exógenas xilanolíticas (origen proteico), sirven como alimento altamente proteico para los microorganismos ruminales, como es el caso de las proteasas que en las primeras horas de la digestión hidrolizan a las enzimas exógenas (Pinos *et al.*, 2002) impidiendo que actúen sobre el material fibroso hidrolizando los carbohidratos estructurales contenidos en las dietas (Stokes, 1992).

7.2. pH ruminal

No se encontraron cambios significativos ($p < 0.05$) en el pH ruminal a las 12 horas de incubación (Figura 5.), lo cual coincide con lo obtenido por Kung *et al.* (1998); Beauchemin *et al.* (2000); Hristov *et al.* (2000); Bowman *et al.* (2003). Por su parte Karnezos (2000) adicionando el extracto enzimático exógeno xilanolítico, empleado en esta investigación observaron cambios en la fermentación ruminal, con una disminución en el pH. Por su parte Beauchemin *et al.* (1999) y Yang *et al.* (1999) al adicionar Extractos enzimático fibrolíticos (EEF) comercial en la dieta no observaron cambios en la concentración de pH en ovinos alimentados con rastrojo de maíz, alfalfa y 10 o 25 % de grano. McAllister *et al.* (1999) no encontraron cambios ($p > 0.05$) en el pH ruminal de bovinos en finalización alimentados con ensilaje de cebada.

Cuadro 6. Digestibilidad *in sacco* de la FDA con adición extracto enzimático xilanolítico comercial (%)

Horas de incubación	-EEX	+2EEX	+3EEX	EEM	P	
					Lineal	Cuadrático
Heno de alfalfa						
6	10.98	10.75	10.66	2.03	0.53	0.44
12	19.92	19.98	20.56	2.19	0.25	0.47
24	26.20	26.84	27.14	2.60	0.16	0.70
48	36.03	34.95	35.19	1.62	0.57	0.34
72	39.22	39.07	39.28	2.03	0.82	0.59
Rastrojo de maíz						
6	10.82	10.57	10.60	10.60	0.53	0.44
12	19.82	19.84	20.36	20.36	0.25	0.24
24	25.80	26.44	25.94	25.94	0.28	0.88
48	34.43	32.75	34.59	34.59	0.44	0.24
72	39.22	39.07	39.28	39.28	0.82	0.59
Sorgo						
6	13.39	14.55	10.60	2.04	0.25	0.29
12	26.72	26.81	20.36	4.59	0.15	0.26
24	45.77	44.11	25.94	2.71	0.86	0.14
48	55.11	55.02	34.59	1.97	0.96	0.36
72	61.48	60.84	39.28	1.27	0.43	0.45
Dieta integral						
6	10.84	9.25	10.90	2.12	0.97	0.22
12	21.37	19.63	21.21	3.56	0.96	0.63
24	31.59	33.03	32.27	2.47	0.21	0.51
48	35.62	36.01	36.41	2.69	0.77	0.67
72	38.92	38.97	38.04	1.24	0.43	0.48

-EEX = Testigo; +2EEX = 2 g⁻¹ kg de dieta de FZ; +3EEX = 3 g⁻¹ kg de dieta de FZ

EEM: Error estándar de la media; ³Efectos: lineal y cuadrático; *** (p<0.01), ** (p<0.05).

Sin embargo, estos resultados difieren de los reportado por McAllister *et al.* (2000), quienes reportaron un incremento en el pH, en borregos alimentados con forraje en comparación con los alimentados con concentrado, aunque no existió efecto en la digestibilidad con la adición de la EEF. Pinos *et al.* (2002) observó que las EEF disminuyeron ($p < 0.05$) el pH ruminal en borregos alimentados con heno de alfalfa y no tuvieron efecto cuando consumieron heno de pasto ballico. Lewis *et al.* (1996) mencionan que las EFE adicionadas al forraje y al animal disminuye el pH en novillos alimentados con pasto. Por su parte Basurto (2002) menciona que las EEF con actividad xilanólítica o celulítica actúan mejor bajo condiciones de temperatura entre los 30° a 50° C y con pH de 3.5 a 5.5; sin embargo, en este experimento no resulto así.

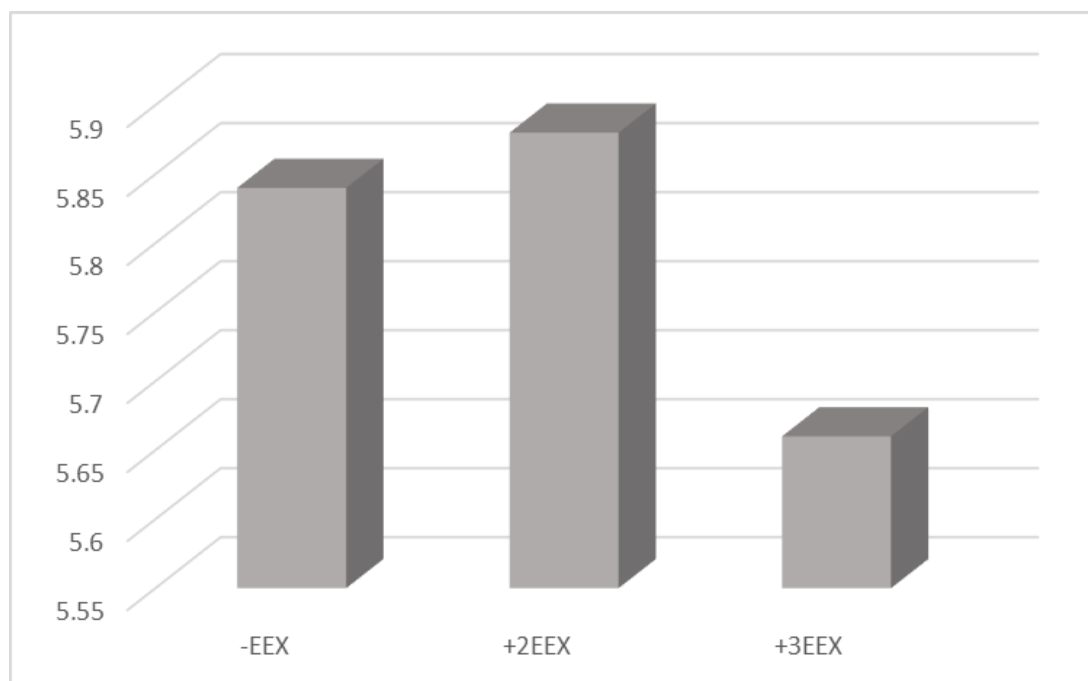


Figura 5. pH del fluido ruminal en bovinos a las 12 horas de incubación post alimentación con dietas adicionada con la enzima exógena xilanólítica comercial.

El pH bajo en este estudio pudo deberse la composición de la dieta de finalización y esto a su vez a la presencia de bacterias como *Streptococcus bovis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola* y *Selenomona ruminantium* (Huntignton, 1997). El pH ruminal afecta la digestión de

la fibra debido a la influencia que tiene sobre la tasa de crecimiento de las bacterias celulolíticas, ya que estas no crecen en $\text{pH} > 6.0$ debido a que no regulan la concentración intracelular de aniones a pH bajos (Russell y Wilson, 1996). Por su parte Mertens y Ely (1982) mencionan que un pH superior a 6.0 favorece la degradación de la MS de la fibra.

7.3. Ácidos grasos volátiles

En este estudio se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la concentración de AGV (Figura 6), destacando que en el ácido acético se observa que el tratamiento testigo y al que se le adiciono la dosis de 3 g de extracto enzimático xilanolítico comercial mostraron mayor cantidad de este AGV en comparación con la dosis de 2 g. En la concentración de ácido propiónico se puede observar que al adicionar 2 g del extracto enzimático exógeno xilanolítica comercial muestra cambios numéricos, aunque con el análisis estadístico no son detectados (Figura 6). En el butírico no se observaron diferencias ($p > 0.05$) comportándose las concentraciones sin variación las entre tratamientos.

Estos resultados son similares a los observados por Judkins y Stobart (1998); Yescas *et al.* (2004) en ovinos; Feng *et al.* (1996); Lewis *et al.* (1996); Hristov *et al.* (1998); Krause *et al.* (1998); Beauchemin *et al.* (1999); Tirado-Estrada *et al.* (2001) en novillos y vacas lecheras no encontraron diferencia en las concentraciones de ácido acético y propiónico.

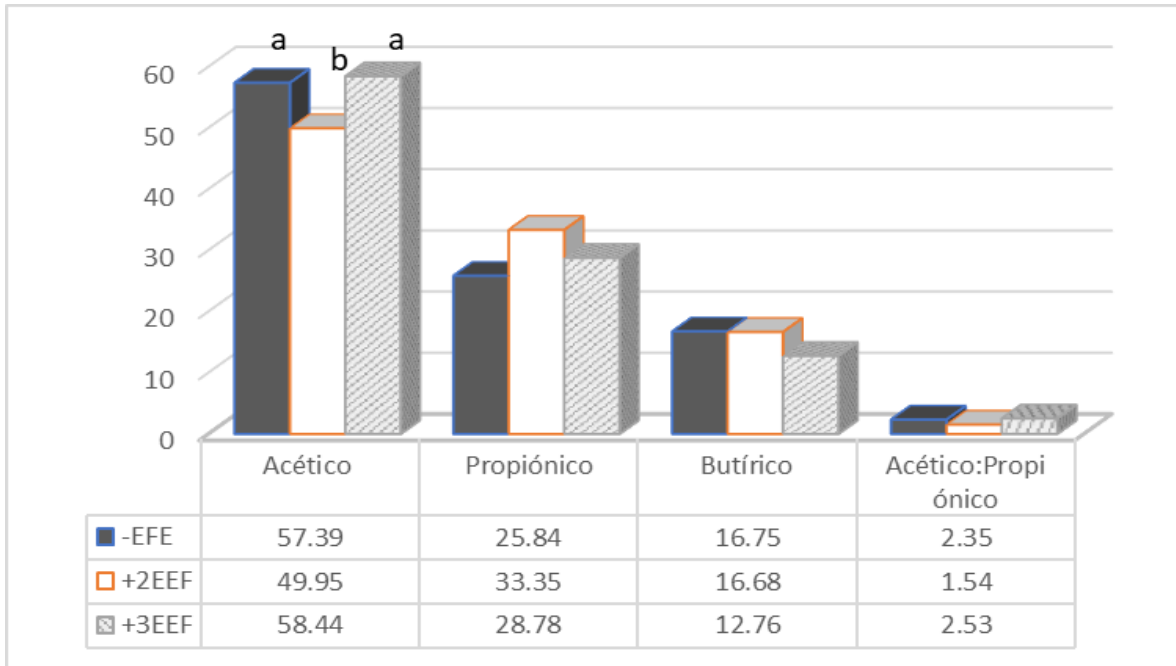


Figura 6. Porcentaje de AGV en el líquido ruminal al adicionar la enzima exógena xilanolítica comercial.

^{a,b,c} Valores de las media en el mismo renglón con diferentes literales son diferentes ($p < 0.05$)

8. CONCLUSIÓN

La desaparición *in sacco* de la FDN y FDA no se afectó por la acción del extracto enzimático exógeno xilanolítico comercial, además, no se afectó el pH ni las concentraciones de ácidos grasos volátiles, en dietas para finalización de rumiantes.

Por lo cual, se sugiere seguir realizando investigaciones con este aditivo fibrolítico para tratar de eficientizar el uso de forrajes en rumiantes en etapa de finalización.

9. BIBLIOGRAFIA

- Abreu, A., Carulla, J. E., Lascano, C. E., Díaz, T. E., Kreuzers, M., & Hess, H. D. (2004). Effects of *Sapindus saponaria* fruits on ruminal fermentation and duodenal nitrogen flow of sheep fed a tropical grass diet with legume. *J. Ani. Sci.*, *82*, 1392–1400.
- Agrawal, A. R., Karim, S. A., Kumar, R., Sahoo, A., & John, P. J. (2014). Review Article Sheep and goat production : basic differences , impact on climate and molecular tools for rumen microbiome study. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, *3*(1), 684–706.
- Allen, M. S. (2000). Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J. Dai. Sci.*, *83*(7), 1598–1624.
- Allen, M. S., & Mertens, D. R. (1988). Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. *The J. Nut.*, *118* (2), 261-270.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M., & Aranzazu, M. M. (2006). Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regu. Toxicol. and Pharma.*, *45* (1), 91–95.
- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. 15th Ed. Association of Official Analytical Chemist. Washington, D. C. 1298 p.
- Argel, P. J. (2006). Contribución de los forrajes mejorados a la productividad ganadera en sistemas de doble propósito, (506), 26–28.
- Armero, E & Falagán, A. (2015). A comparison of growth , carcass traits , and tissue composition of “Segureña” lambs raised either in extensive or intensive production systems. *Anim. Prod. Sci.*, *55*, 804–811.
- Avellaneda, J., Cabezas, F., Quintana, G., Luna, R., Montañez, O., Espinoza, I., Pinargote, E. (2008). Comportamiento agronómico y composición química de

- tres variedades de *Brachiaria* en diferentes edades de cosecha. *Cie. y Tecn.*, 1, 87–94.
- Bargo, F., Muller, L. D., Delahoy, J. E., & Cassidy, T. W. (2002). Milk Response to Concentrate Supplementation of High Producing Dairy Cows Grazing at Two Pasture Allowances. *J. Dai. Sci.*, 85(7), 1777–1792.
- Barillet, F., Arranz, J. J., & Carta, A. (2005). Mapping quantitative trait loci for milk production and genetic polymorphisms of milk proteins in dairy sheep. *Gene. Selec. Evol.*, 37, S109–S123.
- Barth, N. A., Savian, J. V., Tres Schons, R. M., Bonnet, O. J. F., Canto, M. W. do, Moraes, A., de Faccio Carvalho, P. C. (2014). Italian ryegrass establishment by self-seeding in integrated crop-livestock systems: Effects of grazing management and crop rotation strategies. *Eur. J. of Agro.*, 57, 77–83.
- Beauchemin, K. A., L. M. Rode and V. J. H. Sewalt. (1995). Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forage. *Can. J. Anim. Sci.* 75:641-644.
- Beauchemin, K. A., W. Z. Yang, and L. M. Rode. (1999). Effects of grain sources and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:378-390
- Beauchemin, K. A., L. M. Rode, M. Maekawa, D. P. Morgavi and R. Kampen. (2000). Evaluation of a non –starch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. *J. Dairy Sci.* 86:565-575.
- Beker, A., Gipson, T. A., Puchala, R., Askar, A. R., Tesfai, K., Detweiler, G. D., Goetsch, A. L. (2009). Effects of Stocking Rate, Breed and Stage of Production on Energy Expenditure and Activity of Meat Goat Does on Pasture. *J. App. Ani. Res.*, 36(2), 159–174.
- Belanche, A., Doreau, M., Edwards, J. E., Moorby, J. M., Pinloche, E., & Newbold, C. J. (2012). Shifts in the Rumen Microbiota Due to the Type of Carbohydrate

and Level of Protein Ingested by Dairy Cattle Are Associated with Changes in Rumen Fermentation. *The Jou. of Nut.*

- Bello, M. G. D., & Escobar, A. (1997). Rumen manipulation for the improved utilization of tropical forages. *Anim. F. Sci. Tech.*, 69, 91–102
- Bhat, M.K., and G.P. Hazlewood. (2001). Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: M. Bedford and G. Partridge, editors, *Enzymes in farm animal nutrition*. CABI Publishing, Oxford, UK. p. 11–60.
- Blümel, R., & Smilansky, U. (1990). Random-matrix description of chaotic scattering: Semiclassical approach. *Phyi. Rev. let.*, 64 (3), 241.
- Bouwman, A. F., Van Der Hoek, K. W., Eickhout, B., & Soenario, I. (2005). Exploring changes in world ruminant production systems. *Agri. Sys.*, 84 (2), 121–153.
- Bravo, D. M., & Wall, E. H. (2016). The rumen and beyond : Nutritional physiology of the modern dairy cow 1. *J. Dairy Sci.*, 99 (6), 4939–4940.
- Briske, D. D., Derner, J. D., Brown, J. R., Fuhlendorf, S. D., Teague, W. R., Havstad, K. M., Willms, W. D. (2008). Rotational Grazing on Rangelands: Reconciliation of Perception and Experimental Evidence. *Range. Eco. y Mana.*, 61(1), 3–17.
- Burroughs, W., W. Woods, S. A. Ewing, J. Greig, and B. Theurer. (1960). Enzyme additions to fattening cattle rations. *J. Ani. Sci.* 19:458-464.
- Calsamiglia, S. 1997 Nuevas bases para la utilización de la fibra en dietas de rumiantes. XIII Curso de especialización FEDNA. 17 p.
- Cano, A. L., E. Aranda, G. Mendoza, J. Pérez, y Ramos J. J. (2003). Comportamiento de toretes en pastos tropicales suplementados con caña de azúcar y enzimas fibrolíticas. *Téc. Pec. Méx.* 41 (2): 153-164.

- Carrera, B., Gómez, M., & Schwentesius, R. (2015). *La Ganadería Bovina de Carne en México: Un Recuento Necesario Después de la Apertura Comercial*.
- Castillo, O. I., López, M. J., Vázquez, V. C., Salazar, S. E., & Ramírez, R. M. (2014). Análisis microeconómico de una unidad Representativa de producción de carne de ovino en el estado de México bajo un sistema de producción semi intensivo. *Rev. Mex. Agroneg.*, XVIII(34), 720–728.
- Chaucheyras-Durand, F., Ameilbonne, A., Bichat, A., Mosoni, P., Ossa, F., & Forano, E. (2015). Live yeasts enhance fibre degradation in the cow rumen through an increase in plant substrate colonisation by fibrolytic bacteria and fungi. *J. of App. Micro.*, 129, 560–570.
- Chaudhry, A. S. (1998). Nutrient composition, digestion and rumen fermentation in sheep of wheat straw treated with calcium oxide, sodium hydroxide and alkaline hydrogen peroxide. *Ani. F. Sci. Tech.*, 74 (4), 315-328.
- Chauvet Sánchez, M. (1999). *La ganadería bovina de carne en México: del auge a la crisis*. Editorial: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, División de Ciencias Sociales y Humanidades, Departamento de Sociología.
- Church, D. C. (1993). Clasificación e importancia de los animales rumiantes. *Church, DC. El Rumiante: Fisiología digestiva y nutrición. Zaragoza: Editorial Acribia, SA*, 1-14.
- Cingolani, A. M., Posse, G., & Collantes, M. B. (2005). Plant functional traits, herbivore selectivity and response to sheep grazing in Patagonian steppe grasslands. *J. Appl. Ecoo.*, 42 (1), 50–59.
- Clauss, M., Stewart, M., Price, E., Peilon, A., Savage, T., Ekris, I. Van, & Munn, A. (2016). The effect of feed intake on digesta passage , digestive organ fill and mass , and digesta dry matter content in sheep (*Ovis aries*): Flexibility in

digestion but not in water reabsorption. *S. Rumi. Res.*, 138, 12–19.

Colombatto, D., Hervás, G., Yang, W. Z., & Beauchemin, K. A. (2003). Effects of enzyme supplementation of a total mixed ration on microbial fermentation in continuous culture, maintained at high and low pH 1. *Jou. Ani. Sci.*, 81(10), 2617-2627.

Colombatto, D., Morgavi, D. P., Furtado, A. F., & Beauchemin, K. A. (2003). Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: Relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation. *J. Ani. Sci.*, 81(10), 2628-2638.

Corona, I., López, J. D., Vazquez, C., Salazar, E. S., & Ramírez, M. E. (2014). Microeconomic analysis of Representative Production Units of sheep meat in Mexico under a semi intensive production system. *Rev. Mex. Agrone.*, XVIII (34), 720–728.

De la Peña, J. A. P., Varela, D. B., & Rojas, L. M. (2009). Desempeño productivo y propiedades de la canal en ovinos Pelibuey y sus cruzas con Suffolk o Dorset. *Rev. Mex. Cie. Pec.*, 47(3), 313-322.

Dean, D. B., Adesogan, A. T., Krueger, N. A., & Littell, R. C. (2008). Effects of treatment with ammonia or fibrolytic enzymes on chemical composition and ruminal degradability of hays produced from tropical grasses. *Ani. F. Sci. Tech.*, 145(1–4), 68–83.

DeFrain, J. M., Hippen, A. R., Kalscheur, K. F., & Patton, R. S. (2005). Effects of Feeding Propionate and Calcium Salts of Long-Chain Fatty Acids on Transition Dairy Cow Performance. *J. Dai. Sci.*, 88(3), 983–993.

del Moral, L. E., & Murillo, B. (2015). Dinámica del mercado de la carne bovina en México : un análisis de competitividad. *Parad. Econ.*, 7(1), 107–125.

Devi, T. I., Yadava, P. S., & Garkoti, S. C. (2014). Cattle grazing influences soil microbial biomass in sub-tropical grassland ecosystems at Nambol, Manipur,

northeast India. *Trop. Ecol.*, 55(2), 195–206.

Dunn, B. H., Smart, A. J., Gates, R. N., Johnson, P. S., Beutler, M. K., Diersen, M. a., & Janssen, L. L. (2010). Long-Term Production and Profitability From Grazing Cattle in the Northern Mixed Grass Prairie. *Range. Ecol. Manag.*, 63(2), 233–242.

Durmic, Z., Moate, P. J., Eckard, R., Revell, D. K., Williams, R., & Vercoe, P. E. (2014). In vitro screening of selected feed additives, plant essential oils and plant extracts for rumen methane mitigation. *J. Sci. F. Agric.*, 94(6), 1191–1196.

Eckard, R. J., Grainger, C., & de Klein, C. A. M. (2010). Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Liv. Sci.*, 130(1–3), 47–56.

Entrena, I., Chacón, E., & González, V. (1998). Influencia de la carga animal y la fertilización con azufre sobre las tasas de crecimiento, biomasa y producción aérea neta de una asociación de *Brachiaria mutica*-*Teramnus uncinatus*. *Zoo. Trop.* 16(2), 183-206.

Erwin, E. S., Marco, G. J., & Emery, E. M. (1961). Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dai. Sci.*, 44, 1768-1771.

FAO. (2010). Aumento de precios en los mercados de alimentos.

FAO. (2015). El estado de los mercados de productos básicos agrícolas 2015-16, 1–8.

Feng, P., C. W. Hunt, G. T. Pritchard and W. E. Julien. (1996). Effect of enzymes preparations on *in situ* and *in vitro* degradation and *in vivo* digestive characteristic of mature cool-season grass forage in beef steers. *J. Anim. Sci.* 74:1349-1357.

- Feng, P., Hunt, C. W., Pritchard, G. T., & Julien, D. W. (1996). Effect of enzyme preparations on *in situ* and *in vitro* degradation and *in vivo* digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. *J. Ani. Sci.*, 74(6), 1349-1357.
- FIRA. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. (2015). Panorama Agroalimentario. Dirección de Investigación Económica y Sectorial, Subdirección de Investigación Económica. Sorgo (2014). Consultado el 18/11/2018. Disponible en línea en: <https://www.fira.gob.mx/InfEspDtoXML/TemasUsuario.jsp>
- FIRA. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. (2017). Panorama Agroalimentario. Dirección de Investigación Económica y Sectorial, Subdirección de Investigación Económica. Maíz 2014. Consultado el 18/11/2018. Disponible en línea en: <https://www.fira.gob.mx/InfEspDtoXML/TemasUsuario.jsp>
- FIRA. Red de Valor: Bovinos y Caprinos en Coahuila. (2014). Disponible en: <https://www.fira.gob.mx/OportunidadNeg/DetalleOportunida.jsp?Detalle=43>
Publicado en mayo del 2014. Acceso en mayo del 2014.
- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., & Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Micro.*, 3(4), 289–306.
- Fondevilla, M., Barrios U., A., Balcells, J., & Castrillo, C. (2002). Gas production from straw incubated *in vitro* with different levels of purified carbohydrates. *Ani. F. Sci. and tech.*, 101(1-4), 1-15.
- France, J., & Dijkstra, J. (2005). Volatile fatty acid production. *Qua. Asp. Rum. Dig. Metabo.*, 2, 157-175.
- Galindo, J., Elías, A., Muñoz, E., Marrero, Y., González, N., & Sosa, A. (2017). Ruminant activators , general features and their advantages for feeding ruminants. *Cub. J. Agri. Sci.*, 51(1), 11–23.

- García Martínez, M. I., & Fuentes Rodríguez, J. M. (2018). Concentración de ácidos grasos volátiles en líquido ruminal de ovinos texel alimentados con diferentes niveles de levadura y masilla de cerveza.
- García, H. y Peña V. (1995). *La pared celular, componente fundamental de las células vegetales*. UACH. Primera Edición. México, DF.
- Garg, M. R., & Gupta, B. N. (1992). Effect of supplementing urea molasses mineral block lick to straw based diet on DM intake and nutrient utilization. *Asi.-Aust. J. Ani. Sci.*, 5(1), 39-44.
- Giraldo, L. A., Tejido, M. L., Ranilla, M. J., & Carro, M. D. (2008). Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratios. *Ani. F. Sci. and Techn.*, 141(3-4), 306-325.
- Golding, K. P., Wilson, E. D., Kemp, P. D., Pain, S. J., Kenyon, P. R., Morris, S. T., & Hutton, P. G. (2011). Mixed herb and legume pasture improves the growth of lambs post-weaning. *Ani. Prod. Sci.*, 51(8), 717-723.
- Gómez-Vázquez, A., Pérez, J., Mendoza, G. D., Aranda, E., & Hernández, A. (2003). Fibrolytic exogenous enzymes improve performance in steers fed sugar cane and stargrass. *Liv. Prod. Sci.*, 82(2-3), 249-254.
- Góngora-Pérez, R. D., Góngora-González, S. F., & Magaña-Magaña, M. Á. (2010). Caracterización técnica y socioeconómica de la producción ovina en el estado de Yucatán, México. *Agron. Mesoam.*, 21(1), 131-144.
- Grace, C., Lynch, M. B., Sheridan, H., Lott, S., Fritch, R., & Boland, T. M. (2018). Grazing multispecies swards improves ewe and lamb performance. *Anim.*, 1-9.
- Groot, J. C., Cone, J. W., Williams, B. A., Debersaques, F. M., & Lantinga, E. A. (1996). Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. *Ani. F. Sci. and Techn.*, 64(1), 77-89.

- Hall, M. B., Pell, A. N., & Chase, L. E. (1998). Characteristics of neutral detergent-soluble fiber fermentation by mixed ruminal microbes. *Ani. F. Sci. and Tech.*, 70(1-2), 23-39.
- Herrera, R. S., & Hernández, Y. (1985). Efecto de la fertilización nitrogenada en la calidad de *Cynodon dactylon* cv. Coastcross-1, rendimiento de materia seca, proteína bruta y porcentaje de hojas. *Pas. y Forr.*, 8(2).
- Herrero, M., Grace, D., Njuki, J., Johnson, N., Enahoro, D., Silvestri, S., & Rufino, M. C. (2013). The roles of livestock in developing countries. *Anim.*, 7(S1), 3–18.
- Hidayat, C. Hillman, K. Newbold, C. Y Stewart, C. (1993). The contributions of bacteria and protozoa to ruminal forage fermentation *in vitro*, as determined by microbial gas production. *Ani. F. Sci. and Tech.* pp 193 – 208
- Hochman, G., Rajagopal, D., Timilsina, G., & Zilberman, D. (2014). Quantifying the causes of the global food commodity price crisis. *Biom. and Bioe.*, 68, 106–114.
- Hristov, A. N., McAllister, T. A. and Cheng, K. J. (1998). Effect of dietary or abomasal supplementation on rumen fermentation and nutriente digestibility. *J. Anim. Sci.* 76: 3146-3156.
- Hristov, A. N., McAllister, T. A., & Cheng, K. J. (2000). Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle fed a barley grain diet. *J. Anim. Sci.*, 78(2), 477-487.
- Hungate, R. E. (2013). *The rumen and its microbes*. Editorial Academic Press. Primera Edición Elsevier.
- Inal, F., Gürbüz, E., Coskun, B., Alatas, M., Cital, B. O., Polat, E. S., Ozkan, C. (2010). The Effects of Live Yeast Culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on Rumen Fermentation and Nutrient Degradability in Yearling Lambs. *Kafkas*

- Ishaq, S. L., AlZahal, O., Walker, N., & McBride, B. (2017). An investigation into rumen fungal and protozoal diversity in three rumen fractions, during high-fiber or grain-induced sub-acute ruminal acidosis conditions, with or without active dry yeast supplementation. *Front. in Microbio.*, 8, 1943.
- Jerrentrup, J. S., Seither, M., Petersen, U., & Isselstein, J. (2015). Little grazer species effect on the vegetation in a rotational grazing system. *Agri. Ecosys. and Envi.*, 202 (April), 243–250.
- Ji, Y. Z., Wang, Y., Zhao, X., Xie, G., & Zhang, T. (2005). Grassland recovery by protection from grazing in a semi-arid sandy region of northern China. *New Zea. J. of Agri. Res.*, 48(2), 277–284.
- Jouany, J.-P., & Morgavi, D. P. (2007). Use of “natural” products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *International J. of Ani. Biosci.*, 1(10), 1443–1466.
- Joy, M., & Bernue, A. (2014). Role of self-sufficiency , productivity and diversification on the economic sustainability of farming systems with autochthonous sheep breeds in less favoured areas in Southern Europe. *Anim*, 8 (8), 1229–1237.
- Kamra, D. N. (2005). Rumen microbial ecosystem. *Cur. Sci.*, 89 (1), 124–135.
- Katz, S. H., Morris, B., Heatherington, T., & Mcfate, M. (2008). Food to fuel and the world food crisis. *Anthro. Tod.y*, 24 (1), 2007–2009.
- Khazaal, K., & Ørskov, E. R. (1994). The *in vitro* gas production technique: an investigation on its potential use with insoluble polyvinylpolypyrrolidone for the assessment of phenolics-related antinutritive factors in browse species. *Ani. F. Sci. and Tech.*, 47(3-4), 305-320.
- Khazaal, K., Boza, J., & Ørskov, E. R. (1994). Assessment of phenolics-related antinutritive effects in Mediterranean browse: a comparison between the use of the *in vitro* gas production technique with or without insoluble

- polyvinylpolypyrrolidone or nylon bag. *Ani. F. Sci. and Tech.*, 49(1-2), 133-149.
- Kobayashi, Y. (2010). Abatement of methane production from ruminants: Trends in the manipulation of rumen fermentation. *Asi.-Austral. J. Ani. Sci.*, 23(3), 410–416.
- Krause, M. K. A. Beauchemin, L. M. Rode, B. I. Farr and P. Norgaard. (1998). Fibrolytic enzymes treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets to growing cattle. *J. Anim. Sci.* 76:2912-2920.
- Krause, M., Beauchemin, K. A., Rode, L. M., Farr, B. I., & Nørgaard, P. (1998). Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. *Jou. Anim. Sci.*, 76(11), 2912-2920.
- Kung, Jr. L., R. S. Tung, K. G. Maciorowski, K. Buffum, and K. Knutsen. (1991). Effects of plant cell-wall-degrading enzymes and lactic acid bacteria on silage fermentation and composition. *J. Dairy. Sci.* 74:4284-4296.
- Lee, S. S., Ha, J. K., & Cheng, K. (2000). Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to *in vitro* degradation of orchard grass cell walls and their interactions relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to *in vitro* degradation of orchard grass cell walls. *Appl. Envi. Microb.*, 66 (9), 3807–3813.
- Lewis, G. E., C. W. Hunt, W. K. Sanchez, R. Treacher, G. T. Pritchard, and P. Feng. (1996). Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. *J. Anim. Sci.* 74:3020-3028.
- Macedo, R., & Castellanos, Y. (2004). Rentabilidad de un sistema intensivo de producción ovino en el trópico. *Avan. Invest. Agropec.*,8(3).

- Marnet, P. G., & Komara, M. (2008). Management systems with extended milking intervals in ruminants: regulation of production and quality of milk. *J. Ani. Sci.*, *86*, 47-56.
- Martineau, R., Benchaar, C., Petit, H. V, Lapierre, H., Ouellet, D. R., Pellerin, D., & Berthiaume, R. (2007). Effects of lasalocid or monensin supplementation on digestion, ruminal fermentation, blood metabolites, and milk production of lactating dairy cows. *J.f Dai. Sci.*, *90*(12), 5714–5725.
- Martínez, S., Aguirre, J., Gómez, A. A., Ruíz, M., Lemus, C., Macías, H., Ramírez, M. H. (2010). Tecnologías para mejorar la producción ovina en México. *Rev. Fuen.*, (5), 41–51.
- McAllister, T. A., S. J. Oosting, J. Popp, Z. Mir, L. J. Yanke, A. N. Hristov, R. J. Treacher, and K. J. Cheng. (1999). Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* *79*:353-360.
- McAllister, T. A., D. Stanford, H. Bae, R. J. Treacher A. N. Hristov, J. Baah, J. A. Shelford, and K. J. Cheng. (2000). Effect of a surfactant and exogenous enzymes on digestibility of feed and on growth performance and carcass traits of lambs. *Can. J. Anim. Sci.* *80*:35-44.
- Mejía, H. J., Delgado, H. J., Mejía, H. I., Guajardo, H. I., y Valencia, P. M. (2011). Efectos de la suplementación con bloques multinutricionales a base de nopal fermentado sobre la ganancia de peso de ovinos en crecimiento, *21*(1), 11–16.
- Mendoza, M. G. D., Rojo. R. R. (2002). Utilización de enzimas exogenas en la alimentación de rumiantes. In: Memoria XII Reunión internacional sobre producción de carne y leche en climas calidos. Universidad Autónoma de Baja California. Instituto de Ciencias Agrícolas. 3 y 4 de Octubre. Mexicali, B. C. México.

- Mendoza, G. D., Plata, F. X., Mónica, P., Mella, R., Alejandro, M., Delgadillo, M., Bárcena, R. (2007). Evaluation of Complete Feeds for Intensive Fattening Lambs. *Rev. Cient., FCV-LUZ, XVII*, 66–72.
- Mendoza, G. D., Ricalde, R., Esparza, H., & Velazquez, L. (1995). Effect of two yeast culture with *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal neutral detergent fiber degradability]. *Investigación agraria. Producción y sanidad animales- INIA (España)*. (10(2), 105-110.
- Mendoza, G., Plata, F., Espinosa, R., & Lara, A. (2008). Nutritional management to improve efficiency in the use of energy in ruminants. *Uni. y Cie.*, 24(1), 75–87.
- Mendoza, M. G. D., Pinos, R. J. M., Lee-Rangel, H. A., Hernández-García, P. A., Rojo, R. R., & Relling, A. (2015). Effects of dietary calcium propionate on growth performance and carcass characteristics of finishing lambs. *Ani. Prod. Sci.*
- Meneses, E. G., J. R. Bárcena, R. Yescas, y M. Cordoba. (2001). Empleo de enzimas fibrolíticas y amilolíticas en la degradación de almidón y fibra en raciones para ovinos. In: Reunión Anual de Asociación Mexicana de Producción Animal. Cd. Victoria, Tamaulipas, México. pp. 203-207.
- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., & Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *Jou. Agri. Sci.*, 93(1), 217-222.
- Molina Botero, I. C., Cantet, J. M., Montoya, S., Correa Londoño, G. A., & Barahona Rosales, R. (2013). Producción de metano *in vitro* de dos gramíneas tropicales solas y mezcladas con *Leucaena leucocephala* o *Gliricidia sepium*.
- Morgavi, D. P., Sakurada, M., Mizokami, M., Tomita, Y., Onodera, R. (1994). Effects of Ruminal Protozoa on Cellulose Degradation and the Growth of an

- Anaerobic Ruminant Fungus, *Piromyces* sp. Strain OTS1, *in vitro*. *Appl. Envi. Micro.*, 60(10), 3718–3723.
- Muñoz-osorio, G. A., Aguilar, A. J., Sarmiento-franco, L. A., y Cámara-sarmiento, W. R. (2007). Descripción de los sistemas intensivos de engorda de corderos en Yucatán , México. *Nov. Scient.*, 7(3), 207–226.
- Partida, J. A., Braña, D. V., & Martínez, L. (2009). *Productive Performance and Carcass Characteristics in Pelibuey Sheep and Crossbreds (Pelibuey Suffolk - Dorset)*, 47(3), 313–322.
- Pell, A. N., & Schofield, P. (1993). Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J. Dai. Sci.*, 76(4), 1063-1073.
- Peng, Y., Jiang, G. M., Liu, X. H., Niu, S. L., Liu, M. Z., & Biswas, D. K. (2007). Photosynthesis, transpiration and water use efficiency of four plant species with grazing intensities in Hunshandak Sandland, China. *Jou. Arid Enviro.*, 70(2), 304–315.
- Pereira, V. T., da Silva, L. E., Rosa, dos S. W., Santos, C. A., Jardim, T. C., Fernandes, L. I., & Moreira, de F. M. A. (2016). Ruminant microorganism consideration and protein used in the metabolism of the ruminants: A review. *Afri. Jou. Micro. Res.*, 10 (14), 456–464.
- Pickering, N.K., Chagunda, M.G.G., Banos, G., Mrode, R. McEwan, J.C. E. Wall (2015) Genetic parameters for predicted methane production and laser methane detector measurements *J. Ani. Sci.* 93: 11-20
- Pinos, R. J. M., S. S. González, G. D. Mendoza. R. Bárcena, M. A. Cobos, A. Hernández, and M. E. Ortega. (2002). Effect of exogenous fibrolitytic enzyme on Ruminant fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lamb. *J. Anim. Sci.* 80: 3016-3020.
- Plascencia, A. (2015). Evaluation of feed additives on performance of ruminants fattening under conditions of high ambient temperatures. *XXV Reunión*

Internacional Sobre Producción de Carne Y Leche En Climas Áridos, (October 2015).

Rode, L. M., Yang W. Z. and Beauchemin, K. A. (1999). Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 82: 2121-2126.

Rojo-Rubio, R., Mendoza-Martínez, G. D., Montañez-Valdez, O. D., Rebollar-Rebollar, S., Cardoso-Jiménez, D., Hernández-Martínez, J. (2007). Exogenous amylolytic enzymes in the feeding of ruminant feeders. *Uni. y Cie.*, 23, 173–182.

Romero, H. M. (2012). Uso de bloques multinutrientes de desechos de tomate y pepino como alternativa al concentrado en la dieta de caprino efectos. Tesis de grado. Universidad de Cordova.

SAGARPA - Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2012). Aprovechamiento de esquilmos y subproductos en la alimentación de ganado. <http://www.sistemasproductohidalgo.org.mx/noticias/aprovechamiento.pdf>. Consultado 03 de diciembre de 2017.

SAGARPA. (2008). Estimación del Consumo Nacional Aparente de Carne de ovino.

Sánchez, A. E., M. E. Ortega, C., G. Mendoza, M., O. D. Montañez, V. y S. E. Buntinx, D. (2012). Rastrojo de maíz tratado con urea y metionina protegida en dietas para ovinos en crecimiento. *Interci.* 37(5):395-399.

Scheppach, W. (1994). Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut*, 35 (1 Suppl), S35-S38.

Schofield, P., & Pell, A. N. (1995). Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. *J. Ani. Sci.*, 73(11), 3455-3463.

- Sheperd, A. C. and L. Kung, Jr. (1996). An enzyme additive for corn silage: Effects on silage composition and animal performance. *J. Dairy. Sci.* 79:1760-1766.
- Siciliano-Jones, J., & Murphy, M. R. (1989). Production of volatile fatty acids in the rumen and cecum-colon of steers as affected by forage: *Conc. and for. Phys. J. Dai. Sci.*, 72(2), 485-492.
- Stokes, M. R. (1992). Effect of an enzyme mixture, an inoculat, and their interaction on silage fermentation and dairy production. *J. Dairy Sci.* 75: 764-773.
- Taboada, M. A., & Micucci, S. N. (2009). Respuesta de las propiedades físicas de tres suelos de la pampa deprimida al pastoreo rotativo. 27(2), 1–11.
- Tagang, A., Ishaku, P., & Abdullahi, A. (2010). Volatile fatty acids production in ruminants and the role of monocarboxylate transporters : A review. *Afri. J. of Biotech.*, 9(38), 6229–6232.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2007). *Fisio. Vege.* (Vol. 10). Universitat Jaume I.
- Takahashi, J. (2011). Some prophylactic options to mitigate methane emission from animal agriculture in Japan. *Asi.-Austra. Jou. Ani. Sci.*, 24(2), 285–294.
- Teacher, R., T. A. McAllister, J. D. Pop, Z. Mir, P. Mir, and K. J. Cheng. (1996). Effect of exogenous cellulose and xylanases on feed utilization and growth performance of feedlot steers. *Can. J. Anim. Sci.* 77:541
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. F. Sci. and Tech.*, 48(3–4), 185–197.
- Throne, M., Bach, A., Ruiz-Moreno, M., Stern, M. D., & Linn, J. G. (2009). Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in

dairy cows. Yeast supplementation on rumen fermentation. *Lives. Sci.*, 124(1–3), 261–265.

Tilley, J. M. A., & Terry, R. A. (1963). A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Gra. forr. sci*, 18(2), 104-111.

Tirado Estrada, G., Mejia Haro, I., Cruz Vázquez, C. R., Mendoza Martínez, G. D., & Tirado González, D. N. (2015). Degradación *in situ* y patrones de fermentación del rastrojo de maíz (*Zea mays* L.) tratado con enzimas exógenas en vacas Holstein. *Interci.*, 40 (10).

Tirado-Estrada, G., I. Mejía-Haro, C. Cruz-Vázquez, G. Mendoza-Martínez, I. Tovar-Luna and J. Fajardo-Peña. (2001) Effects of exogenous enzymes on fiber degradation of corn stalks. *J. Dairy Sci.* 84(suppl 1.) 283 (Abstr)

Valdes, K. I., Salem, A. Z. M., Lopez, S., Alonso, M. U., Rivero, N., Elghandour, M. M. Y., Kholif, A. E. (2014). Influence of exogenous enzymes in presence of *Salix babylonica* extract on digestibility, microbial protein synthesis and performance of lambs fed maize silage. *Jou. of Agri. Sci.*, 153(4), 732–742.

Van Soest, P. J., J. B. Robertson, y B. A. Lewis. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583 – 3597.

Vera, J. K., Avilés, L. R., Ferrer, G. J., Alayón, J. A., & Cancino, L. R. (1999). Árboles y arbustos para la producción animal en el trópico mexicano. *FAO Anim. Prod. Helt.*, 231-258.

Waghorn G and Clark DA (2004). Feeding value of pastures for ruminants. *NEW ZEAL VET J.* 52, 320–331.

Waldron, K. W., & Brett, C. T. (1990). Effects of extreme acceleration on the germination, growth and cell wall composition of pea epicotyls. *J. Exp. Bot.* 41(1), 71-77.

- Wallace R.J., S.J.A. Wallace, N. McKain, V.L. Nsereko, and G.F. Hartnell. (2001). Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *Jou. Anim. Sci.* 79:1905-1916.
- Yang, W. Z., L. M. Rode, and K. A. Beucehmin. (1998). Effects of fibrolytic enzyme additives on milk production of dairy cow. *J. Dairy Sci.* 81 (Suppl. 1.) 320.
- Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, and L. M. Rode. (2000). A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. *J. Dairy Sci.*83:2512-2520.
- Yang, W. Z. K. A. Beauchemin, and L. M. Rode (2000). A comparison of methos of adding fibrolitic enzymes to lactating cow diets. *Jou. Anim. Sci.* 83:2512-2520.
- Yescas, Y. R., Bárcena G. R., Mendoza M. G. D., González M. S. S. Cobos P. M. Ortega C. M. E. (2004). Digestibilidad *in situ* de dietas con rastrojo de maíz o paja de avena con enzimas fibrolíticas. *Agroc.* 38: 23-31.
- Zinn, R. A., Owens, F. N., & Ware, R. A. (2002). Flaking corn: processing mechanics, quality standards, and impacts on energy availability and performance of feedlot cattle. *Jou. Anim. Sci.*, 80(5), 1145-1156.