ALTERNATIVAS A LOS ANTIBIÓTICOS DE USO ALIMENTARIO EN RUMIANTES: PROBIÓTICOS, ENZIMAS Y ÁCIDOS ORGÁNICOS (y II)

G. Caja1, E. González1, C. Flores1, M.D. Carro2 y E. Albanell1
1Grupo de Investigación en Rumiantes, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra
2Departamento de Producción Animal I, Universidad de León, León

Tras repasar en la primera parte el ecosistema ruminal y los probióticos, a continuación se aborda la actividad enzimática del rumen, así como, el modo de acción de los ácidos orgánicos en poligástricos. De la misma manera, se investigan los resultados obtenidos hasta la fecha.

4.- ENZIMAS

Las enzimas son proteínas que producen todos los organismos vivos, desde unicelulares al hombre, y están presentes en prácticamente todos los procesos naturales. Actúan como biocatalizadores que aceleran y aumentan la eficacia de los compuestos que intervienen en las reacciones químicas, independientemente del estado energético en que se encuentren. Las propiedades catalíticas de las enzimas se deben a la forma tridimensional y la posición de los aminoácidos reactivos dentro de su molécula de proteína. Sin las enzimas los alimentos no podrían ser digeridos. Se han descubierto más de 3.000 enzimas hasta la fecha.

En el contexto de los aditivos de alimentos para rumiantes, las enzimas tienen interés para catalizar las reacciones degradativas que ocurren durante la digestión tanto de los componentes de la pared celular (celulasas, xilanasas, b-glucanasas, pectinasas...), como de su contenido (amilasas, proteasas...). En el caso de los rumiantes, no se ha considerado todavía de interés el empleo de fitasas y enzimas encargadas de degradar toxinas presentes en algunas especies vegetales (i.e. tanasas) de la pared celular de los alimentos.

4.1.- Actividad enzimática del rumen

La variedad de enzimas presentes en el rumen viene dada, no sólo por la diversidad de su comunidad microbiana, sino también por la multitud de enzimas fibrolíticas producidas por microorganismos individuales. La digestión eficiente de sustratos complejos en el rumen requiere de la acción combinada de muchas enzimas.

Se han propuesto dos modelos para describir la organización del sistema de enzimas fibrolíticas siguiendo los mecanismos de síntesis y secreción en células individuales. En el primer modelo, las enzimas actúan individualmente y en sinergia para efectuar la hidrólisis de la celulosa. Este modelo tuvo su origen en investigaciones en hongos aeróbicos representantes de algunos géneros que incluían Trichoderma spp. y Phanerochaete spp., y ha sido revisado por Béguin y Aubert (1994). En el segundo modelo, las enzimas individuales se acoplan formando un complejo multienzimático (i.e. celulosomas). El complejo multienzimático celulosomal de la bacteria termófila Clostridium thermocellum es el ejemplo más estudiado de este modelo. Por otra parte, muchas celulasas contenidas en compuestos complejos de alto peso molecular, se han identificado en bacterias ruminales (i.e Butyrivibrio fibrisolvens, Ruminococcus albus y Fibrobacter succinogenes) y hongos ruminales (i.e. Neocallimastix frontalis y Piromyces sp).

(Forsberg et al., 1993).

Las bacterias mas comunes con actividad enzimática sobre sustratos carbonados en el rumen (Forsberg et al., 1993) son:

• Amilolíticas y dextrinolíticas: Bacteroides amylophilus, Streptococcus bovis, Succinimonas amylolytica y Succinivibrio dextrinosolvens.
• Sacarolíticas: Bacteroides ruminicola, Butyrivibrio fibrisolvens y Selenomonas ruminantium.
• Celulolíticas: Ruminococcus albu, R. flavefaciens, Fibrobacter succinogenes y Bacteroides succinogenes.

La conversión de celulosa en glucosa y posteriormente en piruvato es un proceso complejo y poco conocido. La celulosa aparece en las formas amorfa y cristalina, siendo la forma cristalina la más difícil de degradar en el rumen. La celulasa producida por R. albus degrada solamente la celulosa amorfa, mientras que las producidas por R. flavefaciens pueden hidrolizar también la celulosa cristalina. Las mismas especies bacterianas que degradan la celulosa son normalmente degradadoras de la hemicelulosa.

Las principales bacterias celulolíticas (R. albus, R. flavefaciens y F. succinogenes), sólo representan del 0.3-4% del total de la población bacteriana (Krause et al., 1999). Los hongos, por otra parte, representan aproximadamente el 8% de la biomasa microbiana, aunque sólo una porción de éstos producen celulasas y hemicelulasas de alta actividad (Trinci et al., 1994). Un número limitado del protozoos cuenta también con un importante papel en la digestión de la pared celular vegetal, pudiendo digerir del 5-21% de los materiales celulósicos en función del tipo de ración (Dijkstra y Tamminga, 1995).

En la práctica, el factor primario limitante de la digestión de la celulosa parece ser la disponibilidad de sitios específicos para desarrollar el proceso en el material vegetal, más que una baja actividad celulolítica. Sin embargo, las diferencias en las poblaciones celulolíticas individuales entre distintas vacas son mayores que las atribuibles a la ración, sugiriendo entonces que cada animal mantiene un conjunto único de especies celulolíticas. Esto puede ser resultado de diferencias en la masticación de las paredes celulares de las plantas, si se considera que el grueso de la digestión microbiana ocurre en la pared celular secundaria (Wilson y Mertens, 1995). En consecuencia, deben esperarse diferencias individuales en la respuesta a las enzimas y por ello pueden existir casos en que la producción endógena resulte insuficiente.

A partir de los estudios realizados sobre la estructura de la pared celular de las plantas, se ha hecho evidente que un buen número de elementos de carácter organizacional determinan la naturaleza de los procesos de biodegradación de dichas barreras físicas en el material vegetal. El más importante de estos factores lo constituye la distribución del tamaño de los espacios entre los polímeros individuales que contribuyen a la estructura de la pared y que es bastante similar en todas las especies de cultivos usadas en los propósitos de alimentación. La medición directa a través de una variedad de métodos de comprobación ha demostrado que la mayoría de estos espacios o poros tienen un diámetro entre 2 y 4 nm (Chesson y Forsberg, 1997). Estas dimensiones no son suficientes para permitir la difusión libre dentro de la pared por simples enzimas globulares con masas mayores de ~20 kDa. La porosidad de la pared y su composición cambia muy poco durante el curso de su degradación, incluso cuando mas del 70% de la materia seca ha sido descompuesta.
La selección natural no ha producido sin embargo una solución para superar esta limitación. En cambio, muchas de las bacterias y hongos ruminales han optimizado las acciones de degradación de la pared celular formando un ‘celulosoma’, adaptado a una acción erosiva superficial sobre la pared celular de las plantas. Esto indica la reducida probabilidad de que la introducción de genes codificados para actividades enzimáticas específicas en determinados microorganismos, tal como se ha hecho en el pasado (Forsberg et al., 1993), mejore significativamente el proceso de degradación de la fibra. Mas interesante parece ser la opción de aplicar las técnicas de ingeniería genética al propio celulosoma.

Con la erosión superficial como mecanismo predominante de la degradación microbiana de la pared celular, dos factores son particularmente importantes para aumentar su eficacia. En primer lugar, el área superficial disponible para la colonización y, en segundo lugar, la composición química de la superficie disponible. La superficie está determinada por el procesado del alimento y la masticación y/o rumia que separan las células de la plantas y las exponen a la colonización. La eliminación subsiguiente de los polisacáridos de superficie puede, en células muy lignificadas, conducir a la aparición de una superficie en la que los polisacáridos restantes estén protegidos por compuestos fenólicos. La cantidad de superficie que logra no sufrir el ataque microbiano por este mecanismo es el producto de las proporciones de lignina presentes y el grado de entrelazamiento a otros polímeros de la estructura, todo lo cual en su conjunto define la magnitud de la degradación (Forsberg et al., 1993).

El desarrollo de organismos ruminales capaces de digerir la lignina eficientemente no parece ser una opción viable actualmente debido a sus requerimientos aeróbicos estrictos, lo que limita que el proceso se realice a un ritmo compatible con el de paso hacia tramos posteriores del digestivo. Una estrategia más indicada parece ser la limitación de la lignificación de las plantas por métodos de manejo (i.e. momento óptimo de corte, pretratamiento químico, físico o mecánico de los forrajes) o genético (i.e. regulación de la biosíntesis de la lignina y de los precursores de los taninos).
La modificación de la síntesis de los precursores de la lignina raramente disminuye su cantidad, pero tiene efectos sobre su composición y propiedades (Boudet, 1998). Así, la regulación de la enzima cinnamil CoA reductasa, que cataliza la reducción de los

ácidos fenólicos a su correspondiente aldehído, produce a mayores cantidades de ácido ferúlico libre en la célula (Piquemal et al., 1998).

4.2.- Empleo de enzimas en rumiantes

Interés

Las enzimas exógenas han sido ampliamente utilizadas en los monogástricos, con objeto de eliminar los factores antinutritivos de los alimentos, aumentar la digestibilidad de los nutrientes, y complementar la actividad de las enzimas endógenas principalmente en aves (Classen et al., 1991; Bedford, 1993).

En el caso de los rumiantes, los primeros trabajos de investigación sobre el empleo de enzimas exógenas proceden de la década de los 60 (Burroughs et al., 1960; Rovics y Ely, 1962; Rust et al., 1965). Los variabilidad de los resultados obtenidos, unido a las elevadas dosis y coste de producción de las enzimas, hicieron desistir en su empleo.

En la actualidad, la reducción en los costes industriales de fermentación y la existencia de preparaciones enzimáticas de actividad más alta y mejor definida, han vuelto a plantear el interés por el estudio del papel de las enzimas fibrolíticas en la alimentación de los rumiantes (Chen et al., 1995; Beauchemin et al., 1997; Mc Allister et al., 1999). Trabajos recientes han demostrado así que la suplementación con enzimas exógenas (celulasas y xilanasas) puede mejorar la digestibilidad ruminal y aumentar la producción de leche o el crecimiento de los rumiantes (Yang et al., 1999). Estos resultados resultan sorprendentes para algunos autores al considerar el extenso potencial de las enzimas fibrolíticas endógenas de la microflora del rumen.

Entre las razones que justifican el empleo de enzimas en rumiantes, destacan las señaladas por Beauchemin y Rode (1996) y Hristov et al. (1996):

• La digestibilidad de la materia orgánica en rumiantes raramente supera el 90% y resulta con frecuencia considerablemente menor.
• Se dispone actualmente de nuevos alimentos para rumiantes, muchos de ellos subproductos de baja calidad, en los que las enzimas pueden ser de especial utilidad para mejorar sus posibilidades digestivas.

Una posible justificación del posible efecto beneficioso de la adición de polisacaridasas extracelulares sería que un ataque inmediato del material vegetal a consumir, proporcionaría una disponibilidad adicional de carbohidratos que estimularía el crecimiento y actividad de la población ruminal, disminuyendo por tanto el tiempo (‘lag time’) requerido para la colonización microbiana. El efecto neto puede llegar a equivalente a un mayor tiempo de retención dentro del rumen. Otra posibilidad es que dieran origen a prebióticos, lo cual condicionaría el desarrollo de población microbiana propia del animal, tal como se ha comentado anteriormente.

En este sentido, diversos estudios han discutido los posibles modos de acción de las enzimas (Judkins y Stobart, 1987; Feng et al., 1996; Hristov et al., 1998ab; Yang et al., 1999). Aunque todavía no existe acuerdo sobre sus mecanismos de acción, se considera que las enzimas exógenas pueden provocar efectos de origen multifactorial, actuando tanto sobre la microbiota gastrointestinal como sobre el propio rumiante.

Fuentes de enzimas

Aunque existe una gran variabilidad de productos enzimáticos comercializados para el ganado (Muirhead, 1996), los mas utilizados derivan fundamentalmente de un número limitado de bacterias (n = 4), levaduras (n = 1) y hongos (n = 2), algunos de los cuales son también utilizados como probióticos (ver Cuadro 1):

• Bacterias: Lactobacillus acidophilus (PB), L. Plantarum (PB), Bacillus subtilis (PB) y Streptococcus faecium.
• Levaduras: Saccharomyces cerevisiae (PB).
• Hongos: Aspergillus oryzae (PB) y Trichoderma reesei. Otras especies de hongos, incluyendo Humicola insolens y Thermomyces amiginosus, están siendo comercializadas pero en una menor medida.

CUADRO 4: Efecto de la dosis de enzimas fibrolíticas en raciones a base de forrajes en vacuno de engorde (Beauchemin et al., 1995).

Item	Dosis de enzima					
	Control	1X	2X	4X	8X	16X
Heno de alfalfa:						
GMD, kg/d	1.03^{a}	1.27^{bc}	1.28^{bc}	1.34^{c}	1.19^{abc}	1.12^{ab}
MSI, kg/d	10.2^{a}	10.8^{a}	10.5^{a}	11.7^{b}	10.9^{a}	10.3^{a}
IC, kg MS/kg	9.9	9.0	8.7	8.5	9.6	9.5
Heno de fleo:						
GMD, kg/d	1.21^{a}	1.32^{a}	1.13^{a}	1.24^{a}	1.27^{a}	1.64^{b}
MSI, kg/d	8.8^{bc}	8.3^{ab}	7.5^{a}	9.2^{bc}	8.6^{bc}	9.3^{c}
IC, kg MS/kg	7.3^{b}	6.5^{ab}	7.5^{b}	6.3^{ab}	6.8^{ab}	5.9^{a}
Ensilado de cebada:						
GMD, kg/d	1.12	1.15	0.99	1.02	1.12	1.11
MSI, kg/d	7.5^{ab}	8.1^{b}	6.8^{a}	7.8^{b}	7.3^{ab}	7.3^{ab}
IC, kg MS/kg	7.1	7.0	7.2	7.6	6.9	7.0

GMD = Ganancia media diaria de peso; MSI = Materia seca ingerida; IC = Índice de conversión;
^{ab} : Letras diferentes en una misma columna indican diferencias a $P < 0.05$.

La digestión completa de los alimentos complejos requiere literalmente de la intervención de cientos de enzimas. Los preparados enzimáticos para rumiantes son comercializados primeramente sobre la base de su capacidad para degradar la pared celular de las plantas y, como tal, son frecuentemente referidos como celulasas o xilanasas. Sin embargo, ninguno de estos productos comerciales constituye una preparación exclusiva con la participación de una sola enzima aislada (Beauchemin y Rode, 1996), presentando actividades enzimáticas secundarias como amilasas, proteasas o pectinasas.

La degradación de la celulosa y la hemicelulosa requiere de enzimas específicos, y la diferencia en sus proporciones relativas y actividades individuales determinará la eficacia para la degradación de la pared celular de las mezclas comerciales. Incluso dentro de una especie microbiana aislada, los tipos y actividades enzimáticas pueden variar ampliamente, dependiendo de la cepa seleccionada, del sustrato de crecimiento y de las condiciones de cultivo empleadas (Considine y Coughlan, 1989; Gashe, 1992).

En la práctica, la diversidad de actividades enzimáticas presentes en los preparados comerciales puede resultar ventajosa, en el sentido de que una amplia variedad de sustratos puede ser cubierta por un solo producto pero, al mismo tiempo, representa un problema en el control de calidad y la extrapolación de los resultados obtenidos.

Resultados en ganado vacuno

Los primeros estudios, realizados hace más de treinta años, que mostraron diferencias significativas en la mejora de la ganancia de peso y del índice de conversión en ganado vacuno, se basaron en suplementar las raciones con preparados enzimáticos de actividad amilolítica, proteolítica y celulolítica (Burroughs et al., 1960; Rovics y Ely,1962). Dichas mejoras se debieron principalmente a aumentos en la digestibilidad de la materia seca y de la fibra (Rust et al.,1965).

Sin embargo, otros estudios (Burroughs et al., 1960) indicaron que las enzimas exógenas no mejoraron de manera consistente la respuesta de los animales. Además, los efectos de los enzimas o sus mecanismos de actuación no pudieron ser confirmados en experimentos in vitro o de digestibilidad desarrollados en paralelo. La falta de información sobre los productos enzimáticos usados y los métodos de suministro, hacen además muy difícil la comparación de los estudios.

La mayor parte de los resultados positivos proceden de estudios recientes en ganado vacuno en crecimiento y lactación (Krause et al., 1998; Rode et al., 1999; Yang et al., 1999). Stokes y Zheng (1995) observaron mejoras del valor nutritivo de raciones completas a base de heno de alfalfa y ensilados de alfalfa y trigo, al tratarlas con un preparado de enzimas fibrolíticas. El consumo de materia seca se incrementó cerca de un 11%, mientras la producción de leche lo hizo en un casi un 15%. Lewis et al. (1995) también observaron efectos positivos al incluir enzimas en raciones semejantes a las anteriores en vacas lecheras. Las vacas suplementadas con enzimas produjeron 1.3 kg/d mas de leche que las del control y su consumo de alimento aumentó en 2 kgMS/d.

Los resultados inconsistentes son al parecer causados por un número de factores que incluyen la composición de la ración, el tipo de preparado enzimático usado, el complemento de las actividades enzimáticas, el nivel de enzima suministrado, la estabilidad de la enzima y el método y momento de aplicación a la ración (Yang et al., 1999).

El nivel óptimo de adición de enzimas depende del sustrato, lo cual indica la necesidad de determinar los ritmos de aplicación óptimos de cada preparado para sustratos o alimentos específicos (Beauchemin et al., 1995). Algunos estudios han demostrado una respuesta cuadrática a la suplementación con enzimas, con respuestas reducidas o incluso negativas al aumentar la dosis.

Sin embargo, esto por lo general ocurre cuando se suministran niveles demasiado altos y muy por encima de lo económicamente justificable. Así, Beauchemin et al. (1995), han observado en terneros de engorde (Cuadro 4) que la ganancia de peso con heno de alfalfa se incrementó un 30% a niveles bajos de enzima, pero no con los más altos (4x). Para el heno de fleo, enzimas adicionados al nivel más alto (16x) mejoraron ganancia de peso en un 36%, debido principalmente al incremento de la digestibilidad de la fibra (17%).

En los efectos sobre la producción y composición de leche en vacas, Beauchemin et al. (1995) han señalado además tendencias lineales de mejora cuando se añadieron enzimas hasta lo que los autores consideran niveles medios de inclusión (Cuadro 5).

CUADRO 5: Efectos de la dosis de enzimas fibrolíticas en la producción y composición de leche en vacas alimentadas con raciones base de alfalfa (Beauchemin et al., 1995).

Item	Dosis de enzima		
	Control	Baja	Media
Ingestión, kgMS/d	20.4	20.7	20.7
Producción de leche, kg/d	23.7[b]	24.6[ab]	25.6[a]
Leche corregida 4%, kg/d	22.7[b]	23.3[ab]	24.6[a]
Grasa, %	3.79	3.70	3.78
Proteína, %	3.4	3.4	3.4
Eficacia (kg leche/kgMSI)	1.20	1.22	1.29

[ab]: Letras diferentes en una misma fila indican diferencias a $P < 0.05$.

Las tendencias divergentes, en condiciones aparentemente similares de experimentación, evidencian la complejidad de elegir la dosis de suplementación de las enzimas fibrolíticas en rumiantes. Como consecuencia, los resultados de las investigaciones deben analizarse como el producto de la interacción de más de un factor.

Además, como se puede observar, es más difícil obtener respuestas positivas en la suplementación enzimática del ensilado que en el heno. La carencia de respuesta en el ensilado pudiera ser debida a la especificidad del sustrato, al método de aplicación del enzima, al tiempo requerido para que la enzima reaccione con el alimento o al contenido de humedad del alimento.

Importancia de la forma y dosis de aplicación de la enzima
Por otra parte, los efectos de enzimas exógenas se maximizan cuando se aplica una solución enzimática acuosa sobre los forrajes secos. Se ha observado así que, en estas condiciones, se crea un complejo enzima-alimento estable que incrementa su efectividad. Este complejo se produce rápidamente (en horas) y una vez estabilizado en el forraje, las enzimas son estables y efectivas durante algunas semanas.

Aunque resulta razonable esperar que exista un efecto de la temperatura en el desarrollo del complejo enzima-alimento, no se han observado diferencias cuando las enzimas son aplicadas en un rango de temperaturas entre -30 y +35 oC. Sin embargo, McAllister et al. (1999) observaron una mejora lineal de la digestibilidad in vitro del ensilado de cebada cuando incrementaba la temperatura. No está claro hasta el momento si la diferencia se debe al tipo de alimento o a su contenido de humedad.

Como los forrajes y granos procesados son almacenados antes de su suministro a los animales, esto proporciona una oportunidad ideal para el uso de los productos enzimáticos (Beauchemin et al., 1995). Las enzimas pueden ser aplicadas durante la fabricación del alimento, teniéndose la adecuada precaución para asegurar que la temperatura empleada durante el procesamiento esté dentro de los rangos aceptables para los preparados enzimáticos en cuestión. Las temperaturas de procesamiento empleadas en los alimentos tratados con enzimas para el caso de las aves pueden ser adaptables a rumiantes.
Feng et al. (1992 a,b) evaluaron la aplicación de una solución enzimática directamente sobre el forraje de pradera, no observando efectos cuando se añadió sobre el forraje fresco o predesecado, pero si cuando se hizo sobre el forraje seco. En este caso, la enzima aumentó las digestibilidades de la materia seca y la fibra. De la misma forma, según Beauchemin y Rode (1996), la

aplicación de un nivel bajo de enzimas fibrolíticas sobre ensilado de alfalfa antes de su distribución, no produjo efectos en la digestibilidad de la materia seca. Sin embargo, cuando el mismo preparado fue añadido al ensilado después de que este había sido deshidratado, la digestibilidad aumentó aproximadamente en un 3%.

Treacher et al. (1996) también han señalado que los efectos de la adición de enzimas al ensilado de cebada son variables. En su estudio el preparado enzimático fue rociado diariamente sobre la porción de ración base (ensilado de cebada y cebada grano; 60% de la MS) de terneros de engorde y, aunque no se observaron efectos sobre la ganancia de peso, la ingestión aumentó para el máximo nivel de adición de la enzima.

La aplicación directa de enzimas en el ambiente ruminal ha tenido una menor repercusión desde el punto de vista productivo que la aplicación al alimento antes de ser suministrado a los animales. Treacher et al. (1996) compararon los efectos de rociar el enzima en el forraje en relación a la infusión directa en el rumen a través de una cánula. Las digestibilidades de la materia seca y la fibra resultaron mayores cuando el preparado fue aplicado sobre el alimento. De hecho, la adición directa en el rumen pudo realmente disminuir la digestibilidad, tal como indican Treacher et al. (1996). Esto implica que, al menos para ciertas mezclas enzimáticas, el uso del producto de manera directa sin haberse previamente estabilizado en el alimento, tiene pocas posibilidades de provocar beneficios.

Aunque la aplicación de una solución acuosa directamente al alimento favorece la reacción de la enzima con el sustrato, la posibilidad de obtener una respuesta beneficiosa mediante el suministro directo de las enzimas con los suplementos también ha producido efectos positivos (Burroughs et al., 1960). Sin embargo, según la mayoría de las experiencias hasta ahora publicadas, la cantidad de producto necesario (y su coste) es significativamente mayor cuando se usa un preparado enzimático seco en comparación con su solución acuosa.

En este sentido, Bowman et al. (2002) consideran que la adición del enzima puede realizarse en el concentrado a razón de 1 g/vaca y d, no encontrando diferencias significativas respecto a su aplicación en otras partes de la ración. La dosis de 1 g/d parece ser la adecuada en raciones convencionales para vacas lecheras.

En raciones con heno de alfalfa se han comprobado resultados positivos en condiciones de engorde (Beauchemin y Rode, 1996). En ese estudio la suplementación con enzimas resultó en un incremento del 13% de la ganancia de peso, sin cambios significativos en la ingestión. Cuando se incorporó actividad celulasa, además de xilanasa, al mismo preparado enzimático, se elevó la ganancia de peso y la ingestión sólo al menor nivel de inclusión de la mezcla de enzimas, lo que indica la aparición de interacciones no deseables en el rumen.

Con una preparación enzimática similar se elevó el valor nutritivo de las raciones cuando el preparado enzimático fue rociado en el ensilado justo antes de suministrárselas a los animales, requiriéndose en este caso altos niveles de enzima para poder lograr una relación dosis-respuesta significativa (Cuadro 6).

CUADRO 6: Efectos de la suplementación del ensilado de maíz con enzimas fibrolíticas en ganado vacuno de carne (adaptado de Beauchemin y Rode, 1996).

Item	Dosis de enzima			
	0	15X	22.5X	30X
Ganancia peso, kg/d	1.06	1.07	1.12	1.23
	(100)	(101)	(106)	(116)
Ingestión, kgMS/d	6.6	6.3	6.3	6.2
	(100)	(95)	(95)	(94)
Índice conversión	6.22	5.88	5.63	5.05
	(100)	(95)	(91)	(81)

Sin embargo, Sánchez et al. (1996) no observaron la relación dosis-respuesta en una experiencia en la que se suplementó a una ración de heno de alfalfa con tres niveles de mezcla enzimática en ganado vacuno lechero. Estos autores comprobaron que el nivel intermedio de adición de enzima fue más efectivo que el mayor nivel empleado, lo que confirmaría un tipo de respuesta cuadrática

(Cuadro 7).

CUADRO 7: Efectos del tratamiento del forraje con diferentes dosis de enzima (adaptado de Sánchez et al., 1996)

Item	Dosis enzima			
	Sin tratar	1.25 l/ton	2.5 l/ton	5 l/ton
Ingestión, kgMS/d	24.3[a]	26.2[b]	26.1[b]	26.6[b]
Leche corregida, kg/d	41.1[a]	42.1[a]	48.1[b]	41.9
Condición corporal, 1-5	2.6[a]	3.0[b]	2.6[a]	3.0[b]

[ab]: Letras distintas en la misma fila indican diferencias a $P < 0.05$.

Sorprendentemente en este estudio se obtuvo una disminución de la producción de leche corregida por grasa a niveles similares a los del tratamiento control en los animales suplementados con mayor proporción de enzima, al tiempo que se elevaba el consumo de materia seca. Los autores sugieren un fraccionamiento de la energía hacia la mejora de la condición corporal al mayor nivel de adición de enzima, pero se desconoce el mecanismo que pueda hacerlo posible.

Beauchemin et al. (2000) destacaron que los efectos de la suplementación con enzimas resultaron mayores cuando las vacas se encontraban en balance energético negativo, lo cual ha constituido una hipótesis prácticamente constante en la mayoría de los trabajos de estos autores, cuestionándose asimismo el mecanismo mediante el cual la suplementación estimula el consumo y sin embargo sólo mejora los parámetros de digestibilidad en el nivel más bajo de inclusión.

Las deficiencias en el balance energético de los animales se han visto atenuadas con la adición de enzimas fibrolíticas a la ración (Rode et al., 1999; Yang et al., 2000). Estos autores no reportan efectos sobre el consumo y los resultados en digestibilidad difirieron con raciones similares al probarlas en vacas lecheras o en corderos, probablemente por un efecto de la especie animal y sus diferencias en la fisiología digestiva. La digestibilidad obtenida en vacas manifestó una significativa mejora con el tratamiento enzimático siendo la principal causa a su vez para una mayor producción de leche.

Beauchemin y Rode (1996) han resaltado algunos de los problemas con los que se enfrenta el experimentador cuando estudia los efectos de las enzimas. Así, los preparados enzimáticos con alta actividad xilanasa y celulasa pudieran mejorar significativamente la calidad nutritiva de la cebada al compararse con el maíz. Esto es debido a que aunque la cebada contiene altos niveles de xilanos hay también altos niveles de b-glucanos que contribuyen significativamente a su fracción fibrosa. De hecho, es este componente de la cebada el que se ha demostrado ser uno de los principales responsables de su pobre valor nutritivo en aves. El polisacárido b-glucano ha sido por ello el objetivo de las enzimas b-glucanasa en las raciones para aves con gran éxito comercial (Annison, 1993). Las xilanasas, por su parte, son mucho menos potentes contra la cebada y son inefectivas en el caso del maíz, el cual contiene bajos niveles de ambos polisacáridos. En segundo lugar, raras veces los granos de cereales contienen apreciables cantidades de celulosa, por lo que no se debe esperar un gran efecto de enzimas celulasas en estas raciones.

Recientes resultados de Bowman et al. (2003) indican que la adición de enzimas aumenta la producción de saliva en vacas lecheras, lo que se atribuye al efecto del aumento de los productos de la digestión.

Resultados en ovino lechero

La utilización de una mezcla de enzimas fibrolíticas (celulasa y xilanasa), adicionada al pienso granulado al 0.47% (aproximadamente 0.5 g/d), ha sido recientemente estudiada por Flores et al. (2002, 2003ab) en un ensayo de producción con dos razas de ovejas lecheras de diferente nivel de ingestión y producción de leche. La comparación de ambas razas se realizó en los periodos de cría y ordeño, lo que permite el estudio de los efectos de las enzimas en condiciones muy diversas. Los resultados obtenidos (Cuadro 8) indican la ausencia de efectos significativos en la ingestión, producción y composición de leche de los dos tipos de ovejas y condiciones productivas.

CUADRO 8: Efectos de la suplementación con enzimas fibrolíticas en ovejas lecheras durante los periodos de cría y ordeño (Flores et al., 2003).

Item	Tratamiento (T)		Raza (R)		Efecto (P <)		
	Control	Enzima	Manchega	Lacaune	T	R	T X R[1]
Periodo de cría:							
Ingestión, kgMS/d	2.96	2.94	2.95	2.95	0.551	0.916	0.001
Leche, l/d	2.42	2.40	2.17	2.65	0.930	0.004	0.529
Leche estandarizada	2.09	2.10	1.84	2.36	0.922	0.001	0.579
Eficicacia, l/kgMS	0.70	0.70	0.61	0.79	0.864	0.008	0.141
Composición, %							
Grasa	5.92	6.09	5.89	6.12	0.351	0.219	0.706
Proteína	5.21	5.30	5.23	5.28	0.170	0.458	0.840
Caseína	3.96	4.03	3.98	4.01	0.116	0.431	0.718
Periodo de ordeño:							
Ingestión, kgMS/d	2.90	2.91	2.66	3.16	0.839	0.001	0.001
Leche, l/d	1.79	1.82	1.26	2.35	0.797	0.001	0.188
Leche estandarizada	1.67	1.68	1.22	2.13	0.970	0.001	0.118
Eficicacia, l/kgMS	0.56	0.57	0.46	0.67	0.765	0.001	0.385
Composición, %							
Grasa	6.83	6.53	7.07	6.28	0.060	0.001	0.620
Proteína	5.85	5.76	6.00	5.60	0.223	0.001	0.660
Caseína	4.48	4.41	4.60	4.29	0.294	0.001	0.545

[1]Interacción tratamiento enzima x raza

Resultados en caprino lechero

La utilización de una mezcla de enzimas fibrolíticas (celulasa y xilanasa), adicionada al pienso granulado al 0.47% (aproximadamente 0.4 g/d), ha sido recientemente estudiada por González et al. (2002, 2003) en un ensayo de producción con cabras lecheras que se completó con la medida de la digestibilidad de las raciones. Los resultados obtenidos (Cuadro 9) indicaron la ausencia de efectos en la ingestión, producción y composición de leche también en el caso de las cabras.

Sin embargo, la adición del enzima produjo una mejora importante de la digestibilidad de la materia seca y de la materia orgánica (Cuadro 10). Dichas mejoras sólo se tradujeron en mayores ganancias de peso y condición corporal en las cabras suplementadas con enzimas (Cuadro 9). Los altos valores de ingestión observados en estas cabras lecheras (4.7%PV), muy superior a los de vacuno, debieron limitar las posibilidades de acción del enzima en el rumen como consecuencia del elevado ritmo de paso.

CUADRO 9: Efectos de la suplementación con enzimas fibrolíticos en cabras lecheras a mitad de la lactación (González et al., 2003).

Item	Control	Enzima	± ES	Efecto (P<)
Ingestión, kgMS/d	2.04	2.00	0.04	0.327
Producción de leche, l/d				
Real	1.51	1.53	0.04	0.289
Corregida al 4% grasa	1.78	1.80	0.04	0.542
Composición, %				
Grasa	5.34	5.16	0.15	0.620
Proteína total	3.77	3.73	0.10	0.344
Proteína verdadera	3.54	3.53	0.11	0.387
Caseína	2.87	2.81	0.12	0.089
Eficacia, l leche/kg MSI	0.87	0.90	0.02	0.207
Cambio de peso, kg	-0.1	+1.9	0.4	0.092
Cambio de condición corporal	+0.09	+0.19	0.06	0.136

La discusión conjunta de los resultados en ovino y caprino pone de manifiesto que, a diferencia de las conclusiones obtenidas en el caso de las levaduras, el uso de enzimas fibrolíticos no aumentó la producción de leche ni la composición en grasa, lo que parece debía haberse producido. Más bien al contrario, se observa un efecto de disminución del contenido en grasa de la leche, pero que no resultó significativo en todos los casos.

En todos los casos la ingestión resultó especialmente elevada, lo que pudo haber producido un efecto de interacción entre la dosis y el tiempo de actuación de la enzima en el rumen.

CUADRO 10: Efecto de enzimas fibrolíticas en la digestibilidad de cabras lecheras (González et al., 2003).

Digestibilidad, %	Control	Enzima	±ES	Efecto (P<)
MS	68.89	71.8971.89	0.810.81	0.014
MO	70.37	72.88	0.87	0.014
PB	59.59	63.03	2.20	0.066
FB	41.89	35.09	4.32	0.278
FND	52.59	55.26	1.51	0.248
FAD	46.35	50.46	1.98	0.186

5.- ÁCIDOS ORGÁNICOS

5.1.- Interés y modo de acción en rumiantes

Los ácidos orgánicos se encuentran de forma natural en los tejidos biológicos, ya que son productos intermedios de algunos ciclos metabólicos, y algunos de ellos se producen también en el tracto digestivo de los animales durante los procesos de fermentación.

Estos ácidos se utilizan frecuentemente como aditivos en la alimentación de los animales monogástricos, pero su uso en los animales rumiantes es todavía limitado. De hecho, la mayoría de las experiencias realizadas en estos animales se reducen a los ácidos fumárico y málico, ácidos dicarboxílicos que intervienen en el metabolismo del piruvato. Cuando se utilizan como aditivos, los ácidos orgánicos pueden ser administrados como tales, pero su manejo es problemático, ya que son líquidos corrosivos; por ello, resulta más conveniente la utilización de sus sales, que son sólidas y mas fáciles de manipular.

En los rumiantes, los hidratos de carbono de la ración se degradan en el rumen hasta convertirse en piruvato, y éste es metabolizado por los microorganismos ruminales para producir ácidos grasos volátiles (principalmente acético, propiónico y

butírico). Los ácidos fumárico y málico son metabolitos intermedios de una de las vías metabólicas (la llamada 'via succínica') por las cual el piruvato se transforma en propionato, evitando la formación de lactato (Figura 1). El propionato es absorbido en el rumen es transportado al hígado, donde se convierte en glucosa (gluconeogénesis) que sirve como fuente energética o precursor de la síntesis de lactosa, proteína y grasa corporal.

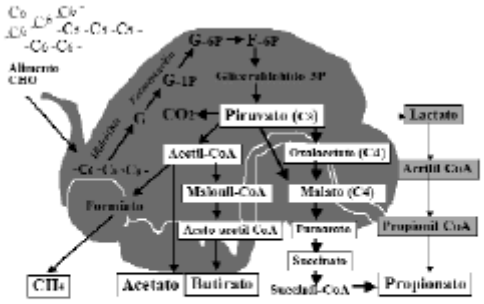


Fig. 1.- *Esquema de la formación y metabolismo de los ácidos grasos volátiles en el rumen*

El modo de acción de los ácidos orgánicos no se conoce totalmente, pero en el caso de los monogástricos se ha observado que provocan modificaciones en la población microbiana del tracto gastrointestinal. En el caso de los rumiantes los ácidos orgánicos (o sus sales) ejercen su acción a nivel del rumen cuando son administrados con el alimento (Carro y Ranilla, 2000). En diversos estudios in vitro (Russell y Van Soest, 1984; Callaway y Martin, 1997) se ha observado que los microorganismos ruminales son capaces de fermentar concentraciones 7.5 mM de malato entre 10 y 24 h. Esto significa que cuando son administrados a estos niveles se transforman completamente en el rumen y no pasan al tracto digestivo posterior, por lo que no dejarían residuos en los productos animales destinados a consumo humano.

CUADRO 11: Efecto de la adición de ácidos orgánicos (10 mM) en condiciones ruminales in vitro (Carro y Ranilla, 2003ab; Ranilla y Carro, 2003).

Ácido	Substrato	pH[1]	Ácidos grasos volátiles[2]			dMO[2]
			Acetato	Propionato	Butirato	
Malato	Maíz	+0.13*	+6.3*	+21.7*	+28.2*	+1.8*
	Cebada	+0.12*	+1.8	+19.3*	+25.8*	–1.5
	Trigo	+0.09*	+3.9*	+14.8*	+9.0*	+0.5
Fumarato	Maíz	+0.11*	+12.1*	+29.1*	+2.6	+4.5*
	Cebada	+0.11*	+5.8*	+36.2*	–3.5	–1.7
	Trigo	+0.11*	+8.8*	+33.9*	–0.5	–1.3
Aspartato	Maíz	+0.11*	+13.2*	+29.5*	+6.8*	+9.2*
	Cebada	+0.19*	+7.1*	+31.0*	+1.7	+1.5
	Trigo	+0.11*	+8.1*	+29.5*	+3.0*	+0.5

[1]: Diferencia respecto al control. [2]: Porcentaje de variación respecto al control, dMO = degradación de materia orgánica. *: Diferencia significativa respecto al control ($P < 0.05$).

Si bien en la década de los ochenta se realizó algún estudio sobre los ácidos orgánicos como aditivos en la alimentación de los rumiantes, ha sido sólo a partir de los años noventa cuando se han llevado a cabo diversas experiencias para investigar sus efectos sobre la fermentación ruminal y su modo de acción. La amplia mayoría de estas investigaciones se han llevado a cabo en condiciones in vitro, y son todavía pocas las experiencias realizadas con animales. Por todo ello, la información existente en la actualidad sobre los mecanismos de acción de los ácidos orgánicos y sus efectos sobre los procesos digestivos y productivos de los animales rumiantes es escasa.

5.2.- Efectos ruminales in vitro

Nisbet y Martín (1990; 1991) observaron que la adición de fumarato y malato (hasta alcanzar concentraciones 10 mM) multiplicaba por dos el crecimiento de Selenomonas ruminantium en estudios in vitro.

S. ruminantium es una bacteria ruminal que puede llegar a representar hasta la mitad del total de bacterias viables en el rumen en animales que reciben raciones con altas proporciones de concentrados (Caldwell y Bryant, 1966). Esta bacteria fermenta un gran número de monosacáridos (i.e. glucosa, fructosa y galactosa), disacáridos (maltosa y lactosa) y oligosacáridos para producir acetato, propionato y lactato como principales productos finales. Otra característica de esta bacteria es que muchas de sus subespecies pueden utilizar ácido láctico como fuente de energía. Cuando los rumiantes reciben raciones ricas en hidratos de carbono rápidamente fermentables en el rumen se puede producir una acumulación de ácido láctico que provoca una disminución del pH ruminal. Cuando el pH disminuye por debajo de 6.0 durante períodos de tiempo prolongados se produce la llamada 'acidosis ruminal', que ocasiona una serie de alteraciones microbianas y fisiológicas que provocan la disminución de la digestión de la fibra, el descenso en la ingestión de alimentos, diarrea, úlceras ruminales e incluso muerte.

Dado que en estudios in vitro se ha observado que el fumarato y el malato favorecen la captación y utilización del ácido láctico por S. ruminantium (Nisbet y Martin, 1990), su administración en las raciones de los animales podría disminuir las concentraciones de este ácido en el rumen, y así evitar los descensos acusados de pH y los problemas de acidosis. De hecho, en diversos experimentos realizados con cultivos in vitro de microorganismos ruminales y con fermentadores semicontinuos se ha observado una disminución de las concentraciones de lactato (Carro et al., 1999; López et al., 1999; Carro y Ranilla, 2003a) y un aumento de los valores de pH (Callaway y Martin, 1996; López et al., 1999; Carro y Ranilla, 2003ab) cuando se utilizaron malato o fumarato como aditivos.

Por otra parte, S. ruminantium metaboliza el lactato que capta hasta propionato. Debido a este proceso, en la mayoría de los estudios realizados con los ácidos fumárico, málico y aspártico (o con sus sales) se ha observado un aumento en la producción y/o concentración de propionato, tanto en cultivos in vitro de microorganismos ruminales (Asanuma et al., 1999; Carro y Ranilla, 2003ab; Ranilla y Carro, 2003), en fermentadores semicontinuos (Carro et al., 1999; López et al., 1999), como en el rumen de vacas lecheras y terneros (Kung et al., 1982). Si el animal hospedador puede absorber una mayor cantidad de propionato, dispondrá previsiblemente de una mayor cantidad de glucosa y, por lo tanto, de energía.

Otro aspecto interesante es que las cantidades de acetato y butirato producidas no se han visto afectadas por la adición de estos ácidos orgánicos, y en ocasiones incluso se han registrado aumentos (Kung et al., 1982; Callaway y Martin, 1997; Carro y Ranilla, 2003ab; Ranilla y Carro, 2003). Las respuestas variables obtenidas en diferentes estudios en lo podrían indicar que el tipo de ración base puede determinar los efectos de los ácidos orgánicos sobre la fermentación ruminal. De hecho, en el Cuadro 11 se puede observar como la adición de malato, fumarato y aspartato a cultivos in vitro de microorganismos ruminales, con maíz, cebada o trigo como sustratos, produjo distintos efectos en la fermentación ruminal según el sustrato incubado.

Otro de los efectos que se han observado tras la administración de fumarato y malato es una reducción de la producción de metano. El metano es uno de los productos finales de la fermentación ruminal y constituye una pérdida energética importante para el animal, que oscila entre el 11-13% de la energía metabolizable de la ración. Por otra parte, el metano contribuye al efecto invernadero, y el producido por los animales se estima que puede representar entre el 15-20 % de la producción global (Cicerone y Oremland, 1988).

CUADRO 12: Efecto de ácidos orgánicos (8 mM) según la relación forraje concentrado del sustrato en condiciones ruminales in vitro (García Martínez et al., resultados no publicados).

Acido	Relación F:C[1] en el sustrato	pH[2]	Acidos grasos volátiles[3]			dMO[3]
			Acetato	Propionato	Butirato	
Fumarato	80:20	+0.05	+8.2*	+37.5*	+7.6*	+4.3
	50:50	+0.06*	+6.3*	+27.3*	-1.0	+2.0
	20:80	+0.06*	+10.5*	+34.1*	+2.6	+3.0
Malato	80:20	+0.04	+12.2*	+38.3*	+14.1*	+4.7
	50:50	+0.06*	+8.5*	+22.6*	+2.0	+4.0
	20:80	+0.08*	+6.1*	+28.1*	+3.4	+0.1

[1]: Forraje: Concentrado. [2]: Diferencia respecto al control.
[3]: Porcentaje de variación respecto al control; dMO = degradación de la materia orgánica.
*: Diferencia significativa respecto al control ($P < 0.05$).

Debido a estas razones, la búsqueda de aditivos que reduzcan la producción de metano ha sido un objetivo importante en producción animal en los últimos años, y tanto el ácido fumárico como el málico parecen cumplir con este objetivo. Cuando existe hidrógeno en el medio ruminal, S. ruminantium fermenta a ambos ácidos y produce succinato y propionato (Figura 1). Por medio de esta vía disminuye la concentración de hidrógeno en el rumen y se reduce la cantidad de hidrógeno disponible para formar metano.

En diversos experimentos in vitro realizados con cultivos de microorganismos ruminales y con fermentadores semicontinuos se ha observado una disminución de la producción de metano al añadir fumarato (Asanuma et al., 1999; López et al., 1999; Carro y Ranilla, 2003b) y malato (Carro et al., 1999; Carro y Ranilla, 2003a) al medio. Sin embargo, hay que señalar que las reducciones de metano observadas en estos estudios son bajas (3-17%), por lo que no debe considerarse a estas sustancias como un medio realmente eficaz para reducir las emisiones de metano de los rumiantes.

Todo parece indicar que la respuesta de producción de metano a los ácidos orgánicos depende del tipo de ración que se administra a los animales, y que el efecto sobre la producción de metano podría ser más acusado en las raciones con un alto contenido en forraje. De hecho, en un estudio in vitro en el que se incubaron con líquido ruminal tres raciones con diferente relación forraje:concentrado, se observó que los efectos de la adición de fumarato o malato sobre la producción de ácidos grasos volátiles también eran variables en función de la ración utilizada como sustrato (Cuadro 12).
En resumen, tanto el fumárico como el málico pueden producir un aumento de la cantidad de propiónico producido en el rumen a través de un doble mecanismo: por una parte, estimulan la captación y transformación del láctico a propiónico que lleva a cabo S. ruminantium (via acrílica), y, por otra, esta misma bacteria puede transformar a ambos ácidos en succínico y propiónico (via succínica).

Como consecuencia de la disminución de los niveles de lactato en el rumen, otro efecto beneficioso de la suplementación con ácidos orgánicos es frenar el descenso de pH que se produce en los animales alimentados con grandes cantidades de concentrados.

5.3.- Efectos en vacuno
Los estudios que se han realizado hasta el momento son limitados, y la mayoría de ellos se han centrado en la utilización de ácido málico y de malato sódico. A pesar de que los resultados obtenido in vitro son claros, no siempre se han obtenido las mismas respuestas en experimentos in vivo.

Así, en unos de los primeros experimentos realizado con vacas lecheras y con terneros, Kung et al. (1982) no observaron ningún efecto de la adición de ácido málico sobre el pH ruminal. Las dosis de ácido málico según se tratase de vacas (70, 105 y 140 g/d) o de terneros (100 y 200 mg/kgPV).

CUADRO 13: Efecto de la dosis de malato en terneros en cebo intensivo (Martin et al., 1999).

Ensayo	Peso inicial (kgPV)	n	Duración del ensayo (d)	Malato (g/d)	Ingestión (kgMS/d)	GPV (kg/d)	IC (kg/kg)
1	367	11	84	0	10.8	1.86*	5.81*
				40	10.4	1.94*	5.36*
				80	11.3	2.11*	5.36*
2	432	9	10	0	11.5	2.87*	4.01*
				60	11.7	3.35*	3.49*
				120	11.4	3.68*	3.10*
			52	0	12.7	1.92	6.61
				60	12.3	2.05	6.00
				120	12.0	1.90	6.32
3	319	24	113	0	8.57	1.72	4.98
				100	8.65	1.75	4.94

* Efecto lineal de la suplementación con malato ($P < 0.10$).

Por el contrario, otros autores han observado aumentos del pH ruminal como consecuencia de la administración de malato. En diversas pruebas realizadas con terneros que recibían una ración con un 60% de maíz aplastado, Martin et al. (1999) observaron que la administración de niveles crecientes de malato (0, 27, 54 y 80 g/d) producía un aumento lineal del pH ruminal, de tal forma que en los animales que recibieron 80 g diarios de malato el pH ruminal no descendió de 6.0 a lo largo del día.

En otras pruebas realizadas con terneros que recibían una ración con un 77% de copos de cebada (Montaño et al., 1999) el descenso del pH ruminal producido a las 2-3 h de la administración de la ración era menos acusado cuando los animales recibían 80 g/d de malato (los valores medios de pH fueron 5.11 y 5.20 para el control y malato, respectivamente).

Las diferencias entre los resultados de las distintas pruebas experimentales pueden deberse a las características de las raciones ingeridas por los animales. Así, las respuestas mas positivas en el pH ruminal se han observado cuando las raciones contenían altas proporciones de cereales y provocaban bajos valores del pH ruminal. En el caso de las pruebas realizadas por Kung et al. (1982) los animales consumían ensilado de maíz ad libitum y los valores de pH ruminal dos horas después de la administración de alimento oscilaron entre 6.9-7.1. Según los resultados de estos estudios el malato podría controlar el fuerte descenso de pH ruminal que se produce tras la ingestión de raciones ricas en hidratos de carbono rápidamente fermentables (i.e., raciones con un alto contenido en granos de cereales). Este efecto no se manifiesta cuando, debido a las características de la ración, no se produce una brusca disminución del pH ruminal.

En un estudio realizado con vacas lecheras que recibían niveles de ácido málico de 70, 105 y 140 g/d, Kung et al. (1982) observaron que el índice de conversión del alimento (kg de alimento/kg de leche) fue un 3% menor en los animales que recibían la dosis más alta de malato que en el grupo control, si bien estas diferencias no fueron significativas. En todas las vacas que recibieron ácido málico se registraron concentraciones mayores de los principales ácidos grasos volátiles respecto a las del control, lo que podría indicar que el ácido málico provocó una mayor fermentación de la ración.

Martin et al. (1999) realizaron varias pruebas con terneros en las últimas fases de cebo intensivo (Tabla 13) obteniendo diversos resultados. En general, la adición de malato a niveles crecientes (40-120 g/d) provocó un aumento lineal de la ganancia de peso y una mejora del índice de conversión, lo que resulta de especial interés. Sin embargo, en algunas pruebas, las mejoras en los rendimientos productivos de los animales sólo se manifestaron en los períodos de adaptación a las raciones de cebo, por lo que Martin et al. (1999) sugieren que podría ser más conveniente utilizar malato sólo como aditivo durante la fase de transición entre la cría y el cebo. Debe también tenerse en cuenta las diferencias entre los sistemas de alimentación para el engorde de terneros americano y europeo, lo que no permite una extrapolación directa de los resultados.

CUADRO 14: Efectos del malato en corderos en cebo intensivo

Autor (año)	Características del pienso	Raza	Malato (%)	Ingestión pienso (kg/d)	Ganancia de peso (g/d)	IC (kg/kg)
Flores et al. (2003bc)	Cebada (66%) Maíz (6%)	Manchega y Lacaune	0	0.95	259[a]	3.8[b]
			0.2	0.92	330[b]	2.9a
	Maíz (60%) Mandioca (7%)	Manchega y Lacaune	0	0.91[b]	299	3.3[b]
			0.2	0.84[a]	307	2.9[a]
Cuesta et al. (2003)	Cebada (50%) Maíz (30%)	Merina	0	0.82	292	3.0
			0.4	0.89	308	3.1

[a,b] : Letras distintas indican diferencias significativas a $P < 0.05$ en la misma experiencia.

5.4.- Efectos en cabras lecheras

Salama et al. (2002b) estudiaron los efectos de la suplementación con malato (3.2 g malato/kgMS de ración) sobre la producción y composición de leche en cabras lecheras durante toda la lactación, no observando diferencias entre tratamientos. La principal causa atribuida a la falta de efecto fue el elevado contenido en malato de la ración base (8.1 g malato/kgMS) que contenía una importante cantidad de heno y granulado de alfalfa.

De una forma general los autores concluyen que debe tenerse en cuenta los contenidos en malato de la ración y que, en particular, todas las leguminosas contienen importantes cantidades de ácido málico, por lo que los efectos esperados se verán minimizados en estos casos. Por el contrario, el interés de los ácidos orgánicos es mayor en las raciones a base de gramíneas y con elevado aporte de concentrado, lo cual resulta frecuente en determinados sistemas de producción de caprino.

5.5.- Efectos en corderos de engorde

Algunos de los resultados más positivos del empleo del ácido málico se han obtenido en corderos en cebo en las condiciones españolas. Los primeros resultados publicados por Garín et al. (2000) indicaron una mejora del índice de conversión del pienso al utilizar una mezcla de levaduras y malato sódico. La respuesta fue más elevada a dosis moderadas del producto.

A partir de estos resultados, Flores et al. (2003abc) han estudiado más detalladamente los efectos específicos del malato incluido en el concentrado de cebo de corderos al 0.2%. La suplementación con malato produjo un aumento de la velocidad de crecimiento y una mejora del índice de conversión cuando los animales recibieron pienso granulado, con altos contenidos en maíz o cebada, y paja ad libitum. Los efectos obtenidos fueron más marcados para la ración basada en cebada (Cuadro 14), apreciándose cambios significativos en el pH del rumen, que fue más elevado, y en las características del epitelio ruminal. De una forma especial, el malato redujo la gravedad de la paraqueratosis ruminal y aumentó el número de las papilas ruminales funcionales.

El estudio de la digestibilidad de los piensos, en condiciones ad libitum, indicó mejoras en la digestibilidad del pienso, y en especial de la fibra, y puso en evidencia el bajo consumo de paja por los corderos y su incapacidad de modificarlo para compensar los efectos de la acidosis ruminal (Flores et al., 2003a)

Por el contrario, Cuesta et al. (2003) no han observado efectos positivos de la suplementación con malato en corderos en cebo que recibían una ración basada en maíz y cebada. La diferencia de respuesta obtenida puede atribuirse a las condiciones experimentales empleadas en los estudios, como son, entre otros, el tipo de ración, la dosis de malato y su forma de administración, que en este último caso consistió en una única dosis diaria.

Tanto el ácido fumárico como el ácido málico aparecen en la lista de aditivos cuyo uso está permitido en la UE (Directiva 70/524/CEE; Nº EC E297 y E296 para el ácido fumárico y málico, respectivamente). Ambos ácidos se encuentran en el grupo de los denominados 'conservantes' y se permite su uso en todos los alimentos destinados a todas las especies de animales, sin que se indiquen dosis máximas o mínimas de uso, ni restricción alguna en la edad de los animales a los que van destinados. Es decir, en la actualidad no existe ningún impedimento legal que restrinja su uso, a pesar de que su utilización como agentes promotores del crecimiento no está todavía registrada. La principal limitación actual es el coste de fabricación, aunque en algunos países como Japón su utilización como aditivo resulta económicamente rentable (Asanuma et al., 1999). Una posible alternativa es combinar estos productos con otros aditivos que presenten acciones sinérgicas en el tracto digestivo de los animales, como pueden ser los aditivos microbianos o algunos extractos vegetales.

En resumen, los ácidos fumárico y málico se perfilan como aditivos de uso potencial en la alimentación de los rumiantes. Sin

embargo, los resultados de los trabajos realizados hasta la fecha con animales parecen indicar que la respuesta animal a estos aditivos podría depender de las características de la ración, por lo que probablemente sólo sean sólo efectivos en determinados sistemas de producción. Por otro lado, tampoco se conoce claramente cual es su dosis óptima en las diferentes condiciones productivas. Es de esperar que en los próximos años se amplíe el número de trabajos sobre estos dos ácidos, o incluso se investigue el efecto de otros ácidos orgánicos, y que estas experiencias contribuyan a aportar nueva información sobre el tema.

6.- REFERENCIAS

AGUILERA, J.F., PRIETO, C. y FONOLLÁ, J. (1990) Brit. J. Nut. 63: 165-175.

ANNISON, G. (1993). Aust. J. Agric. Res. 44:405.

ASANUMA, N., IWAMOTO, N. y TSUNEO, H. (1999) J. Dairy Sci. 82: 780-787.

BEAUCHEMIN, K.A, RODE, L.M. y SEWALT, V.J.H. (1995) Can. J. Anim. Sci. 75: 641-644

BEAUCHEMIN, K.A. y RODE, L.M. (1996) En: Animal Science Research Development. Meeting Future Challenges. Proc. Can. Soc. Anim. Sci. Meeting. L.M. Rode (Ed.). Lethbridge, Alberta.

BEAUCHEMIN, K.A., JONES, S.D., RODE, L.M. y SEWALT, V.J.H. (1997) Can. J. Anim. Sci. 77: 641-644.

BEAUCHEMIN, K.A., RODE, L.M., MAEKAWA, M., MORGAVI, D.P. y KAMPEN, R. (2000) J. Dairy Sci. 83: 543-553.

BEDFORD, M.R. (1993) J. Appl. Poultry Res. 2: 85-92.

BOUDET, A.M. (1998) Trends Plant Sic. 3: 67–71.

BOWMAN G.R., BEAUCHEMIN, K.A. y SHELFORD, J.A. (2002) J. Dairy Sci. 85: 3420–3429.

BOWMAN, G.R., BEAUCHEMIN, K.A. y SHELFORD, J.A. (2003) J. Dairy Sci. 86: 565–575.

BURROUGHS, W., WOODS, W., EWING, S.A., GREIG, J. y THEURER, B. (1960) J. Anim. Sci., 19: 458-464.

CALDWELL, D.R. y BRYANT, M.P. (1966) Appl. Microbiol.
14: 794-801.

CALLAWAY, T.R. y MARTIN, S.A. (1997) J. Dairy Sci. 80: 1126-1135.

CARRO, M.D., LOPEZ, S., VALDES, C. y OVEJERO, F.J.. (1999) Anim. Feed Sci. Technol. 79: 279-288.

CARRO, M.D. y RANILLA, M.J. (2000) Mundo Ganadero 126: 50-54

CARRO, M.D. y RANILLA, M.J. (2003a) Br. J. Nutr. 89: 181-188.

CARRO, M.D. y RANILLA, M.J. (2003b) Br. J. Nutr. (en prensa).

CHEN, K.H., HUBER, J.T., SIMAS, J., THEURER, C.B., YU, P., CHAN, S.C., SANTOS, F., WU, Z. y SWINGLE, R.S. (1995) J. Dairy Sci. 78: 1721-1727.

CHESSON, A. y FORSBERG, C.W. (1997) En: The Rumen Microbial Ecosystem, 2º ed. Hobson, P. y Stewart, C. (Eds.). Chapman & Hall Ltd, Andover, UK.

CICERONE R.J. y OREMLAND, R.S. (1988) Global Biogeochem. Cycles 2: 299-327.

CLASSEN, H.L., GRAHAM, H., INBORR, J. y BEDFORD, M.R. (1991) Feedstuffs 63: 22-24.

CONSIDINE, P.J. y COUGHLAN, M.P. (1989) En: Enzyme System for lignocellulose degradation. Coughlan, M.P. (Ed.). Elsevier Applied Science, New York.

CUESTA, A. RANILLA, M.J., GIRÁLDEZ, F.J., MANTECÓN, A.R. y CARRO, M.D. (2003) ITEA, Vol. Extra, 24: 762-764.

FENG, P., C.W. HUNT, W.E. JULIEN, K. DICKINSON y T. MOEN. (1992a) J. Anim. Sci. 70 (Suppl 1): 309 (Abstr.).

FENG, P., C.W. HUNT, W.E. JULIEN, S.C. HAENNY y G.T. PRITCHARD. (1992b) J. Anim. Sci. 70 (Suppl 1): 310 (Abstr.).

FENG, P., HUNT, C.W., PRITCHARD, G. T. y JULIEN, W. E. (1996) J. Anim. Sci. 74:1349-1357.

FLORES, C., CAJA G., CASALS, R., ALBANELL, E., SUCH, X., VERA, G., GONZALEZ, E., BACH, A. y TORRE, C. (2002) J .Anim. Sci. 80 (Suppl. 1): 357.

FLORES, C., CAJA, G., ROMERO, R. y MESIA, J. (2003a) ITEA, Vol. Extra, 24: 747-749.

FLORES, C., CAJA, G., ROMERO, R. y MESIA, J. (2003b) ITEA, Vol. Extra, 24: 765-767.

FLORES, C., CAJA G., ROMERO, R. y MESIA, J. (2003c) J .Anim. Sci. 81 (Suppl. 1): 357.

FORSBERG, C.W. y CHENG, K.-J. (1992). En: Biotechnology and Nutrition. Bills, D.D. y Kung, S.D. (Eds.). Butterworth Heinemann, Stoneham. pp. 107-147.

FORSBERG, C.W., CHENG, K.J. y PHILLIPS, J.P. (1993) En: Proc. VII World Conference on Animal Production. World Association for Animal Production, Edmonton.

FULLER, R. (1989) J. Appl. Bacteriology 66: 365-378.

GASHE, B.A. (1992) J. Appl. Bacteriology 73: 79-82.

GIGER-REVERDIN, S., BEZAULT, N., SAUVANT, D. y BETIN, G. (1996) Anim. Feed Sci. Technol. 63: 149-162.

GIBSON, G.R. y ROBERFROID, B. (2002) J. Nutrition 25: 1401-1412.

GOLDIN, B.R. (1998) Br. J. Nutr. 80 (Suppl. 2): S203–S207.

GONZALEZ, E., CAJA, G., ALBANELL, E., FLORES, C., CASTRO, A., CASALS R., SUCH, X., BACH, A. y TORRE, C. (2002) J .Anim. Sci. 80 (Suppl. 1): 355.

GONZALEZ E., ALBANELL, E:, CAJA, G. y CASALS R (2003) ITEA, Vol. Extra, 24: 747-749.

GRABBER, J.H., HATFIELD, R.D. y RALPH, J. (1998) J. Sci . Food Agric. 77: 193–200.

HADJIPANAYIOTOU, M., ANTONIOU, I. y PHOTIOU, A. (1997) Livest. Prod. Sci. 48: 129-134.

HAVENAAR, R. y HUIS IN'T VELD, J.H.S. (1992) En: The lactic acid bacteria in health and disease. Vol. 1. B.J.B. Wood (Ed.), Elsevier, New York.

HERVIEU, J., MORAND-FEHR, P., SCHMIDELY, PH., FEDELE, V. y DELFA, R. (1991) Options Med., Série Séminaires, 13: 43-56.

HRISTOV, A.N., MCALLISTER, T.A. y CHENG, K.-J. (1996) En: Proc. 17th Western Nutrition Conference. Edmonton, Alberta.
HRISTOV, A.N., MCALLISTER, T.A. y CHENG, K.J. (1998a.) Anim. Feed Sci. Technol. 76: 165-172.
HRISTOV, A.N., MCALLISTER, T.A. y CHENG, K.J. (1998b) J. Anim. Sci. 76: 3146-3156.
JUDKINS, M.B. y STOBART, R.H. (1987). J. Anim. Sci. 66:1010-1015.
KRAUSE, M., BEAUCHEMIN, K.A., RODE, L.M., FARR, B.I. y NØRGAARD, P. (1998) J. Anim. Sci. 76: 2912-2920.
KUNG, L.Jr., HUBER, J.T., KRUMMREY, J.D., ALLISON, L. y COOK, R.M. (1982) J. Dairy Sci. 65: 1170-1174.
LEWIS, G.E., SÁNCHEZ, W.K., TREACHER, R., HUNT, C.W. y PRITCHARD, G.T. (1995) En: Proc. Western Section Am. Soc. Anim. Sci. 46: 310.
LOPEZ, S., VALDES, C., NEWBOLD, C.J. y WALLACE, R.J. (1999) Br. J. Nutr. 81: 59-64.
MCALLISTER, T.A., OOSTING, S.J., POPP, J.D., MIR, Z., YANKE, L.J., HRISTOV, A.N., TREACHER, R.J. y CHENG, K.J. (1999) Can. J. Anim. Sci. 79: 353-360.
MARTIN, S.A. STREETER, M.N., NISBET, D. J., HILL, G.M. y WILLIAMS, S. E. (1999) J. Anim. Sci. 77: 1008-1015.
MONTAÑO, M.F., CHAI, W., ZINN-WARE, T.E. y ZINN, R.A. (1999) J. Anim. Sci. 77: 780-784.
MUIRHEAD, S. (1996) En: Enzyme and Forage Additive Compendium. 3º Ed. The Miller Publishing Company, Minetonka, Minnesota.
NEWBOLD, C.J. (2003) En: International One-Day Seminar: Role of Probiotics in Animal Nutrition and their Link to the Demands of European Consumers. Lelystad.
NISBET, D.J. y MARTIN, S.A. (1990) Appl. Environ. Microbiol. 56: 3515-3518.
NISBET, D.J. y MARTIN, S.A. (1991) J. Anim. Sci. 69: 4628-4633.
RANILLA, M.J. y CARRO, M.D. (2003) ITEA, Vol. Extra 24: 741-743.
PIQUEMAL, J., LAPIERRE, C., MYTON, K., O'CONNELL, A., SCHUCH, W., GRIMA PETTENATI, J. y BOUDET, A.M. (1998) Plant Journal 13: 71–83.
RALPH, J. (1997) Chemistry and Industry. p. 708.
RODE, L.M., YANG, W.Z., y BEAUCHEMIN, K.A. (1999) J. Dairy Sci. 82: 2121-2126.
ROVICS, J.J. y ELY, C.M. (1962) J. Anim. Sci. 21:1012.
RUSSELL, J.B. y VAN SOEST, P.J. (1984) Appl. Environ. Microbiol. 47: 155-159.
RUST, J.W., JACOBSEN, N.L., MCGILLIARD, A.D. y HOTCHKISS, D.K. (1965) J. Anim. Sci. 24: 156-160.
SALAMA, A., CAJA, G., ALBANELL, E., SUCH, X., CASALS, R. y PLAIXATS, J. (2002a) J. Dairy Res. 69: 1-14
SALAMA, A.A.K., CAJA, G., GARIN, D., ALBANELL, E., SUCH, X. y CASALS, R. (2002b) Anim. Res. 51: 295-303.
SÁNCHEZ, W.K., HUNT, C.W., GUY, M.A., PRITCHARD, G.T., SWANSON, B., WARNER, T. y TREACHER, R.J. (1996) En: Proceedings of American Dairy Science Association. Crovallis, Oregon.
SANDERS, M.E., MORELLI, L. y TOMPKINS, T.A. (2003) CFSSFS 2: 102-111.
SNEL, J., HARMSEN, H.J.M., VAN DER WIELEN, P.W.J.J. y WILLIAMS, B.A. (2002) En: Nutrition and health of the gastrointestinal tract. M.C. Block et al. (Ed). Wageningen Academic Publishers, Wageningen.
TRAVIS, A.J., HIRST, D.J. y CHESSON, A. (1996) Annals of Botany 78: 325–331.
TREACHER, R., MCALLISTER, T.A., POPP, J.D., MIR, Z., MIR, P. y CHENG., K.J. (1996) Can. J. Anim. Sci. 77: 541 (Abstr.).
VAN EYS, J. y DEN HARTOG, L. (2003) En: International One-Day Seminar: Role of Probiotics in Animal Nutrition and their Link to the Demands of European Consumers. Lelystad.
VAN VUUREN, A.M. (2003) En: International One-Day Seminar: Role of Probiotics in Animal Nutrition and their Link to the Demands of European Consumers. Lelystad.
YANG, W.Z., BEAUCHEMIN, K.A. y RODE, L.M. (1999) J. Dairy Sci. 82: 391–403.–223.
YANG, W. Z., BEAUCHEMIN, K.A. y RODE, L.M. (2000) J. Dairy Sci. 83: 2512-2520.