

Evaluación de una fuente de α -amilasa y proteasa sobre el consumo y la digestibilidad de nutrientes de las dietas y parámetros fisiológicos en ovinos

Por

Beatriz A. Quintana Méndez

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

INDUSTRIA PECUARIA

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGUEZ
2015

Aprobado por:

Abner A. Rodríguez Carías, Ph. D.
Presidente del Comité Graduado

Fecha

John Fernández Van Cleve, Ph. D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Paul F. Randel Folling, Ph. D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Luis C. Solórzano, Ph. D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

José R. Latorre Acevedo, Ph. D.
Director del Departamento

Fecha

Alexandra Gregory Crespo, Ph. D.
Representante de Escuela Graduada

Fecha

Abstract

The effects of adding a commercial source of α -amylase, an experimental protease or their combination on dry matter and nutrient intake and digestibility and several blood parameters were determined in lambs fed a basal diet of 34% ground corn, 40% tropical grass hay, and 26% soybean meal providing 21% dietary starch. Twelve crossbred lambs (22 kg) were assigned to one of four diets: no additive control (1) or diets containing α -amylase (2), protease (3), or their combination (4). Diets (DM basis) were offered daily at 4% of animal BW in four 28-day experimental periods consisting of 21 d of adaptation to the diet followed by 7 d of complete fecal collection. In each period, feed offered,orts, and feces were collected, quantified, and analyzed for DM, starch, CP, and NDF contents to determine intake and digestibility. Blood samples were collected from individual lamb at the end of each experimental period to determine glucose, BHB, NEFA, and insulin concentrations. Data were analyzed according to a 4 x 4 Latin Square experimental design. Treatments contrasts were performed using least squares means adjustment for multiple comparisons (Tukey-Kramer) between diets as follows: enzymes (2, 3 and 4) versus no enzymes (1), amylase (2 and 4) versus no amylase (1 and 3) and protease (3 y 4) versus no protease (1 and 2). In additional research the structural changes of hydrated corn grain treated or not with the enzymes were observed after 0, 6 and 24 hours using a scanning electronic microscope. In the feeding trial, DM intake was similar across treatments (1106, 1088, 1105 and 1088 g/d for control, and diets containing α -amylase, experimental protease or their combination, respectively). Adding protease to the diet decreased ($P<0.05$) starch consumption (248 vs. 255 g/d) and increased, but not significantly, NDF digestibility (48.6 vs 46.8%) as compared to that of lambs fed without the experimental enzyme. Adding enzymes to the diet tended ($P<0.10$) to decrease blood BHB concentration below the control level (4.26 vs. 4.68 mg/dL). Blood NEFA concentration tended to increase ($P<0.10$) in lambs fed α -amylase compared to

those fed without α -amylase (0.17 vs. 0.14 mEq/L). Insulin level tended ($P < 0.10$) to increase in lambs fed protease versus lambs not receiving the enzyme (80.3 vs. 71.8 pmol/L). Glucose level was similar for all experimental treatments. Both exogenous enzymes influenced blood metabolites, however a greater effect was observed in lambs fed the protease. Under electron microscopic examination structural changes in the starch-protein matrix and in the starch granule in hydrated corn grain treated with the exogenous enzymes were observed. Starch agglutination and zeina degradation occurred progressively due to enzyme activity.

Resumen

Se determinaron los efectos de la adición de una fuente comercial de α -amilasa, una proteasa experimental o su combinación sobre la ingestión y la digestibilidad de la materia seca y nutrientes y varios parámetros sanguíneos en corderos alimentados con una dieta basal compuesta por 34% de maíz molido, 40% heno de hierba tropical y 26% de harina de soya proporcionando 21% de almidón. Doce corderos mestizos (22 kg) fueron asignados a uno de cuatro tratamientos: ningún aditivo (1) o dietas con adición de la α -amilasa (2), la proteasa (3) o la combinación de ambas enzimas (4). Las dietas (en MS) se ofrecieron diariamente al 4% del PV de los animales en cuatro periodos experimentales de 28 días que consistieron en 21 días de adaptación a la dieta, seguida por 7 días de recolección fecal completa, cuando se pesó el alimento ofrecido, el rechazado y las heces. Se analizaron muestras de estos materiales para contenido de MS, almidón, PB, y FDN para determinar el consumo y la digestibilidad. Al final de cada periodo experimental se obtuvieron muestras de sangre de cada cordero para determinar las concentraciones de glucosa, BHB, AGNE e insulina. Los datos se analizaron de acuerdo con un diseño experimental cuadrado latino 4 x 4. Se realizaron contrastes de los tratamientos utilizando la media de los cuadrados mínimos esperados ajustados para comparaciones múltiples (Tukey-Kramer), de las siguientes combinaciones; dietas conteniendo enzimas (2, 3, y 4) versus sin enzimas (1), aquellas con la amilasa (2 y 4) versus sin amilasa (1 y 3) y dietas con proteasa (3 y 4) versus sin la misma (1 y 2). En investigación adicional se observaron los cambios estructurales en grano de maíz hidratado y tratado o no con las enzimas en cuestión después de 0, 6 y 24 horas usando un microscopio electrónico de rastreo. En el ensayo de alimentación el consumo de MS fue similar en todos los tratamientos (1106, 1088, 1105 y 1088 g/d para las dietas 1, 2, 3 y 4 en orden). La adición de la proteasa disminuyó ($P < 0.05$) el consumo de almidón (248 vs. 255 g/d) y aumentó, no significativamente, la digestibilidad de FDN (48.6 vs 46.8%) en comparación con

el tratamiento sin la enzima. La adición de enzimas a la dieta tendió ($P < 0.10$) a disminuir la concentración sanguínea de BHB por debajo del nivel testigo (4.26 vs. 4.68 mg/dL). La concentración de AGNE en la sangre tendió a aumentar ($P < 0.10$) en corderos alimentados con α -amilasa versus sin α -amilasa (0.17 vs 0.14 mEq/L). El nivel de insulina tendió ($P < 0.10$) a aumentar en corderos alimentados con la proteasa en comparación con los corderos alimentados sin la enzima (80.3 vs. 71.8 pmol/L). Los niveles de glucosa fueron similares para todos los tratamientos. Ambas enzimas exógenas influyeron sobre los componentes sanguíneos, pero se observó un mayor efecto con la proteasa. Bajo examen microscópico de electrones se observaron cambios estructurales en el gránulo de almidón y en la matriz proteica en el grano de maíz tratado con las enzimas exógenas. Ocurrió progresivamente aglutinación de los gránulos de almidón y degradación de la zeína, debido a la actividad de las enzimas.

Tabla de Contenido

Página

Abstract	ii
Resumen.....	iv
Tabla de contenido	vi
Lista de Cuadros	ix
Lista de Figuras.....	x
Lista de Abreviaturas	xii
1.0 Introducción	1
2.0 Objetivos	3
3.0 Revisión de Literatura.....	4
3.1 Sistemas de Producción de Pequeños Rumiantes.....	4
3.1.1 Sistema Extensivo.....	4
3.1.2 Sistema Semi-Intensivo	5
3.1.3 Sistema Intensivo	6
3.2 Carbohidratos en la Dieta del Rumiante	6
3.2.1 Carbohidratos Estructurales	7
3.2.2 Carbohidratos No Estructurales	8
3.2.2.1 Almidón	8
3.2.3 Maíz	9
3.2.3.1 Proteínas del Grano de Maíz.....	11
3.3 Digestión de Nutrientes por los Rumiantes	11
3.3.1 Carbohidratos Estructurales	12

3.3.2	Carbohidratos No Estructurales	13
3.3.3	Compuestos Nitrogenados	14
3.4	Componentes Sanguíneos Relacionados con el Metabolismo Energético	15
3.4.1	Ácidos Grasos No Esterificados	16
3.4.2	Insulina.....	16
3.4.3	β-hidroxiacetato	17
3.4.4	Glucosa	17
3.5	Aditivos en la Nutrición Animal.....	18
3.5.1	Enzimas como Aditivos en la Nutrición de Rumiantes	18
3.5.1.1	Proteasas	21
3.5.2	Otros Aditivos Utilizados en Dietas Para Rumiantes	22
3.5.2.1	Ionóforos	22
3.5.2.2	Probióticos	22
3.5.2.3	Sustancias Amortiguadoras.....	24
4.0	Materiales y Métodos.....	25
4.1	Animales y Dieta.....	26
4.2	Consumo Voluntario	29
4.3	Digestibilidad Aparente de la Materia Seca, PB, FDN y Almidón	30
4.4	Indicadores Sanguíneos del Estado Metabólico.....	31
4.5	Estructura del Grano Según Revelada por Microscopio Electrónico de Rastreo....	32
4.6	Análisis Estadístico	34
5.0	Resultados y Discusión	35
6.0	Conclusiones	50

7.0	Recomendaciones	52
8.0	Referencias.....	53
9.0	Apéndice	61

Lista de Cuadros

Página

Cuadro 1 Fórmula porcentual de la dieta experimental en términos de almidón, proteína bruta y fibra detergente neutro, de los ingredientes y según la aportación de cada ingrediente individual	26
Cuadro 2 Requerimientos Nutricionales Teóricos por Día de Ovinos en Crecimiento	35
Cuadro 3 Niveles de probabilidad de los efectos principales de los tratamientos y periodos experimentales sobre el consumo, digestibilidad y componentes sanguíneos	36
Cuadro 4 Efecto de la adición de una fuente de α amilasa comercial, de una proteasa experimental y la combinación de ambas enzimas en la dieta sobre el consumo y la digestibilidad de nutrientes y concentración de componente en la sangre	37
Cuadro 5 Niveles de Probabilidad de los contrastes de los cuadrados medios esperados por tratamiento ajustado por la prueba de comparaciones múltiples Tukey-Kramer	39
Cuadro 6 Contrastes ajustados por comparaciones múltiples de los cuadrados medios esperados de las respuestas evaluadas de las combinaciones de los tratamientos	40
Cuadro 7 Valores Normales de Metabolitos Energéticos en Sangre Ovina	44
Cuadro 8 Cambio en Peso Vivo Según el Periodo Experimental.....	61

Lista de Figuras

Página

Figura 1: Partes del Grano de Maíz	10
Figura 2: Localización de endospermo duro y suave en granos de maíz cortados longitudinalmente..	10
Figura 3: Finca Alzamora - UPRM	25
Figura 4: Pabellón Proyecto de Pequeños Rumiantes	25
Figura 5: Jaulas de piso utilizadas en el experimento	27
Figura 6: Molienda de heno.....	28
Figura 7: Heno molido para ser ofrecido.....	28
Figura 8: Pesaje de un componente dietético	28
Figura 9: Transferencia de un componente al envase de mezcla	28
Figura 10: Almacenamiento de raciones listas	28
Figura 11: Pesaje de un ovino.....	29
Figura 12: Pesaje de alimento a ofrecer.....	29
Figura 13: Ofreciendo Heno	29
Figura 14: Ovinos consumiendo alimento ofrecido	29
Figura 15: Recogido de alimento rechazado	30
Figura 16: Pesaje heno rechazado	30
Figura 17: Bolsa Recolectora de heces.....	30
Figura 18: Recolectando heces	30
Figura 19: Pesaje de heces totales excretadas	30
Figura 20: Obtención de Sangre de la vena yugular.....	31
Figura 21: Muestra de sangre obtenida.....	31

Figura 22: Centrifugación de muestras de sangre	32
Figura 23: Suero (capa superior) en muestra de sangre centrifugada.....	32
Figura 24: Obtención del suero usando pipeta	32
Figura 25: Hidratación de Maíz	33
Figura 26: Muestras de maíz hidratado 0, 6 y 24 horas	33
Figura 27: Muestras a retratar	33
Figura 28: Microscopio de Rastreo	33
Figura 29: Consumo diario de MS como % PV por tratamiento	35
Figura 30: Fotografía con microscopía de rastreo del grano de maíz a una resolución de 2000X.....	45
Figura 31: Fotografía utilizando el microscopio de rastreo a una resolución de 2000X del efecto de la adición de la α -amilasa comercial y la proteasa experimental sobre la estructura del grano de maíz al momento de hidratarse	47
Figura 32: Fotografía utilizando el microscopio de rastreo a una resolución de 2000X del efecto de la adición de la α -amilasa comercial y la proteasa experimental sobre la estructura del grano de maíz 6 horas después de hidratarse.....	48
Figura 33: Fotografía utilizando el microscopio de rastreo a una resolución de 2000X del efecto de la adición de la α -amilasa comercial y la proteasa experimental sobre la estructura del grano de maíz 24 horas después de hidratarse.....	49

Lista de Abreviaturas

α -amilasa comercial	AC
Ácidos grasos no esterificados	AGNE
Ácidos grasos volátiles	AGV
β -Hidroxibutirato	BHB
Body weight	BW
Crude Protein	CP
Consumo Voluntario	CV
“Direct Feed Microbials”	DFM
Dry matter	DM
Error estándar de la media	EEM
Fibra detergente ácido	FDA
Fibra detergente neutro	FDN
Fracción proteica	FP
Gránulos de almidón	GA
Gastrointestinal	GI
Heno de gramíneas tropicales	HGT
Materia Orgánica	MO
Materia seca	MS
Neutral detergent fiber	NDF
Non esterified fatty acids	NEFA
Nitrógeno amoniacal	N-NH ₃
Compuestos Nitrogenados No Proteicos	NNP
Proteína bruta	PB
Proteasa experimental	PE
Peso Vivo	PV
Rumen degradable protein (Proteína degradada en el rumen)	RDP
Rumen undegradable protein (Proteína no degradada en el rumen)	RUP
Scanning electron microscope (Microscopio electrónico de rastreo)	SEM

1.0 Introducción

La alimentación representa el mayor costo variable que enfrentan los productores pecuarios, por lo que conviene evaluar nuevas estrategias para alimentar los animales y obtener una producción costo efectiva. El no encontrar una forma viable de alimentar el hato, obteniendo ganancias en la producción, podría resultar en el cese de operaciones de diferentes industrias. Por ello es de suma importancia continuar realizando investigaciones en busca de nuevas opciones para mejorar el consumo voluntario, la digestibilidad y la eficiencia de utilización de los alimentos ofrecidos.

En sistemas intensivos de producción animal, la utilización de dietas con una alta proporción de granos de cereales es una práctica común. Las dietas típicas para ganado especializado para la producción de leche son de alta densidad energética y su contenido de proteína bruta es mayor de 16%.

La digestión ruminal del almidón ejerce un gran efecto sobre el comportamiento productivo de los rumiantes alimentados con dietas altas en granos (Huntington, 1997; Britton y Stock, 1986). Con el objetivo de mejorar la digestibilidad de dietas altas en almidón se han creado procesamientos físicos como el rolado en seco y a vapor, entre otros (Owens et al., 1997).

También se ha evaluado la utilización de enzimas exógenas como amilasas y proteasas, para mejorar el valor nutritivo de tales dietas (Rojo-Rubio et al., 2001). Las enzimas amilolíticas son de uso común en las industrias alimentarias para catalizar la hidrólisis de almidón (Reilly, 1985). Estas enzimas incrementan la digestibilidad in vitro del almidón. Se han adicionado las mismas en dietas para rumiantes altas en granos (Mora-Jaimes et al., 2002) y han mejorado el comportamiento productivo de ovinos (Romero et al., 1992). Sin embargo, para uso con

rumiantes, a las enzimas amilolíticas y proteolíticas se les ha prestado menos atención (Rojo-Rubio et al., 2001) que a otras clases de enzimas como las fibrolíticas.

Las enzimas exógenas añadidas a la dieta fortalecen la actividad amilolítica presente naturalmente en bacterias y también protozoarios (Mendoza et al. 1994, 1993) y hongos (Yanke et al. 1993) ruminales. Rojo-Rubio et al. (2001) reportaron que la adición de una amilasa termoestable, aislada de *Bacillus licheniformis*, incrementó la digestión in vitro del almidón aportado por el sorgo y maíz ingeridos. También se ha estudiado el uso de las enzimas para aumentar la producción de leche, logrando Klingerman (2009) un resultado positivo.

En cambio, Weiss et.al (2011) añadieron a la dieta una amilasa exógena sin ver un efecto ni en la digestibilidad de energía, o de almidón, ni en la producción de leche. En la investigación presente se estudia si la adición de una fuente de α -amilasa comercial y una proteasa experimental o la combinación de ambos al alimento ofrecido a ovinos aumentará el consumo voluntario y digestibilidad de la MS, PB, almidón y FDN y si habrá un efecto de dicha adición sobre la concentración sanguínea de varios metabolitos y una hormona.

2.0 Objetivos

Determinar el efecto de la adición de una α -amilasa comercial y una proteasa experimental o su combinación, sobre el consumo voluntario, la digestibilidad de MS, PB, almidón y FDN y algunos parámetros fisiológicos en ovinos.

Observar mediante microscopía de electrones el efecto de las aludidas adiciones enzimáticas sobre los granulos de almidón y la fracción proteica presentes en el granulo de maíz partido e hidratado.

3.0 Revisión de Literatura

3.1 Sistemas de Producción de Pequeños Rumiantes

La crianza de caprinos y ovinos para la producción de carne, leche o fibra a nivel mundial se ha desarrollado mediante las tres clases de sistemas: extensivos, semi-intensivos e intensivos. Esta clasificación se basa entre otras características en la disponibilidad y tipo de alimento que consumen los animales. Cada sistema presenta sus ventajas y desventajas y su adopción dependerá, entre otros factores, de razones geográficas, sociales, económicas y ambientales en una región determinada.

3.1.1 Sistema Extensivo

Los sistemas extensivos de producción animal se basan en la utilización de especies ganaderas de interés zootécnico capaces de aprovechar eficazmente los recursos alimentarios naturales mediante el pastoreo (Martín et al., 2001). Los animales se mantienen gracias al forraje pastoreado sin ningún tipo de restricción. Los sistemas de este tipo son muy comunes en regiones tropicales y en países en vías de desarrollo. Según Sánchez Hermosillo (2001), los forrajes tropicales pueden ser clasificados en las tres categorías: pastos de gramíneas, leguminosas y follajes de alta calidad. Las gramíneas, son las especies forrajeras más disponibles y utilizadas en los sistemas extensivos, pero generalmente su valor nutritivo es menor que el de las leguminosas o follajes de alta calidad. Las diversas especies de gramíneas forrajeras en condiciones normales presentan una digestibilidad alrededor del 50% y un contenido de PB entre 4 a 8%. Estas características nutricionales pueden mejorarse, llegando a subir la digestibilidad a un máximo de 60%, mediante excelente manejo y prácticas de fertilización. El segundo grupo de forrajes tropicales, las leguminosas, cuentan típicamente con

digestibilidades entre 50% – 70% y contenidos de PB de 16 a 26%. Al referirse a follajes de alta calidad, se trata de plantas cuyas digestibilidades rondan los 70 a 90% y que presentan contenidos de PB similares a las leguminosas (16 a 26%), pero a diferencia de éstas, no tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Siguiendo la tradición llevada para los bovinos en los trópicos, los ovinos y caprinos han sido alimentados principalmente a base de pastos. Las producciones obtenidas bajo condiciones de pastoreo son generalmente modestas, debido a los pastos de limitado valor nutritivo utilizados. Además son necesarias grandes extensiones de terreno para que los pequeños rumiantes puedan obtener todos los nutrientes requeridos mediante la búsqueda y consumo selectivo de hojas anchas, frutos y espigas (Sánchez Hermosillo, 2001). En Puerto Rico la producción de caprinos y ovinos se realiza generalmente en sistemas extensivos basados en la alimentación de pasturas nativas naturalizadas. Sin embargo, debido a las limitaciones geográficas de la isla no existen muchos predios tan extensos y con tal variedad de vegetación como para que los ovinos o caprinos puedan alimentarse bien. Por ello los sistemas semi-intensivos o intensivos comienzan a implementarse.

3.1.2 Sistema Semi-Intensivo

En un sistema semi-intensivo los animales pastorean, pero en adición se les ofrece suplementos para satisfacer todos sus requerimientos nutricionales, compensando la pobre calidad y disponibilidad estacional del pasto. La alimentación suplementaria es la manera más fácil pero también la más costosa de proporcionar suficiente energía y proteína a los animales (Sánchez Hermosillo, 2001). La utilización de aditivos en este tipo de sistema de producción para mejorar el valor nutritivo de los alimentos, es otra práctica que busca una mejor utilización de los pastos y forrajes por parte de los pequeños rumiantes.

3.1.3 Sistema Intensivo

En estos sistemas los animales están en confinamiento, y se les provee todo el alimento necesario para satisfacer sus requerimientos nutricionales de mantenimiento y producción. Es común la utilización de raciones mixtas completas que contienen una alta proporción de granos de cereales, como maíz y trigo, que sirven de fuente de energía y proteína. Otros granos utilizados incluyen trigo, avena, cebada, sorgo y centeno, y generalmente se incorporan en proporciones de hasta 80% en la dieta, acompañado con un 15% de una fuente de fibra. Las limitaciones al uso de estas dietas, además del costo, incluyen una mayor incidencia de enfermedades metabólicas si el manejo es inadecuado. La porción fibrosa en la alimentación del rumiante, además de un tamaño lo suficientemente grande de las partículas en la dieta, es necesaria para estimular la rumia, proceso vital para la salud del complejo retículo-ruminal. Durante la rumia ocurre la remasticación del alimento, lo que genera un mayor flujo de saliva que actúa como amortiguador en el rumen (Mertens, 1997). Dietas bajas en fibra y con alto contenido de granos generalmente mejoran la eficiencia alimenticia, pero son más propensas a causar desordenes metabólicos como acidosis, ruminitis, laminitis e incluso cojera. Se ha dedicado mucha investigación a evaluar el uso de aditivos, ya sean sustancias amortiguadoras, inóculos microbianos o enzimas para mejorar la utilización de este tipo de dietas.

3.2 Carbohidratos en la Dieta del Rumiante

La función principal de los carbohidratos en la alimentación es el aporte energético. Se encuentran almacenados en las plantas mayormente en forma de compuestos complejos de alto peso molecular (polisacáridos). Estos están formados por unidades básicas (monosacáridos) cuya molécula contiene los tres elementos carbono, hidrogeno y oxígeno. Los carbohidratos son los constituyentes mayoritarios de los tejidos vegetales, y se hallan distribuidos entre la pared

celular y el contenido celular, además, constituyen el tipo de nutriente de mayor consumo por los animales de interés pecuario después del agua. De los carbohidratos incluidos en los tejidos vegetales, se denominan estructurales aquellos presentes en la pared celular y no estructurales los localizados en el contenido celular. La dieta aporta ambos tipos de carbohidratos y pueden ser utilizados por los rumiantes.

3.2.1 Carbohidratos Estructurales

Estos son polímeros presentes en la pared celular, cuyas unidades básicas o monómeros son monosacáridos, unidos éstos entre sí por los enlaces glicosídicos tipo β . La celulosa, un homopolisacárido formado por una cadena lineal de glucosa; y la hemicelulosa, un heteropolisacárido con cadenas ramificadas de varias hexosas y pentosas, son los dos principales carbohidratos estructurales presentes en la pared celular. Los enlaces tipo β hacen que estos carbohidratos no puedan ser degradados por enzimas producidas por ningún mamífero. En conjunto con otros componentes presentes en la pared celular, como lignina y pectina, estos polisacáridos forman la fibra.

La fibra es necesaria en la dieta de los rumiantes para un funcionamiento óptimo del sistema gastrointestinal (G.I.). Un método analítico usado para cuantificar el contenido de pared celular de los alimentos, perteneciente al sistema desarrollado por P.J. Van Soest y colaboradores (1991), se denomina fibra detergente neutro (FDN). El contenido de FDN determinado en un alimento es un buen indicador del tiempo que un rumiante dedicará a masticar el mismo y el tiempo de masticación se relaciona a su vez con la secreción de saliva, rica en fosfatos y bicarbonatos. Estos tienen una función amortiguadora, neutralizando los ácidos orgánicos que se producen durante la fermentación y manteniendo el pH ruminal dentro de límites adecuados de 6.9 a 7.2 (Lechartier y Peyraud, 2010; Tafaj et al., 2007; Delgado, 2005).

3.2.2 Carbohidratos No Estructurales

Este grupo abarca azúcares y otros carbohidratos solubles presentes en el contenido celular. Cuando su molécula se forma de más de una unidad de monosacáridos (oligosacáridos y polisacáridos), éstas unidades se encuentran unidas por enlaces tipo α . Los granos de cereales tienen un alto contenido de este tipo de carbohidratos, representando de un 50 – 70% del peso seco (Agama-Acevedo et al., 2005). Entre los granos de cereales más utilizados en dietas para rumiantes se encuentran el maíz, trigo, avena, cebada y sorgo (Knowlton et al., 1996), siendo el maíz el de mayor utilización. Los alimentos concentrados y las dietas ofrecidas a los rumiantes para maximizar su potencial productivo suelen contar con una alta proporción de granos cereales y de almidón.

3.2.2.1 Almidón

El almidón, es un polímero de unidades de glucosa compuesto por macromoléculas de dos diferentes estructuras. La molécula de la amilosa presenta cadenas lineales compuestas por monómeros unidos por enlaces α 1-4, mientras la de amilopectina presenta cadenas ramificadas del monómero unidos por enlaces α 1-4 y α 1-6 (Agama-Acevedo et al., 2005). El almidón es de rápida degradabilidad en el rumen a diferencia de los carbohidratos estructurales fibrosos presentes en la pared celular. El deseo de maximizar la producción por los rumiantes de leche o carne, ha llevado a la utilización de dietas altas en almidón (Lechartier y Peyraud, 2010). La eficacia de utilización del almidón en dietas para rumiantes puede verse afectada por diversos factores, entre ellos la variedad y el procesamiento previo del grano, el tiempo de retención y la tasa de pasaje por el complejo retículo-rumen y su porcentaje de inclusión en la dieta. Se ha investigado diversas alternativas para mejorar la eficiencia de utilización del almidón a nivel

ruminal y post-ruminal (Rojo Rubio et al., 2007, 2005; Knowlton et al., 1996; Mendoza et al., 1994, 1993). El manejo inadecuado de dietas con un alto contenido de almidón puede generar como consecuencia desordenes metabólicos como acidosis ruminal e inapetencia (Lechartier y Peyraud 2010; Yang y Beauchemin, 2009; Rustomo et al., 2006; Beauchemin et al., 2003).

3.2.3 Maíz

Este es el grano más utilizado como fuente de energía en dietas para rumiantes. La estructura del grano de maíz incluye las siguientes partes: una cutícula, el pericarpio, el endospermo, el germen y el pedicelo (Figura 1; Paredes López et al., 2009). Su componente químico más abundante es el almidón. La variedad botánica de que proviene el grano y su contenido de almidón afectará la funcionalidad del maíz para sus diferentes tipos de usos, incluso para consumo humano (Narváez González et.al, 2007; Agama-Acevedo et al., 2005). Entre los componentes estructurales del grano de maíz, el germen contiene la información genética además de almacenar vitaminas, minerales y aceites. El pericarpio, la cubierta externa que protege el grano, contiene fibra, minerales y vitaminas. El endospermo conforma en promedio el 82% del peso del grano y almacena almidón en asociación con proteínas. Esta estructura está formada por una región harinosa clasificada como suave y otra vítrea de consistencia dura (Figura 2; Narváez González et al., 2007). Se ha encontrado que el almidón presente en el maíz puede tener una mayor o menor degradabilidad de acuerdo con las proporciones de endospermo vítreo y harinoso presentes en el grano. Cuando el endospermo vítreo se encuentra en mayor proporción, el almidón es menos digerible e inversamente (Robutti et al., 1973).

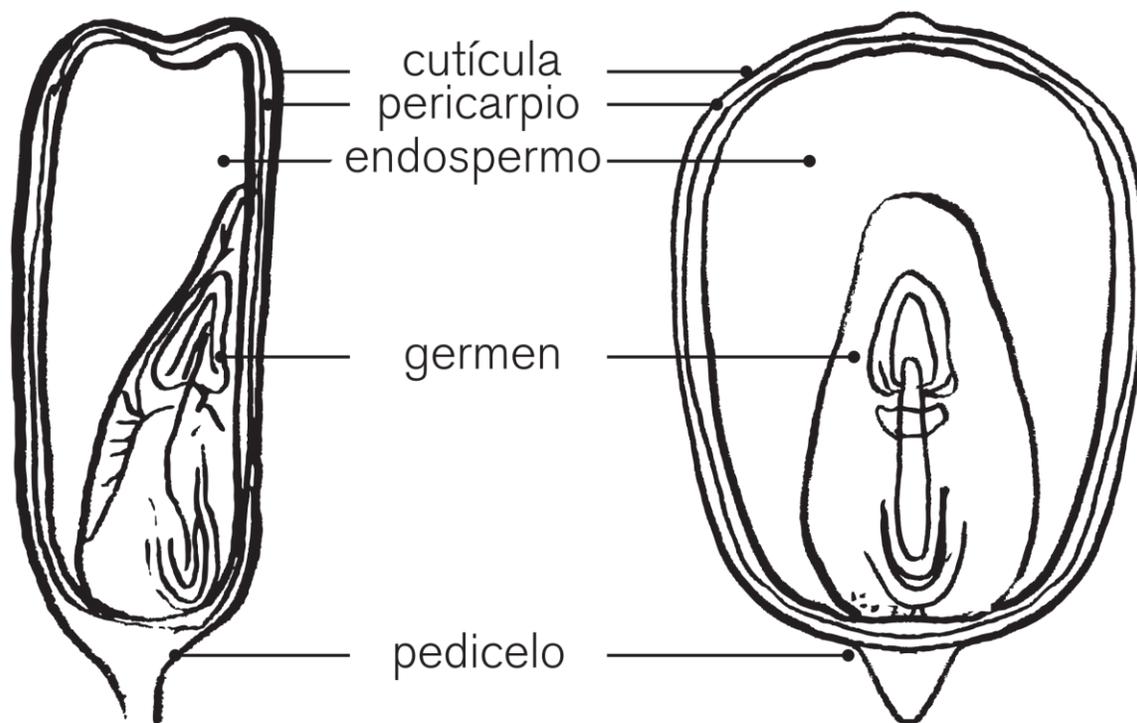


Figura 1: Partes del Grano de Maíz (Paredes López et al. 2009)

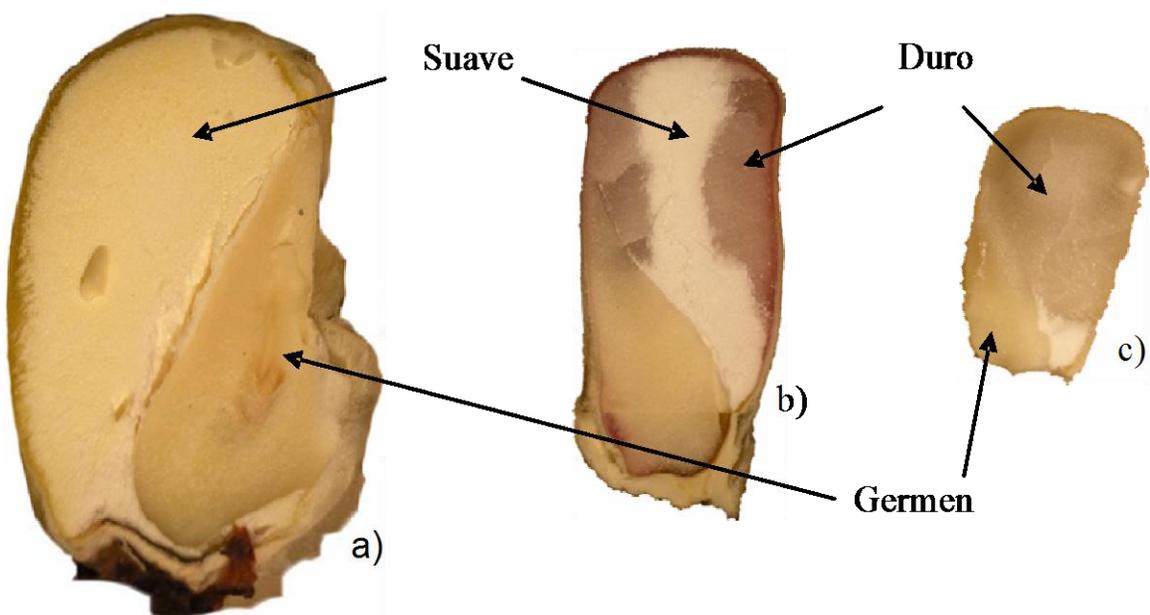


Figura 2: Localización de endospermo duro y suave en granos de maíz cortados longitudinalmente (Narváez González et al., 2007)

3.2.3.1 Proteínas del Grano de Maíz

Alrededor del 52% de la proteína presente en el grano de maíz es la zeína (una prolamina), ubicada principalmente en el endospermo. La zeína representa aproximadamente el 60% de la proteína del endospermo, en maíces normales es la principal reserva de proteína en el grano (Sánchez et.al, 2007). Las prolaminas se caracterizan por ser solubles en soluciones alcohólicas. Hay también albúminas (solubles en agua) y globulinas (solubles en soluciones de sales), que constituyen alrededor de 22% de las proteínas y se encuentran concentradas en el germen. Finalmente, están las glutelinas (solubles en soluciones alcalinas o ácidas diluidas) que aportan aproximadamente al 25% de la proteína total y se localizan en el germen y el endospermo (Paredes López et al., 2009; Sánchez et al., 2007).

Dentro de la estructura del grano de maíz, la fuerza de adhesión entre la proteína zeína y el almidón es menor que la adhesión entre los mismos gránulos de almidón (Robutti et al., 1973). Este tipo de conformación podría dificultar el mecanismo de adhesión que los microorganismos que habitan en el complejo retículo-rumen requieren para degradar la molécula de almidón. Por otro lado es necesario tener en cuenta el tamaño de las partículas, ya que se ha observado que el quebrantamiento del gránulo del almidón aumenta grandemente a medida que disminuye el tamaño de la partícula (Robutti et al., 1973)

3.3 Digestión de Nutrientes por los Rumiantes

Debido a las características anatómicas-fisiológicas del tubo digestivo, específicamente la división de su estómago en cuatro compartimientos y la fermentación microbiana que ocurre en los primeros dos de los mismos (retículo-rumen), los rumiantes tienen la habilidad de degradar fracciones fibrosas no utilizables o degradables por enzimas digestivas propias de los animales mamíferos (Dehority, 2000). A diferencia de otras especies y como resultado de las poblaciones

microbianas existentes en el complejo retículo-rumen, los rumiantes son capaces de degradar fibra, utilizar fuentes de nitrógeno no proteico y sintetizar amino ácidos esenciales y vitaminas del complejo “B” y la vitamina K (Dehority, 2000).

3.3.1 Carbohidratos Estructurales

El término fibra dietética se define como todo material vegetativo no digerido por enzimas propias de los animales mamíferos. Los polisacáridos celulosa y hemicelulosa, componentes fibrosos presentes en la pared celular de las plantas, son los principales carbohidratos estructurales degradables por los microorganismos del complejo retículo-rumen (*Weimer, 1992*). La degradación de estos dos polisacáridos requiere la intervención de enzimas producidas por los microbios. Además de la celulosa y hemicelulosa, la pared de las plantas se compone de pectina, sílice y lignina.

La hidrólisis de los carbohidratos estructurales comienza con la adhesión de las células bacterianas a las partículas del alimento. Una vez adheridas al sustrato, las bacterias producen celulasas y hemicelulasas que hidrolizan los enlaces tipo β que unen las unidades de glucosa que forman la celulosa y los enlaces del mismo tipo que unen las hexosas y pentosas que forman la molécula de hemicelulosa. La pectina es un polisacárido cuya molécula contiene como principal monómero ácido galacturónico, y que también es degradada por pectinasas microbianas. Los monosacáridos y derivados de éstos que la aludida hidrólisis libera, representan una fuente de energía para los microorganismos. El metabolismo microbiano produce ácidos grasos volátiles (AGV's) de cadena corta (2 a 8 carbonos), que representan la principal fuente de energía para el rumiante luego de su absorción, que ocurre principalmente a través de la pared ruminal. Los AGV's que se producen en mayor cantidad en el complejo retículo-rumen son los ácidos acético, propiónico y butírico, compuestos que poseen 2, 3 y 4 carbonos en su molécula respectivamente.

Otro producto principal de la fermentación de los carbohidratos por los microorganismos en el retículo-rumen son los gases, mayormente CO₂ y CH₄, que el rumiante elimina eructándolos. De estos dos gases la eliminación de CH₄, pero no de CO₂ representa una pérdida de energía (ineficiencia alimentaria peculiar en los rumiantes) (Bach et al., 2005). Tres de las especies bacterianas con mayor capacidad celulolítica, o de hidrolizar celulosa, en el complejo retículo-rumen son *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes* (Miron et al., 2001; Weimer, 1992). Otras bacterias que hidrolizan hemicelulosa son *Butyrivibrio fibrosolvens* y *Prevotella ruminicola*, mientras que *Lachnospira multiparus* es un ejemplo de una especie que tiene la capacidad de degradar pectina. Además de las bacterias existen hongos con capacidad fibrolítica, como *Neocallismastix frontalis*, *Neocallismastix patriciarium* y *Piromyces communis*. Protozoarios de los géneros *Entodinium*, *Epidinium* y *Eudiplodinium* también tienen capacidad celulolítica (Donmez et al., 2003). En cambio, la lignina, otro compuesto que forma parte de las paredes celulares vegetales, es indigerible tanto por las enzimas de los microorganismos como las del animal huésped.

3.3.2 Carbohidratos No Estructurales

Los azúcares simples y el almidón localizados en el contenido interior de la célula vegetal, son los principales carbohidratos no estructurales que consumen los rumiantes. Aunque el rumiante, como otros mamíferos, produce enzimas que degradan el almidón en el duodeno, existen en el complejo retículo-rumen microorganismos (bacterias y protozoarios) que producen amilasa e hidrolizan el almidón a nivel ruminal anterior a su llegada al duodeno. Las bacterias con mayor capacidad amilolítica en el complejo retículo-rumen incluyen *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amilophilus*, *Succinomonas amilolitica*, *Bacteroides amilophilus* y *Selenomonas ruminantium* (Negaraja and Titgemeyer, 2007). Los protozoarios de los géneros *Dasytricha* e *Isotricha*

utilizan azúcares simples como fuente de energía y los *Isotricha* hidrolizan también el almidón. La hidrólisis y metabolismo de almidón por las bacterias amilolíticas generan como productos principales AGV's y ácido láctico. A diferencia de las bacterias tipo celulolíticas, estos microorganismos que degradan el almidón generan una menor proporción de ácido acético y mayor de ácido propiónico (Negaraja y Titgemeyer, 2007).

A nivel práctico, las proporciones de los AGV's, el ácido láctico y los gases producidos a nivel ruminal dependerá del tipo de dieta. Cuando ésta incluye granos cereales con su alto contenido de almidón, aumenta la producción de ácido propiónico y disminuye la de ácido acético y de gases a nivel ruminal, además de que se produce ácido láctico.

3.3.3 Compuestos Nitrogenados

A diferencia de los mamíferos no rumiantes y las aves, los rumiantes adultos en mantenimiento no tienen requerimientos dietéticos de proteína ni requieren que la dieta contenga los aminoácidos esenciales. Esta menor dependencia de los abastos dietéticos se debe a las poblaciones microbianas que habitan en el complejo retículo-rumen, cuyos requerimientos de nitrógeno en la materia ingerida fluctúan entre 1.28 a 1.92% y son equivalentes del 8 al 12% de PB.

Las fuentes de nitrógeno utilizables por el rumiante incluyen la proteína verdadera contenida en los alimentos y también compuestos nitrogenados no proteicos (NNP) (Bach et al., 2005). Después de consumida, una parte variable de la proteína verdadera es hidrolizada en el complejo retículo-rumen por proteasas microbianas procedentes de especies como *Prevotella ruminicola* y *Lachnospira multiparus*. Esto da origen a péptidos y amino ácidos libres, substratos que son rápidamente desaminados con liberación de amoníaco y formación de compuestos con cadenas de carbono de largo variable. Estos compuestos y el nitrógeno amoniacal (N-NH₃) son utilizados

por los microorganismos para la síntesis de sus propias proteínas y otros constituyentes de la célula. En un caso típico aproximadamente el 65% de la proteína bruta consumida es degradada en el rumen (RDP; “Rumen Degradable Protein”), mientras que la porción proteica del alimento que escapa de la degradación a nivel ruminal (RUP; “Rumen Undergradable Protein”), es de aproximadamente 35%. Esta porción que no se degrada en el retículo-rumen se conoce como proteína sobrepasante o de escape (Bach et al., 2005).

La hidrólisis de fuentes de NNP, por ejemplo la urea, ocurre mediante la acción de bacterias tipo epidurales, que son aquellas que habitan adheridas a las paredes del complejo retículo-rumen. Este tipo de bacteria produce la enzima ureasa que hidroliza la molécula de urea con formación de dos moléculas de amoníaco y una de dióxido de carbono. El amoníaco es utilizado por los microorganismos como fuente de nitrógeno para la síntesis de proteína microbiana. El exceso de amoníaco que no se usa para dicho fin, se absorbe a través de las paredes ruminales y pasa en la sangre al hígado donde se convierte nuevamente en urea, compuesto que puede ser excretado a través de la orina o reciclado al tracto GI por medio de la saliva.

3.4 Componentes Sanguíneos Relacionados con el Metabolismo Energético

Como resultado de la digestión, metabolismo y utilización de nutrientes presentes en los alimentos ingeridos; los carbohidratos, las proteínas, los lípidos y otros, y en dependencia de su relación con los requerimientos energéticos del animal, varía la concentración en la sangre de algunos componentes indicadores del estado nutricional y balance energético del organismo (Pinto-Santini et al., 2009). Los ácidos grasos no esterificados (AGNE); el cuerpo cetónico, β -hidroxibutirato (BHB); la glucosa y la hormona insulina son algunos de estos componentes.

3.4.1 Ácidos Grasos No Esterificados

Denominados también como ácidos grasos libres, éstos se liberan en el plasma sanguíneo cuando se moviliza el tejido adiposo, para satisfacer las necesidades metabólicas del animal, principalmente la necesidad de energía (Nuñez Ochoa y Boauda, 2007; Bowden, 1971). Los lípidos de la sangre incluyen los AGNE junto a glicéridos, ésteres de colesterol, colesterol libre, fosfolípidos y ácidos grasos de cadena corta (Bowden, 1971). Los periodos de balance energético negativo del animal obligan a la movilización de grasa corporal, reflejada en un aumento en los AGNE sanguíneos (Ingvarsen y Andersen, 2000). Los animales rumiantes se caracterizan por concentraciones de AGNE en la sangre inferiores a las de no rumiantes de tamaño corporal similar. Aún así, su concentración es un factor importante en la homeostasis calórica del cuerpo. Lógicamente, se ha observado que en ovinos sub-nutridos la concentración de AGNE en la sangre es superior a la de aquellos animales alimentados adecuadamente (Fernández-Foren et al., 2011; Al-Qarawi, 2004).

3.4.2 Insulina

Esta hormona reguladora metabólica que circula en la sangre es liberada por el páncreas. Juega un papel en la regulación del consumo voluntario (Chase et al., 1977; Baile, 1975). Actúa a nivel celular promoviendo el metabolismo de glucosa (Duygu Udum et al., 2008); su secreción se acelera por la alimentación (Sano, et al., 1999) y es inhibida por la subnutrición (Jimeno et al., 2001). Ovinos en ayuno desarrollan un estado de resistencia insulínica (Recabarren et al., 2000). Aunque se espera en animales rumiantes que los niveles sanguíneos de glucosa y de insulina estén directamente relacionados, no toda investigación ha establecido una relación estrecha entre las concentraciones de ambos componentes (Duygu Udum et al., 2008). Las diferentes vías de

utilización de los carbohidratos entre animales no rumiantes y rumiantes podría explicar sus diferentes relaciones glucosa-insulina en la sangre.

3.4.3 β -Hidroxibutirato

Se produce este compuesto mayormente como resultado del metabolismo de ácido butírico en la pared retículo-ruminal. El β -hidroxibutirato (BHB) es uno de los llamados cuerpos cetónicos que aumentan su concentración en el plasma sanguíneo del animal cuando existe una deficiencia energética (Nuñez Ochoa y Boauda, 2007; Whitaker et al., 1999).

3.4.4 Glucosa

La concentración sanguínea de glucosa en los rumiantes es considerablemente menor que la de los no-rumiantes. Esto se debe a que de los carbohidratos ingeridos por los primeros se fermentan casi todos los digeribles en el complejo retículo-rumen (Duygu Udum et al., 2008; Delgado, 2005). Los rumiantes dependen de la glucogénesis (formación de novo de glucosa en el hígado) para obtener su glucosa. El mayor precursor en este proceso es el ácido propiónico, producido en el rumen y absorbido a través de la pared de dicho órgano (Sano, et al., 1999); otros precursores son el ácido láctico, glicerol y algunos aminoácidos.

Es posible que ésta sea la razón por la cual no se ha encontrado relación entre los niveles de insulina y glucosa en el rumiante, ya que la glucosa presente depende de su síntesis en el hígado y no de la glucosa dietética. Investigaciones sobre los factores que afectan los niveles de glucosa sanguínea en los rumiantes han reportado resultados diversos. En algunos casos los niveles de glucosa en la sangre no han reflejado diferencias en los regímenes de alimentación (Duygu Udum et al., 2008), pero se ha observado que una subnutrición causa una disminución en los niveles de glucosa (Fernández-Foren, et al., 2011), y que los niveles son menores en animales en ayuno que en animales alimentados (Recabarren et al., 2000).

3.5 Aditivos en la Nutrición Animal

La utilización y evaluación de aditivos para mejorar diversas características de los alimentos para animales ha sido el objetivo de muchas investigaciones a través de los años. En lo que respecta a los animales rumiantes, la mayoría de los estudios se han basado en la evaluación de aditivos para manipular la fermentación ruminal, ya sea aquellos que alteren el ambiente del rumen, como las sustancias amortiguadoras; compuestos que modifiquen la actividad metabólica y población de ciertos microorganismos, como los ionóforos; y compuestos que degraden ciertos nutrientes mejorando así la utilización de los alimentos, como los microorganismos de alimentación directa (DFM) o algunas enzimas (Pinos Rodríguez y González Muñoz, 2000).

3.5.1 Enzimas como Aditivos en la Nutrición de Rumiantes

Los catalizadores producidos y empleados por los seres vivos, son de naturaleza orgánica y reciben el nombre de enzimas. Las enzimas modifican la velocidad de las reacciones químicas, sin aparecer en los productos finales (McDonald et al., 1999). Se ha evaluado la utilización de enzimas exógenas en dietas para rumiantes en busca de efectos tales como aumentar el consumo voluntario y la digestibilidad de los alimentos, remover sustancias antinutricionales o manipular la fermentación en el complejo retículo-rumen para reducir la formación de productos de excreción dañinos al medio ambiente (Walsh et al., 1993; Campbell y Bedford, 1992). Las enzimas exógenas utilizadas son producto de la biotecnología, los diversos tipos de las cuales actúan en ambientes con intervalos amplios de pH (4 – 9) y de temperatura (30 a 90°C); también pueden trabajar sinérgicamente con las poblaciones microbiales del rumen e incrementar la degradabilidad de los alimentos con liberación de sus nutrientes. Para estos propósitos se han evaluado enzimas que degradan componentes de la pared celular como celulasas y hemicelulasas, y del contenido celular, incluyendo amilasas, proteasas, fitasas y lipasas

(McCleary, 2000).

Se ha investigado extensamente el uso de varias enzimas celulolíticas para incrementar la digestión ruminal de la fibra y mejorar la producción en los rumiantes, pero se ha dado menos atención a las enzimas amilolíticas y proteolíticas, cuyo uso podría mejorar el aprovechamiento alimentario de los granos. Otra opción para promover la productividad del ganado es el uso de mezclas de enzimas exógenas, tales como la combinación de amilasas, proteasas, celulasas y hemicelulosas.

En las industrias pecuarias se hace algún uso de las enzimas exógenas para mejorar la degradabilidad ruminal de la fibra y del almidón presente en los alimentos utilizados con los rumiantes (Rojo-Rubio et al., 2001). La adición de enzimas al alimento de los animales puede ser beneficiosa para aumentar la digestibilidad al remover factores antinutricionales o reducir la formación de sustancias dañinas al medio ambiente. Contrario al caso de los mamíferos no rumiantes y las aves, en los rumiantes la mayoría de las investigaciones han tenido como objetivo la evaluación de enzimas exógenas tipo fibrolíticas con miras a mejorar la digestibilidad de los carbohidratos estructurales. Las diversas preparaciones enzimáticas se clasifican como aditivos y proceden mayormente de especies de bacterias, como *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus faecium*; o de especies de levaduras como *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei* y *Saccharomyces cerevisiae* (McAllister et al., 2001). Las principales enzimas fibrolíticas estudiadas son celulasas, xilanasas y pectinasas y la respuesta a su utilización para mejorar el valor nutritivo de los forrajes ha sido variable. La actividad de estas preparaciones enzimáticas puede verse afectada por diversos factores que incluyen el pH, la temperatura, las condiciones del experimento, el producto base de la enzima, la cepa microbiana seleccionada y/o el sustrato utilizado para su producción (Officer DI., 2000;

Lee et al., 1998; Rodríguez, 1996; Coughlan, 1989).

En una investigación local Tous-Rivera et al. (2010) aplicaron en forma rociada, dos enzimas fibrolíticas comerciales, derivados de *Trichoderma longibratum* y *Aspergillus reesei*, y aportadoras principalmente de celulasas y xilanasas, a HGT de ocho semanas de rebrote y obtuvieron mejoras sustanciales en la calidad nutritiva. Pinos Rodríguez et al. (2002) usaron ovejas canuladas para estudiar una enzima fibrolítica exógena aplicada a heno de gramíneas o leguminosas y observaron que la enzima puede cambiar la fermentación ruminal, el consumo y la digestibilidad de acuerdo al valor nutritivo del forraje. Krueger et al. (2008) aplicaron un cóctel multienzimático a hierba bermuda madura, lo que redujo el largo de la fase de latencia en la multiplicación microbiana, mejoró la eficiencia de la fermentación ruminal y aceleró el flujo saliente del rumen, pero no afectó la digestión de la MS. Giraldo et al. (2008) demostraron que una enzima exógena de actividad xilanasas y otra de actividad endoglucanasa añadidas directamente al rumen de ovinos fistulados, pueden incrementar la actividad fibrolítica y estimular el crecimiento de las bacterias celulolíticas, pero sin observar interacción entre ellas. López Soto et al. (2006) verificaron que una enzima fibrolítica actuó en forma sinérgica con el proceso de maceración, resultando en una mejora del valor nutricional de forrajes de baja calidad. En cambio, Szasz et al. (2002) no encontraron un efecto beneficioso sobre el consumo y la digestibilidad en ganado de carne cuando adicionaron a la paja de semilla de “bluegrass” (alta en fibra) una preparación enzimática con actividad de celulasa y xilanasas. Peters et al. (2010) tampoco observaron efectos sobre la concentración de nitrógeno microbiano, la digestibilidad aparente de las fracciones de MS, MO, FDN y FDA, ni en la producción o composición de la leche en vacas lecheras cuando añadieron una enzima fibrolítica con actividad de celulasa y xilanasas a una ración mixta completa.

Aunque en menor magnitud, la utilización de amilasas y proteasas para mejorar la digestión ruminal del almidón procedente de los granos, también ha sido el objetivo de varias investigaciones (Rojo-Rubio et al., 2001). La actividad amilolítica de los microorganismos ruminales se da principalmente por medio de enzimas extracelulares como las provenientes de cepas microbianas como *Streptococcus bovis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola* y *Selenomonas ruminantium* (Cotta, 1988). Se ha alegado que la utilización de enzimas exógenas con actividad de amilasa en la alimentación de vacas lecheras puede mejorar la digestibilidad total del almidón dietético y aumentar la producción de leche y la eficiencia alimenticia, mejorando así el aprovechamiento del maíz consumido (Hutjens, 2013).

3.5.1.1 Proteasas

Los esfuerzos por evaluar la utilización de proteasas como aditivos en las dietas para rumiantes han sido limitados. Esto puede deberse a la preocupación por un posible efecto negativo causado por la degradación de otras enzimas digestivas que son de naturaleza proteica. El propósito de adicionar proteasas a dietas con alta proporción de almidón de maíz es, además de aumentar la digestibilidad de la proteína dietética, promover la digestión del almidón al facilitar la liberación de los gránulos unidos a la zeína que actúa como un agente adhesivo entre las moléculas del polisacárido. También se ha mencionado que las amilasas pueden ser útiles al actuar sinérgicamente con las enzimas extracelulares sintetizadas por las bacterias ruminales amilolíticas aún cuando las condiciones fisicoquímicas del rumen no sean las óptimas (Rojo-Rubio et al., 2001).

3.5.2 Otros Aditivos Utilizados en Dietas Para Rumiantes

3.5.2.1 Ionóforos

Los ionóforos son compuestos lipolíticos capaces de ligar cationes como potasio, sodio, calcio y magnesio a través de la membrana celular de organismos procariotes y eucariotes (Russell y Strobel, 1989). El uso de ionóforos en la alimentación de los rumiantes ha sido un avance biotecnológico importante ya que mejora la eficiencia productiva en forma consistente y efectiva. Aunque existen diversos ionóforos los más utilizados en la alimentación de rumiantes son los carboxílicos, como monensina y lasalocida (Pinos Rodríguez y González Muñoz, 2000).

La monensina se une selectivamente a cationes monovalentes, mientras que lasalocida se une a iones monovalentes y bivalentes (Elsasser, 1984). Ambos ionóforos poseen actividad de antibiótico débil, sus moléculas son de estructura lineal, con presencia de oxígeno y de varios grupos funcionales como carboxilo, hidroxilo y amino. Dichas propiedades químicas afectan algunas bacterias ruminales, debido a que interrumpen el intercambio iónico y modifican los gradientes protónicos y catiónicos de la membrana celular (Pinos Rodríguez y González Muñoz, 2000).

3.5.2.2 Probióticos

La adición de probióticos a la dieta para fortalecer la alimentación tiene una larga historia, pero recientemente ha aumentado el interés por su estudio (Hong et al., 2005). Un probiótico puede ser definido de varias maneras, según Kritas et al., (2006) se trata de microorganismos disponibles en suficiente cantidad para alterar la microflora del tracto digestivo del animal hospedero. Krehbiel et al. (2003); Hong et al. (2005); Taras et al. (2006) lo definen como microorganismos vivos que al consumirse le brindan algún beneficio al hospedero por mejorar el balance de microorganismos en el intestino. También se describe como la alimentación directa

de microorganismos (Ghorbani et al., 2002). Los probióticos son de interés como posibles sustitutos para los antibióticos y otros químicos cuya adición a las dietas es problemática (Musa et al., 2009). A nivel comercial la Administración de Drogas y Alimentos (Food and Drug Administration) obliga a los fabricantes de estos productos a llamarlos “Direct Feed Microbials” (DFM) y los mismos deben cumplir con los requisitos de ser específicos para uso en un animal hospedero dado, resistir destrucción en las diversas regiones del tracto GI, mostrar estabilidad genética y ser seguros y no patógenos (Krehbiel et al., 2003).

Los probióticos no solamente se utilizan en animales de producción pecuaria incluyendo aves, porcinos, peces, bovinos y conejos, sino también en la alimentación humana. Incluso productos para consumo humano conteniendo probióticos del género *Lactobacillus* se mercadearon tan temprano como la década del 1920 en Japón (Musa et al., 2009).

Los probióticos han sido menos estudiados en los rumiantes que en los no rumiantes, mamíferos y aves. Sin embargo, experimentos en becerros lactantes, corderos y toretes para engorde indican que, tal como los antibióticos, los probióticos mejoran el desempeño productivo y reducen la incidencia de diarrea (Kritas et al., 2006). El concepto original de añadir probióticos a la dieta del ganado vacuno era principalmente obtener efectos beneficiosos postruminales mediante el establecimiento de una microflora intestinal deseable (Ghorbani et al., 2002; Krehbiel et al., 2003). En estudios más recientes, la suplementación con probióticos en caprinos para carne ha disminuido las poblaciones de *E. Coli* y *Salmonella* en las heces fecales, lo que es de interés para la protección del medioambiente (Whitley et al., 2009).

Existen indicaciones de que los probióticos también pueden producir beneficios ruminales (Krehbiel et al., 2003). Uno de los desordenes ruminales más comunes es la acidosis. Para lograr el efecto deseado se precisan bacterias capaces de competir con la actividad de las

bacterias productoras de ácido láctico en el rumen y así disminuir la concentración de este ácido y prevenir o aminorar la acidosis. Por ejemplo, los bovinos que consumen dietas bien altas en granos cereales experimentan con frecuencia acidosis ruminal subaguda, pero si se añade bacterias utilizadoras de ácido láctico, como *Propionilbacterium* o una combinación de ésta con otras cepas, se puede evitar esta condición (Ghorbani et al., 2002). *Megasphaera elsdenii* es otra especie que ayuda a prevenir la acumulación de ácido láctico y combatir la acidosis (Krehbiel et al., 2003).

3.5.2.3 Sustancias Amortiguadores

Estos aditivos actúan neutralizando los ácidos orgánicos y mitigando las variaciones del pH en el complejo retículo-rumen. Tienen limitaciones prácticas de incorporación dietética para no desmejorar la palatabilidad, pero su inclusión puede favorecer la digestibilidad de los alimentos. Se han utilizado muchas sustancias como amortiguadores, sin embargo el bicarbonato sódico es el más estudiado y su utilización está generalizada en la alimentación de rumiantes para la producción de carne y leche. El bicarbonato sódico se puede administrar de muchas formas (ad libitum, en bloques para lamer, en el pienso, etc.), pero la forma más eficiente y segura es la inclusión continuada a un 1% en las raciones mixtas completas.

4.0 Materiales y Métodos

El experimento de alimentación se realizó en el Proyecto de Pequeños Rumiantes localizado en la Finca Alzamora de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez, UPRM (Figuras 3 y 4). El objetivo fue determinar en corderos el efecto de una fuente comercial de α -amilasa, una proteasa experimental y la combinación de ambas al incluirse en una dieta cuya composición incluyó 21% de almidón, sobre el consumo voluntario (CV) y digestibilidad de la materia seca (MS), PB, almidón y FDN y sobre algunos componentes sanguíneos. El experimento se llevó a cabo entre los meses de octubre 2012 y febrero 2013 y tuvo una duración de 84 días en adición a 7 días preliminares de adaptación de los animales al manejo y a la dieta experimental.



Figura 3: Finca Alzamora – UPRM



Figura 4: Pabellón Proyecto de Pequeños Rumiantes

4.1 Animales y Dieta

Se utilizaron 12 ovinos criollos alimentados según sus requerimientos nutricionales teóricos (NRC, 2001) y con un peso vivo (PV) promedio inicial de 22 kg. Los animales se alojaron en jaulas individuales de dimensiones (1.5.2 x 1.22 x 1.30 m), provistas de comederos de piso y bebederos automáticos (Figura 5). Los ovinos se desparasitaron antes del comienzo del experimento mediante tratamiento con antihelmínticos comerciales y se permitieron acostumbrarse a las instalaciones físicas y rutina de manejo durante 7 días. Durante el periodo experimental, tres ovinos elegidos aleatoriamente se sometieron a cada uno de los cuatro tratamientos a evaluarse; T1, control (sin aditivo), T2, α -amilasa comercial (1.2g/d), T3, proteasa experimental (0.3g/d) y T4, la combinación α -amilasa + proteasa. La selección de la dosis de la enzima α -amilasa usada en el presente estudio se basó en un trabajo previo de Klingerman et al. (2009), quienes analizaron diferentes dosis de la enzima y obtuvieron resultados positivos sobre la producción de leche. Por otro lado la dosis de proteasa experimental fue la recomendada por los investigadores que nos facilitaron dicha enzima.

Cuadro 1 Fórmula porcentual de la dieta experimental en términos de almidón, proteína bruta y fibra detergente neutro, de los ingredientes y según la aportación de cada ingrediente individual

Fracción Química	Contenido (%)			
	Grano de Maíz	Heno	Soya	Total
Inclusión en la Fórmula	34.00	40.00	26.00	100.00
	(Por Ingrediente)			
	(Composición Individual)			
Almidón	60.60	0.00	1.90	-----
Proteína Bruta	9.40	5.00	53.40	-----
FDN	11.80	72.20	11.80	-----
	(Aportado en la Dieta)			
Almidón	20.60	0.00	0.49	21.10
Proteína Bruta	3.20	2.00	13.80	19.00
FDN	4.00	28.80	2.86	35.70



Figura 5: Jaulas de piso utilizadas en el experimento

Los animales se alimentaron con cantidades equivalente al 4% del PV en base seca diariamente con una dieta compuesta de 40% heno de gramíneas tropicales (HGT), 34% maíz partido y 26% harina de soya, con un contenido teórico de 21% almidón y 19% PB (Cuadro 1). El HGT se compró a un productor comercial de forrajes, se transportó al proyecto de pequeños rumiantes y se picó mecánicamente “(trituradora de ramas Vermeer: BC1230A) a un tamaño teórico de partícula de 5 a 10 cm para uso en el experimento. Dicho paso fue en busca de la uniformidad de las dietas y para reducir la selectividad animal (Figuras 6 y 7). Se analizaron muestras de cada uno de los ingredientes utilizados para determinar contenidos de MS, mediante el secado al horno a 65°C durante 48° horas, y de PB, almidón y FDN en un laboratorio comercial (Dairy One Forage Lab., Itaca. NY).

Las dietas usadas se prepararon con o sin el aditivo correspondiente para cada ovino individual. Diariamente se ofreció la ración de heno en un comedero y en otro comedero los granos de maíz y soya. Estos se mezclaron manualmente y se almacenaron en envases de plástico (Figuras 8, 9 y 10). Las dietas se ofrecieron a los ovinos en dos porciones diarias iguales, a las 8:00 a.m. y

2:00 p.m. Había bloques de sal y minerales disponibles en las jaulas y a cada animal se le inyectó intramuscularmente un complejo nutricional aportador de vitaminas A, D y E.



Figura 6: Molienda del heno



Figura 7: Heno molido listo para ser ofrecido



Fig. 8. Pesaje de un componente dietético



Figura 9. Transferencia de un componente al envase de mezcla



Figura 10. Almacenamiento de raciones listas

El diseño experimental fue un cuadrado latino 4 x 4 con tres repeticiones. El experimento constó de cuatro periodos de 28 días, de los cuales 21 días fueron de adaptación a las respectivas dietas y 7 días de recolección de datos comparativos.

4.2 Consumo Voluntario

Se pesaron los ovinos al inicio y al final de cada periodo (Figura 11) y se usó el PV para determinar la cantidad del ofrecimiento individual de la dieta. Durante los 7 días de recolección de datos, en cada periodo experimental, se cuantificó el alimento ofrecido (Figura 12, 13 y 14) y rechazado (Figura 15 y 16) para determinar el consumo voluntario. Se tomaron muestras del alimento ofrecido y rechazado y se analizaron las mismas para determinar el contenido de las cuatro fracciones citadas y así determinar el consumo de cada una individualmente.



Figura 11: Pesaje de un ovino



Fig. 12. Pesaje de alimento a ofrecer



Figura 13. Ofreciendo Heno



Figura 14. Ovinos consumiendo alimento ofrecido



Figura 15: Recogido de alimento rechazado



Figura 16: Pesaje heno rechazado

4.3 Digestibilidad Aparente de la Materia Seca, PB, FDN y Almidón

Para estas determinaciones se utilizaron bolsas recolectoras de heces ajustadas a los animales (Figura 17 y 18). Diariamente durante 7 días en cada periodo, las heces recolectadas se pesaron en su totalidad y se tomó una alícuota de las mismas (15% del total; Figura 19). También se siguió tomando muestras del ofrecimiento y rechazo de las dietas. Las muestras compuestas de las dietas y las heces por ovino individual se analizaron para determinar los contenidos de las cuatro fracciones según indicado anteriormente.



Figura 17: Bolsa Recolectora de heces



Figura 18: Recolectando heces



Figura 19: Pesaje de heces totales excretadas

4.4 Indicadores Sanguíneos del Estado Metabólico

Al finalizar la fase comparativa de cada periodo experimental se tomaron muestras de sangre individuales que se enviaron al Diagnostic Center for Population and Animal Health (DCPAH), localizado en la ciudad de East Lansing en Michigan State University, para determinar las concentraciones de los metabolitos β -hidroxibutirato (BHB), ácidos grasos no esterificados (AGNE) y glucosa, además del nivel de actividad de la hormona insulina. Las muestras de sangre se colectaron de la vena yugular utilizando una aguja de 20 x 1½'' y un tubo Vacutainer™, hecho de plástico, sin aditivo anticoagulante (Figura 20 y 21). Se centrifugaron las muestras a 1,600 rpm durante 20 minutos y se colectó el suero sobrenadante para someterse a los análisis antes mencionados (Figura 22, 23 y 24)



Figura 20: Obtención de sangre de la vena yugular

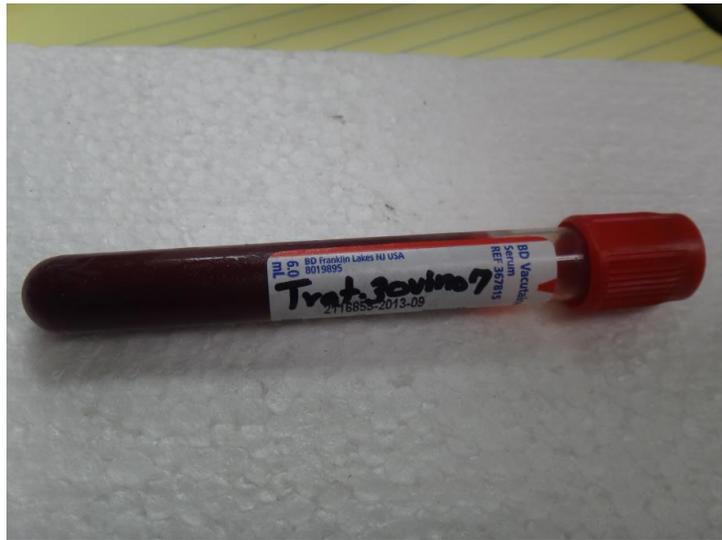


Figura 21: Muestra de sangre obtenida



Fig.22: Centrifugación de muestras de sangre

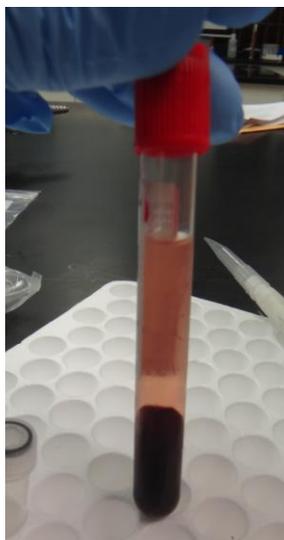


Fig. 23: Suero (capa superior) en muestra sangre centrifugada



Fig. 24: Obtención del suero usando pipeta

4.5 Estructura del Grano Según Revelada por el Microscopio Electrónico de Rastreo

Para determinar los efectos de la adición de la α -amilasa, la proteasa o la combinación de ambas en la estructura del grano de maíz se tomaron fotografías de muestras del maíz hidratado y tratado con las enzimas, también un testigo sin tratamiento enzimático, bajo un microscopio electrónico de rastreo. El instrumento usado está ubicado en El edificio de Biología UPRM. Para realizar la hidratación se prepararon cuatro bandejas con 10kg de maíz partido y se le agregó un 10% de agua (1L H₂O/10kg maíz; Figura 25). Al maíz previamente hidratado en las bandejas se le adicionó las enzimas a las dosis equivalentes utilizadas en la prueba in vivo; T2, α -amilasa comercial (5.6g/bandeja); T3, proteasa experimental (1.2g/bandeja) y T4, la combinación de ambas enzimas. Del maíz hidratado con o sin enzima de cada bandeja se tomaron muestras (250 g) en triplicado que se guardaron en bolsas plásticas para ser expuestas a temperatura ambiente durante 0, 6 y 24 horas (Figura 26). Después de cada periodo de tiempo de exposición las mezclas se secaron al horno a 65°C durante 48 h y se transportaron al Laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Biología. Muestras del maíz sometido a cada

tratamiento se prepararon para examinarse utilizando cilindros especiales, pegándolas con cinta adhesiva de carbón en los cilindros y bañándolas en oro (Figura 27), según las especificaciones del fabricante. Las fotografías fueron tomadas con el microscopio de rastreo (Figura 28) utilizando una resolución de 2000x.



Figura 25: Hidratación de Maíz



Figura 26: Muestras de maíz hidratado 0, 6 y 24 horas



Figura 27: Muestras a retratar



Figura 28: Microscopio de Rastreo

4.6 Análisis Estadísticos

Para determinar el efecto de la adición de las enzimas sobre las variables dependientes: CV y digestibilidad de las cuatro fracciones dietéticas y las características sanguíneas, los datos se analizaron según un diseño experimental cuadrado latino 4x4 con tres repeticiones, utilizando el procedimiento GLIMMIX del programa estadístico SAS (2009). Además se efectuaron pruebas de contrastes de los cuadrados medios esperados, utilizando la prueba Tukey-Kramer para establecer diferencias significativas. Los contrastes en cuestión fueron los tratamientos sin enzima vs enzimas (T1 vs T2, T3 y T4), α -amilasa vs. sin α -amilasa (T2 y T4 vs T1 y T3) y proteasa vs sin proteasa (T3 y T4 vs T1 y T2). (SAS, 2009)

El Modelo utilizado fue: $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{ijk}$

Y_{ijk} = variable dependiente (e.i. CV y digestibilidad de las dietas y características sanguíneas)

μ = media general estimada

α_i = efecto del tratamiento

β_j = efecto del periodo experimental

γ_k = efecto del ovino

ε_{ijk} = Error experimental (30 gl)

5.0 Resultados y Discusión

Tal como formulada, la dieta experimental contenía 21.1% de almidón, 19.1% de PB y 35.7% de FDN, valores que satisfacen los requerimientos teóricos de los ovinos utilizados en el experimento (Cuadro 2; NRC, 2001). En este experimento, el consumo promedio general de PB consumida fue de 169, 217, 253, 269 g/d, en los cuatro periodos sucesivos.

Cuadro 2 Requerimientos Nutricionales Teóricos por Día de Ovinos en Crecimiento

PV (g)	Ganancia en PV/d (g)	Consumo presumido de MS		Requerimiento de PB (g)
		g	% PV	
20,000	250	1,000	5	167
30,000	300	1,300	4.3	191
40,000	345	1,500	3.8	202

El consumo diario como porcentaje del peso corporal en base seca fue similar entre los cuatro tratamientos experimentales con variación desde 3.63% a 3.73% (Figura 29). El ofrecimiento diario de MS dietética fue equivalente al 4% del PV, lo que indica que los animales solo rechazaron una cantidad equivalente a 0.37% al 0.27% del peso vivo. Además, no se observó inapetencia ni algún caso de enfermedad u otro problema de salud durante el transcurso de la investigación.

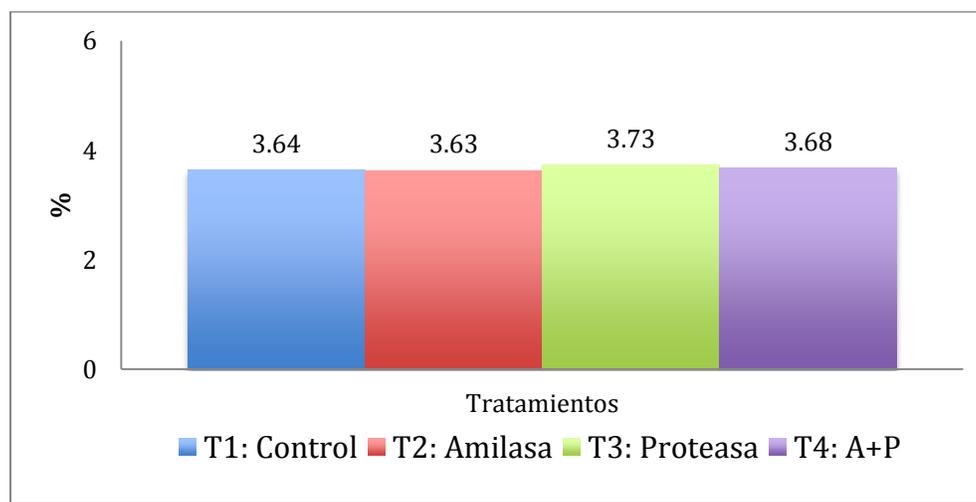


Figura 29: Consumo diario de MS como %PV por tratamiento

La adición de la α -amilasa comercial, la proteasa experimental o la combinación de ambas enzimas no resultó en efectos principales significativos sobre el consumo y la digestibilidad de la MS y las otras fracciones consideradas, ni sobre los componentes de la sangre evaluados (Cuadros 3 y 4).

Cuadro 3 Niveles de probabilidad de los efectos principales de los tratamientos y periodos experimentales sobre el consumo, digestibilidad y componentes sanguíneos

Componente	Probabilidad	
	Tratamiento	Periodo
<u>Consumo</u>		
MS	0.878	0.001
Almidón	0.137	0.001
PB	0.361	0.001
FDN	0.744	0.001
<u>Digestibilidad</u>		
MS	0.231	0.001
Almidón	0.229	0.064
PB	0.717	0.283
FDN	0.312	0.001
<u>Componentes Sanguíneos</u>		
BHB	0.303	0.043
AGNE	0.278	0.605
Insulina	0.178	0.098
Glucosa	0.652	0.016

El significativo efecto principal verificado sobre el consumo de la MS y nutrientes entre los cuatro periodos, se puede adjudicar al crecimiento continuo de los animales y el aumento en el peso de estos, siendo el PV promedio de 22, 29, 34 y 36 kg del primero al cuarto periodo, respectivamente.

Cuadro 4 Efecto de la adición de una fuente de α amilasa comercial, de una proteasa experimental y la combinación de ambas enzimas en la dieta sobre el consumo y la digestibilidad de nutrientes y concentración de componente en la sangre

Componente	Tratamiento Experimental				EEM ¹
	Control T1	Amilasa T2	Proteasa T3	A + P T4	
<u>Dietas (g/d)</u>					
<u>Ofrecido</u>					
MS	1235.80	1218.87	1201.65	1193.49	40.82
Almidón	257.46	254.13	250.43	248.42	8.47
PB	207.09	204.37	201.42	199.88	6.82
FDN	441.43	435.04	429.09	426.71	14.66
<u>Rechazado</u>					
MS	129.61	131.28	96.78	104.94	21.99
Almidón	0.72	0.00	0.00	1.68	0.89
PB	6.88	6.56	4.83	6.19	1.27
FDN	92.06	94.52	69.68	72.63	15.69
<u>Consumido</u>					
MS	1106.19	1087.60	1104.87	1088.55	38.42
Almidón	256.74	254.13	250.43	246.74	8.61
PB	200.20	197.80	196.58	193.68	6.58
FDN	349.37	340.52	359.41	354.08	16.72
<u>Digestibilidad (%)</u>					
MS	72.96	72.09	72.04	71.86	0.64
Almidón	98.91	98.00	98.93	99.04	0.42
PB	76.05	75.45	75.92	75.86	0.66
FDN	48.15	45.55	48.75	48.42	1.61
<u>Parámetros de la Sangre</u>					
BHB, mg/dL	4.69	4.17	4.24	4.37	0.31
AGNE, mEq/L	0.14	0.17	0.13	0.18	0.02
Insulina, pmol/L	73.42	70.17	84.00	76.67	6.70
Glucosa, mmol/L	4.19	4.20	4.13	4.03	0.12

¹ Error estándar de la media

Al efectuar comparaciones entre las medias de tres combinaciones de tratamientos; los con amilasa versus sin amilasa (T2+T4 vs T1+T3), los con proteasa versus sin proteasa (T3+T4 vs T1+T2) y el control (ninguna enzimas) versus los tres tratamientos con adición de enzimas (T1 vs T2+T3+T4); se detectaron algunas diferencias significativas en las variables evaluadas (Cuadros 5 y 6). Los corderos alimentados con la proteasa experimental en la dieta (T3 y T4) consumieron menos almidón ($P < 0.05$) que aquellos sin recibir la enzima (T1 y T2). También se verificó una tendencia ($P = 0.09$) a mayor consumo de almidón en los corderos control (T1) que en los alimentados con una ó ambas enzimas en la dieta (T2, T3 y T4). La diferencia ($P < 0.05$) detectada en la digestibilidad de la MS favoreció el control (T1) sobre los tratamientos que incluyeron enzimas (T2, T3 y T4).

Referente a los componentes de la sangre evaluados, al realizar los contrastes de las combinaciones de los tratamientos se encontró que la concentración de BHB tendió ($P = 0.08$) a ser menor en corderos alimentados con la amilasa comercial (T2), la proteasa experimental (T3) o la combinación de ambas enzimas (T4) que en el control (T1). Se observó una tendencia ($P = 0.064$) en la disminución de la concentración de AGNE en animales alimentados con dietas conteniendo α -amilasa (T2 y T4) que en aquellos sin la enzima (T1 y T3). En corderos alimentados con proteasa en la dieta (T3 y T4) los niveles de insulina tendieron ($P = 0.08$) a ser superiores que en aquellos alimentos sin esta enzima (T1 y T2).

Cuadro 5 Niveles de probabilidad de los contrastes de los cuadrados medios esperados por tratamiento ajustado por la prueba de comparaciones múltiples Tukey-Kramer

Variable	amilasa vs no amilasa (T2+T4 vs T1+T3)	proteasa vs no proteasa (T3+T4 vs T1+T2)	enzimas vs no enzimas (T2+T3+T4 vs T1)
<u>Consumo</u>			
MS	0.4189	0.9931	0.6144
Almidón	0.3166	0.0344	0.0874
PB	0.3121	0.1431	0.1699
FDN	0.5731	0.3508	0.8923
<u>Digestibilidad</u>			
MS	0.1795	0.1902	0.0439
Almidón	0.3194	0.1871	0.5785
PB	0.4821	0.7675	0.5675
FDN	0.2755	0.1964	0.7097
<u>Componentes de la Sangre</u>			
BHB	0.3489	0.5542	0.0800
AGNE	0.0640	0.7854	0.4921
Insulina	0.2793	0.0855	0.5295
Glucosa	0.6825	0.3188	0.5918

En este experimento al adicionar la proteasa experimental en dietas para corderos conteniendo 21% de almidón disminuyó ($P < 0.05$) el consumo de almidón, aunque esto puede no ser de importancia a nivel práctico, dada la pequeña diferencia entre estos valores (248.6 vs 255.4 g/d). El consumo del polisacárido tendió a ser menor también en las tres dietas con enzimas (250.4 g/d) que en el control (256.7 g/d). Resultó significativa ($P < 0.05$) la disminución en la digestibilidad de la MS (73.0 vs 72.0 %) en las dietas con las enzimas versus el control. Al utilizar la α -amilasa comercial no se observaron efectos sobre el CV, ni la digestibilidad de las fracciones estudiadas.

En otros estudios relacionados se han encontrado efectos positivos, negativos o ninguno al utilizar aditivos de enzimas exógenas en dietas para rumiantes. Muchas de esas investigaciones

han tenido como objetivo la evaluación de enzimas exógenas tipo fibrolíticas para mejorar el consumo y la digestibilidad de los carbohidratos estructurales presentes en la pared de las células vegetales.

Cuadro 6 Contrastes ajustados por comparaciones múltiples de los cuadrados medios esperados de las respuestas evaluadas de las combinaciones de los tratamientos

Variable	amilasa vs no amilasa		proteasa vs no proteasa		enzimas vs no enzimas	
<u>Consumo, g/d</u>						
MS	1088.08	1105.53	1096.71	1096.90	1093.67	1106.19
Almidón	250.44	253.59	248.59 ^a	255.44 ^b	250.43 ^y	256.74 ^z
PB	195.74	198.39	195.13	199.00	196.02	200.20
FDN	347.30	354.39	356.75	344.95	351.34	349.37
<u>Digestibilidad, %</u>						
MS	71.98	72.50	71.95	72.52	72.00 ^a	72.96 ^b
Almidón	98.52	98.92	98.99	98.46	98.66	98.91
PB	75.65	75.99	75.89	75.75	75.74	76.05
FDN	46.99	48.45	48.59	46.85	47.57	48.15
<u>Parámetros de la Sangre</u>						
BHB, mg/dL	4.27	4.46	4.31	4.43	4.26 ^y	4.69 ^z
AGNE, mEq/L	0.17 ^z	0.14 ^y	0.15	0.16	0.16	0.14
Insulina, pmol/L	73.42	78.71	80.33 ^z	71.79 ^y	76.94	73.42
Glucosa, mmol/L	4.12	4.16	4.08	4.20	4.12	4.19

^{a,b} Medias con letras diferente dentro de cada comparación difieren ($p < 0.05$)

^{y,z} Medias con letras diferente dentro de cada comparación difieren ($p < 0.10$)

Aunque en menor magnitud, la utilización de enzimas exógenas para degradar los componentes presentes en el contenido celular de los granos de cereales ha sido también objeto de investigaciones en los últimos años. La adición de una α -amilasa en la dieta para vacas lecheras, conteniendo 26 a 31% de almidón procedente mayormente de granos secos de maíz, no afectó el consumo voluntario, ni la producción y la composición química de la leche, pero se observó una tendencia a aumentar la digestibilidad de la FDN al adicionar la enzima (Weiss et al., 2011). Semejante efecto no se manifestó en el experimento presente. Se ha sugerido que un efecto

beneficioso de la adición de α -amilasa exógena sobre la digestibilidad de FDN, si lo hubiera, sería una consecuencia de una mayor eficiencia de utilización de almidón a nivel ruminal (Tricarito et al., 2008). Posiblemente la alimentación cruzada de oligosacáridos entre los microorganismos retículo-ruminales, como resultado del aumento en la degradabilidad del almidón al adicionar la enzima, podría ser el mecanismo para esta mejora en la digestibilidad de la pared celular (Russell et al., 1981). Según otra explicación, al mejorar la degradabilidad del almidón en el complejo retículo-ruminal mediante la adición de α -amilasa, se mantienen niveles más consistentes de ciertos sustratos que requieren bacterias utilizadoras de ácido láctico, estimulando así la transformación de ácido láctico en otros compuestos y consecuentemente reduciendo la acidez del contenido retículo-ruminal. Un pH ruminal menos ácido y más estable beneficia la población de las bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas, mejorando consecuentemente la digestibilidad de la FDN. La lógica de estas posibles explicaciones podría aplicarse también al caso de una mejora en la digestibilidad de la FDN como resultado indirecto de la acción de una proteasa sobre los gránulos de almidón en el maíz, siendo esto compatible con el efecto de la enzima observado en el presente estudio (48.59 vs 46.85%; aunque a $P < 0.20$) (Cuadro 5 y 6).

Una tercera teoría postula que la adición de α -amilasa exógena a la dieta resulta en fermentaciones ruminales secundarias, que generan sustratos en forma de ciertos AGV de cadena ramificada, necesarios éstos para el crecimiento y proliferación de bacterias celulolíticas, lo que a su vez resulta en un aumento en la degradabilidad de las paredes celulares. Una cuarta teoría plantea que adicionar α -amilasa exógena a la dieta genera una competencia entre las diversas bacterias ruminales que degradan almidón como sustrato, con disminución en las poblaciones de aquellas que producen ácido láctico en mayor proporción.

Gencoglu, et al. 2010 evaluaron el efecto de la adición de α -amilasa en dietas con alto o bajo contenido de almidón (27.1 y 20.7%) en vacas lecheras lactantes y observaron un mayor consumo de MS y digestibilidad de la mayoría de los otros nutrientes con la excepción del almidón, que fue similar con o sin adición de la enzima en animales alimentados con la dieta baja en almidón. El peso vivo y el índice de condición corporal de los animales no fueron afectados por los tratamientos. Dilorenzo et al. (2010) suplementaron una dieta basada en granos de maíz en forma de hojuelas secadas a vapor o el mismo grano rolado seco, con adición de α -amilasa exógena a 600 KNU/ kg MS y no obtuvieron un efecto sobre la digestibilidad de nutrientes ni el rendimiento de novillos en engorde. Asimismo, Ferraretto, et al. (2011) adicionaron amilasa exógena a una dieta para vacas lactantes baja en almidón, lo que resultó en beneficio mínimo sobre el rendimiento y la composición de la leche. Rojo et al., (2005) observaron una disminución en el CV a medida que aumentaba el nivel de α -amilasa suplementaria en la dieta. En dicho experimento se evaluaron in vivo dos enzimas exógenas industriales, una α -amilasa de *Bacillus licheniformis* y una glucoamilasa de *Aspergillus niger*. Usaron seis corderos (30 kg PV) equipados con cánulas ruminales y duodenales, cuya dieta incluyó 700g/kg MS de granos de sorgo, para determinar el efectos de las enzimas sobre la ingestión, digestibilidad y fermentación ruminal. A medida que la adición de α -amilasa aumentó, disminuyó el consumo de MS y de almidón, pero a su vez aumentó la digestibilidad de estas dos fracciones. Esto sugiere que dicha enzima podría tener utilidad en rumiantes a los cuales se les ofrecen dietas altas en granos pero de relativa baja digestibilidad.

La utilización de proteasas como aditivo en dietas para rumiantes ha sido menos evaluada que la adición de α -amilasa. En el presente experimento se observó una menor ingestación de almidón conjuntamente con una tendencia a mayor concentración de insulina en la sangre de los corderos

al recibir las dietas conteniendo proteasa versus las sin proteasa. Con respecto a la digestibilidad, se infiere que la adición de la proteasa ocasiona cambios en la superficie externa de las proteínas que cubren el germen y endocarpio del grano de maíz, lo que en teoría provocaría un aumento en su degradabilidad ruminal y/o digestibilidad intestinal del almidón. Sin embargo en este experimento la ventaja sobre la digestibilidad de almidón fue escasamente a favor de proteasa vs no proteasa (T3 + T4 vs T1 + T2) (98.99 vs 98.46%, $P < 0.19$). En teoría la mayor degradación del almidón pudo ocasionar un aumento en la absorción posterior de glucosa a nivel intestinal y por ende un aumento en la concentración de insulina tal como se observó.

El hecho de que la utilización de enzimas como aditivo en dietas para rumiantes resulta en cambios en la concentración de algunos componentes sanguíneos sugiere que existen efectos sobre el metabolismo de los lípidos e hidratos de carbono en el cuerpo. DeFrain et al., (2005) estudiaron la suplementación con α -amilasas en dietas para vacas lactantes y verificaron diferencias en los niveles sanguíneos de indicadores claves del metabolismo energético, como cuerpos cetónicos, hormonas y glucosa. En cambio los efectos de la suplementación enzimática sobre la composición de la leche fueron mínimos. Estos autores observaron que las concentraciones plasmáticas pre-parto de BHB y AGNE aumentaron en vacas alimentadas con adición de α -amilasa exógena en la dieta en comparación con los animales sin recibir la enzima. En las vacas lecheras post-parto las concentraciones plasmáticas de glucosa mostraron una tendencia ascendente como resultado de la adición de α -amilasa en la dieta. Se sugirió que estos cambios, en BHB y AGNE pre-parto y glucosa post-parto, podrían ser el resultado de un cambio hacia menor dependencia del metabolismo de grasas y mayor en la utilización de carbohidratos en vacas suplementadas con la α -amilasa. Otros autores han observado que ovinos sub-nutridos presentan concentraciones de AGNE superiores a las de animales con una alimentación adecuada

(Fernández-Foren et al., 2011; Al-Qarawi, 2004). Nuñez Ochoa y Boauda (2007) notaron que la concentración de BHB en la sangre de corderos tiende a aumentar cuando hay deficiencias energéticas en las dietas. La secreción de insulina es acelerada por la buena alimentación (Sano et al., 1999) y al contrario inhibida por la subnutrición (Jimeno et al., 2001). En el presente estudio se verificó una tendencia a disminuir la concentración de BHB en corderos alimentados con las enzimas en la dieta (4.26 vs. 4.69 mg/dL; Cuadro 6). La adición de α -amilasa en la dieta tendió a aumentar la concentración de AGNE (0.17 vs. 0.14 mEq/L; Cuadro 6) en relación a corderos alimentados sin la enzima. En cambio los niveles de glucosa fueron similares entre todos los tratamientos experimentales. A pesar de las diferencias citadas en los niveles de BHB e insulina en la sangre entre corderos con o sin las enzimas suplementarias, los niveles de estos componentes y los de glucosa se mantuvieron dentro de los límites normales para ovinos (Cuadro 7). La excepción a esto la constituyeron los niveles de AGNE, que fueron inferiores a los publicados como guías de lo normal.

Cuadro 7 Valores Normales de Metabolitos Energéticos en Sangre Ovina

Metabolito	Valor Normal	Referencia
Glucosa	2.4 – 4.4 mmol/L	Wittwer, 2006
BHB	2.08-6.25 mg/dL	Wittwer, 2006
AGNE	<0.6769 mEq/L	Wittwer, 2006
Insulina	16.67-250 pmol/L	Duygu Udum et al., 2008

Microscopía de Rastreo

A través de microscopía de rastreo a una resolución de 2000X se investigó los efectos de la adición de ambas enzimas sobre la estructura del gránulo de maíz, sacando fotografías al momento de hidratado y 6 y 24 horas más tarde. En la Figura 30 se presenta una imagen del gránulo de maíz hidratado sin la adición de enzimas en la cual se identifican los componentes

que se presumen susceptibles a ser degradadas por la α -amilasa comercial, la proteasa experimental o la combinación de ambas enzimas.

En esta fotografía se puede observar la superficie mayormente lisa o poco rugosa y la forma casi esférica de los gránulos de almidón (GA) rodeadas por cuerpos de proteínas o fracción proteica (FP; Zeína), que actúa como agente adhesivo entre los gránulos.

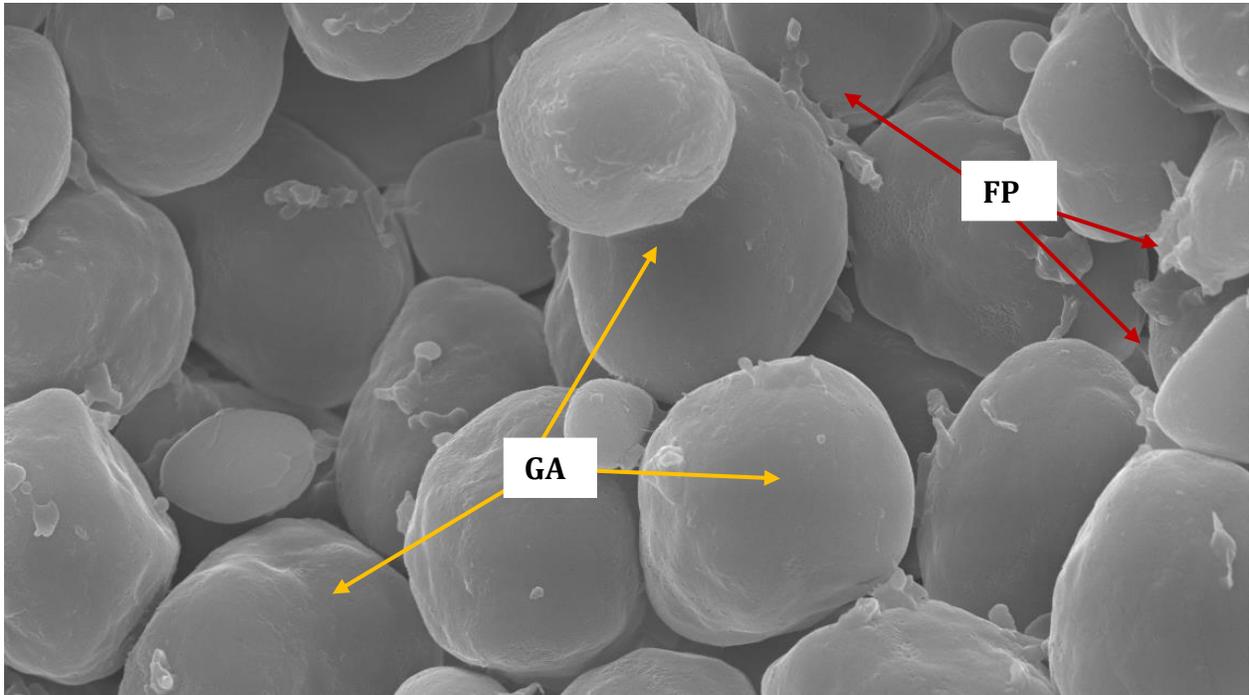
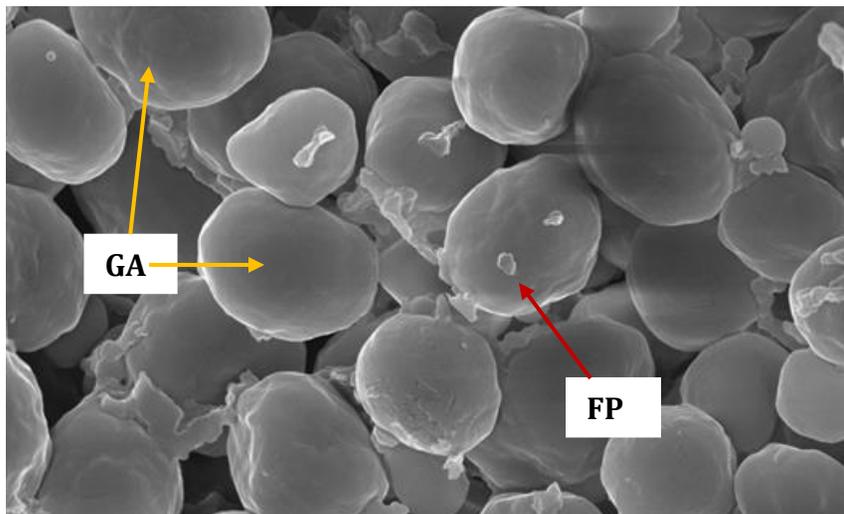


Figura 30: Fotografía con microscopía de rastreo del grano de maíz a una resolución de 2000X

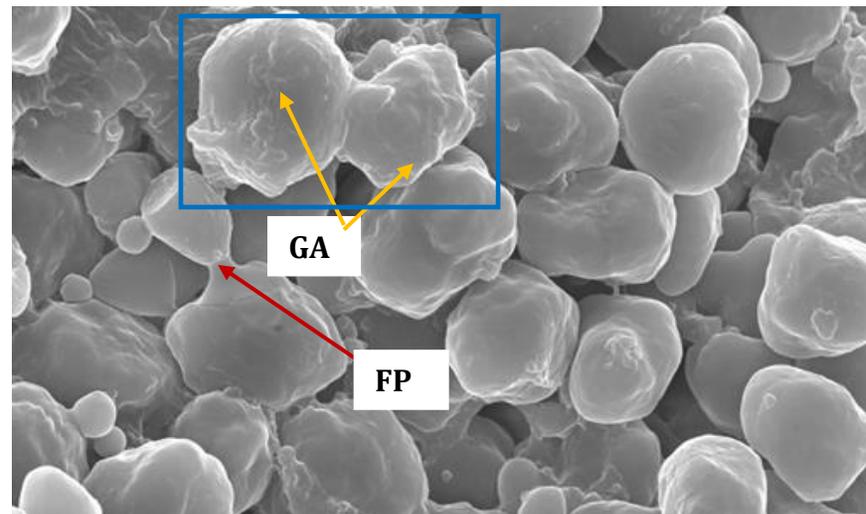
- a. Gránulos de almidón (GA)
- b. Fracción proteica (FP)

Inmediatamente o al momento (hora 0) de adicionar las enzimas al maíz hidratado ya se pueden observar el comienzo de cambios en la estructura del grano (Figura 31). Al tratar el maíz con α -amilasa solo o combinada con la proteasa la forma mayormente esféricas de los GA se torna en forma irregular que presenta una superficie menos lisa. Se detecta también una mayor aglutinación, tal vez como resultado de la posible gelatinización de los GA que podría deberse a la acción de la proteasa al degradar la FP (zeína) de la cubierta del grano. Estos cambios observados en la estructura del grano hidratado al momento de estar en contacto con las enzimas,

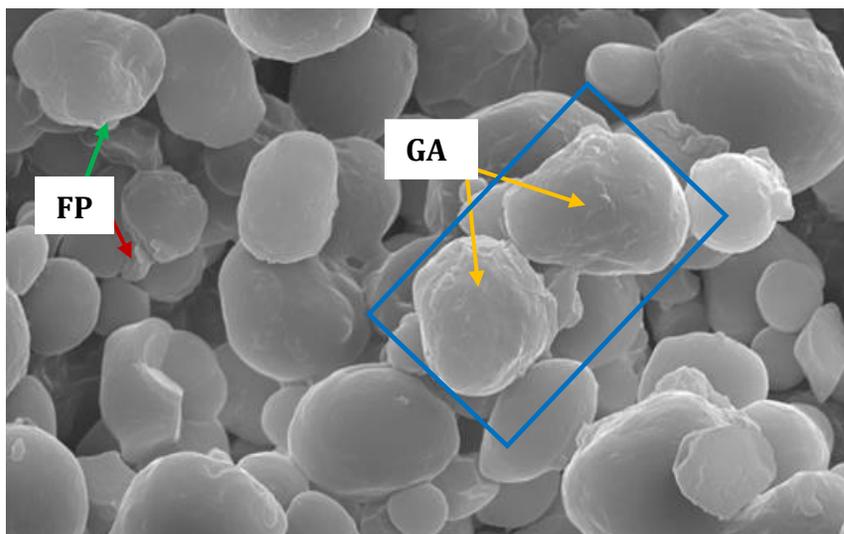
podrían atestiguar la efectividad de un medio acuoso para aumentar la actividad enzimática y facilitar o acelerar la degradación de los componentes que son sus sustratos correspondientes. Los efectos progresivos de la actividad enzimática para cambiar la estructura del grano de maíz hidratado se siguen apreciando en la fotografía tomada después de 6 horas (Figura 32). Los GA continúan perdiendo su superficie lisa y esfericidad original, y los cuerpos de proteínas se reducen a pequeños trozos. Se observa los GA con estructuras rugosas y aglutinación de los mismos. En la imagen obtenida a las 24 horas de adicionar las enzimas (Figura 33), se observa la continuada disociación del GA con la FP, cambios que son más apreciables en el maíz tratado con la combinación de ambas enzimas. También se nota, que la superficie de los GA del maíz tratado con α -amilasa tiene una apariencia más porosa, lo que no se observan en los GA en ausencia de la enzima. Esta porosidad resultaría de la acción hidrolítica de la α -amilasa sobre los enlaces α -glicosídicos que unen las unidades de glucosa en la molécula de almidón. Existe muy poca información publicada sobre los cambios que ocurren en la estructura de los granos como resultado de la adición de enzimas exógenas antes o durante el proceso fermentativo para la producción del ensilaje. En la presente investigación, fueron notables los cambios observados utilizando el microscopio de rastreo, en la forma, aspecto y distribución de los GA y la FP en maíz hidratado y tratado con o sin enzimas. Podemos inferir que la adición de las enzimas en un medio acuoso aceleró los cambios progresivos observados en los componentes estructurales del maíz al compararse con el maíz hidratado sin las enzimas. Hoffman et al. (2007) estudiaron cambios en la estructura del grano húmedo en maíz de alta humedad ensilado durante 240 d y observaron que durante el proceso de ensilamiento la superficie del gránulo de almidón se puso porosa y rugosa y ocurrió aglutinación de las partículas como resultado de la degradación de la cubierta proteica del grano.



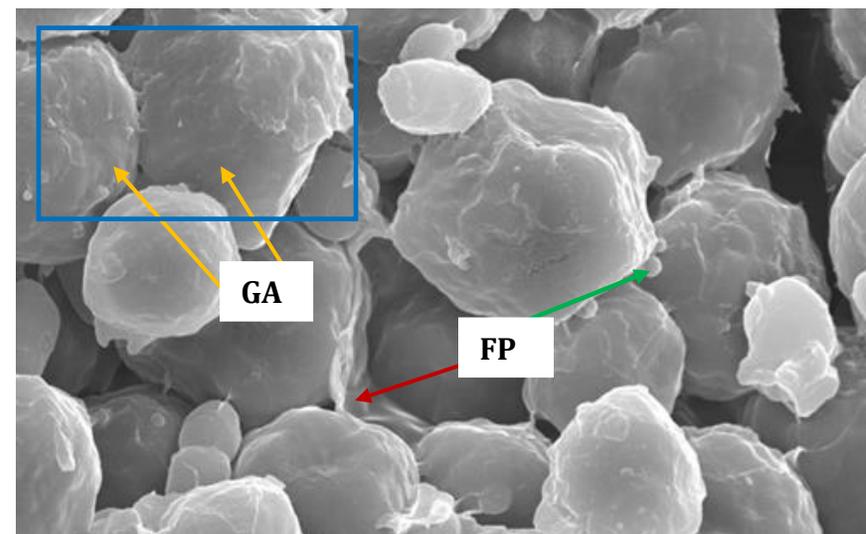
Control



Amilasa Comercial



Proteasa Experimental



Amilasa + Proteasa

Figura 31: Fotografía utilizando el microscopio de rastreo a una resolución de 2000X del efecto de la adición de la α -amilasa comercial y la proteasa experimental sobre la estructura del grano de maíz al momento de hidratarse

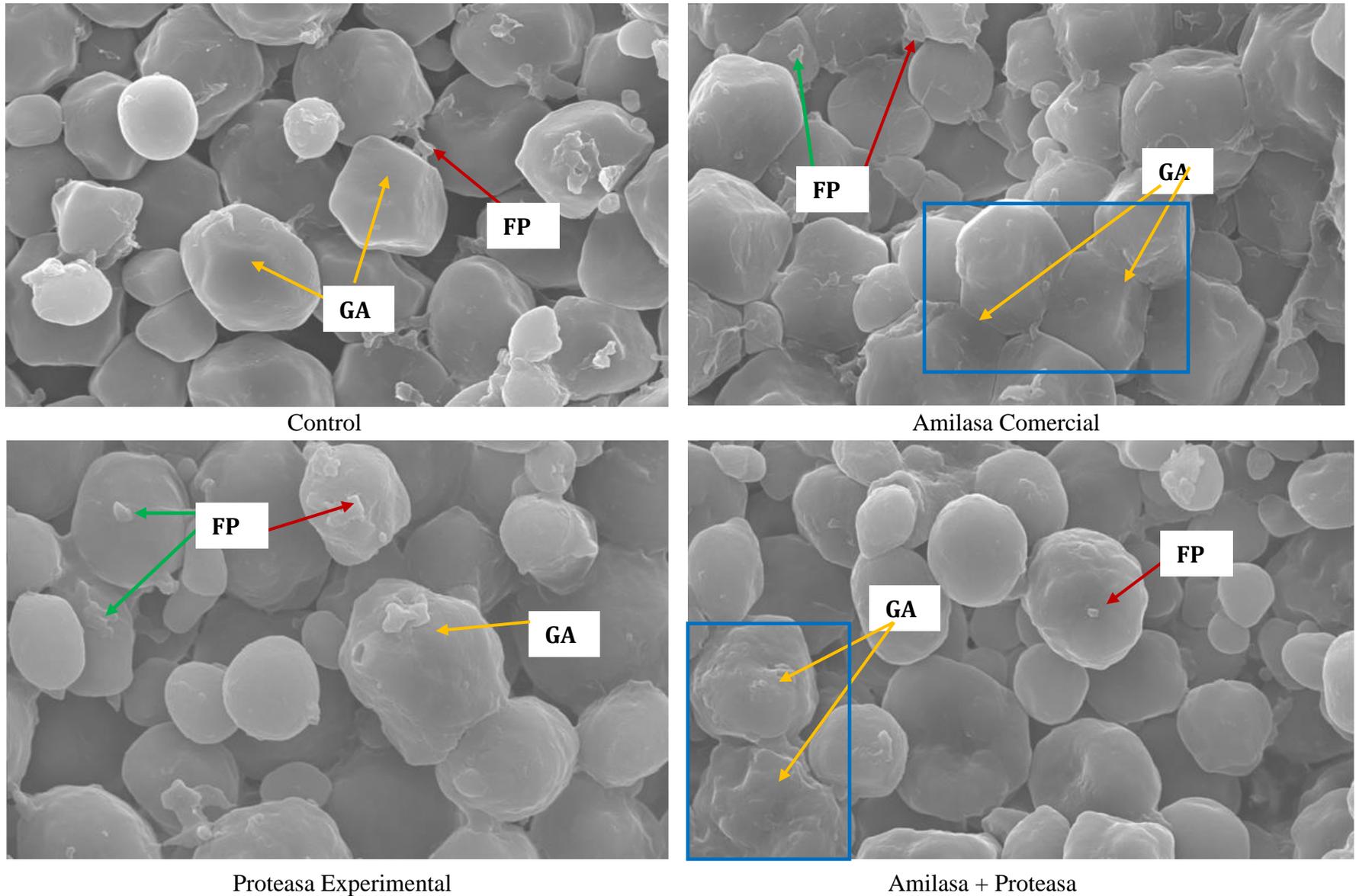
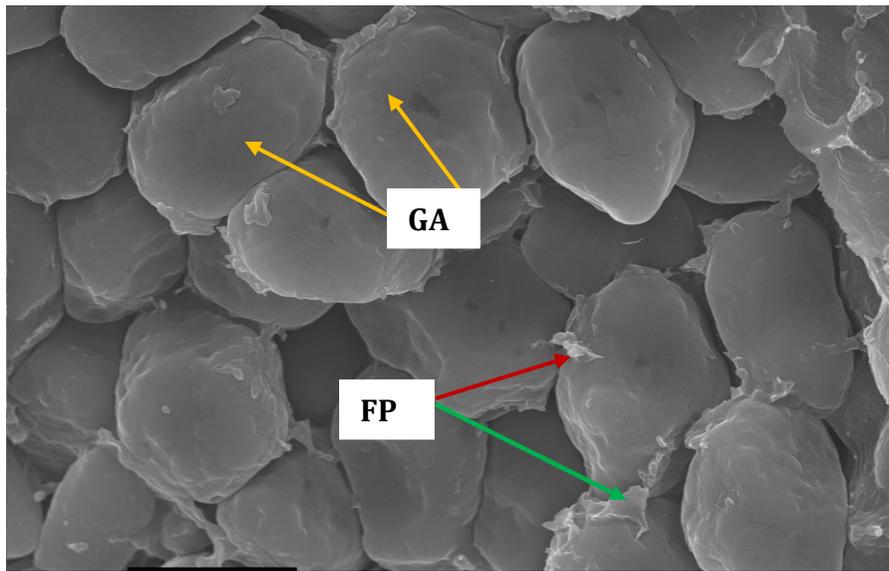
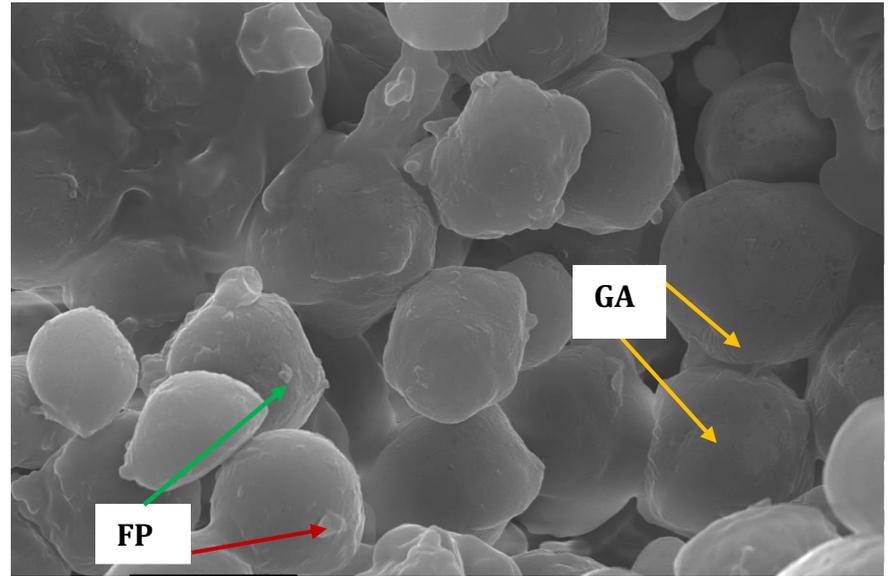


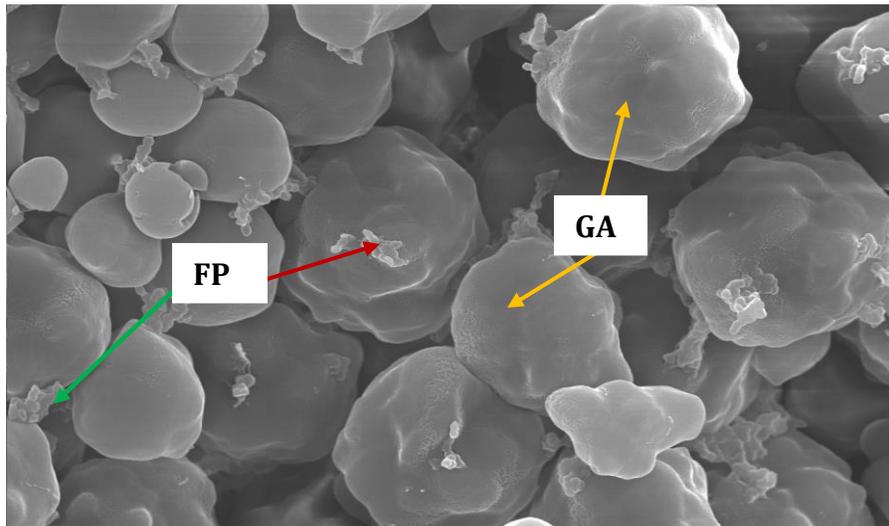
Figura 32: Fotografía utilizando el microscopio de rastreo a una resolución de 2000X del efecto de la adición de la α -amilasa comercial y la proteasa experimental sobre la estructura del grano de maíz 6 horas después de hidratarse.



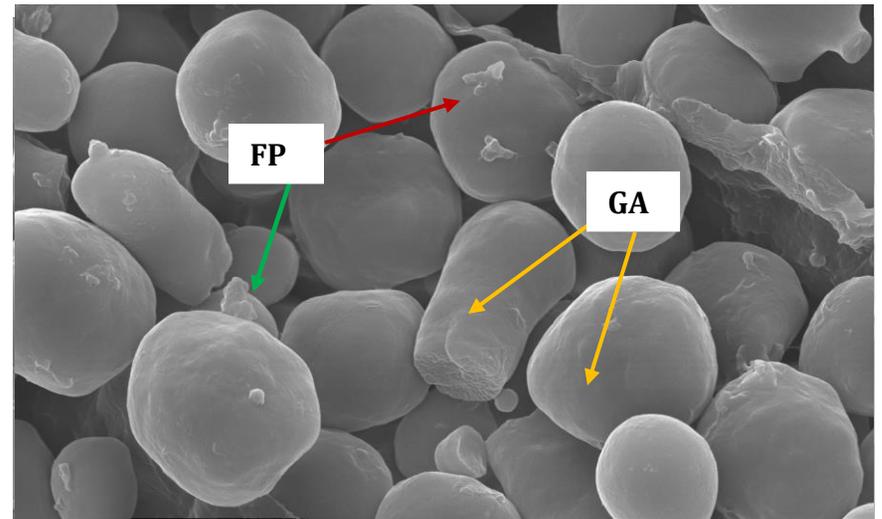
Control



Amilasa Comercial



Proteasa Experimental



Amilasa + Proteasa

Figura 33: Fotografía utilizando el microscopio de rastreo a una resolución de 2000X del efecto de la adición de la α -amilasa comercial y la proteasa experimental sobre la estructura del grano de maíz 24 horas después de hidratarse

6.0 Conclusiones

Efecto de la adición en la dieta de enzimas α -amilasa y proteasa sobre:

Consumo de alimento

- No se encontraron efectos significativos sobre el consumo voluntario de MS, PB y FDN por los ovinos, entre las cuatro dietas experimentales
- El consumo de almidón se vio afectado negativamente ($p < 0.05$) por la presencia de la enzima proteasa experimental, tanto sola como en combinación con α -amilasa, en comparación con las dietas sin la proteasa.

Digestibilidad de las dietas

- Se observó una menor digestibilidad de MS ($p < 0.05$) al añadir una o ambas enzimas en las dietas de los ovinos, en comparación con el testigo.

Parámetros sanguíneos indicativos del estado fisiológico

- Tendió ($p < 0.10$) a aumentar el nivel de AGNE por la presencia de la enzima α -amilasa en la dieta de los ovinos.
- Por el contrario, el nivel de BHB tendió ($p < 0.10$) a disminuir por la presencia de las enzimas en la dieta.
- La actividad de insulina tendió ($p < 0.10$) a aumentar al añadir proteasa a la dieta.
- La concentración de glucosa no sufrió ningún cambio relacionado a las dietas experimentales.

Cambios en la estructura microscópica de maíz partido hidratado y tratado con enzimas

- La observación de agujeros en la superficie en los gránulos de almidón en presencia de α -amilasa a la hora cero indica que al momento en que la enzima hace contacto con el maíz hidratado comienza en seguida la hidrólisis.
- Se detectó un grado de hidrólisis del almidón tan grande o hasta mayor con la α -amilasa sola que con la combinación de las dos enzimas lo que sugiere que la proteasa actuó sobre la α -amilasa, interfiriendo con su actividad.
- Fue evidente la gelatinización progresiva en los gránulos de almidón en los tratamientos de α -amilasa a las 6 y 24 horas, lo que también apoya el supuesto que la α -amilasa trabaja mejor sobre el almidón sin la presencia de proteasa. También sugiere que la α -amilasa trabajaría mejor sobre el alimento hidratado, en vez de añadirla en la dieta de los ovinos.

7.0 Recomendaciones

Durante los 112 días de este experimento dividido en 4 periodos, se observaron algunas diferencias significativas ($P < 0.05$) y tendencias ($P < 0.10$) en variables de consumo y digestibilidad de las dietas, así como en ciertos parámetros fisiológicos en los ovinos, pero no queda claro cuan importante puede ser la adición dietética de las enzimas en los rumiantes a nivel práctico. Estas enzimas merecen un estudio más a fondo para determinar los efectos de su adición en dietas con diferentes niveles de almidón.

Por otro lado, en fotos tomadas por el SEM de muestras hidratadas de maíz partido se observaron efectos de las enzimas sobre los gránulos del almidón. Por ello se recomienda que se realicen futuras investigaciones para probar el tratamiento previo con enzimas proteasa y α -amilasa de los alimentos a utilizarse en la dieta de los ovinos u otra clase de rumiante.

La magnitud del efecto encontrado en el presente estudio al añadir las enzimas en la dieta de los rumiantes no justifica su utilización en la práctica. Debe estudiarse más a fondo este tópico con miras a lograr un mayor efecto favorable de las enzimas. Los cambios observados en los gránulos de almidón del maíz hidratado, por la adición de las enzimas, despierta interés sobre el uso de aplicación previa de las enzimas a alimentos hidratados.

8.0 Referencias

- Agama-Acevedo, E., Ottenhof, M.-A., Farhat, I., Paredes-López, O., Ortíz-Cereceres, J., y Bello-Pérez, L. (2005). Aislamiento y caracterización del almidón de maíces pigmentados. *Agrociencia*, 39: 419-429.
- Al-Qarawi, A. (2004). Changes in plasma insulin, thyroid hormones, non-esterified fatty acids and blood glucose in underfed najdi lambs. *Benha Vet. Med. J.*, 15 (2).
- Bach, A., Calsamiglia, S. and Stern, D. (2005). Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci*, 88: E9-E21
- Baile, C. (1975). Control of feed intake in ruminants. In I. McDonald, and A. Warner, *Digestion and metabolism in the ruminant*. Australia: NSW. pp.333-350
- Beauchemin, K., Yang, W., and Rode, L. (2003). Effects of particle size of alfalfa based dairy cow diets on chewing activity ruminal fermentation, and milk production. *J. Dairy Sci*, 86: 630-643.
- Bowden, D. (1971). Non-esterified fatty acids and ketone bodies in blood as indicators of nutritional status in ruminants: A Review. *Canadian J. Anim. Sci.*, 51 (1): 1-13
- Britton, R., and Stock, R. (1986). Acidosis, rate of starch digestion and intake. *Agricultural experiment station, Oklahoma State University (ed.)*, pp.125-136.
- Campbell, G., and Bedford, M. (1992). Enzyme applications for monogastric feeds: a review. *Canadian J. Anim. Sci.*, 72: 449-466.
- Chase, L., Wangsness, P., and Martin, R. (1977). Portal blood insulin and metabolite changes with spontaneous feeding in steers. *J. Dairy Sci.*, 60: 410-415.
- Cotta, M. (1988). Amylolytic activity of selected of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*, 54: 772-776
- Coughlan, M.P., (1989). The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 3: 39-109
- Defrain, J.M., Hippen, A.R., Kaisceur, K.F, and Tricarico, J.M. (2005). Effects of dietary α -amilase on metabolism and performance of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 88: 4405-4413
- Dehority, B. A. (2002). Gastrointestinal tracts of herbivores, particularly the ruminant: anatomy, physiology and microbial digestion of plants. *J. Appl. Anim. Res.*, 21: 145-160.

Delgado, D. (2005). Fisiología digestiva del rumen. Aspectos bioquímicos y fisiológicos de la nutrición animal, pp.6-21.

Dilorenzo, N., Smith, D.R., Quinn, M.J., May, M.L., Ponce, C.H., Steinberg, W., Engstrom, H.A. and Gayean, M.L. (2010). *Livest. Sci.* Doi: 10.1016/j.livsci.2010.11.003

Donmez, N., Karsli, M.a., Cinar, A., Aksu, T. And Baytok, E. (2003). The effects of different silage additives on rumen protozoan number and volatile fatty acid concentration in sheep fed corn silage. *Small Rum. Res.*, 48: 227-231.

Duygu Udum, C., Meltem Cetin, Faruk Balci, Nazmiyed Gunes, and Canan Hecer. (2008). Effects of plasma insulin, glucose and NEFA concentrations of feeding frequency during long term in lambs. *J. Biol. Environ. Sci.*, 2: 45-51.

Elsasser, T. (1984). Potential interactions of ionophore drugs with divalent cations and their function in the animal body. *J. Anim. Sci.*, 59: 845-853.

Fernández-Foren, A., Avecia, J., Vázquez, M., Forcada, F., Sartore, I., Carriquiry, M., et al. (2011). Restricción alimenticia en ovinos: Respuesta endocrinometabólica dependiente de las reservas corporales. *Información Técnica Económica Agraria*, 107 (4): 257-271.

Ferraretto, L. F., R. D. Shaver, M. Espineira, H. Gencoglu, and S. J. Bertics. (2011). Influence of a reduced-starch diet with or without exogenous amylase on lactation performance by dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 94: 1490-1499.

Gencoglu, H., Shaver, R.D., Stenberg, W., Ensink, J., Ferraretto, L.F., Bertics, S.J., Lopes, J.C. and Akins, M.S. (2010). Effect of feeding a reduced-starch diet with or without amylase addition on lactation performance cows. *J. Dairy Sci.*, 93: 723-732.

Ghorbani, G., Morgavi, D., Beauchemin, K., and Leedle, J. (2002). Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.*, 80: 1977-1985

Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Ramos, S. y Carro, M.D. (2008). Influence of direct fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay based diet. *J. Anim. Sci.*, 86 (7): 1617-1623.

Hoffman, P.C., Lundberg, K.M., Bauman, L.M., Shaver, R.D. y Contreras- Govea, F.E. (2007). El efecto de la madurez en la digestibilidad del FDN (fibra detergente neutro). *Focus on Forage – 5(15)*. University of Wisconsin-Madison.

Hong, H.A., Duc, L. and Cutting, S.M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 813-835

Huntington, G. (1997). Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *J. Anim. Sci.*, 75: 852-867.

Hutjens, M. (2013). Fisiología digestiva y uso de aditivos alimenticios en rumiantes. Madrid: XXIX Curso de Especialización FEDNA.

Ingvartsen, K., and Andersen, J. (2000). Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J. Dairy Sci.*, 83 (7): 1573-1597.

Jimeno, V., Castro, T., and Rebollar, P. (2001). Interacción nutrición-reproducción en ovino de leche. XVII Curso de Especialización FEDNA (Fundación española para el desarrollo de la nutrición animal): Avances en Nutrición y Alimentación Animal.

Klingerman, C.M., Hu, W., Mckonell, E., DerBedrosian, M., and Kung Jr., L. (2009). An evaluation of exogenous enzymes with amylolytic activity for dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 92: 1050-1059.

Knowlton, K., Glenn, B., and Erdman, R. (1996). Performance, ruminal fermentation, and site of starch digestion in early lactation Cows Fed Corn Grain Harvested and Processed Differently. *J. Dairy Sci.*, 81: 1972-1964.

Krehbiel, C., Rust, S., Zhang, G., and Gilliland, S. (2003). Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: performance response and mode of action. *J. Anim. Sci.*, 81: 120-132.

Kritas, S.K., Govaris, A., Christodoulopoulos, G. And Burriel, R. (2006). Effect of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* supplementation of ewe's feed on sheep milk production and young lamb mortality. *J. Vet. Med. Ass.*, 53: 170-173

Krueger, N.A., Adesogan, A.T., Staples, C.R., Krueger, W.K., Kim, S.C., Littell, R.C., y Sollenberger, L.E. (2008). Effect of method of applying fibrolytic enzymes or ammonia to Bermuda grass hay on feed intake, digestion, and growth of beef steers. *J. Anim. Sci.*, 86: 882-889.

Lechartier, C., and Peyraud, J.-L. (2010). The effects of forage proportion and rapidly degradable dry matter form concentrate on ruminal digestion in dairy cows fed corn silage-based diets with fixed neutral detergent fiber and starch contents. *J. Dairy Sci.*, 93: 666-681.

Lee, B., Pometto, A.L., Demici, A. Y Hinz, P.N., (1998). Media evaluation for the production of microbial enzymes. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 4775-4778.

- López Soto, M.A., Arellano González, E., Barreras Serrano, A., González Vizcarra, V.M., May García, D., Plascencia Jorquera, A. y Averyzinn, R. (2006). Influencia de una enzima fibrolítica exógena y el proceso de maceración en un forraje de baja calidad sobre digestión y función ruminal en vacas Holstein secas. *Vet. Mex.*, 37 (3): 275-289
- Martín Bellido, M., Escribano Sánchez, M., Mesías Díaz, F., Rodríguez de Ledesma Vega, A., and Pulido García, F. (2001). Extensive systems in animal production. *Arch. Zootec.*, 50: 465-489
- McAllister, T.A., Hristov, A.N., Beauchemin, K.A., Rode, L.M, and Cheng, K.J. Enzymes in ruminant diets. In M.R. Bedford, and G.G. Partridge (2001). *Enzymes in Farm Animal Nutrition*, CAB International Londres, UK pp.273-298.
- McCleary, B. (2000). Analysis of feed enzymes. In M. Bedford, and G. Partridge, *Enzymes in farm animal nutrition*, pp. 85-107. ISBN-10: 0851993931.
- McDonald, P., Edwards, R., Greenhalgh, J., and Morgan, C. (1999). *Nutrición Animal (Quinta Edición ed.)*. (S. Editorial Acribia, Ed.) Zaragoza.
- Mendoza, M., Britton, R., and Sock, R. (1994). Effect of protozoa and urea level on in vitro starch disappearance and amylolytic activity of ruminal microorganisms. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 54: 315-325.
- Mendoza, M., Britton, R., and Sock, R. (1993). Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.*, 71: 1572-1578.
- Mertens, D. (1997). Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 80: 1463-1482.
- Miron, J., Ben-Ghedalia, D. And Morrison, M. (2001). Invited Review: Adhesion Mechanisms of Rumen Cellulotic Bacteria. *J. Dairy Sci.*, 84: 1294-1309
- Mora-Jaimes, G., Bárcena-Gama, R., Mendoz-Martínez, G., González-Muñoz, S., y Herrera-Haro, J. (2002). Respuesta productiva y fermentación ruminal en ovinos alimentados con grano de sorgo tratado con amilasas. *Agrociencia*, 36: 31-39.
- Musa, H., Wu, S., Zhu, C., Seri, H., and Zhu, G. (2009). The potencial benefits of probiotics in animal production and health. *J. Anim. Vet. Adv.*, 8: 313-321
- Narváez González, E., Figueroa Cárdenas, J., Taba, S., Castaño Tostado, E., y Martínez Peniche, R. (2007). Efecto del tamaño del gránulo de almidón de maíz en sus propiedades térmicas y de pastificado. *Rev. Filotec. Mex.*, 30: 269-277.

National Research Council - NRC. (2001). Nutrient requirements of small ruminants. National Academy Press Washington, DC.

Negaraja, T.G. and Titgemeyer (2007). Ruminal Acidosis in Beef Cattle: The Current Microbiological and Nutritional Outlook *J. Dairy Sci.*, 90: E17-E38

Nuñez Ochoa, L., y Boauda, J. (2007). Patología Clínica Veterinaria (1era ed.). (L. Nuñez Ochoa, y J. Boauda, Eds.) México.

Officer D.I., (2000). Feed Enzymes. In J.P.F. D'Mello: Farm Animal Metabolism and Nutrition. (ed) The Scottis Agricultural College, Edinburgh, U.K. Disponible en: www.cabi.org/bookshop/ReadingRoom/0851993788/3788ch19.pdf2000:448

Owens, F., Secrist, D., Hill, W., and Gill, D. (1997). The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle. *Journal Animal Science. J. Anim. Sci.*, 75: 868-879.

Paredes López, O., Guevara Lara, F., y Bello Pérez, L. (2009). La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Revista Ciencias* 92: 60-70.

Peters, A., Lebzien, P., Meyer, U., Borchert, U., Bulang, M. y Flachowsky, G. (2010). Effect of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and nutrient digestion in dairy cows. *Arch. Anim. Nutri.*, 64 (3): 221-237.

Pinos Rodríguez, J., y González Muñoz, S. (2000). Efectos biológicos y productivos de los ionóforos en rumiantes. *Interciencia*, 25 (8): 379-385.

Pinos Rodríguez, J.M., González, S.S., Mendoza, G.D., Bárcena, R., Cobos, M.A., Hernández, A., and Ortega, M.E. (2002). Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and ryegrass hay fed to lambs. *J. Anim. Sci.*, 80: 3016-3020

Pinto-Santini, L., Drescher, K., Ruiz, A., Pérez, R., Domínguez, C., Benezra, M. (2009). Relación entre los niveles de glucosa e insulina sanguínea y el reinicio de la actividad ovarica en vacas de doble proposito con diferentes condiciones corporales al parto y diferente nivel de alimentación postparto. *Interciencia* , 34 (5): 350-355.

Recabarren, S., Lobo, A., Schneider, C., Cox, J., y Parilo, J. (2000). Sensibilidad tisular a la insulina antes, durante y después de un ayuno en ovejas prepúberes. Laboratorio de Fisiología y Endocrinología Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Concepción, Campus Chillán, CHILE. ISSN 0301-732X.

Reilly, P. (1985). Enzymic degradation of starch. In: Starch Conversion Technology. Beyumm G.M. And Roels J.A. (eds). N.Y.: Macel Dekker, Inc. p.345

Robutti, J., Hosoney, R., and Wassom, C. (1973). Modified Opaque-2 Corn Endosperms. II. Structure Viewed with a Scanning Electron Microscope. American Association of Cereal Chemistry, Inc., 51: 173-180.

Rodríguez, A.A. (1996). Studies on the efficiency of a homofermentative lactic acid-producing bacterial inoculant and commercial, plant cell-wall degrading enzyme mixtures to enhance the fermentation characteristics and aerobic stability of forage ensiled in temperature and tropical environments. Ph.D. Dissertation, Michigan State University. East Lansing, MI.

Rojo, R., Mendoza, G., González, S., Landois, L., Bárcena, R., and Crosby, M. (2005). Effects of exogenous amylases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* on ruminal starch digestion and lamb performance. *Anim. Feed Sci. Tech*, 655-665.

Rojo Rubio, R., Mendoza Martínez, G., Montañez Valdez, O., Rebollar Rebollar, S., Cardoso Jiménez, D., Hernández Martínez, J., et al. (2007). Enzimas amilolíticas exógenas en la alimentación de rumiantes. *Uciencia*, 22: 173-182.

Rojo-Rubio, R., Mendoza-Martínez, G., and Crosby-Galván, M. (2001). Uso de la amilasa termoestable de *Bacillus licheniformis* en la digestibilidad in vitro del almidón de sorgo y maíz. *Agrociencia*, 35: 423-427.

Romero, B., López, D., and Gómez, A. (1992). Digestibilidad de dietas de engorda tratadas con enzimas para grano de sorgo. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Chihuahua. p.181.

Russell, J.B., Cotta, M.A. and Dombrowski, D.B. (1981). Rumen bacterial competition in continuous culture: *Streptococcus bovis* versus *Megasphaera elsdenii*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 41(6): 1394-1399.

Russell, J., and Strobel, H. (1989). Effect of ionophoros on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol*, 55: 1-6.

Rustomo, B., Alzahal, O., Odongo, N., Duffield, T., and McBrode, B. (2006). Effects of rumen acid load from feed and forage particle size on ruminal pH and dry matter intake in the lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 89: 4758-4768.

Sánchez, F., Salinas, M., Vázquez, C., Velázquez, C., y Aguilar, G. (2007). Efecto de las prolaminas del grano de maíz (*Zea Mays L.*) sobre la textura de la tortilla. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 57 (3): 295-301.

Sánchez Hermosillo, M. (2001). Sistemas de alimentación para pequeños rumiantes en los trópicos. Memorias II: Congreso Latinoamericano de especialistas en pequeños rumiantes y camélidos sudamericanos.

Sano, H., Takebayahi, A., Kodama, Y., Nakamura, K., Ito, H., Arino, Y., (1999). Effects of feed restriction and cold exposure on glucose metabolism in response to feeding and insulin in sheep. *J. Anim. Sci.*, 77(2): 564-2573.

SAS Institute Inc. (2009). SAS/STAT® 9.2 User's Guide, Second Edition. Cary, NC

Szasz, J.I., McCalmant, T.M., Hunt, C.W., Grove, A.V. y Kennington, L.R. (2002). Effect of a fibrolytic enzyme preparation on intake and digestibility of bluegrass seed straw fed to beef cattle. Proc. Western Section. Americ. Soc. Anim. Sci. 53: 10-15

Tafaj, M., Zebeli, Q., Baes, C., Steingass, H., and Drochner, W. (2007). A meta-analysis examining effects of particle size of total mixed rations on intake, rumen, digestion and milk production in high yielding dairy cows in early lactation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 138: 137-161.

Taras, D., Vahjen, W., Macha, M. And Simon, O. (2006). Performance, diarrhea incidence, and occurrence of Escherichia coli virulence genes during long-term administration of a probiotic Enterococcus faecium strain to sows and piglets. *J. Anim. Sci.* 84: 608-617

Tous Rivera, K., Valencia, E., Rodríguez, A., Randel, P., y Adesogan, A.T. (2010). Enzimas exógenas tipo fibrolíticas sobre el consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes de heno de pasto de guinea. *J. Agric. Univ. PR.*, 94: 131-146

Tricarico, J.M., Johnston, J.D. and K.A. Dawson (2008). Dietary supplementation of ruminant diets with an Aspergillus oryzae α -amilase. In enzymes, direct fed and plant extracts in ruminant nutrition wallace R.J.D. Colombatto and P.H. Robinson, eds. *Anim Feed Sci Technol.*, 145: 136-150.

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

Walsh, G., Power, R., and Headon, D. (1993). Enzymes in animal feed industry. *Trends Biotechnol*, 11: 424-430.

Weimer, P.J. (1992). Cellulose Degradation by Ruminant Microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12(3): 189-223

Weiss, W., Steinberg, W., and Engstrom, M. (2011). Milk production and nutrient digestibility by dairy cows when fed exogenous amylase with coarsely ground dry corn. *J. Dairy Sci.*, 94: 2492-2499.

Whitaker, D., Goodger, W., Garcia, M., Perera, B., and Wittwer, F. (1999). Use of metabolic profiles in dairy cattle in tropical and subtropical countries on smallholder dairy farms. *Prev. Vet. Med.*, 38 (2-3): 119-131.

Whitley, N.C., Cazac, D., Rude, B.J., Jackson-O' Brien, D. And Parveen., S. (2009) Use of a commercial probiotic supplement in meat goats. *J. Anim. Sci.*, 87:723-728.

Wittwer, F. (2006). Exploración clínica de los animales domésticos. In *patología clínica animal*. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile. pp.92-148

Yang, W., and Beachemin, K. (2009). Increasing physically effective fiber content of dairy cow diets through forage proportion versus forage chop length: Chewing and ruminal pH. *J. Dairy Sci.*, 92: 1603-1615.

Yanke, L., Dong, Y., Callister, T., Baem, H., and Cheng, K. (1993). Comparison of amylolytic activities of ruminal fungi grown on cereal grains. *Canadian J. Microbiol.*, 39: 817-820.

9.0 Apéndice

Cuadro 8 Cambio en Peso Vivo Según el Periodo Experimental

Ovino	Peso Inicial (kg)	Peso al final de cada periodo (kg)			
		1	2	3	4
1	19.09	23.64	30.45	33.18	36.36
2	23.64	29.55	35.45	37.27	40.91
3	21.82	27.73	32.73	35.45	37.27
4	16.36	27.73	29.09	32.73	35.45
5	20.91	27.73	30.91	32.73	35.45
6	23.64	29.55	33.64	36.82	38.18
7	24.55	31.82	38.18	41.82	45.91
8	20.45	26.36	31.82	34.55	37.27
9	27.27	37.27	43.64	45.45	50.00
10	22.73	28.64	31.82	34.55	37.27
11	21.82	28.18	32.73	35.45	40.00
12	22.73	28.18	32.73	34.55	36.36