



# Efectos de la suplementación con enzimas fibrolíticas en cabras lecheras

Eliel González García

## ► To cite this version:

Eliel González García. Efectos de la suplementación con enzimas fibrolíticas en cabras lecheras. Agricultural sciences. Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona), 2002. Español. NNT: . tel-02831334

**HAL Id: tel-02831334**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02831334>**

Submitted on 7 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Facultat Veterinària  
Departament de Ciència Animal y dels Aliments**

# **Efectos de la suplementación con enzimas fibrolíticas en cabras lecheras**

**Treball de Recerca**

**Eliel González García**

Bellaterra (Barcelona) Julio, 2002

## **RESUMEN**

Un total de veinticuatro cabras multíparas Murciano-Granadina a mitad de lactación (semanas 13 a 26) fueron usadas en un diseño “cross-over” simple para evaluar el efecto de la suplementación con un complejo de enzimas fibrolíticas exógenas (Promote®) sobre el consumo de alimento, la producción y composición de la leche, y los cambios en peso vivo y condición corporal en la lactación. Al finalizar la experiencia de lactación (semanas 27 a 30), se eligieron ocho cabras representativas (cuatro por tratamiento) para determinar la digestibilidad in vivo de las raciones. Por último, se estudió en condiciones in vitro, la degradabilidad de la materia seca y de la fibra neutro detergente, así como la producción de gas de las raciones experimentales. Las cabras recibieron “ad libitum” una ración completa compuesta por 65% de forraje (mezcla de 50% alfalfa y 50% maíz planta entera deshidratados) y 35% de concentrado al cual se le adicionó la enzima. Los tratamientos correspondieron al tipo de concentrado: Control (C; sin enzima) y Enzima (E; Promote®, incluido a 0.47 %). El consumo de alimento (2.02 kgMS/d), la producción de leche (1.51 l/d), la leche estandarizada al 4% (1.80 l/d), y su composición (sólidos totales, 13.9%; grasa, 5.25%; proteína bruta, 3.75%; proteína verdadera, 3.54%) no fueron afectados por la enzima, aunque la caseína tendió a disminuir (C, 2.87%; E, 2.81%;  $P < 0.09$ ). Los cambios en peso vivo (C, -0.1 kg; E, +1.90 kg;  $P < 0.10$ ) y en condición corporal (C, +0.09; E, +0.19;  $P < 0.14$ ) tendieron a ser mayores con el enzima. Las digestibilidades de MS (C, 68.9%; E, 71.9%) y MO (C, 70.4%; E, 72.9%) resultaron mayores ( $P < 0.05$ ) con la enzima, y la de la FB tendió a decrecer (Control, 41.9%; Enzima, 37.6%;  $P < 0.14$ ), mientras que las de la PB (61.9%), FND (54.3%) y FAD (48.8%) no variaron. Los resultados de digestibilidad in vivo no pudieron ser confirmados en el experimento in vitro, en el que ambas raciones presentaron valores de degradabilidad (MS, 51.8%; FND, 37.7%) y de producción de gas (143 ml/gMS) a las 48h. La suplementación de la ración de cabras lecheras con Promote®, en las condiciones de este estudio, no modificaron los rendimientos productivos en lactación, a pesar de mejorar las digestibilidades de la MS y de la MO.

**(Palabras claves:** enzimas fibrolíticas, cabras, leche, ingestión, digestibilidad)

## **SUMMARY**

Twenty-four multiparous Murciano-Granadina dairy goats in mid lactation (weeks 13 to 26) were used in a single cross-over design to evaluate the effect of supplementation with an exogenous fibrolytic enzyme complex (Promote®) on feed intake, milk yield and composition, live-weight and body condition score change. At the end of lactation trial, eight goats (four per treatment) were selected to measure the total tract digestibility from week 27 to 30 of lactation. Degradability of DM and NDF, as well as gas production, were also studied under in vitro conditions. Goats received an ad libitum total mixed ration composed of 65% forage (dehydrated mixture of 50% alfalfa and 50% maize-whole plant) and 35% concentrate to which the enzyme was added. Treatments were according to concentrate: Control (**C**; without enzyme) and Enzyme (**E**; Promote®, included at 0.47 % in the concentrate). Feed intake (2.02 kg DM/d), milk yield (1.51 l/d), 4% ECM (1.80 l/d), and milk composition (TS, 13.9%; fat, 5.25%; CP, 3.75%; true protein, 3.54%) were not affected by enzyme supplementation, although CN tended to decrease in Enzyme treatment (Control, 2.87%; Enzyme, 2.81%;  $P < 0.09$ ). Body weight change (Control, -0.1 kg; Enzyme, +1.90 kg;  $P < 0.10$ ) and body condition score change (Control, +0.09; Enzyme, +0.19;  $P < 0.14$ ) tended to be higher with enzyme treatment. Digestibilities of DM (Control, 68.9%; Enzyme, 71.9%) and OM (Control, 70.4%; Enzyme, 72.9%) were higher ( $P < 0.05$ ) with enzyme supplementation, CF digestibility tended to decrease (Control, 41.9%; Enzyme, 37.6%;  $P < 0.14$ ), while those of CP (61.9%), NDF (54.3%) and ADF (48.8%) were not affected with the enzyme addition. Total tract digestibility results could not be supported by the in vitro trial on which similar effects were observed both for degradability (DM, 51.8%; NDF, 37.7%) and gas production (143 ml/gDM) at 48h. Supplementing dairy goat diets with Promote®, under the conditions of this trial, did not affect lactation performance but enhanced DM and OM digestibility.

**(Key words:** fibrolytic enzymes, goat, milk, intake, digestibility)

## **INDICE**

|                                                                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUCCIÓN</b>                                                                                                   | <b>5</b>  |
| <b>I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>                                                                                      | <b>8</b>  |
| <b>I. 1. Antecedentes</b>                                                                                             | <b>8</b>  |
| <b>I.2. La estructura vegetal como factor físico limitante del consumo</b>                                            | <b>9</b>  |
| <b>I. 3. Los carbohidratos estructurales. Introducción a su clasificación y digestión</b>                             | <b>10</b> |
| <b>I. 4. El ecosistema ruminal como fuente de enzimas</b>                                                             | <b>16</b> |
| I. 4. 1. La actividad microbiana y enzimática del rumen                                                               | <b>19</b> |
| I. 5. La fermentación de los carbohidratos en el rumen                                                                | <b>21</b> |
| <b>I. 6. Estrategias para superar las limitaciones a la degradación microbiana de la pared celular de las plantas</b> | <b>23</b> |
| <b>I. 7. El uso de enzimas en las raciones de rumiantes</b>                                                           | <b>26</b> |
| I. 7. 1. Fuentes de enzima                                                                                            | <b>27</b> |
| I. 7. 2. Resultados en ganado vacuno                                                                                  | <b>29</b> |
| <b>I. 8. Objetivos</b>                                                                                                | <b>38</b> |
| <b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                                                                       |           |
| II. 1. Animales y tratamientos                                                                                        | <b>40</b> |
| II. 2. Consumo de alimento                                                                                            | <b>42</b> |
| II. 3 Producción y composición de la leche                                                                            | <b>43</b> |
| II.4. Peso vivo y condición corporal                                                                                  | <b>43</b> |
| II.5. Digestibilidad                                                                                                  | <b>43</b> |
| II. 6. Degradabilidad y producción de gas in vitro                                                                    | <b>45</b> |
| II. 7. Análisis químico                                                                                               | <b>46</b> |

|                                              |    |
|----------------------------------------------|----|
| II. 8. Análisis estadístico                  | 47 |
| <b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>           |    |
| III.1. Consumo                               | 48 |
| III. 2. Producción y composición de la leche | 50 |
| III. 3. Peso vivo y condición corporal       | 54 |
| III.4. Digestibilidad                        | 56 |
| <b>IV. CONCLUSIONES</b>                      | 64 |
| <b>V. BIBLIOGRAFÍA</b>                       | 65 |

## **INTRODUCCIÓN**

Los altos costos de la producción animal, en los que la alimentación representa del 40-60%, la disponibilidad de nuevas mezclas enzimáticas, y el posible potencial económico a materializar con el empleo de suplementos enzimáticos efectivos, ha contribuido a que en las últimas décadas se incremente el interés por el uso de enzimas como aditivos a la ración en los diferentes sistemas de alimentación animal.

Preparados enzimáticos con altos niveles de celulasa, hemicelulasa, xilanasa y pectinasa, han sido usados para mejorar la calidad nutritiva de los forrajes, ensilajes y raciones en especies monogástricas de importancia económica como pollos de engorde y cerdos (Annison, 1992; Chesson, 1993; Bhat, 2000). No obstante, los resultados referentes a la adopción de estas tecnologías en rumiantes han sido hasta el momento inconsistentes.

Algunos estudios, sin embargo, han demostrado mejoras sustanciales en la digestibilidad del alimento y en los rendimientos productivos (Beauchemin et al., 1999; Rode et al., 1999; Yang et al., 2000), mientras otros autores no han encontrado diferencias e incluso algunos efectos negativos (Judkins y Sobart, 1987); aparentemente, los resultados inconsistentes hasta hoy obtenidos pudieran atribuirse a un grupo de factores que incluyen: la composición de la ración, el tipo de preparación enzimática, el complemento de las actividades de las enzimas endógenas o exógenas, la dosis de inclusión del preparado enzimático en la ración, la estabilidad de la enzima, y el método de aplicación (Yang et al., 1999).

Los trabajos desarrollados en esta temática en rumiantes han sido conducidos fundamentalmente con ganado vacuno (Burroughs et al., 1960; Feng et al., 1996; Beauchemin et al., 2000), por lo que resulta de interés realizar llevar a cabo este tipo de proyectos en otras especies de importancia económica como es el caso de los pequeños rumiantes (cabras y ovejas), diferentes en sus hábitos de consumo y fisiología digestiva y en las cuales las enzimas fibrolíticas pueden constituir una nueva alternativa que contribuya a mejorar las estrategias de alimentación.

## **I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **I. 1. Antecedentes**

La salud humana, la seguridad ambiental y el bienestar animal, son algunos de los temas que más preocupan a los consumidores y que más se repiten en las agendas de los medios informativos y círculos políticos de todas las esferas de la actividad humana a nivel internacional. Estos temas se han convertido en la actualidad en centros de interés y relevancia mundial como consecuencia y reflejo del acelerado incremento en los procesos de globalización de la cadena alimentaria y de la industria de los alimentos.

Dentro de los ejemplos más recientes en este sentido están las controversias relacionadas con los cultivos genéticamente modificados, el uso de antibióticos promotores del crecimiento, los alimentos contaminados (dioxinas, pesticidas...) los cuales, entre otros aspectos, han provocado la adopción de una serie de medidas y procedimientos de regulación, comprobación y control de la calidad encaminadas a mantener y mejorar la confianza entre los productores y los consumidores finales. Estos nuevos conceptos y tendencias, unidos al incremento del grado de intensificación de los sistemas de producción animal, obligan a continuar desarrollando nuevas estrategias que desemboquen en un uso más eficiente de los recursos naturales y económicos disponibles sin que se afecten los indicadores de productividad y de satisfacción de la demanda de alimentos de una población en crecimiento exponencial.

Los rumiantes “modernos” que han evolucionado en aspectos relacionados con su genética y adaptación ambiental, hacia sistemas de producción más intensivos, han cambiado en sus necesidades nutricionales respecto a sus ancestros, dentro de las cuales están las diferencias en sus necesidades y requerimientos nutricionales. En este sentido, existen algunas razones que explican la inclusión en la práctica ganadera de hoy de muchos de los aditivos, entre las que se encuentran (West, 2000):

- Mayor actividad metabólica por animal, lo que requiere de la suplementación con nutrientes para alcanzar el adecuado balance.



- Los aditivos ayudan a mantener un deseable ambiente ruminal en las raciones con más concentrado y menos forraje. Los altos consumos de alimento y producción de leche condicionan la síntesis de compuestos orgánicos por parte de los microorganismos del rumen, cuya actividad poblacional estará muy en dependencia con lo que se le suministre al animal en la ración.
- Ante el considerable empleo de subproductos de bajo o variable valor nutricional, resulta beneficiosa la suplementación estratégica con algunos elementos o nutrientes deficitarios
- Los aditivos son frecuentemente necesarios en momentos fisiológicos y productivos de mayores necesidades nutricionales (gestación, inicios de lactación, animales de alto potencial genético, etc.)
- Algunos aditivos pueden aumentar la inmunidad de los animales y su resistencia por tanto a determinadas enfermedades
- Los aditivos mejoran por lo general las funciones microbianas ruminales y pueden incrementar la digestión de la fibra en este compartimiento, así como la biosíntesis proteica.

En correspondencia con el desarrollo de este tipo de tecnologías, la suplementación con enzimas fibrolíticas exógenas a la ración de los rumiantes se ha convertido en los últimos años en una de las alternativas para aumentar la eficiencia de utilización de los carbohidratos estructurales en el tracto digestivo de estas especies (Beauchemin y Rode, 1996).

## **I.2. La estructura vegetal como factor físico limitante del consumo**

Generalmente se señala a los factores físicos como los que más directamente influyen sobre el volumen inicial ocupado por la ingestión de un alimento y el ritmo mediante el cual ese volumen es disminuido por la digestión y velocidad de paso. El contenido de pared celular fibrosa es uno de los principales factores que determinan este proceso, toda vez que sus estructuras son menos solubles y ocupan más espacio que el contenido celular (Akin, 1989). Los forrajes contienen una gran proporción de su materia orgánica (MO) (35–80%) en forma de pared celular, lo cual proporciona la integridad estructural de la planta. Los

carbohidratos estructurales, principalmente la hemicelulosa, la celulosa y las pectinas, son degradadas por los microorganismos en el rumen, lo cual capacita a los rumiantes a utilizar fuentes de energía que no pueden ser utilizadas eficientemente por los monogástricos.

La distribución de las diferentes moléculas dentro de la planta y las uniones entre ellas serán factores importantes que afectan la facilidad con la cual los microorganismos pueden romper las células (Jung y Allen, 1995) y al consiguiente espacio ocupado por ellas en el tracto gastrointestinal. Las características físicas de la pared celular o las partículas fibrosas por sí mismas (tales como el origen del tejido, su forma y disposición y la gravedad específica) afectarán el ritmo con el que las partículas son degradadas y su relativa facilidad de tránsito (Wilson y Kennedy, 1996), además de estar relacionadas con la resistencia a la reducción del tamaño de partícula.

Reid et al. (1988) encontraron un efecto significativo del tipo de fotosíntesis de la especie (C-3 ó C-4) o tipo de forraje (gramínea o leguminosa) en las pendientes e intercepto para las regresiones de la materia seca ingerida (MSI) con relación a la fibra neutro detergente (FND), tanto para ganado vacuno como para ovino, indicando que el efecto de llenado puede variar con los diferentes forrajes. Esto pudiera ser explicado por la distribución de los polisacáridos estructurales. Minson (1990) observó que para grupos de forrajes con similar digestibilidad de la materia seca (DMS), el contenido de fibra sería mayor en leguminosas que en gramíneas, en pastos templados respecto a los tropicales y en las hojas respecto a los tallos. Wilson y Kennedy (1996) sugirieron que la menor digestibilidad de las gramíneas tropicales con relación a las de clima templado y las leguminosas, refleja la presencia en ellos de una estructura física más rígida y entrelazada. Estos autores también plantean que la mayor digestibilidad de las leguminosas con relación a las gramíneas puede estar relacionada con el tamaño de las hojas.

Las partículas de gramíneas son inherentemente largas con una gravedad específica funcional (GEF) baja, mientras que las partículas de leguminosas al ser

masticadas son cortas y de consistencia más “gomosa” con alta GEF y por ello tienden a escapar rápidamente del rumen. De esta manera, el consumo potencial es dependiente no sólo del contenido de fibra en la ración, sino también de la estructura original de la planta y de la vía en la cual se degrada durante la digestión.

El contenido de MS de los alimentos puede también influir sobre el volumen de espacio ocupado en el tracto digestivo. El predesechado de las gramíneas antes de producirse un ensilado ha demostrado incrementar su consumo al compararlo con la misma muestra no predesechada (Peoples y Gordon, 1989; Teller et al., 1993), en ocasiones hasta un 44% (Romney et al., 1997). Una explicación pudiera ser que la efectividad de la masticación durante la comida, así como el ritmo de degradación de las partículas, se ve estimulado con un material más seco. Sin embargo, en los años recientes las ventajas en términos de producción animal han sido menos evidentes (Forbes, 1995), si se tiene en cuenta que el control de la fermentación en los ensilados húmedos ha mejorado y las gramíneas se siegan en un estadio de madurez más temprano, originando un material con mayor digestibilidad en el que los efectos del predesechado no son tan significativos.

### **I. 3. Los carbohidratos estructurales. Introducción a su clasificación y digestión**

La reducción del contenido de forraje en la ración y, por tanto, de su contenido en fibra como resultado del empleo de altas proporciones de grano, está estrechamente relacionada con cambios en las concentraciones de grasa de la leche y con desórdenes metabólicos tales como acidosis, abomaso desplazado, abscesos en el hígado, y un declive general de los parámetros de la salud (Harris, 2001). El conocimiento de la importancia de una eficiente utilización de estos compuestos en las raciones para rumiantes, constituye entonces uno de los factores a tener en cuenta en la implementación de adecuados sistemas de alimentación en cualquier explotación ganadera.

Los hidratos de carbono desempeñan cuatro papeles importantes en los organismos vivos: 1) como fuente de energía, mediante su combustión, 2)

aportan átomos de carbono a la síntesis de otros componentes celulares, 3) constituyen la forma principal de almacenamiento de energía química y 4) son elementos estructurales de las células y los tejidos (Lenhinger, 1985).

Existen tres clases principales de hidratos de carbono: *monosacáridos*, *oligosacáridos* y *polisacáridos* (Figura I.1; McDonald et al., 1995). Los monosacáridos o azúcares sencillos están constituidos por una unidad aislada de polihidroxi-aldehído o cetona. El monosacárido más abundante es la glucosa, azúcar de seis átomos de carbono, que constituye la molécula combustible más importante para la mayor parte de los organismos, y que desempeña también el papel de construcción de algunos de los polisacáridos más abundantes, tales como el almidón y la celulosa (Van Soest, 1982).

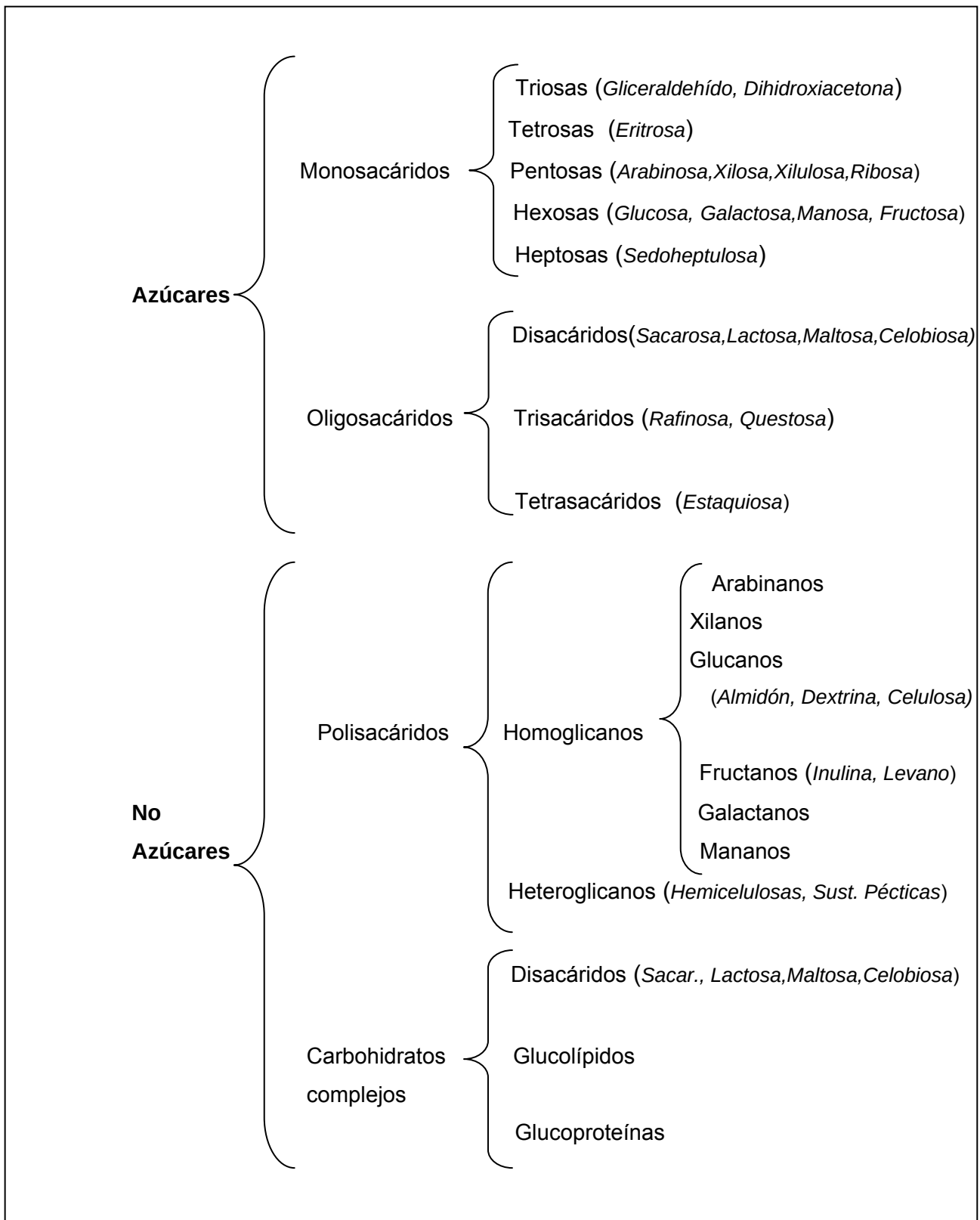
Los oligosacáridos están constituidos por dos a diez unidades de monosacáridos, unidas mediante enlaces glicosídicos. Entre ellos se encuentran los disacáridos y los trisacáridos, que poseen dos y tres unidades de monosacárido, respectivamente. Los polisacáridos están integrados por cadenas muy largas de unidades monosacáridas pudiendo ser lineales o ramificados.

La mayor parte de los hidratos de carbono de la naturaleza aparecen en forma de polisacáridos de elevado peso molecular. En su hidrólisis completa, mediante ácidos, o con el concurso de enzimas específicos, producen moléculas de monosacáridos, o de derivados de estos últimos.

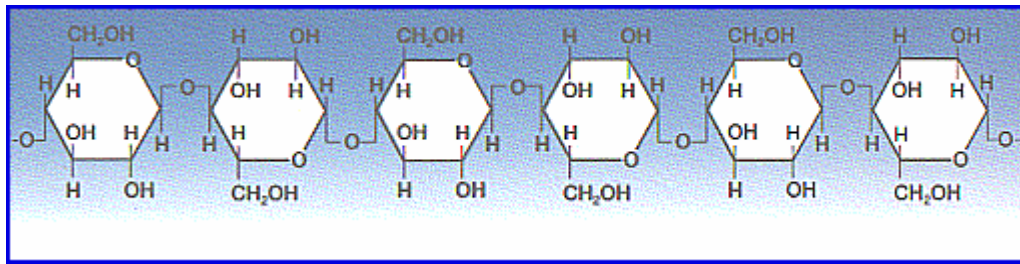
Los polisacáridos, que también reciben el nombre de glicanos, difieren en la naturaleza de las unidades monosacáridicas recurrentes, en la longitud de sus cadenas, y en el grado de ramificación. Suelen agruparse en polisacáridos de reserva (almidón, glucógeno) y polisacáridos estructurales (celulosa, hemicelulosa).

Los polisacáridos estructurales se sintetizan en el interior de las células, pero son impelidos hacia el exterior, para formar una pared o cubierta que rodea a la célula. En las plantas, la celulosa (Figura I. 2) es el componente principal de las gruesas y rígidas paredes celulares, constituyendo más del 50% de la materia orgánica total de la biosfera.

La membrana celular de los vegetales se inicia como una membrana pectínica, que gradualmente va siendo sustituida por depósitos de celulosa, hemicelulosas y lignina . El contenido en pectina desciende notablemente según envejece la planta y se produce de forma simultánea un incremento en el contenido de lignina y celulosa. La hidrólisis de la celulosa mediante su tratamiento con ácido sulfúrico al 72% proporciona alrededor de un 98% de glucosa, indicando que la celulosa está constituida por residuos de glucosa unidos mediante enlaces  $\beta$ 1,4 glucosídicos.



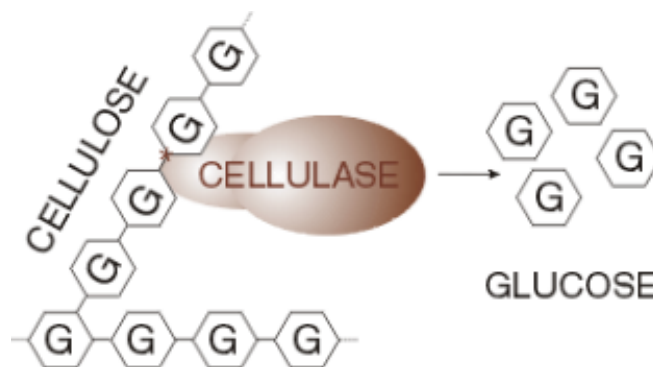
**Figura I. 1.** Clasificación de los carbohidratos (adaptado de Mc Donald et al.,1995)



**Figura I. 2.** Estructura química de la celulosa.

La mayoría de los carbohidratos consumidos por los rumiantes son polímeros de la glucosa que aparecen en forma de celulosa o almidón, por su parte la fracción fibrosa de éstos contiene fundamentalmente celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales son los encargados de conformar la estructura de la planta, de ahí el término “carbohidratos estructurales” o “carbohidratos de la pared celular”; sin embargo, algunas dietas pueden contener cantidades importantes de hemicelulosa y de pectina. Por consiguiente, para que tenga lugar su fermentación, la mayoría de los carbohidratos deben experimentar una hidrólisis en el rumen (Chesson y Forsberg, 1997).

La celulosa es degradada por una enzima compleja, la celulasa (Figura I. 3), la cual consta de dos unidades importantes como mínimo: C-1, que rompe los enlaces de hidrógeno, liberando cadenas de glucosa susceptibles a una posterior hidrólisis, y C-x, que hidroliza estas cadenas hasta celobiosa y glucosa. Las celulosas parecen diferir en su capacidad para absorber el factor hidrolítico (Beauchemin y Rode, 1996).



**Figura I. 3.** Representación esquemática de la destrucción de los enlaces glicosídicos de la celulosa por una enzima celulasa.

Las hemicelulosas (xilanos) son un grupo heterogéneo de polisacáridos asociados con la celulosa y la lignina de las membranas celulares de las plantas, definiéndose por lo general como polisacáridos que son insolubles en agua, que pueden ser extraídos con álcalis diluidos y que, tras la hidrólisis ácida, dan origen a azúcares y algunas veces azúcares y ácidos del azúcar (Van Soest, 1982). Las hemicelulosas contienen dos tipos diferentes de polisacáridos: polisacáridos de cadena corta (o celulosanas) que forman parte de la propia estructura de la celulosa y están orientadas en la estructura micelar y polisacáridos amorfos incrustados que se asocian íntimamente con la lignina de la membrana celular.

Las celulosanas pueden consistir en pentosanas y hexosanas. Las hemicelulosas que se encuentran aparentemente unidas a la lignina para formar un componente estructural de la membrana celular contienen tanto azúcares como ácidos urónicos. La celulosana más común es el xilano, un polisacárido que aparece en casi todas las plantas y que es insoluble en agua, soluble en solución alcalina, hidrolizado con facilidad y levógiro. Tanto por su distribución botánica como por su importancia, el xilano se clasifica a continuación de la celulosa y el almidón, abundando en los cultivos anuales, particularmente en residuos agrícolas como tallos de maíz, vainas y pajas de cereales, pudiendo representar del 15 al 30 % de los residuos. La forma en que se asocia con la celulosa podría ser explicada por su capacidad para ser comprimido entre grupos íntimamente asociados en los que podría ocupar espacios en lugar de celulosa.



Aparentemente, el xilano aparece enredado en la fibra de celulosa aunque no es un componente de la región micelar cristalina.

#### **I. 4. El ecosistema ruminal como fuente de enzimas**

El rumen tiene dos funciones básicas:

- Producir energía a partir de fuentes de carbohidratos que de otra manera no estarían disponibles para el animal; y
- Fijar nitrógeno no proteico de forma que pueda ser utilizado por el animal, como es el caso de la proteína microbiana.

Estas funciones son llevadas a cabo por la microflora y microfauna del rumen compuesta, principalmente por bacterias, hongos y protozoos mediante una acción conjugada de todos los microorganismos que conviven en el ecosistema ruminal y sus respectivos mecanismos de degradación (Figura I. 4).

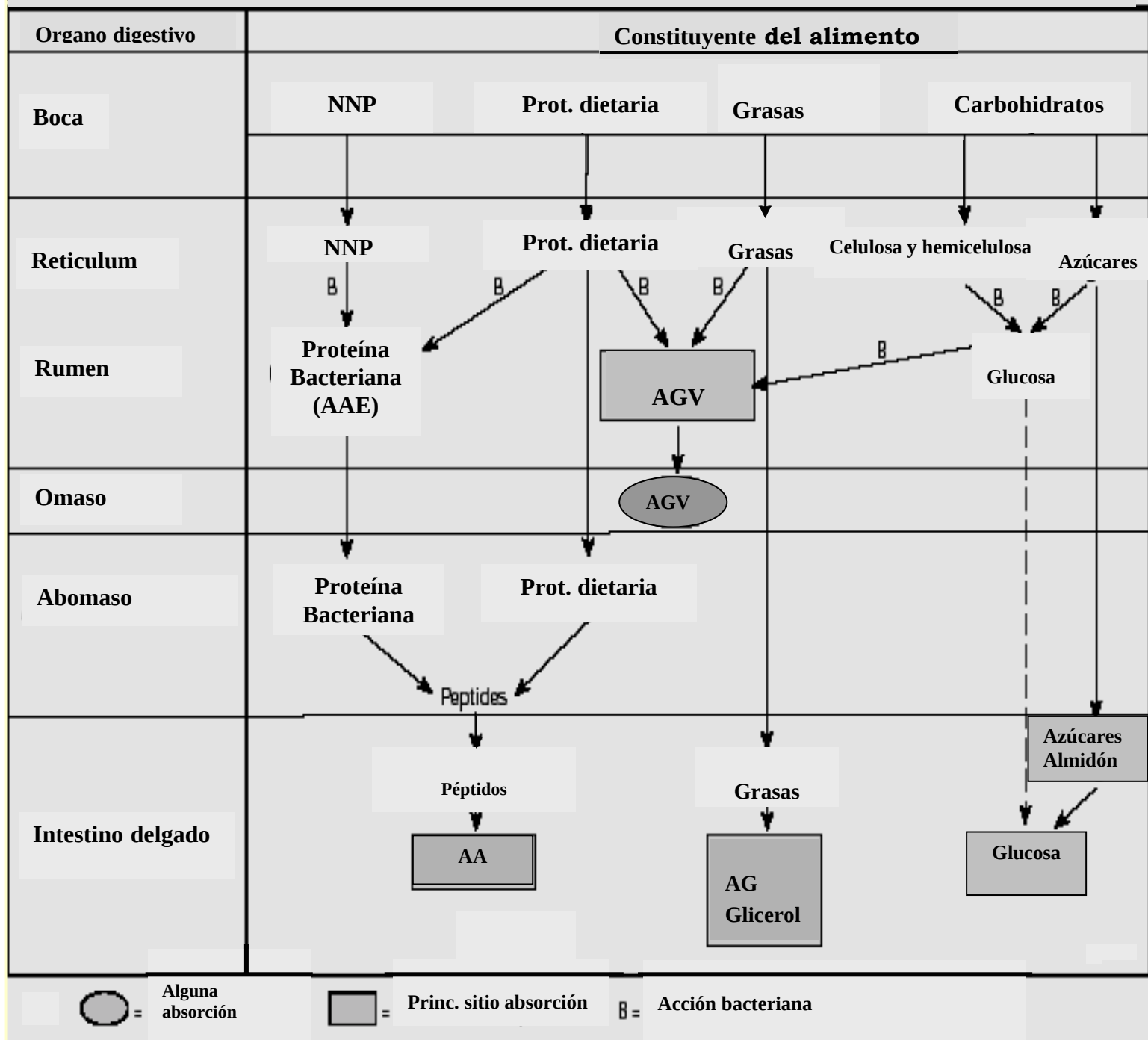
La microflora produce un volumen vasto de enzimas encargadas de intervenir activamente en el proceso de degradación del material alimenticio. La complejidad de este sistema no puede ser subestimada. Los organismos funcionan de manera sinérgica y competitiva y, debido a su gran diversidad, pueden adaptarse a una amplia variedad de alimentos convirtiéndolos en sustratos energéticos y en proteínas utilizables por el animal hospedero (Preston y Leng, 1987). Muchos de estos alimentos son completamente inutilizables por animales monogástricos. De esta manera los rumiantes representan un medio idóneo para transformar fuentes de alimentos de distintas formas de presentación en productos de alta calidad y demanda por el ser humano (carne, leche y fibra).

Para optimizar la producción de los rumiantes, se requiere del desarrollo de diferentes estrategias nutricionales con los siguientes objetivos (Preston y Leng, 1987):

1. Maximizar la fermentación de los carbohidratos que son imposibles de digerir en el intestino delgado
2. Minimizar la fermentación de carbohidratos que son digeridos y absorbidos en el intestino delgado
3. Maximizar la síntesis de proteína microbiana a partir del nitrógeno no proteico (NNP)
4. Minimizar la degradación de la proteína alimenticia a nivel de rumen

El rumen es una adaptación pre-péctica altamente especializada del tracto digestivo que facilita el almacenamiento y procesamiento microbiano de una gran cantidad de material vegetal (Hungate, 1988). La degradación y utilización del material vegetal ingerido por los rumiantes es regulado por factores inherentes a las plantas, los animales y la población microbiana ruminal (Forsberg y Cheng, 1992). El acceso de las enzimas digestivas a los nutrientes de las plantas es gobernado en gran medida por las características de éstas en cuanto a su estructura, composición, y las técnicas de procesamiento empleadas, entre otros factores. La masticación, salivación y rumia efectuadas por el animal comienzan a acondicionar la liberación de nutrientes e incrementa su disponibilidad para las enzimas digestivas microbianas. La degradación y metabolismo de los componentes del alimento (celulosa, hemicelulosa, almidón, proteína) llevada a cabo por los microorganismos ruminales, suministra el carbono, energía, aminoácidos (proteína microbiana) y vitaminas requeridas por el rumiante huésped.

**Figura I. 4.** Resumen de la digestión v absorción en el rumiante



El ecosistema ruminal comprende una muy diversa población de bacterias anaeróbicas estrictas, hongos y protozoos (Forsberg y Cheng, 1992) definidos por la intensa presión selectiva del ambiente ruminal. Estos microorganismos en simbiosis se adaptan a sobrevivir en condiciones de anaerobiosis, altos ritmos de dilución, altas densidades de células y la predación protozoaria, y han desarrollado la capacidad para la utilización eficiente de los complejos polímeros vegetales (p.ej. celulosa y hemicelulosa). A pesar de su complejidad, la baja porosidad y la variante capacidad de cristalización, los compuestos fibrosos de las plantas son en efecto digeridos por la actividad simultánea de todo el conjunto de enzimas microbianas presentes en el rumen (Chesson y Forsberg, 1997).

#### **I. 4. 1. La actividad microbiana y enzimática del rumen**

La actividad enzimática confirmada que existe en el rumen es muy diversa, e incluye las enzimas que degradan los polímeros de las paredes celulares en las plantas (celulasas, xylanases,  $\beta$ -glucanasas, pectinasas, etc.), las amilasas, las proteasas, las fitasas y las encargadas de degradar las toxinas presentes en un grupo de especies vegetales (p.ej. tannasas). La variedad de enzimas presentes en el rumen viene dada no sólo por la diversidad de su comunidad microbiana sino también por la multiplicidad de enzimas fibrolíticas producidas por microorganismos individuales (Doerner y White, 1990; Yanke et al., 1995).

La digestión eficiente de sustratos complejos en el rumen requiere de la acción combinada de muchas enzimas. Dos modelos han sido propuestos para células individuales con el objetivo de describir la organización del sistema de enzimas fibrolíticas siguiendo la síntesis y secreción de la célula. En el primer modelo, las enzimas actúan individualmente y sinérgicamente para efectuar la hidrólisis de la celulosa. Este modelo fue originado a partir de investigaciones en hongos aeróbicos representantes de algunos géneros que incluían el *Trichoderma* y el *Phanerochaete* y ha sido recientemente revisado (Wood, 1992; Béguin y Aubert, 1994). En el segundo modelo, las enzimas individuales se acoplan en un complejo multienzimático (p.ej. celulosomas). El complejo multienzimático celulosomal de la bacteria termofílica *Clostridium thermocellum* es el ejemplo más

extensivamente estudiado de este modelo (Bayer et al., 1998). Por otra parte, un alto número de celulasas contenidas en complejos de alta masa molecular, han sido identificados en un número de bacterias ruminales tales como *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus* y *Fibrobacter succinogenes*, así como en los hongos *Neocallimastix frontalis* y *Piromyces* sp. (Forsberg et al., 1993; Ali et al., 1995; Fanutti et al., 1995).

Cuatro especies de bacterias, *Bacteroides amylophilus*, *Streptococcus bovis*, *Succinimonas amylolytica* y *Succinivibrio dextrinosolvens*, son las bacterias amilolíticas y dextrinolíticas más comunes en el rumen, siendo las *Bacteroides ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Selenomonas ruminantium* las bacterias sacarolíticas más representativas y *Bacteroides succinogenes*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens* las celulolíticas (Baldwin y Allison, 1983).

La celulosa aparece en las formas amorfa y cristalina, siendo la forma cristalina la más difícil de degradar en el rumen (Van Soest, 1982). La celulosa producida por *R. albus* degrada solamente la celulosa amorfa mientras que las producidas por *R. flavefaciens* pueden hidrolizar la celulosa cristalina. La conversión de celulosa en glucosa y posteriormente en piruvato es un proceso más complejo y menos conocido. Las mismas especies bacterianas que degradan la celulosa son degradadoras normalmente de hemicelulosa.

Las principales bacterias celulolíticas, *R. albus*, *R. flavefaciens* y *F. succinogenes*, pueden representar del 0.3–4% del total de la población bacteriana (Krause et al., 1999; Weimer et al., 1999). Los hongos, por otra parte, representan aproximadamente el 8% de la biomasa microbiana (Orpin, 1983), y sólo una porción de estos producen celulasas y hemicelulasas altamente activas (Trinci et al., 1994). Un número limitado del género protozoario cuenta también con un importante papel en la digestión de la pared celular de las plantas, pudiendo digerir del 5–21% de los materiales celulolíticos en dependencia de la ración (Dijkstra y Tamminga, 1995). El factor primario limitante de la digestión de la celulosa parece ser la disponibilidad de sitios específicos para desarrollar este

proceso en el material vegetal más que una baja actividad celulolítica (Dehority y Tirabasso, 1998). Esta conclusión es confirmada por estudios similares llevados a cabo por Weimer et al. (1999).

Sin embargo, Weimer et al. (1999) reportaron que las diferencias en las poblaciones celulolíticas en vacas individuales fueron mayores que aquellas atribuibles a la ración, sugiriendo entonces que cada animal mantiene un ensamblaje único de especies celulolíticas. Esto pudiera ser el resultado de diferentes eficiencias 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).

#### **I. 5. La fermentación de los carbohidratos en el rumen**

Como en los monogástricos, en rumiantes los carbohidratos pueden ser clasificados dentro de dos tipos: aquellos que son digeridos y absorbidos en el intestino delgado (carbohidratos disponibles) y aquellos que no lo son. Los carbohidratos esencialmente disponibles son (Kreikemeier et al., 1990): los monosacáridos (glucosa, fructosa y galactosa), disacáridos (tales como lactosa y las series de maltosa), y almidones. Los carbohidratos no disponibles son esencialmente los que quedan sin digerir. Estos son en esencia los polisacáridos no almidonados y los oligosacáridos (tales como las series de rafinosa y fructo-oligosacáridos). Estos carbohidratos no disponibles son encontrados mayoritariamente en el componente denominado `fibra` de los alimentos.

La microflora del rumen no está capacitada para distinguir entre estos dos tipos de carbohidratos. Todos los alimentos que llegan al rumen son fermentados hasta convertirse en los productos metabólicos comunes como son los ácidos grasos de cadena corta (volátiles), metano y calor (Preston y Leng, 1987). Estos ácidos grasos son absorbidos directamente desde el rumen y pueden ser usados tanto en los procesos catabólicos como anabólicos (p.ej. gluconeogénesis). El proceso de fermentación resulta en significativas pérdidas de energía en la forma de metano, hidrógeno y calor. Así por ejemplo, cuando la glucosa alimenticia

elude el rumen ('bypass') y es absorbida en el intestino delgado, la eficiencia de utilización de la energía es capaz de incrementarse hasta un 30%.

La microflora del rumen degrada y fermenta los polisacáridos no amiláceos (PNA) muy eficientemente. Si bien es cierto que hay una gran diversidad en los tipos de polisacáridos encontrados en los alimentos, hay también un número muy alto de enzimas producidas por la microflora del rumen capaces de degradarlos.

Para la degradación de los PNA a sus azúcares constituyentes, lo cual es un prerequisite para la fermentación, se requiere de la acción coordinada de muchas polisacaridasas. Por ejemplo, la degradación de los arabinoxylanos, un polisacárido estructural que se encuentra en las paredes celulares de los forrajes y en el endospermo de los cereales, requiere de un rango de enzimas trabajando secuencialmente. Esencialmente las enzimas que destruyen las cadenas de arabinosa, grupo acetil, ácido ferúlico y ácido glucurónico actúan primero seguidas por las xilanasas que se encargan de fraccionar las principales cadenas de xilano. La descomposición de la celulosa también requiere una serie de enzimas las cuales incluyen endo-1,4 $\beta$ -D-glucanasas, 1,4 $\beta$ -D-glucan celobiohidrolasas y  $\beta$ -glucosidasas.

La descomposición de los PNA hasta azúcares fermentables es por tanto un sistema complejo de cooperación entre los microorganismos y sus enzimas. Estos aspectos característicos de los procesos fermentativos ruminales en su orden bioquímico y microbiológico, son de una importancia primordial al momento de comprender y hacer más efectivas las tecnologías que incluyen las enzimas exógenas como aditivos a los alimentos. A pesar de ello, la digestión del material fibroso es raramente completa en el rumen por lo que la de los factores que limitan la degradación de los PNA puede aportar elementos para la investigación en este campo.

## **I. 6. Estrategias para superar las limitaciones a la degradación microbiana de la pared celular de las plantas**

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 ha demostrado que la mayoría de estos espacios o poros tienen un diámetro entre 2 y 4 nm (Chesson y Forsberg, 1997; Gardner et al., 1999). Estas dimensiones no son suficientes para permitir la difusión libre dentro de la pared por simples enzimas globulares con masas mayores que ~20 kDa. La porosidad de la pared (Gardner et al., 1999) y su composición (Chesson et al., 1986) cambia muy poco durante el curso de su degradación, incluso cuando ~70% de la materia seca ha sido descompuesta.

La evolución no ha producido una solución para superar esta limitación. En cambio, muchas de las bacterias y hongos ruminales han optimizado un sistema de actividades de degradación de la pared celular en forma de celulosoma que reconoce las limitaciones de difusión impuestas por la pared celular de las plantas, y que está altamente adaptado a un modo de acción superficial. Esto hace ver la improbabilidad de que la introducción de genes codificados para actividades específicas, como se ha hecho en el pasado (Forsberg et al., 1997), contribuya significativamente al proceso de degradación. Quedaría, no obstante, la opción de la aplicación de las técnicas de ingeniería al celulosoma en si mismo (Bayer et al., 1998).

Aceptando pues la superficie de erosión como el mecanismo fundamental de la degradación de la pared celular, dos factores son particularmente importantes. En primer lugar, la cantidad de área superficial disponible para la colonización microbiana, en segundo lugar, la composición química de la superficie disponible (Din et al., 1991).



La superficie disponible está determinada por la preparación del alimento y los procesos de masticación y/o rumia, los cuales abren las células de la planta y las exponen a la colonización. La eliminación subsiguiente de los polisacáridos de la superficie puede, en los tipos de células más lignificadas, conducir al desarrollo de una superficie inerte en la cual algunos polisacáridos remanentes están protegidos del ataque por la presencia de compuestos fenólicos. Consecuentemente, el área superficial disponible alcanza un máximo para disminuir después en el tiempo, resultando en una disminución del ritmo de degradación. 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 define la magnitud de la degradación en conjunto (Forsberg et al., 1997).

El desarrollo de organismos ruminales capaces de digerir la lignina no parece ser una opción de interés actual debido a los requerimientos aeróbicos para que el proceso se realice a un ritmo compatible con el ritmo de paso. Una estrategia más adecuada en este sentido lo constituye la modificación de la lignificación de las plantas usadas como alimentos para rumiantes mediante prácticas de manejo factibles (p.ej. control del momento óptimo de siega, métodos de pretratamiento químico, físico o mecánico del forraje) aunque algunas de ellas puedan ser cuestionables desde el punto de vista económico.

Las enzimas implicadas en la biosíntesis de la lignina y los precursores de los taninos han sido identificadas para su modificación genética, habiéndose producido también cultivos en los cuales una o más de estas enzimas han sido alteradas. En este sentido se ha observado que los compuestos de polímeros fenólicos parecen tener una estructura mucho más plástica que la que se pensaba en un inicio (Ralph, 1997). Se ha encontrado además que la modificación de la naturaleza de los precursores raramente disminuye la cantidad de lignina formada, pero sí tiene efectos significativos sobre su composición y propiedades (Boudet, 1998).

El bloqueo de una vía bioquímica en un punto determinado puede también conducir a la reorientación del flujo de las moléculas precursoras. La regulación de la enzima cinnamyl CoA reductasa, que cataliza la reducción de los ácidos fenólicos a su correspondiente aldehído, condujo a mayores cantidades de ácido ferúlico libre presente en la célula (Piquemal et al., 1998). Debido a la plasticidad de la lignina, la identificación de la magnitud de los enlaces cruzados entre polímeros dentro de la pared celular, puede ser una vía efectiva de alteración de las características de su degradación (Grabber et al., 1998).

Existe también un aumento en la valoración de la importancia de la distribución espacial del material de la pared celular dentro de la planta respecto a su valor nutricional. Desafortunadamente, la aplicación de este nuevo criterio a la genética de nuevas variedades de cultivos ha sido obstaculizada por la carencia de herramientas cuantitativas de mediciones rutinarias en la anatomía vegetal. Los análisis de imágenes al microscopio han revolucionado los enfoques en este sentido, permitiendo el reconocimiento automatizado de los tipos de células y tejidos a ser usados como criterios de selección (Travis et al., 1996). Sin embargo, la falta de conocimiento de las bases genéticas de la anatomía vegetal ha provocado que el desarrollo de cultivos mejorados, usando elementos anatómicos como criterio de selección, esté restringido hasta el presente a la genética convencional.

Actuando en otra dirección, recientes trabajos han demostrado que la suplementación con enzimas en la ración de rumiantes (celulasas y xilanasas) puede incrementar la digestibilidad ruminal y la respuesta en producción de leche o en el crecimiento del ganado (Yang et al., 1999). Estos resultados resultan sorprendentes para muchos autores al considerarse el amplio potencial de las enzimas fibrolíticas endógenas producidas por la microflora del rumen. Una de las explicaciones en este sentido está relacionada con la posibilidad de producir un efecto beneficioso por la adición de polisacaridasas extracelulares enriquecidas que darían como resultado un ataque inmediato del material vegetal a consumir, proporcionando con ello una disponibilidad adicional de carbohidratos que estimularía un crecimiento y actividad microbiana más rápidos, disminuyendo por

tanto el tiempo ("lag time") requerido para la colonización microbiana. El efecto neto puede ser el equivalente a un mayor tiempo de retención dentro del rumen.

## **I. 7. El uso de enzimas en las raciones de rumiantes**

Las enzimas están presentes prácticamente en cualquier lugar, se encuentran en los procesos naturales y son producidas por todos los organismos vivos desde los unicelulares, pasando por las plantas, los insectos, los animales y el hombre, y actuando en todos los casos como catalizadores de las funciones mediante la aceleración de las reacciones químicas (Sheppy, 2001).

Sin las enzimas, los alimentos no podrían ser digeridos. Más de 3000 enzimas han sido descubiertas, cuya totalidad está compuesta por cadenas de aminoácidos como cualquier proteína. Como resultado de la actividad enzimática, los ritmos de progresión de las reacciones químicas se ven ampliamente modificados independientemente del estado energético de que se trate. La forma tridimensional y la posición de los aminoácidos reactivos dentro de la molécula es lo que confiere las propiedades catalíticas a las enzimas (Sheppy, 2001).

Las enzimas exógenas han sido ampliamente empleadas con la finalidad de eliminar los factores antinutricionales de los alimentos, incrementar la digestibilidad de los nutrientes existentes, y complementar la actividad de las enzimas endógenas en los animales monogástricos, principalmente aves de importancia económica (Classen et al., 1991; Bedford, 1993).

Casi desde la primera apreciación de que el normal funcionamiento del sistema digestivo de todos los animales incluía la descomposición de los macronutrientes presentes en los alimentos por enzimas endógenas, los nutricionistas han intentado estimular este proceso mediante la aplicación de enzimas exógenas, alcanzando los principales éxitos en las tecnologías aplicadas a las especies monogástricas y, particularmente, en pollos de engorde. La ciencia detrás del uso de enzimas en pollos de engorde está bien revisada (Annison y Choct, 1991; Annison, 1993). Las razones principales que justifican el éxito de la aplicación de enzimas exógenas en estas especies son:

- La estructura relativamente simple del tracto digestivo de los pollos, particularmente sensible a alteraciones nutricionales lo cual puede ser superado consecuentemente por las enzimas
- La adaptabilidad de estas especies como animales de laboratorio relativamente baratos lo cual permite desarrollar experimentos bien diseñados estadísticamente a gran escala, para elucidar los aspectos químicos, bioquímicos y fisiológicos que contribuyan a explicar lo registrado en las observaciones nutricionales. Consecuentemente, la generación de productos es también estimulada por la facilidad de experimentación con dichas especies.

Teniendo en cuenta lo anterior, el empleo de enzimas para mejorar la calidad de las raciones de rumiantes puede ser visto como un reto más lejano. Aunque las mismas técnicas analíticas pueden ser aplicadas a los alimentos para rumiantes, el tracto digestivo de estos resulta mucho más complejo.

Aunque los conocimientos sobre el rumen son bastante amplios, los intentos para modificar su función con enzimas han sido mucho menos efectivos que los obtenidos en pollos de engorde (Annison, 1992; Chesson, 1993). Sin embargo, a pesar de la comprensión acerca de las dificultades en el uso de estas tecnologías en los animales poligástricos, teniendo en cuenta la complejidad del rumen, y lo caro que resulta la utilización de ovinos o bovinos como animales experimentales, existen marcadas oportunidades para el uso de enzimas exógenas como aditivos a los alimentos, las cuales se encuentran en dos observaciones principales (Beauchemin y Rode, 1996; Hristov et al. 1996):

- La digestibilidad de la materia orgánica en rumiantes raramente alcanza el 100% y resulta con frecuencia considerablemente menor
- Están siendo investigadas y desarrolladas nuevas materias primas alimentarias para rumiantes, muchas de baja calidad, donde las enzimas pudieran contribuir a su descomposición en el rumen o en cualquier otro compartimento del tracto digestivo.

Algunos investigadores en la década de los 60 probaron el uso de enzimas exógenas en la ración de rumiantes (Burroughs et al., 1960; Rovics y Ely, 1962; Rust et al., 1965) pero en aquellos momentos las respuestas fueron variables y no se realizaron esfuerzos complementarios para determinar el modo de acción de estos productos, aparte de que la producción de enzimas exógenas resultaba cara y no era económicamente factible la aplicación de estos preparados en las concentraciones necesarias para elucidar respuestas animales positivas y rentables. Las reducciones recientes en los costes de fermentación, unido a la existencia de preparaciones enzimáticas más activas y mejor definidas, ha estimulado a los investigadores en los últimos años a reexaminar el papel de las enzimas fibrolíticas en la nutrición de los rumiantes (Chen et al., 1995; Beauchemin et al., 1997; Mc Allister et al., 1999).

Algunos estudios han intentado definir posibles modos de acción de estos aditivos (Judkins y Stobart, 1987; Feng et al., 1996; Hristov et al., 1998 a,b; Yang et al., 1999). Las enzimas exógenas pueden producir un amplio número de efectos, tanto en la microflora gastrointestinal como en el propio animal rumiante. Resulta por ello muy probable que las respuestas fisiológicas a las enzimas exógenas sean de un origen multifactorial.

### ***1. 7. 1. Fuentes de enzima***

Aunque existe una gran variabilidad de productos enzimáticos comercializados para el ganado, estos se derivan fundamentalmente de sólo cuatro bacterias (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum* y *Streptococcus faecium*), tres especies de hongos (*Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei* y *Saccharomyces cerevisiae*) (Muirhead, 1996). Otras especies de hongos, incluyendo *Humicola insolens* y *Thermomyces amiganosus*, están siendo comercializadas en una menor medida.

Tal como se ha comentado, las enzimas son biocatalizadores naturales producidos por las células vivas para intervenir en reacciones bioquímicas específicas. En el contexto de los aditivos de alimentos para rumiantes, las enzimas son empleadas para catalizar las reacciones degradativas mediante las

cuales los sustratos (p.ej. los alimentos) son digeridos a sus componentes químicos (p.ej. azúcares simples, aminoácidos, ácidos grasos). Estos componentes son utilizados para el crecimiento celular, tanto por los microorganismos ruminales como por el animal huésped.

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 pura con la participación de una sola enzima aislada (Beauchemin y Rode, 1996). Así, actividades enzimáticas secundarias, tales como amilasas, proteasas o pectinasas, están invariablemente presentes. La degradación de la celulosa y la hemicelulosa requiere de enzimas, y la diferencia en sus proporciones relativas y sus actividades individuales determinan la eficacia para la degradación de la pared celular de estos productos 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).

Resulta ventajosa la diversidad de las actividades enzimáticas presentes en los preparados disponibles comercialmente, en el sentido de que una amplia variedad de sustratos puede ser cubierta por un simple producto, pero al mismo tiempo representa un problema en términos de control de calidad y extrapolación de los resultados de investigación obtenidos con los diferentes preparados.

### ***1. 7. 2. Resultados en ganado vacuno***

Hace más de treinta años, varios estudios mostraron diferencias significativas en la mejora de la ganancia media diaria (GMD) y el índice de conversión de los alimentos en el ganado vacuno, mediante la suplementación de la ración con aditivos enzimáticos que presentaban actividad amilolítica,

proteolítica y celulolítica (Burroughs et al., 1960; Rovics y Ely, 1962; Perry et al., 1966).

Dichas mejoras en la producción animal se debieron principalmente a incrementos en la digestibilidad de la materia seca y la fibra (Rust et al., 1965). Sin embargo, otros estudios han demostrado que las enzimas exógenas no han mejorado de manera consistente la respuesta de los animales (Burroughs et al., 1960), además de que el mecanismo mediante el cual el crecimiento se vio estimulado no fue siempre confirmado en los experimentos de digestibilidad desarrollados.

La carencia de información sobre los productos enzimáticos usados y los métodos de suministro del producto, hacen aun más difícil la comparación entre estudios. Los resultados inconsistentes al parecer son 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 de aplicación (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). Por ejemplo, con heno de alfalfa, en ganado en crecimiento, la GMD se incrementó con los menores niveles de enzima, pero no con los más altos (Tabla I. 1), incrementándose la GMD en un 30% por la adición de la enzima en una cantidad cuatro veces superior al nivel más bajo (4X). Para el heno de fleo, los enzimas adicionados al nivel más alto (16X) mejoraron la GMD en un 36% debido principalmente al incremento en un 17% de la digestibilidad de la fibra.

En producción y composición de la leche en vacas, Beauchemin et al. (1995) reportan tendencias lineales en la mejora de estos indicadores cuando se añadieron enzimas hasta lo que los autores consideran niveles medios de inclusión (Tabla I. 2).

Las tendencias divergentes en condiciones aparentemente similares de experimentación evidencian la complejidad del tema de la suplementación con enzimas fibrolíticas en rumiantes, sobre todo a la hora de interpretar los resultados que deben analizarse como producto de la interacción de más de un factor.

Algunos estudios (Beauchemin et al., 1995; Tabla I. 1) han demostrado una respuesta cuadrática a la suplementación con enzimas observándose que esta práctica puede causar respuestas reducidas o incluso negativas. Sin embargo, esto por lo general ocurre cuando se suministran niveles demasiado altos y muy por encima de lo económicamente justificable.

**Tabla I. 1.** Efectos de diferentes niveles de enzimas fibrolíticas aplicadas como aditivos a heno de alfalfa, heno del fleo, y ensilado de cebada en la ración de vacunos de engorde (Beauchemin et al., 1995).

| <i>Item</i>                   | Control           | 1X                 | 2X                 | 4X                | 8X                  | 16X                |
|-------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| <i>Heno de alfalfa</i>        |                   |                    |                    |                   |                     |                    |
| GMD, kg/d                     | 1.03 <sup>a</sup> | 1.27 <sup>bc</sup> | 1.28 <sup>bc</sup> | 1.34 <sup>c</sup> | 1.19 <sup>abc</sup> | 1.12 <sup>ab</sup> |
| MSI, kg/d                     | 10.2 <sup>a</sup> | 10.8 <sup>a</sup>  | 10.5 <sup>a</sup>  | 11.7 <sup>b</sup> | 10.9 <sup>a</sup>   | 10.3 <sup>a</sup>  |
| Conversión, kg MS/kg ganancia | 9.9               | 9                  | 8.7                | 8.5               | 9.6                 | 9.5                |
| <i>Heno de Fleo</i>           |                   |                    |                    |                   |                     |                    |
| GMD, kg/d                     | 1.21 <sup>a</sup> | 1.32 <sup>a</sup>  | 1.13 <sup>a</sup>  | 1.24 <sup>a</sup> | 1.27 <sup>a</sup>   | 1.64 <sup>b</sup>  |
| MSI, kg/d                     | 8.8 <sup>bc</sup> | 8.3 <sup>ab</sup>  | 7.5 <sup>a</sup>   | 9.2 <sup>bc</sup> | 8.6 <sup>bc</sup>   | 9.3 <sup>c</sup>   |
| Conversión, kg MS/kg ganancia | 7.3 <sup>b</sup>  | 6.5 <sup>ab</sup>  | 7.5 <sup>b</sup>   | 6.3 <sup>ab</sup> | 6.8 <sup>ab</sup>   | 5.9 <sup>a</sup>   |
| <i>Ensilado de cebada</i>     |                   |                    |                    |                   |                     |                    |
| GMD, kg/d                     | 1.12              | 1.15               | 0.99               | 1.02              | 1.12                | 1.11               |
| MSI, kg/d                     | 7.5 <sup>ab</sup> | 8.1 <sup>b</sup>   | 6.8 <sup>a</sup>   | 7.8 <sup>b</sup>  | 7.3 <sup>ab</sup>   | 7.3 <sup>ab</sup>  |
| Conversión, kg MS/kg ganancia | 7.1               | 7                  | 7.2                | 7.6               | 6.9                 | 7                  |

<sup>a,b</sup> Medias con diferentes letras dentro de una misma columna difieren a (  $P < 0.05$  ).



**Tabla I. 2.** Consumo de materia seca, producción y composición de la leche en vacas alimentadas con raciones que contenían 45% de alfalfa tratada con niveles Bajos o Medios de enzimas fibrolíticas (Beauchemin et al., 1995).

| <i>Item</i>               | Ración            |                    |                   |
|---------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
|                           | Control           | Nivel Bajo         | Nivel Medio       |
| MSI, kg/d                 | 20.4              | 20.7               | 20.7              |
| Producción de leche, kg/d | 23.7 <sup>b</sup> | 24.6 <sup>ab</sup> | 25.6 <sup>a</sup> |
| Leche corregida 4%, kg/d  | 22.7 <sup>b</sup> | 23.3 <sup>ab</sup> | 24.6 <sup>a</sup> |
| Grasa, %                  | 3.79              | 3.7                | 3.78              |
| PB, %                     | 3.4               | 3.4                | 3.4               |
| Kg leche/kg MSI           | 1.2               | 1.22               | 1.29              |

<sup>a,b</sup> Medias con diferentes letras dentro de una misma columna difieren a ( $P < 0.05$ ).

Por otra parte, los efectos de enzimas exógenas son maximizados cuando se aplica al forraje seco una solución enzimática acuosa. Se ha observado que en estas condiciones se crea un complejo enzima-alimento estable que incrementa su efectividad. Este complejo estable ocurre rápidamente (en horas) y una vez estabilizado en el forraje seco, las enzimas son estables y efectivas durante algunas semanas. Aún cuando resulta razonable esperar que exista un efecto de la temperatura en el desarrollo del complejo enzima-alimento, no se han observado diferencias en la eficacia cuando las enzimas son aplicadas al grano de cebada seco en un rango de temperaturas de -30 a +35 °C. Sin embargo, McAllister et al. (1999) observaron una mejora lineal para los parámetros de digestión in vitro del ensilado de cebada cuando incrementaba la temperatura. Si esta diferencia se debe al tipo de alimento o a su contenido de humedad no está claro hasta el momento.

Los forrajes y granos procesados son almacenados antes de su suministro a los animales, lo que 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.

Como se ha visto es más difícil obtener respuestas positivas en la suplementación enzimática al ensilado de cebada que en el heno seco (Beauchemin et al., 1995; Tabla I. 1). La carencia de respuesta en el ensilado de cebada 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.

Feng et al. (1992 a,b) evaluando la aplicación de una solución enzimática directamente al pasto, no observaron efectos cuando se añadió al heno fresco o predesechado, pero si cuando se hizo con el pasto seco, donde la enzima incrementó las digestibilidades de la MS y la fibra. Cuando se aplicó un nivel bajo de enzimas fibrolíticas en el ensilado de alfalfa antes de la alimentación, no se registraron efectos en la digestibilidad de la MS. Sin embargo, cuando el mismo preparado fue añadido al ensilado después que este había sido deshidratado, la digestibilidad de la MS se vio incrementada en un 2.9% (Beauchemin y Rode, 1996).

Treacher et al. (1996) también han reportado que los efectos de la adición de enzimas al ensilado de cebada han sido variables. En este estudio un preparado enzimático fue rociado diariamente en la porción de ensilado (60% de MS) de una ración de ensilado de cebada y cebada grano. La adición de enzimas no mejoró la GMD, aunque la MSI aumentó en el máximo nivel de adición.

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 con relación a la infusión directa en el rumen a través de una cánula. Las digestibilidades de la MS y la fibra resultaron mayores cuando el preparado fue aplicado al alimento (Tabla I. 3). De hecho, la adición directa en el rumen pudo realmente disminuir la digestibilidad de la MS (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 altas posibilidades de provocar pocos o ningunos beneficios.

**Tabla I. 3.** Digestibilidad de raciones con 45% del alimento tratado con diferentes dosis de enzimas fibrolíticas (MS)(adaptado de Treacher, et al.,1996).

| Ítem                                                    | Ración            |                    |                   |
|---------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
|                                                         | Control           | Baja               | Mediana           |
| <i>Digestibilidad FND</i>                               |                   |                    |                   |
| Rumen                                                   | 30.7              | 34.9               | 36.9              |
| Tracto digestivo total                                  | 38.8 <sup>b</sup> | 41.2 <sup>ab</sup> | 43.6 <sup>a</sup> |
| Consumo de prot. indegradable en rumen <sup>1</sup> , % | 50.0 <sup>a</sup> | 47.7 <sup>ab</sup> | 39.7 <sup>b</sup> |
| Síntesis de prot. microbiana, g de nitrógeno/d          | 290               | 273                | 336               |
| N total disponible absorción en intestino, g/d          | 636               | 606                | 609               |

<sup>a,b</sup> Medias con letras diferentes en la misma fila difieren (  $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> Proteína pasante.

Aunque la aplicación de una solución acuosa directamente al alimento estimula la reacción de la enzima con el sustrato, la posibilidad de obtener una respuesta beneficiosa mediante el suministro directo de enzimas no puede ser concluida o reglamentada totalmente si se tiene en cuenta que algunos estudios mostraron efectos positivos con el suministro directamente en el suplemento (Burroughs et al., 1960).

Sin embargo, según la mayoría de las experiencias hasta ahora publicadas, la cantidad de producto (y su coste) es significativamente mayor cuando el uso de un preparado enzimático seco se compara con su solución acuosa antes del suministro a los animales.

Como ha sido comentado, las investigaciones sobre los efectos de las enzimas en las raciones de rumiantes han registrado resultados tanto positivos como negativos desde la década de los '60. Existen, sin embargo, algunos estudios recientes que demuestran los efectos positivos de la suplementación con enzimas al ganado vacuno en estados fisiológicos de crecimiento y lactación (Krause et al., 1998; Rode et al., 1999; Yang et al., 1999).

Stokes y Zheng (1995) observaron mejoras del valor nutritivo en una dieta mezclada a base de heno de alfalfa y ensilaje de alfalfa y trigo tratados con un preparado de enzimas fibrolíticas. El consumo de materia seca se incrementó en un 10.7%, mientras la producción de leche lo hizo en un 14.8%.

Lewis et al. (1995) también observaron efectos positivos al incluir enzimas en este tipo de raciones. Las vacas suplementadas con enzimas produjeron 1.3 kg/d más de leche que las del tratamiento control. Al mismo tiempo, el consumo de alimento aumentó a niveles de 2 kg/d.

En raciones con heno de alfalfa Beauchemin y Rode (1996) han obtenido resultados positivos. En ese estudio la suplementación con enzimas resultó en un incremento del 13% de la GMD en vacunos de engorde sin cambios significativos en el consumo de MS. Cuando se incorporó actividad celulasa además de la xilanasa al mismo preparado enzimático, se elevó la GMD y el consumo de MS sólo al menor nivel de inclusión.

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 suministrárselo a los animales, necesitándose en este caso altos niveles de

enzima para poder lograr una convincente relación dosis-respuesta que provocara los valores de GMD y consumo de MS observados (Tabla I. 4).

**Tabla I. 4.** Efectos de la suplementación con enzimas fibrolíticas al ensilado de maíz en ganado vacuno (adaptado de Beauchemin y Rode, 1996).

|                | Nivel de enzima (x1) |      |       |      |
|----------------|----------------------|------|-------|------|
|                | 0                    | 15x  | 22.5x | 30x  |
| GMD, kg/d      | 1.06                 | 1.07 | 1.12  | 1.23 |
| % del Control  | 100                  | 101  | 106   | 116  |
| MSI, kg/d      | 6.6                  | 6.3  | 6.3   | 6.2  |
| % del Control  | 100                  | 95   | 95    | 94   |
| Conversión, kg |                      |      |       |      |
| MSI/kg         | 6.22                 | 5.88 | 5.63  | 5.05 |
| % del Control  | 100                  | 95   | 91    | 81   |

Sánchez et al. (1996) presentaron datos menos convincentes sobre la relación dosis-respuesta en una experiencia en la que se suplementó al ganado vacuno lechero con tres niveles de mezcla enzimática añadida a una ración de heno de alfalfa. Estos autores comprobaron que el nivel intermedio de adición de enzima fue más efectivo que el mayor nivel empleado (Tabla I. 5).

**Tabla I. 5.** Comportamiento de vacas alimentadas con forraje tratado con diferentes niveles de enzima (adaptado de Sánchez et al., 1996)

|                 | Enzima            |                   |                   |                   |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                 | Sin tratar        | 1.25 l/ton        | 2.5 l/ton         | 5 l/ton           |
| MSI, kg/d       | 24.3 <sup>a</sup> | 26.2 <sup>b</sup> | 26.1 <sup>b</sup> | 26.6 <sup>b</sup> |
| Leche           |                   |                   |                   |                   |
| corregida, kg/d | 41.1 <sup>a</sup> | 42.1 <sup>a</sup> | 48.1 <sup>b</sup> | 41.9              |
| Condición       |                   |                   |                   |                   |
| Corporal, 1-5   | 2.6 <sup>a</sup>  | 3.0 <sup>b</sup>  | 2.6 <sup>a</sup>  | 3.0 <sup>b</sup>  |

\*Valores con letras diferentes difieren a  $P < 0.05$ .

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

Beauchemin et al (2000) destacaron que los efectos de la suplementación con enzimas resultaron más relevantes cuando las vacas se encontraban en balance energético negativo. Esto ha constituido una hipótesis prácticamente constante en la mayoría de los trabajos de estos autores, cuestionándose asimismo el mecanismo mediante el cual la suplementación estimuló el consumo y sin embargo sólo mejoró 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 en raciones similares probadas 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 de una mayor producción de leche.

Tal como ha ocurrido en los estudios con enzimas exógenas en raciones forrajeras, los experimentos con raciones a base de cereales han resultado poco menos que contradictorios. Beauchemin y Rode (1996) encontraron que la cebada tuvo mayores niveles de fibra y menores niveles de almidón al compararse con el maíz. Así, los preparados enzimáticos con alta actividad xilanasa y celulasa pudieran mejorar significativamente la calidad nutritiva de la cebada al compararse con el maíz.

Este estudio de Beauchemin y Rode (1996) resulta de interés debido fundamentalmente a que resalta algunos de los problemas con los que se enfrenta el experimentador cuando estudia los efectos de las enzimas. Primeramente, se advierte que aunque la cebada contiene altos niveles de xilanos hay también altos niveles de  $\beta$ -glucanos que contribuyen significativamente a la fracción fibrosa. De hecho, es este componente de la cebada lo que ha demostrado ser uno de los principales responsables de su pobre valor nutritivo para aves. El polisacárido  $\beta$ -glucano ha sido por ello el objetivo de las enzimas  $\beta$ -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 tipos de 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.

Como se ha indicado en todo lo antes expuesto, la gran mayoría de los resultados, tendencias y conceptos en la temática de la suplementación con enzimas fibrolíticas han sido obtenidos en trabajos desarrollados con ganado vacuno. Poco hay publicado con enzimas en ovinos y, nada que se conozca hasta el momento, en el caso de las cabras. El presente trabajo busca contribuir de alguna manera al estudio de los efectos de las enzimas fibrolíticas en la especie caprina, con la evaluación de una mezcla comercial enzimática de reconocida actividad sobre los compuestos de la pared celular.

## **I. 8. Objetivos**

El **objetivo general** de este trabajo ha sido evaluar los efectos del uso de enzimas fibrolíticas (Promote<sup>®</sup>) sobre el consumo de alimentos, la digestibilidad y el comportamiento de cabras lecheras Murciano-Granadina a mediados de la lactación. En síntesis, se trata de comprobar cómo responden las cabras ante la suplementación con enzimas fibrolíticas mediante el análisis de algunos de los principales indicadores productivos y la discusión de los resultados con lo publicado en la literatura.

El cumplimiento del objetivo general se ha logrado mediante el desarrollo de los siguientes **objetivos específicos**:

- Conocer los efectos de la suplementación con **Promote®** sobre la producción y composición de la leche y los cambios en peso vivo y condición corporal de las cabras a mediados de lactación.
- Determinar los efectos de la suplementación con **Promote®** sobre los indicadores de consumo y la digestibilidad del alimento en el tracto digestivo relacionándolo con la respuesta productiva.
- Estudiar los niveles de degradabilidad de la MS, la FND y el potencial de producción de gas como resultado de la suplementación.



## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

El experimento fue desarrollado en la Granja Experimental del S1GCE (Servei de Granges i Camps Experimentals) de la Facultat Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, desde enero hasta mayo del año 2001. Los procedimientos experimentales fueron en todos los casos aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Humana y Animal de la UAB (Referencia: CEEAH: 01/330).

### **II. 1. Animales y tratamientos**

Se utilizaron un total de veinticuatro cabras Murciano-Granadina a mediados de lactación (semanas 13 a 26) distribuidas en dos lotes equilibrados o tratamientos (12 cabras por grupo), teniendo en cuenta sus niveles de producción de leche, peso vivo, condición corporal y número de lactación.

Las cabras recibieron una ración “unifeed” ad libitum compuesta por 65% de forraje (mezcla deshidratada de 50% alfalfa y 50% maíz-planta entera) y 35% de concentrado (Tabla II. 1). La enzima (Promote<sup>®</sup>, Agribands International, St Louis, MI) fue añadida durante el proceso de fabricación al concentrado, estando en correspondencia con los tratamientos: **Control** (Control sin enzima) y **Enzima** (Promote<sup>®</sup>, incluido en una proporción del 0.47% de la materia seca del concentrado). La composición química de la ración y el valor nutritivo de los alimentos usados en el “unifeed” aparecen resumidos en la tabla II. 2.

**Tabla II. 1.** Composición en ingredientes de las raciones experimentales.

| Ingredientes, % del alimento         | Mezcla forrajera | Concentrado |
|--------------------------------------|------------------|-------------|
| Maíz-planta entera deshidratada      | 50.0             | -           |
| Heno de alfalfa deshidratada         | 50.0             | -           |
| Harina de alfalfa peletizada         | -                | 31.9        |
| Harina de cebada                     | -                | 11.5        |
| Maíz molido                          | -                | 11.7        |
| Harina de soja-44                    | -                | 20.9        |
| Harina de semilla girasol-completa   | -                | 22.3        |
| CaCO <sub>3</sub>                    | -                | 1.0         |
| Mezcla mineral-vitamina <sup>1</sup> | -                | 0.3         |
| Rovimix E-50 SD <sup>2</sup>         | -                | 0.01        |
| Bioplex Zn <sup>3</sup>              | -                | 0.02        |

<sup>1</sup> Mezcla mineral-vitamina fue suministrada por Agribrands Europe, Barcelona, España. La preparación contenía 10.5% Ca, 20.0 g/kg Mn, 17.5 g/kg Fe, 15.0 g/kg Zn, 250 mg/kg I, 100 mg/kg Se, 50 mg/kg Co, 3600 kIU/kg of vitamin A, 700 kIU of vitamin D<sub>3</sub>, 22000 IU/kg of vitamin E.

<sup>2</sup> Hoffmann-La Roche Ltd. Vitamins and Fine Chemicals Division (Basel, Switzerland). Contenía 50% acetato DL- $\alpha$ -tocopheryl.

<sup>3</sup> Alltech Ireland Ltd. (Dunboyne, Co. Meath, Ireland). Contenía 10% Zn.

**Tabla II. 2.** Composición química y valor nutritivo de los alimentos usados en las raciones experimentales.

| <i>Item</i>                                   | Mezcla<br>forrajera | Concentrados |                     | Ración Total |        |
|-----------------------------------------------|---------------------|--------------|---------------------|--------------|--------|
|                                               |                     | Control      | Enzima <sup>1</sup> | Control      | Enzima |
| Contenido MS, %                               | 92.66               | 90.79        | 90.83               | 92.01        | 92.02  |
| Composición, % MS                             |                     |              |                     |              |        |
| MO                                            | 91.5                | 90.4         | 90.2                | 91.1         | 91.0   |
| PB                                            | 11.19               | 23.76        | 24.59               | 15.59        | 15.88  |
| FB                                            | 30.9                | 18.8         | 16.3                | 26.7         | 25.8   |
| FND                                           | 51.5                | 27.5         | 27.4                | 43.1         | 43.1   |
| FAD                                           | 30.3                | 16.8         | 17.6                | 25.6         | 25.9   |
| NE <sub>L</sub> , Mcal por kg MS <sup>2</sup> | 1.36                | 1.51         | 1.51                | 1.41         | 1.41   |
| Ca, g <sup>2</sup>                            | 13.8                | 11.3         | 11.3                | 12.9         | 12.9   |
| P, g <sup>2</sup>                             | 3.0                 | 5.0          | 5.0                 | 3.7          | 3.7    |

<sup>1</sup> Mezcla enzima fibrolítico (Promote<sup>®</sup>, Promote Technologies Group, Agribands, Minnetonka, MN) aplicada por aspersión al concentrado al 0.47% de la MS.

<sup>2</sup> Estimado a partir de las tables del INRA (1989).

El diseño experimental fue un “cross-over” simple con dos períodos de medición de 50 días cada uno, así como un período de adaptación y otro de “washing-out” para el cambio de ración de 14 días, respectivamente.

## II. 2. Consumo de alimento

La ración fue ofrecida una vez al día después del ordeño (10:00 h) al 130% del consumo voluntario del día anterior (en base materia seca). Las muestras de concentrado, forraje deshidratado y rechazos fueron tomadas diariamente y posteriormente molidas a través de un tamiz de 1-mm de diámetro en un molino de acero inoxidable y homogeneizadas para su posterior análisis de MS, MO, FB, FND, FAD, y PB (apartado II. 7).

El consumo de materia seca individual (MSI) fue calculado diariamente como la diferencia entre la cantidad de materia seca ofrecida y la rechazada.

### **II. 3 Producción y composición de leche**

Las cabras se ordeñaron una vez al día (09:00 h) en una sala de ordeño tipo “Casse” de 24 plazas (doce unidades de ordeño) en línea baja (Westfalia Surge Iberica, Granollers, Barcelona). Las características de funcionamiento de la máquina de ordeño fueron: vacío de 42 kPa, ritmo de pulsación de 90 ppm y una relación de pulsación de 60:40.

La producción de leche fue controlada individualmente una vez por semana a las 09:00 h durante todo el período experimental. Las muestras para el análisis químico de la leche fueron obtenidas quincenalmente y conservadas con dicromato potásico (0.03%) y analizadas el mismo día.

La determinación del contenido en grasa, proteína bruta, proteína verdadera, sólidos totales y caseína se realizó mediante un equipo de espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS; InfraAlyzer 450, Bran+Luebbe). Las lecturas se hicieron por duplicado, utilizando cápsula de aluminio con un paso óptico de 0.3 mm, siguiendo la metodología descrita por Albanell et al (1999) para leche de oveja.

### **II.4. Peso vivo y condición corporal**

A partir de la semana 15 de lactación, las cabras fueron pesadas semanalmente y la condición corporal (CC) fue estimada también semanalmente en un rango entre 1 y 5 según la metodología indicada por Hervieu et al. (1991).

### **II.5. Digestibilidad**

Al finalizar la experiencia en lactación, ocho cabras (cuatro por tratamiento) fueron seleccionadas para determinar, desde la semana 27 de lactación hasta la 30, la digestibilidad in vivo de las raciones. Las cabras fueron alojadas individualmente en jaulas de metabolismo.

La duración de la experiencia fue de 3 semanas incluyendo 2 semanas para la adaptación a las jaulas y a las raciones y 1 semana para la colecta total de heces. Las raciones fueron suministradas ad libitum (130%) como “unifeed”, de manera similar a la experiencia de lactación, y fueron ofrecidas individualmente a las 09:00 h. La disponibilidad de agua fresca y abundante fue constante. Durante la semana de mediciones, la cantidad de alimento ofrecido y rechazado fue registrada diariamente para determinar la MSI. Cada ración fue muestreada diariamente y homogeneizada para cada animal.

La digestibilidad de los nutrientes fue medida mediante la técnica de colecta total de heces. Las heces fueron recolectadas y pesadas diariamente durante la semana de medición donde. Al finalizar ésta, se mezclaron y se retuvo un 10% del peso total de heces recolectadas.

Las muestras de alimento, rechazo y heces fueron molidas a un tamaño de partícula de 1 mm para su posterior análisis de MS, MO, PB, FB, FND, FAD (apartado II. 7).

En esta fase experimental se calculó el balance energético para cada cabra y tratamiento. La energía requerida para mantenimiento fue calculada a partir del procedimiento descrito por Aguilera et al. (1990) en cabras lecheras de la raza Murciano-Granadina en lactación. La cantidad de energía requerida para la producción de leche fue estimada mediante la multiplicación del volumen de producción de leche corregida al 4% de grasa  $\times 0.745$  (Mcal/kg), interpretándose este último valor como la densidad energética esperada de cada kg de leche corregida. El consumo de energía se asumió como el resultado de la cantidad de materia seca ingerida (MSI) por sus contenidos energéticos estimados a partir de las tablas del INRA (1989).

La eficiencia de utilización de la energía para la producción de leche fue calculada como la proporción de energía consumida que era destinada para los propósitos de mantenimiento y producción de leche. La retención energética se estimó a partir de la multiplicación de los valores de cambio en peso corporal  $\times 0.91$  según lo indicado por Aguilera et al. (1990).

## **II. 6. Degradabilidad y producción de gas in vitro**

El patrón de fermentación microbiana de las raciones fue estudiado con la medición de gas producido durante la incubación in vitro de las muestras, siguiendo la técnica de Theodorou et al (1994). Las muestras de la ración total para cada experimento fueron mezcladas en la misma proporción que las raciones suministradas en los experimentos de lactación y digestibilidad in vivo, y molidas a tamaño de partícula de 1 mm.

Se evaluaron series de fermentación, con botellas selladas por duplicado de aproximadamente 800 mg de cada sustrato en cada serie. Se incluyeron además como blanco, botellas duplicadas de la solución de incubación pero sin sustrato.

Dos cabras de selección negativa del rebaño, que formaron parte en el experimento de lactación fueron sacrificadas y usadas como donantes de líquido ruminal para el estudio de fermentación in vitro. Las cabras fueron adaptadas a la ración “unifeed” (1 cabra por tratamiento) y sacrificadas antes del suministro de alimentos (07:30). El contenido ruminal de los dos animales fue extraído en su totalidad, filtrado con una tela de malla fina y tomadas cantidades iguales para su posterior uso como solución inóculo a una proporción 1:9 con la solución buffer. Las botellas fueron incubadas a 39 °C, y la presión de gas producida en cada botella fue registrada mediante un manómetro HD8804 con una aguja de presión TP 804 (DELTA OHM) después de 2, 4, 8, 20, 24, 32 y 48 horas de incubación. Las lecturas fueron convertidas a volumen con el empleo de una regresión lineal de la presión medida en el mismo tipo de botella con volúmenes de aire conocidos. El volumen de gas para cada tiempo de incubación fue expresado por unidad de materia seca incubada. Los residuos de la incubación fueron recogidos y analizados sus contenidos de MS y FND.

## **II. 7. Análisis de muestras**

Todos las muestras procesadas en el laboratorio, fueron analizadas por duplicado.

### *Materia Seca*

El contenido en materia seca (MS) de las muestras fue determinado mediante secado a 105 °C en estufa de ventilación forzada durante 24 h.

### *Materia Orgánica*

La materia orgánica (MO) fue determinada mediante la incineración total de las muestras utilizadas para la determinación de la materia seca en un horno mufla a 550 °C durante 4 h de acuerdo con los métodos de AOAC (1990).

### *Proteína Bruta*

Los contenidos de proteína bruta (PB) fueron mediante la determinación del nitrógeno total por el método de Kjeldahl (1883), y corrigiéndose el resultado por el factor 6.25.

La digestión se llevó a cabo en un digestor “Digestion System 20, 1015 Digester” (Tecator) y la destilación y valoración de las muestras digeridas se realizó en un aparato de destilación-valoración automática “Kjeltec Auto 1030 Analyzer” (Tecator).

### *Fibra Bruta*

La determinación de fibra bruta (FB) se realizó mediante hidrólisis sucesivas (una ácida y otra alcalina), de las muestras según el método Weende de Henneberg y Stohmann (1860), modificado por el AOAC (1990). Para ello se utilizó un aparato incubador ANKOM<sup>200</sup> Fiber Analyser (ANKOM Technology, Fainport, NY).

### *Fibra Neutro y Acido Detergente*

Para las determinaciones de la fibra neutro detergente (FND) y la fibra ácido detergente (FAD) se procedió de acuerdo con los métodos de Van Soest et al. (1991).

El análisis se realizó de forma secuencial utilizando un incubador ANKOM<sup>200</sup> Fiber Analyser (ANKOM Technology, Fainport, NY).

## **II. 8. Análisis estadístico**

En la experiencia de lactación, se calcularon las medias individuales por cabra para cada período y para todas las variables, incluyendo el consumo de alimentos, la producción y composición de leche, y las variaciones en peso vivo y condición corporal. Los datos fueron analizados usando el procedimiento PROC MIXED con medidas repetidas de SAS (1996) teniendo en cuenta en el modelo los efectos del animal, el período y el tratamiento:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + P_j + C_k + \varepsilon_{ijkl}$$

donde:

Y = observaciones para las variables dependientes,

$\mu$  = media de todas las observaciones,

$T_i$  = efecto del tratamiento, ( $i = 1, 2$ ),

$P_j$  = efecto del período, ( $j = 1, 2$ ),

$C_k$  = efecto del animal, ( $k = 1, 2, 3...24$ ),

y

$\varepsilon_{ijkl}$  = error residual.

Los datos de digestibilidad in vivo fueron analizados mediante el procedimiento GLM de SAS (1996) mientras la degradabilidad in vitro y la producción de gas fueron analizados de la misma manera por GLM pero con medidas repetidas (SAS, 1996). Las diferencias fueron probadas usando la opción PDIF de SAS y declaradas significativas a  $P < 0.05$ ; las tendencias fueron discutidas a  $P < 0.15$ .



### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### III.1. Consumo

La tabla III.1 presenta los valores obtenidos para el consumo de materia seca por tratamiento a lo largo de todo el experimento de lactación el cual resultó elevado para ambos grupos experimentales (4.8 % del peso vivo).

Como se puede observar, este parámetro no fue afectado por la suplementación enzimática ( $P=0.327$ ), encontrándose resultados de 2.00 y 2.04 kg de materia seca ingerida por cabra y día como promedio para el tratamiento suplementado con enzimas y el control, respectivamente, lo que al mismo tiempo representó un 4.7 y 4.9% de ingestión ( $P=0.294$ ) con relación al peso corporal promedio para cada grupo experimental.

Estos valores son considerados normales para la raza Murciano-Granadina bajo las condiciones de explotación en que se desarrolló la experiencia y las características de las raciones que recibieron, coincidiendo con los valores predichos por Morand-Fehr y Sauvant (1989) y con los resultados obtenidos en otros trabajos en condiciones similares con la misma raza a mediados de lactación y que han sido obtenidos por Peris et al. (1996) y Salama et al. (2002); no obstante, sorprendió la tendencia general mostrada en cuanto a la ligera depresión paulatina de los niveles de consumo voluntario en la misma medida en que avanzaba la experiencia, lo cual pudiera estar relacionado con la fase de lactación en que se encontraban las cabras (de mediados hacia finales) y la consiguiente disminución de los requerimientos nutricionales; esta tendencia, así como la semejanza de los valores para ambos tratamientos, se mantuvo constante a través de toda la experiencia (Figura III. 1).

Nuestros resultados están de acuerdo con los publicados por otros autores en estudios donde se añadieron diferentes dosis de preparados enzimáticos similares con alta actividad celulasa y xilanasas tanto a la ración mixta total, como al forraje o al concentrado, y donde no se han observado diferencias en el consumo de materia

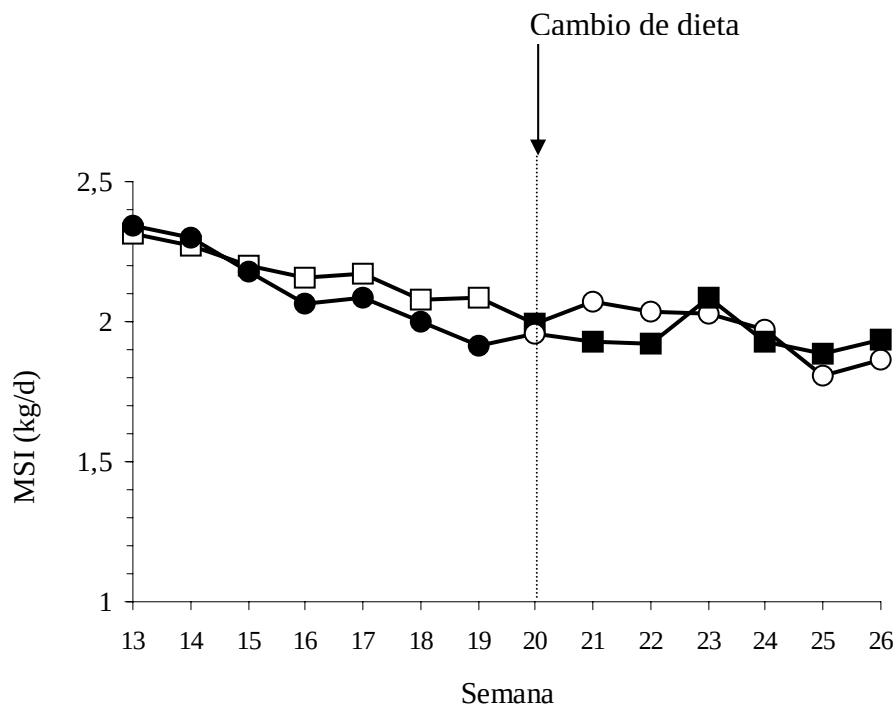
seca en toros de engorde (Feng et al., 1996), novillas (Hristov et al., 2000) o vacas lecheras (Rode et al., 1999; Yang et al., 1999; Kung et al., 2000; Yang et al., 2000).

Por el contrario, otros autores (Rode et al., 1999; Beauchemin et al., 2000) han reportado efectos positivos con la suplementación de enzimas fibrolíticas exógenas sobre el comportamiento de este indicador, sugiriendo que algunas mezclas de este tipo son capaces de incrementar el consumo voluntario de vacas lecheras, pero acotando que esta mejora en el consumo generalmente sólo repercute en una mayor producción de leche en vacas en estadio temprano de lactación debido fundamentalmente al balance energético negativo que presentan los animales en esta fase ; en otros estudios se ha observado también un incremento en el consumo de alimento en ganado vacuno de engorde (Burroughs et al., 1960; Beauchemin et al., 1995).

**Tabla III. 1.** Efectos de la suplementación con enzimas sobre el consumo de materia seca (MSI) de cabras en lactación.

| MSI     | Control | Enzima | ES   | Efecto ( $P <$ ) |
|---------|---------|--------|------|------------------|
| kg/d    | 2.04    | 2.00   | 0.04 | 0.327            |
| % de PV | 4.9     | 4.7    | 0.1  | 0.294            |

**Figura III. 1.** Consumo de materia seca de cabras en lactación suplementadas o no con enzimas exógenas. Cada punto representa la media de 12 observaciones (Control, □ y ○; y, Enzima, ■ y ●)(ES = 0.041).



### III. 2. Producción y composición de leche

Las producciones de leche real o corregida al 4% de grasa en cabras suplementadas con el complejo enzimático no resultaron estadísticamente diferentes a la de las cabras del tratamiento control (Tabla III. 2) (Figura III. 2). Aunque fueron ligeramente inferiores a los reportados por Salama et al. (2002) para la misma fase de lactación mantuvieron una alta persistencia (96.5 %). De esta forma, el aumento de la digestibilidad en MS y MO como producto de la adición de enzimas fibrolíticas al concentrado (Tabla III. 4) no se tradujo en un incremento de los niveles de producción de leche.

**Tabla III. 2.** Efectos de la suplementación con enzimas sobre la producción y composición de la leche de las cabras a mediados de lactación.

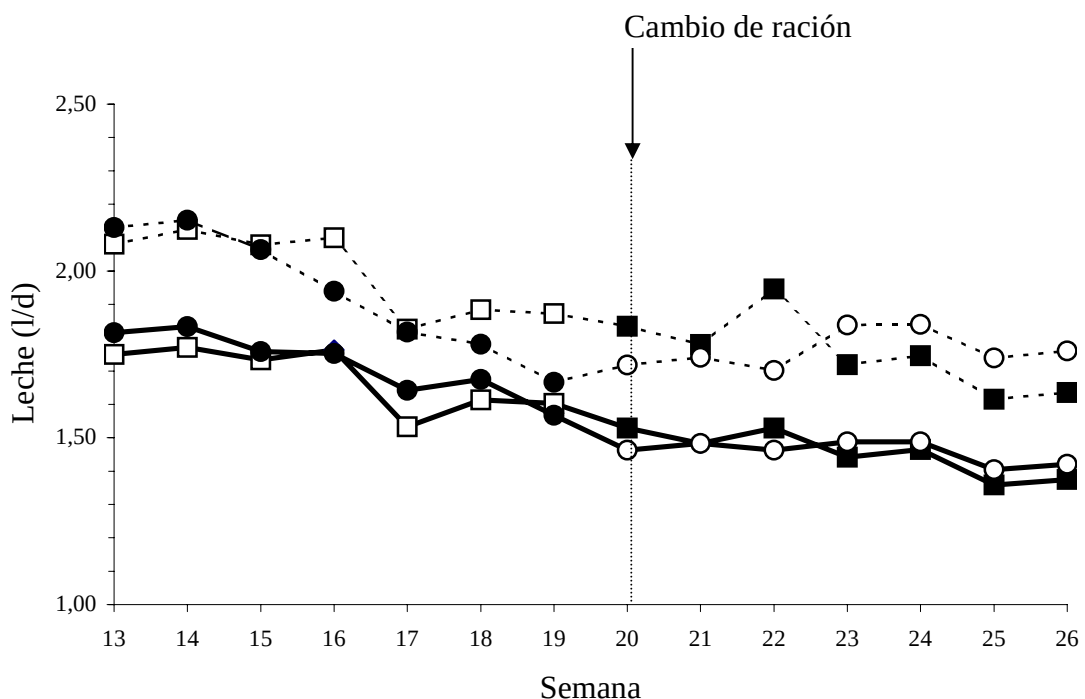
| Item                               | Control     | Enzima      | ES          | Efecto ( <i>P</i> <) |
|------------------------------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|
| <b>Producción de leche, l/d</b>    |             |             |             |                      |
| Real                               | 1.51        | 1.53        | 0.04        | 0.289                |
| 4% Corregida <sup>1</sup>          | 1.78        | 1.80        | 0.04        | 0.542                |
| <b>Composición de la leche, %</b>  |             |             |             |                      |
| Sólidos Totales                    | 13.99       | 13.76       | 0.21        | 0.390                |
| Grasa                              | 5.34        | 5.16        | 0.15        | 0.620                |
| Proteína bruta                     | 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                |
| <b>Producción comp. leche, g/d</b> |             |             |             |                      |
| Grasa                              | 80.6        | 79.2        | 0.1         | 0.623                |
| Proteína bruta                     | 67.1        | 67.2        | 0.1         | 0.584                |
| Proteína verdadera                 | 51.7        | 52.1        | 0.1         | 0.095                |
| Caseína                            | 44.0        | 43.0        | 0.1         | 0.676                |
| <b>Leche corr./MSI</b>             | <b>0.87</b> | <b>0.90</b> | <b>0.02</b> | <b>0.207</b>         |

<sup>1</sup> Estimado de acuerdo a la ecuación de Gaines: kg de 4% Leche Corr. =  $[0.4 + 0.15 \times (\% \text{ grasa})] \times \text{kg leche}$ .

Resultados similares han sido publicados por Beauchemin et al. (1999, 2000) quienes no observaron los efectos esperados por las enzimas sobre los valores de producción de leche total y corregida a grasa o sólidos totales en vacas, lográndose un aumento de la concentración de proteína pero no en el rendimiento de esta en el producto total. De esta manera argumentan también que los incrementos en consumo de energía digestible no se tradujeron en una mejora de los rendimientos productivos, relacionándolos al mismo tiempo con el balance energético positivo en que se encontraban las vacas durante la experiencia, por lo que sugieren un mayor efecto en los casos de balance energético negativo.

En cambio, otras investigaciones llevadas a cabo también en vacunos (Rode et al., 1999; Kung et al., 2000; Yang et al., 2000) mostraron que la aplicación de un preparado enzimático ya sea a la ración integral “unifeed”, al forraje o al concentrado, producido un aumento significativo de la producción de leche (6-10%) sin mejorar el porcentaje de los componentes de la leche, lo cual por lo general atribuyen a que el significativo aumento en la producción no se ve acompañado por un aumento en los valores de MSI, resultando en inadecuados consumos de algunos nutrientes limitantes de la síntesis de los compuestos que conforman la leche (Rode et al., 1999).

**Figura III. 2.** Producción de leche (real, — ; 4% ECM -----) de cabras en lactación suplementadas o no con enzimas exógenas. Cada punto representa el promedio de 12 observaciones (Control, □ y ○; y, Enzima, ■ y ●)(ES = 0.04 para real ó 4% corregida).



La composición de la leche no difirió ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos experimentales (Tabla III. 2) y los valores fueron ligeramente superiores a los obtenidos por Salama et al. (2002). No obstante, la concentración de caseína fue mayor y presentó una tendencia a disminuir con la adición del Promote®. Sin embargo, aunque no se encontraron diferencias significativas, los contenidos en

grasa observados en las cabras con ración suplementada con enzimas resultaron numéricamente menores con relación a los del tratamiento control.

Rode et al. (1999) argumentaron en este sentido que el incremento en la digestión de la fibra que conllevaría el uso de enzimas de este tipo, es capaz de presuponer una reducción en el contenido efectivo de FND en la ración, lo cual podría redundar en la necesidad de una mayor concentración de los elementos de la pared celular en el alimento para poder mantener altos contenidos de grasa en la leche en tales circunstancias.

### III. 3. Cambios en peso vivo y condición corporal

Los cambios en peso vivo y condición corporal (Tabla III. 3) tendieron a manifestarse favorables para el grupo experimental que recibió la suplementación con Promote® durante la lactación ( $P= 0.092$  y  $0.136$ , respectivamente), y los efectos fueron más evidentes en la segunda mitad del experimento (Figura III. 3).

**Tabla III. 3.** Efectos de la suplementación con enzimas sobre los cambios en peso vivo (PV) y condición corporal (CC) de cabras en lactación.

| Ítem                      | Control | Enzima | ES   | Efecto ( $P<$ ) |
|---------------------------|---------|--------|------|-----------------|
| PV, kg                    |         |        |      |                 |
| Inicial                   | 41.6    | 41.7   | 1.4  | 0.480           |
| Final                     | 41.5    | 43.6   | 1.7  | 0.068           |
| Variación                 | -0.1    | 1.9    | 0.4  | 0.092           |
| CC, (1 to 5) <sup>1</sup> |         |        |      |                 |
| Inicial                   | 2.34    | 2.41   | 0.04 | 0.125           |
| Final                     | 2.43    | 2.60   | 0.12 | 0.089           |
| Variación                 | 0.09    | 0.19   | 0.06 | 0.136           |

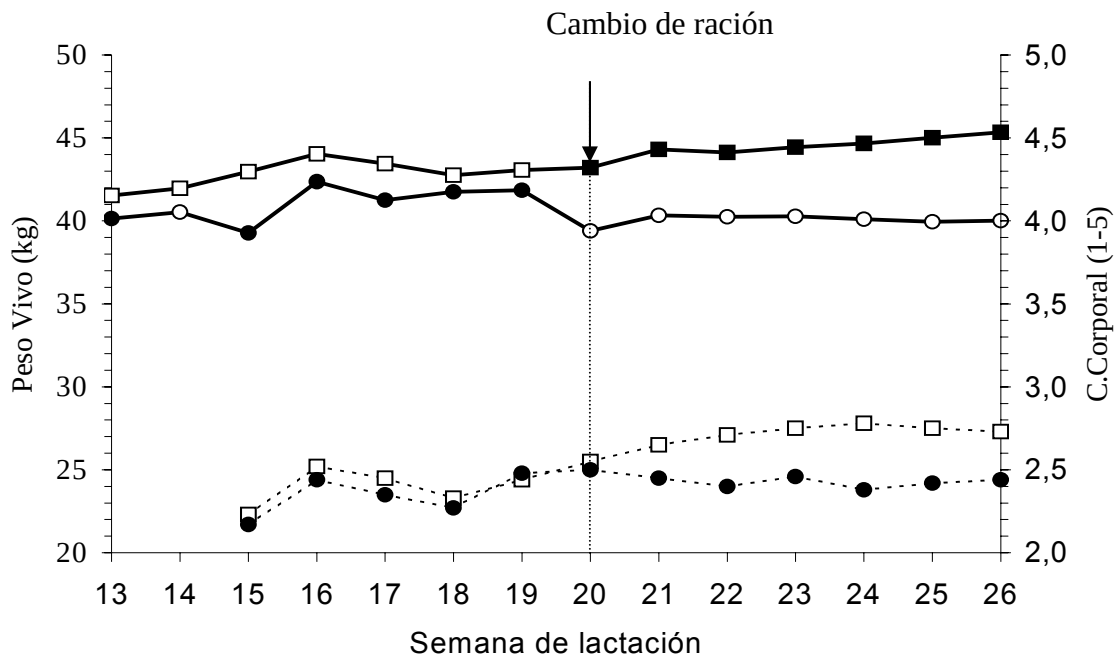
<sup>1</sup>De acuerdo a Hervieu et al. (1991).

Estos resultados coinciden también con los obtenidos en otros estudios por Burroughs et al. (1960) y Beauchemin et al. (1995) en los cuales aumentó el ritmo de crecimiento de machos vacunos cuando se aplicaron complejos enzimáticos exógenos al forraje seco, como consecuencia, según los autores, de un incremento en la digestibilidad del forraje sobre todo en el primer compartimento del tracto digestivo aunque no obligatoriamente en todo el trayecto.

La tendencia evidenciada a mejorar la condición corporal de las cabras pudiera estar relacionada con los mejores valores de digestibilidad de la MS y la MO obtenidos para el tratamiento suplementado (Tabla III. 4), asumiendo una posible estimulación de la producción de ácido propiónico a partir de una presumible mejora en la digestión de los almidones del concentrado como consecuencia de un mejor acceso de los microorganismos ruminales al contenido celular, y la potenciación de los mecanismos de gluconeogénesis y almacenamiento de reservas corporales que ello conlleva; este argumento queda en el plano de la especulación al no considerarse como variables de respuesta en nuestra experiencia la digestibilidad de los almidones o la proporción molar de AGV.

En ese sentido, Rode et al. (1999) evaluando el mismo producto (Promote®) aplicado al concentrado, argumentaron que el incremento en la proporción de ácido propiónico ruminal y glucosa como resultado de la estimulación de la digestión postruminal, podrían haber estimulado la secreción de insulina con el efecto indirecto de depresión de la síntesis de grasa en la leche como consecuencia del aumento de la lipogénesis en los tejidos adiposos. Estos argumentos están en consonancia con los valores de grasa numéricamente más bajos obtenidos en nuestra experiencia (Tabla III. 2).

**Figura III. 3.** Cambios en peso vivo y condición corporal de cabras en lactación suplementadas o no con enzimas fibrolíticas exógenas. (Control, □ y ○; y, Enzima, ■ y ●; Peso vivo: SE = 0.4; Condición corporal: SE = 0.06).



#### III.4. Digestibilidad

La tabla III. 4 expone los resultados obtenidos en la experiencia de digestibilidad in vivo desarrollado al final de la experiencia de lactación.

Las cabras en este experimento manifestaron producciones de leche y consumos de materia seca similares a las obtenidas en condiciones ad libitum establecidas en el diseño experimental. Aunque no existieron diferencias en los niveles de MSI entre los tratamientos, las cabras suplementadas con enzimas a presentaron valores más bajos ( $P < 0.05$ ) cuando se expresaron respecto al peso vivo o al peso metabólico (Tabla III. 4). Esto se considera una consecuencia de las diferencias en peso vivo producidas durante el experimento de lactación como ha sido anteriormente mencionado.

Las cabras del tratamiento suplementado con enzimas fueron aproximadamente 4 kg más pesadas que las del tratamiento control, por lo que de



acuerdo a las predicciones del consumo realizadas para la especie por Morand-Fehr y Sauvant (1989), se esperaba que este grupo consumiera como promedio una cantidad diaria de 40 g de materia seca ( $2.2 \text{ g/d/PV kg}^{0.75}$ ) por encima del grupo control, lo cual no ocurrió de esa manera sino que, por el contrario, las cabras que no se suplementaron consumieron 12 g/d más (10%) de materia seca con relación a su peso metabólico que las del tratamiento con enzimas, por lo que se considera que la suplementación enzimática produjo un efecto negativo sobre la MSI al final de la lactación. Esta conclusión se corresponde con la tendencia manifestada en el consumo de materia seca en el experimento de lactación.

Al contrario del comportamiento manifestado en los consumos de materia seca, los valores en los indicadores de digestibilidades de la MS y la MO en el tracto digestivo si resultaron significativamente diferentes (o tendientes a ello) entre los tratamientos ( $P = 0.014$  y  $0.066$ , respectivamente), indicando mayores porcentajes para el tratamiento Enzima (MS: 71.89% y MO: 72.88%) con respecto al Control (MS: 68.89% y MO: 70.37%) (Tabla III. 4). En cambio, las digestibilidades de la PB, FB, FND y FAD no fueron significativamente afectadas ( $P > 0.05$ ) por la suplementación enzimática.

**Tabla III. 4.** Digestibilidad de los nutrientes en cabras lecheras suplementadas o no con enzimas.

| Item                            | Control | Enzima | ES    | Efecto ( $P<$ ) |
|---------------------------------|---------|--------|-------|-----------------|
| <b>MSI</b>                      |         |        |       |                 |
| kgMS                            | 2.177   | 2.130  | 0.106 | 0.774           |
| gMS/kgPV                        | 49.90   | 44.84  | 1.08  | 0.016           |
| gMS/kgPV <sup>0.75</sup>        | 128     | 118    | 3     | 0.042           |
| <b>Producción de leche, l/d</b> |         |        |       |                 |
| Real                            | 1.41    | 1.35   | 0.12  | 0.726           |
| <b>Digestibilidad, %</b>        |         |        |       |                 |
| MS                              | 68.89   | 71.89  | 0.81  | 0.014           |
| MO                              | 70.37   | 72.88  | 0.87  | 0.066           |
| PB                              | 59.59   | 63.03  | 2.20  | 0.278           |
| FB                              | 41.89   | 35.09  | 4.32  | 0.281           |
| FND                             | 52.59   | 55.26  | 1.51  | 0.248           |
| FAD                             | 46.35   | 50.46  | 1.98  | 0.186           |

Hasta el momento permanece oscuro el mecanismo por el cual el grupo experimental que recibió el preparado de enzimas fibrolíticas tendió a aumentar los parámetros de digestibilidad de la materia seca y orgánica, sin afectar significativamente este indicador para los componentes de la pared celular de la ración (objetivo principal del empleo de este tipo de aditivos).

La mayor digestibilidad de MS obtenida en nuestro estudio no afectó el consumo de MS de las cabras tanto en el experimento de lactación como en el de digestibilidad, posiblemente como consecuencia de la denominada “teoría del hotel” de Van Soest discutida por Beauchemin et al. (2000). De acuerdo con esta teoría las enzimas hidrolizarían el contenido celular y los materiales solubles sin alterar la estructura de la pared celular y, por tanto, sin representar un cambio en el efecto de llenado ruminal.

En una serie de estudios se mostraron incrementos de las digestibilidades de la MS y la MO en el rango entre 3 y 12% en ganado vacuno lechero (Beauchemin et al., 1999; Rode et al., 1999; Yang et al., 1999). No obstante, en esos mismos trabajos no se observaron diferencias en la digestibilidad ruminal de la MO (aparente y corregida) y la MO entrante en el intestino (Beauchemin et al., 1999; Yang et al., 1999).

Beauchemin et al. (2000) observaron, en un experimento con vacas lecheras a inicios de lactación, una respuesta cuadrática de la adición de los enzimas sobre la digestibilidad de la MS y la MO, observándose los mejores valores con los niveles de aplicación más bajos.

Por el contrario, otros autores como Judkins et al. (1987), en corderos, y Burroughs et al. (1960) y Krause et al. (1998) en ganado vacuno de ceba, no han encontrado efectos significativos por la adición de enzimas fibrolíticas sobre las digestibilidades de la MS y la MO.

En este sentido, Yang et al. (2000), tratando de confirmar la mejora de digestibilidad obtenida en vacas encontraron resultados contradictorios al no observar diferencias en dos experimentos de este tipo desarrollados con ovejas de la raza Dorset, para lo cual especularon que al parecer la especie ovina responde de manera diferente a la suplementación enzimática con relación a la vacuna aparentemente debido a que en vacas lecheras muchos alimentos potencialmente digestibles escapan de la digestión a causa del limitado tiempo de retención y el bajo pH ruminal que estos animales presentan.

McAllister et al. (1999) reportaron por su parte que el tratamiento del ensilado de alfalfa con un producto enzimático similar al empleado en este estudio mejoró la ganancia de peso diaria y la eficiencia de utilización del alimento en ganado vacuno de carne, pero no representó un incremento de la digestibilidad de los nutrientes en ovinos utilizados para evaluar la misma dieta en jaulas de metabolismo. Sin embargo, otros estudios con ganado vacuno han reportado un incremento significativo en la digestibilidad de la ración (Beauchemin et al., 1995; Beauchemin et al., 1999; Feng et al., 1996; Krause et al., 1998; Yang et al., 1999).

De acuerdo con nuestros resultados, Burroughs et al. (1960) y Hristov et al. (2000) en ganado vacuno de ceba y novillas, respectivamente, no encontraron efectos de la suplementación enzimática sobre la digestibilidad de la pared celular de la ración. Por otra parte, Judkins et al. (1987) no observaron diferencias en raciones para corderos que contenían un 25% de granos suplementados con dos dosis de un preparado enzimático pero cuando los granos se redujeron al 10% de inclusión, la digestibilidad de la pared celular fue mayor para las dosis enzimáticas más altas. Yang et al. (2000) también reportan no haber encontrado diferencias en las digestibilidades de la FAD y FND en corderos en crecimiento.

Otros estudios han encontrado incrementos significativos en las digestibilidades de la FND y la FAD con mezclas enzimáticas similares a la empleada en nuestro estudio. Beauchemin et al. (1999) y Rode et al. (1999) en estudios con vacas lecheras a inicios de lactación observaron diferencias a favor de las suplementadas con enzimas fibrolíticas en el orden de 5 a 20% de incremento con relación al control para la FND y de 9.5 a 32% para la FAD.

Los niveles de inclusión de la enzima en la ración en vacas lecheras han mostrado un efecto cuadrático sobre estas mismas digestibilidades (Beauchemin et al., 1995, 2000; Yang et al., 1999) concluyéndose en muchos casos la conveniencia de usar dosis no tan elevadas.

La suplementación con enzimas también ha mejorado las digestibilidades de FND y FAD en toros de ceba alimentados con dietas forrajeras (Beauchemin et al., 1995; Feng et al., 1996; Krause et al., 1998).

Krause et al. (1998), en ganado vacuno de engorde con diferentes raciones, no encontraron diferencias en patrones de fermentación ruminal como el pH, la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y las proporciones de sus concentraciones molares, pero sí en los niveles de digestibilidad de la FAD (14% de incremento, en las raciones que contenían cebada y paja, y 55% en las que contenían cebada y ensilaje). Estos autores concluyeron que la suplementación con enzimas fibrolíticas podría significar un útil medio para mejorar la digestión ruminal

en raciones con altos niveles de concentrado, pero las condiciones más eficaces para su aplicación y el modo de acción están aún por definir.

Aunque la digestibilidad de la PB no resultó mejorada con la adición del Promote<sup>®</sup> en nuestro estudio, otros autores como Rode et al. (1999), Beauchemin et al. (1999) y Yang et al. (1999, 2000) observaron para el ganado vacuno un aumento significativo de los niveles de digestibilidad del nitrógeno de 4.8-13% por encima de los tratamientos control en sus respectivos estudios.

El incremento de la digestibilidad como consecuencia de la suplementación de enzimas fibrolíticas en las raciones para rumiantes se ha traducido en una mejora de los indicadores de producción de leche en vacas en lactación (Rode et al. 1999; Yang et al., 1999; Kung et al., 2000) o en un aumento de la velocidad de crecimiento y ritmos de conversión en ganado vacuno (Burroughs et al., 1960; Beauchemin et al., 1995).

Nuestros resultados muestran que el peso vivo y la condición corporal de las cabras manifestó una tendencia a mejorar como resultado de una mejor eficiencia en el balance energético ( $P < 0.15$ ) como se muestra en la Tabla III. 5. Probablemente, esto pudiera explicarse como una consecuencia de la estimulación de la proporción molar de propionato como resultado de los incrementos de digestibilidad en MS y MO.

**Tabla III. 5.** Balance energético en cabras lecheras suplementadas o no con enzimas.

| Item                               | Control | Enzima | ES    | Efecto ( $P<$ ) |
|------------------------------------|---------|--------|-------|-----------------|
| Balance energético, Mcal/d         |         |        |       |                 |
| Consumo NE <sub>L</sub>            | 3.05    | 3.00   | 0.15  | 0.776           |
| Energía en leche <sup>1</sup>      | 1.26    | 1.26   | 0.07  | 0.946           |
| Energía mantenimiento <sup>2</sup> | 1.48    | 1.58   | 0.05  | 0.246           |
| Balance energético <sup>3</sup>    | 0.32    | 0.15   | 0.08  | 0.172           |
| Eficiencia energética <sup>4</sup> | 0.912   | 0.989  | 0.027 | 0.138           |
| PV, kg                             | 43.63   | 47.50  | 2.21  | 0.261           |
| Cambio en PV, g/d                  | 7       | 17     | 3     | 0.196           |

<sup>1</sup> Estimado a partir de la composición.

<sup>2</sup> Calculado de acuerdo con Aguilera et al. (1990).

<sup>3</sup> Energía consumida – energía para mantenimiento y leche.

<sup>4</sup> Energía en leche, ganancia de peso y mantenimiento/energía consumida.

La tabla III. 6 expone los resultados del potencial para la producción de gas y los niveles de desaparición de la MS y la FND en ambas raciones bajo estudio.

Como se observa, la producción de gas a las 48 h de fermentación resultó ser alta (143 ml/100 mg MS) y no fue afectada por la suplementación enzimática en comparación con el control, obteniéndose valores muy similares para los dos tratamientos (Enzima, 143.9 vs. Control, 142.4 ml/100 mg MS).

Por otro lado, y en concordancia con lo encontrado para la producción de gas, la velocidad y el potencial de desaparición de la MS (51.8%) y de la FND (37.7%) tampoco varió ni con la ración ni con el inóculo. De esta manera la mejora de la digestibilidad de la MS encontrada en la experiencia in vivo no pudo ser confirmada en las condiciones in vitro.

**Tabla III. 6.** Efecto de la adición de enzimas fibrolíticos sobre la producción de gas, y los niveles de desaparición de la materia seca y la FND.

| Item                           | Control | Enzima | ES    | Efecto ( <i>P</i> <) |             |
|--------------------------------|---------|--------|-------|----------------------|-------------|
|                                |         |        |       | Inóculo              | Tratamiento |
| Producción de gas <sup>1</sup> |         |        |       |                      |             |
| a+b, ml/100 mg MS              | 142.4   | 143.9  | 0.18  | 0.343                | 0.442       |
| c, h <sup>-1</sup>             | 0.056   | 0.051  | 0.001 | 0.282                | 0.292       |
| Desaparición MS, %             | 52.5    | 51.1   | 1.1   | 0.184                | 0.199       |
| Desaparición FND, %            | 39.6    | 35.7   | 4.1   | 0.215                | 0.324       |

<sup>1</sup> Datos analizados usando la ecuación  $y = a + b(1 - e^{-c \cdot t})$  para el tiempo, (a + b) es la producción de gas potencial (ml/100 mg materia seca), c es la constante de producción de gas por hora.

En un estudio similar realizado por Yang et al. (2000) para comparar la aplicación de un complejo enzimático con actividades semejantes al Promote<sup>®</sup> y diferentes formas de presentación de la ración (concentrado o ración integral), no se obtuvieron efectos sobre la producción de gas acumulada y sus ritmos de producción, aunque al medir el tiempo de retardo ("lag time") encontraron una tendencia a que este disminuyera en el concentrado y que se incrementara la producción de ácidos grasos volátiles, lo que según sus argumentos podría sugerir que esta práctica en raciones ricas en concentrados pudiera estimular un inicio de la digestión más rápido. En este mismo experimento, la desaparición in vitro de la MS fue numéricamente más elevada para los dos tratamientos que recibieron el enzima.

A su vez, Feng et al. (1996), obtuvieron resultados similares en experimentos in vitro desarrollados con raciones forrajeras, argumentaron que la aplicación del tratamiento enzimático al alimento momentos antes de ser incubado difirió significativamente del tratamiento donde el producto fue aplicado durante el proceso de fabricación y después almacenado como ocurrió en nuestro caso. En ese estudio, desarrollado también con machos vacunos en crecimiento, la adición del preparado enzimático mejoró los valores de consumo, de digestibilidad, los ritmos de paso y los

porcentajes de degradabilidad ruminal in situ e in vitro con relación al tratamiento control.

Recientemente, Wallace et al (2001) han demostrado que la producción de gas in vitro en ensilos tratados con enzimas fibrolíticas mostraron dependencia de la concentración enzimática aplicada al medio. Las respuestas en la producción de gas disminuyeron de un 50% a 4% cuando la concentración de la solución enzimática añadida al líquido de fermentación disminuyó 10 veces (de 0.33 a 0.04 ml/100 ml).



#### **IV. CONCLUSIONES**

1. La suplementación de la ración de cabras lecheras con Promote<sup>®</sup>, bajo las condiciones de este experimento, no afecta el comportamiento de los animales en lactación a pesar de estimular la digestibilidad de la MS y la MO.
2. El incremento en la digestibilidad de la MS in vivo no pudo ser confirmado en condiciones in vitro.
3. Se produjo una tendencia a mejorar la condición corporal de las cabras con suplementación enzimática, probablemente explicada por un aumento de la lipogénesis a partir de una mayor digestibilidad de la materia orgánica.
4. Futuras investigaciones en condiciones in vitro e in vivo serán necesarias para arribar a conclusiones más sólidas sobre la efectividad del empleo de diferentes mezclas de enzimas fibrolíticos teniendo en cuenta otras variables como el balance energético de los animales, la forma y momento más adecuados para la adición al alimento, la relación dosis:actividad enzimática:respuesta, diversos gradientes de humedad, de pH, etc.

## **V. BIBLIOGRAFÍA**

- Aguilera, J.F., Prieto, C., y Fonollá, J. 1990. Protein and metabolism of lactating Granadina goats. *British Journal of Nutrition*, 63:165-175.
- Akin, D.E. 1989. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. *Agron. J.* 81:17-25.
- Albanell, E., Cáceres, P., Caja, G., Molina, E., y Gargouri, A. 1999. Determination of fat, protein, and total solids in ovine milk by Near-Infrared Spectroscopy. *J. AOAC Internat.*, 82:753-758.
- Ali, B.R.S., Zhou, L., Graves, F.M, Freedman, R.B., Black, G.W., Gilbert, H.J., y Hazlewood, G.P. 1995. Cellulases and hemicellulases of the anaerobic fungus *Piromyces* constitute a multiprotein cellulose-binding complex and are encoded by multigene families. *FEMS Microbiol. Lett.* 125:15-22.
- Annison, G. 1992. Commercial enzyme supplementation of wheat-based diets raises ileal glycanase activities and improves apparent metabolisable energy, starch and pentosan digestibilities in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 38: 105-121.
- Annison, G. 1993. The role of wheat non-starch polysaccharides in broiler nutrition. *Aust. J. Agric. Res.* 44:405.
- Annison, G., y Choct, M. 1991. Anti-nutritive activities of cereal non-starch polysaccharides in broiler diets and strategies minimizing their effects. *World's Poult. Sci. J.* 47:232.
- Association of Official Analytical Chemists. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. AOAC, Arlington, VA.

- Bayer, E.A., Chanzy, H., Lamed, R. y Shoham, Y. 1998. Cellulose, cellulases and cellulo-somes. *Current Opinion in Structural Biology* 8:548–557.
- Beauchemin, K.A, Rode, L. M. y Sewalt, V.J.H. 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. *Canadian Journal of Animal Science*, 75:641-644
- Beauchemin, K.A., y Rode, L.M. 1996. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. En: *Animal Science Research Development. Meeting Future Challenges. Proceedings of the Canadian Society of Animal Science Meeting*. Ed. L.M. Rode. Lethbridge, Alberta, pp. 103-130.
- Beauchemin, K.A., Jones, S.D., Rode, L.M., y Sewalt, V.J.H. 1997. Effects of fibrolytic enzyme in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 77:641-644.
- Beauchemin, K.A., Yang, W.Z., y Rode, L.M. 1999. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 82:378-390.
- Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Maekawa, M., Morgavi, D.P., y Kampen, R. 2000. Evaluation of a nonstarch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. *J. Dairy Sci.*, 83:543-553.
- Bedford, M.R. 1993. Mode of action of feed enzymes. *Journal of Applied Poultry Research* 2, 85-92.
- Béguin, P. y Aubert, J.P. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:25-58.
- Bhat, M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18:355-383.
- Boudet, A.-M. 1998. A new view of lignification. *Trends in Plant Science* 3, 67–71.

- Boyles, D.W., Richardson, C.R., Robinson, K.D., y Cobb, C.W. 1992. Feedlot performance of steers fed steam-flaked sorghum with added enzymes. En: Proceedings Western section American Society Animal Science 43:502.
- Burroughs, W., Woods, W., Ewing, S.A., Greig, J., y Theurer, B. 1960. Enzyme additions to fattening cattle rations. J. Anim. Sci., 19:458-464.
- 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. Effects of enzyme treatment or steam-flaking of sorghum grain on lactation and digestion in dairy cows. J. Dairy Sci. 78:1721-1727.
- Chesson, A. 1993. Feed enzymes. Animal Feed Science and Technology, 45:65-79.
- Chesson, A. y Forsberg, C.W. 1997. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In: Hobson, P. and Stewart, C. (eds) The Rumen Microbial Ecosystem, 2nd edn. Chapman & Hall Ltd, Andover, UK, pp. 329–381.
- Chesson, A., Stewart, C.S., Dalgarno, K. y King, T.P. 1986. Degradation of isolated grass mesophyll, epidermis and fibre cell walls in the rumen and by cellulolytic rumen bacteria in axenic culture. Journal of Applied Bacteriology 60:327–336.
- Classen, H.L., Graham, H., Inbarr, J., y Bedford, M.R. 1991. Growing interest in feed enzymes to lead to new products. Feedstuffs 63:22-24.
- Considine, P.J. y Coughlan, M.P. 1989. Production of carbohydrate-hidrolizing enzyme blends by solid-state fermentation. In: Coughlan, M.P. (ed.) Enzyme System for Lignocellulose degradation. Elsevier Applied Science, New York, pp. 273-281.
- Dehority, B.A. y Tirabasso, P.A. 1998. Effect of ruminal cellulolytic bacterial concentrations on in situ digestion of forage cellulose. J. Anim. Sci., 76:2905–2911.

- Dijkstra, J. y Tamminga, S. 1995. Simulation of the effects of diet on the contribution of rumen protozoa to degradation of fibre in the rumen. *British Journal of Nutrition* 74, 617–634.
- Din, N., Gilkes, N.R., Tekant, B., Miller, R.C., Jr, Warren, R.A.J. y Kilburn, D.G. 1991. Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulase. *Bio/Technology* 9, 1096–1099.
- Doerner, K.C. y White, B.A. 1990. Assessment of the endo- $\beta$ -1,4-glucanase components of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1844-1850.
- Fanutti, C., Ponyi, T., Black, G.H., Hazlewood, G.P., y Gilbert, H.J. 1995. The conserved noncatalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain. *J. Biol. Chem.* 49:29314-29322.
- Feng, P., C.W. Hunt, W.E. Julien, K. Dickinson y T. Moen. 1992a. Effect of enzyme additives on in situ and in vitro degradation of mature cool-season grass forage *J. Anim. Sci.* 70(Suppl 1):309 (Abstr.).
- Feng, P., C.W. Hunt, W.E. Julien, S.C. Haenny y G.T. Pritchard. 1992b. Effect of enzyme additives to cool-season grass forage on voluntary intake and digestive function in mature beef steers. *J. Anim. Sci.* 70(Suppl 1):310 (Abstr.).
- Feng, P., Hunt, C.W., Pritchard, G. T. y Julien, W. E. 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. Anim. Sci.* 74:1349-1357.
- Forbes, J.M. 1995. *Voluntary Food Intake and Diet Selection in Farm Animals*. CAB International, Wallingford, UK.

- Forsberg, C.W. y Cheng, K.-J. 1992. Molecular strategies to optimise forage and cereal digestion by ruminants. En: Bills D.D. and Kung S.-D. (eds) Biotechnology and Nutrition, pp 107-147. Butterworth Heinemann, Stoneham.
- Forsberg, C.W., Cheng, K.-J. y Phillips, J.P. 1993. Establishment of rumen microbial gene pools and their manipulation to benefit fibre digestion by domestic animals. Proceedings VII World Conference on Animal Production, pp. 281-316. World Association for Animal Production, Edmonton.
- Forsberg, C.W., Cheng, K.-J. y White, B.A. 1997. Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. En: Mackie, R.I. and White, B.A. (eds) Gastrointestinal Microbiology. Chapman & Hall, New York, pp. 319–379.
- Gardner, P.T., Wood, T.J., Chesson, A. y Stuchbury, T. 1999. Effect of degradation on the porosity and surface area of forage cell walls of differing lignin content. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79:11–18.
- Gashe, B.A. 1992. Cellulase production and activity by *Trichoderma* sp. A-001. Journal of Applied Bacteriology 73, 79-82.
- Grabber, J.H., Hatfield, R.D. y Ralph, J. 1998. Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. Journal of the Science of Food and Agriculture 77:193–200.
- Grainger, R.B. y J.W. Stroud. 1960. J. Anim. Sci. 19:1263-1264 (Abstr.).
- Harris, B. 2001. The importance of fiber in feeding dairy cattle. In: [http://edis.ifas.ufl.edu/scripts/htmlgen.exe?DOCUMENT\\_DS064](http://edis.ifas.ufl.edu/scripts/htmlgen.exe?DOCUMENT_DS064). Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, University of Florida, FL.
- Henneberg, W., Stohmann, F. 1860. Begrudung Einer Rationellen Futterung der Wiederkauer. Braunschweig: Schwestschke und Sohne.

- Hervieu, J., Morand-Fehr, P., Schmidely, Ph., Fedele, V., y Delfa, R. 1991. Mesures anatomiques permettant d'expliquer les variations des notes sternales, lombaires et caudales utilisées pour estimer l'état corporel des chèvres laitières. Options Méditerranéennes, Série Séminaires, 13:43-56.
- Hristov, A.N., McAllister, T.A., y Cheng, K.-J. 1996. Exogenous enzymes for ruminants: Modes of action and potential applications. Proceedings 17th Western Nutrition Conference, Edmonton, Alberta.
- Hristov, A.N., McAllister, T.A., y Cheng, K.-J. 1998a. Stability of exogenous polisacharide-degrading enzyme in the rumen. Animal Feed Science and Technology 76:165-172.
- Hristov, A.N., McAllister, T.A., y Cheng, K.-J. 1998b. Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polisacharide-degrading enzyme supplementation on rumen fermentation and nutrient 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. 2000. 78:477-487.
- Hungate, R.E. 1988. Introduction: the ruminant and the rumen. En: Hobson P.N. (ed) The Rumen Microbial Ecosystem, pp 1-19. Elsevier Applied Science, New York.
- Judkins, M.B. y Sobart, R.H. 1987. Influence of two levels of enzyme preparation on ruminal fermentation, particulate and fluid passage and cell wall digestion in wether lambs consuming either a 10% or 25% grain diet. J. Anim. Sci. 66:1010-1015.
- Jung, H.G. y Allen, M.S. 1995. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. J. Anim. Sci., 73:2774-2790.

- INRA, 1989. Ruminant nutrition. Recommended allowances and feed tables. R. Jarrige (Ed.). Libbey Eurotex, Paris, France.
- Kjeldahl, J. 1883. A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Anal. Chem.* 22:266.
- Krause, M., Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Farr, B.I., y Nørgaard, P. 1998. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. *J. Anim. Sci.* 76:2912-2920.
- Krause, D.O., Dalrymple, B.P., Smith, W.J., Mackie, R.I. y McSweeney, C.S. 1999. 16SrDNA sequencing of *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*: design of a signature probe and its application in adult sheep. *Microbiology* 145:1797–1807.
- Kreikemeier, K.K., Harmon, D.L., Peters, J.P., Gross, K.L., Armendariz, C.K., y Krehbiel, C.R. 1990. Influence of dietary forage and feed intake on carbohydrase activities and small intestinal morphology. *J. Anim. Sci.* 68:2916.
- Kung, L.-Jr., Treacher, R.J., Nauman, G.A., Smagala, A.M., Endres, K.M., y Cohen, M.A. 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 83:115-122.
- Lenhinger, A.L. 1985. *Short Course in Biochemistry*. Worth Publishers, Inc., NY.
- Lewis, G.E., Sánchez, W.K., Treacher, R., Hunt, C.W., y Pritchard, G.T. 1995. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on lactational performance of midlactation Holstein cows. En: *Proceedings of Western Section American Society Animal Science*. 46:310.
- 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. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 79:353-360.



- Mc Donald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A. 1995. *Nutrición Animal* (5ta Edición). Addison Wesley Longman Limited. London, UK.
- Minson, D.J. 1990. *Forage in Ruminant Nutrition*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Morand-Fehr, P., and D. Sauvant 1989. Chapter 11. Goats. Pages 169-180 in *INRA Ruminant nutrition Recommended allowances and feed tables*. R. Jarrige, ed. Libbey Eurotex, Paris, France.
- Muirhead, S. 1996. *Direct feed microbial, Enzyme and Forage Additive Compendium*, 3rd edn. The Miller Publishing Company, Minnetonka, Minnesota, 391 pp.
- Orpin, C.G. 1983. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Animal Feed Science and Technology* 10:121–143.
- Peoples, A.C. y Gordon, F.J. 1989. The influence of wilting and season of silage harvest and the fat and protein concentration of the supplement on milk production and food utilisation by lactating cattle. *Animal Production* 48:305–317.
- Peris, S., Such, X., y Caja, G. 1996. Milkability of Murciano-Granadina dairy goats. Milk partitioning and flow rate during machine milking according to parity, prolificacy and mode of suckling. *J. Dairy Res.*, 63:1-9.
- Piquemal, J., Lapierre, C., Myton, K., O'Connell, A., Schuch, W., Grima-Pettenati, J. y Boudet, A.-M. 1998. Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. *Plant Journal* 13:71–83.
- Preston, T.R. y Leng, R.A. 1987. *Matching Ruminant Production Systems with Available Resources in the Tropics and Sub-Tropics*. Penambul Books, Armidale, Australia.

Ralph, J. 1997. Fake plastic trees. Chemistry and Industry, p. 708.

Ralston, A.T., D.C. Church y J.E. Oldfield. 1962. J. Anim. Sci. 21: 306.

Reid, R.L, Jung, G.A. y Thayne, W.A. 1988. Relationships between nutritive quality and fibre components of cool season and warm season forages: a retrospective study. J. Anim. Sci., 66:1275–1291.

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

Romney, D.L., Blunn, V. y Leaver, J.D. 1997. The responses of lactating dairy cows to diets based on grass silage of high or low DM and supplemented with fast and slowly fermentable energy sources. In: Proceedings of the British Society of Animal Science, 1997, Scarborough. British Society of Animal Science, Edinburgh, p. 84.

Rovics, J.J., y Ely, C.M. 1962. Response of beef cattle to enzyme supplement. J. Anim. Sci. 21:1012.

Rust, J.W., Jacobsen, N.L., McGilliard, A.D., y Hotchkiss, D.K. 1965. Supplementation of dairy calf diets with enzymes. II. Effect on nutrient utilization and on composition of rumen fluid. J. Anim. Sci. 24:156-160.

Salama, A., Caja, G., Albanell, E., Such, X., Casals, R., y Plaixats, J. 2002. The role of zinc methionine in milk production, udder health, and zinc metabolism in dairy goats. J. Dairy Res. 69: (In press).

Sánchez, W.K., Hunt, C.W., Guy, M.A., Pritchard, G.T., Swanson, B., Warner, T., y Treacher, R.J. 1996. Effect of fibrolytic enzymes on lactational performance of dairy cows. En: Proceedings of American Dairy Science Association. Crovallis, Oregon.

SAS Institute, Inc. 1996. SAS® User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC.

- Sheppy, C. 2001. The current feed enzyme market and likely trends, En: Enzymes in farm animal nutrition. eds., M:R. Bedford and G.G. Partridge.
- Stokes, M.R., y Zheng, S. 1995. The use of carbohydrase enzymes as feed additives for early lactation cows. 23rd Biennial Conference on Rumen Function, Chicago, IL.
- Teller, E., Vanbelle, M. y Kamatali, P. 1993. Chewing behaviour and voluntary grass silage intake by cattle. *Livestock Production Science* 33:215–227.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., Mc Allan, A. B., y France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48:185-197.
- Travis, A.J., Hirst, D.J. and Chesson, A. 1996. Automatic classification of plant cells according to tissue type using anatomical features obtained by the distance transform. *Annals of Botany* 78:325–331.
- Treacher, R., McAllister, T.A., Popp, J.D., Mir, Z., Mir, P. y Cheng., K.-J. 1997. Effects of exogenous cellulases and xylanases on feed utilization and growth performance of feedlot steers. *Can. J. Anim. Sci.* 77: 541.
- Trinci, A.P.J., Davies, D.R., Gull, K., Lawrence, M.I., Nielsen, B.B., Rickers, A. y Theodorou, M.K. 1994. Anaerobic fungi in herbivorous animals. *Mycological Research* 98:129–152.
- Van Soest, P.J. 1982. En: *Nutritional Ecology of the Ruminant*. O & B Books, Inc., Corvallis, OR.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., y Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, 74:3583-3597.

- Weimer, P.J., Waghorn, G.C., Odt, C.L. y Mertens, D.R. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:122–134.
- West, J.W. 2000. Feed Additives For Dairy Cattle. <http://www.ces.uga.edu/pubcd/b988-w.htm>. Cooperative Extension Service. The University of Georgia College of Agricultural & Environmental Sciences.
- Williams, A.G. y N.H. Strachan. 1984. *Current Microbiology* 10:215.
- Wilson, J.R. y Kennedy, P.M. 1996. Plant and animal constraints to voluntary feed intake associated with fibre characteristics and particle breakdown and passage in ruminants. *Australian Journal of Agricultural Research* 47:199–225.
- Wilson, J.R. y Mertens, D.R. 1995. Cell wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. *Crop Science* 35, 251–259.
- Wood, T.M. 1992. Fungal cellulases. *Biochem. Soc. Trans.* 20:46-53.
- Yanke, L.J., Selinger, L.B., y Cheng, K.-J. 1995. Comparison of cellulolytic and xylanolytic activities of anaerobic rumen fungi. *Proceedings of the 23rd Biennial Conference on Rumen Function*, p 32. Chicago.
- Yang, W.Z., Beauchemin, K.A. y Rode, L.M. 1999 Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 391–403.–223.
- Yang, W. Z., Beauchemin, K.A., y Rode, L.M. 2000. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. *J. Dairy Sci.* 83:2512-2520.

