



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

TESIS

EFFECTO DE PREPARACIONES ENZIMÁTICAS Y ADITIVOS QUÍMICOS SOBRE
LA DIGESTIBILIDAD DEL RASTROJO DE MAÍZ *IN VITRO* E *IN VIVO*

Presenta:

GUSTAVO TIRADO ESTRADA

PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

Tutor:

DR. FIDEL GUEVARA LARA

Comité Tutorial:

Ph. D. GERMÁN DAVID MENDOZA MARTÍNEZ

DR. TEÓDULO QUEZADA TRISTÁN

Aguascalientes, Ags. México. Mayo 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

M. en C. GUSTAVO TIRADO ESTRADA
ALUMNO (A) DEL DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS
P R E S E N T E .

Estimado (a) alumno (a) Tirado:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"Efecto de Preparaciones Enzimáticas y Aditivos Químicos sobre la Digestibilidad del Rastrojo de maíz *in vitro* e *in vivo*"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E
Aguascalientes, Ags., 24 de mayo de 2011
"SE LUMEN PROFERRE"
LA DECANO

M. en C. MARTHA CRISTINA GONZÁLEZ-DÍAZ



c.c.p.- Archivo
MCGD,mjda





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES



M. en C. Martha Cristina González Díaz
Decana del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes
P r e s e n t e .

Por este medio me permito comunicar atentamente a usted que he revisado la versión final del escrito de tesis "**Efecto de preparaciones enzimáticas y aditivos químicos sobre la digestibilidad del rastrojo de maíz *in vitro* e *in vivo***", presentada por el alumno **M. en C. Gustavo Tirado Estrada** como requisito para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas en el área de Biotecnología Vegetal. A mi juicio, este documento contiene ya todas las correcciones solicitadas por un servidor al hacer la revisión del mismo. Por lo anterior, considero que se puede a proceder ya a su impresión definitiva y a la programación del examen de grado.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, Ags., a 20 de Mayo de 2011

Dr. Fidel Guevara Lara
Tutor del Trabajo de Tesis
Sinodal Designado para el Examen de Grado





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

23 de mayo de 2011

M. en C. Martha Cristina González Díaz
Decana del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes
P r e s e n t e.

Por este medio me permito comunicar atentamente a usted que he revisado la versión final del escrito de tesis "**Efecto de preparaciones enzimáticas y aditivos químicos sobre la digestibilidad del rastrojo de maíz *in vitro* e *in vivo***", presentada por el alumno **M. en C. Gustavo Tirado Estrada** como requisito para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas en el área de Biotecnología Vegetal. A mi juicio, este documento contiene ya todas las correcciones solicitadas por un servidor al hacer la revisión del mismo. Por lo anterior, considero que se puede a proceder ya a su impresión definitiva y a la programación del examen de grado.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 20 de Mayo de 2011

Dr. Germán David Mendoza Martínez
Miembro de Comité Tutorial del Trabajo de Tesis
Sinodal Designado para el Examen de Grado

UNIDAD XOCHIMILCO

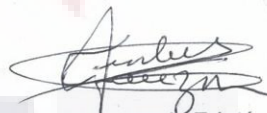
Calzada del Hueso No. 1100, Col Villa Quietud, Deleg. Coyoacán, México 04960, D.F., Edificio 34, 3^{er}. Piso
Tels.: 5483-7230, 54837231 Fax: 5483-7238



M. en C. Martha Cristina González Díaz
Decana del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes
P r e s e n t e.

Por este medio me permito comunicar atentamente a usted que he revisado la versión final del escrito de tesis "Efecto de preparaciones enzimáticas y aditivos químicos sobre la digestibilidad del rastrojo de maíz *in vitro* e *in vivo*", presentada por el alumno M. en C. Gustavo Tirado Estrada como requisito para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas en el área de Biotecnología Vegetal. A mi juicio, este documento contiene ya todas las correcciones solicitadas por un servidor al hacer la revisión del mismo. Por lo anterior, considero que se puede a proceder ya a su impresión definitiva y a la programación del examen de grado.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, Ags., a 20 de Mayo de 2011



Dr. Teódulo Quezada Tristán
Miembro de Comité Tutorial del Trabajo de Tesis
Sinodal designado para el examen de grado

c.c.p. Archivo

JOURNAL OF APPLIED ANIMAL RESEARCH
GARUDA SCIENTIFIC PUBLICATIONS
151 JANAKPURI BAREILLY 243122, India


Date: 31.01.2011

D. K. Agrawal
Chief Editor
Shashi Agrawal
Managing Editor

Dear Dr. Pinos ,

Your manuscript **JAAR 20274** entitled “**Effects of two fibrolytic enzyme mixtures on growth performance, digestion and ruminal fermentation in lambs fed corn stover based diets**” authored by **G. Tirado-Estrada, G.D. Mendoza-Martínez, J.M. Pinos-Rodríguez, T. Quezada-Tristán, and F. Guevara-Lara** has been accepted for publication in the Journal.

Yours sincerely



(D. K. Agrawal)

DEDICATORIA

Dedico esta tesis al creador universal. “Porque digno eres tú, Jehová, nuestro Dios mismo, de recibir toda la gloria, la honra y el poder, porque tú creaste todas las cosas, y a causa de tu voluntad existieron y fueron creadas”; porque “Estás abriendo tu mano y satisfaciendo el deseo de toda cosa viviente”. “¡Oh, la profundidad de las riquezas, y de la sabiduría y el conocimiento de Dios! ¡Cuán inescrutables son sus juicios e ininvestigables sus caminos! [...] Porque procedentes de él, y por él y para él son todas las cosas. A él sea la gloria para siempre. Amén” (Apocalipsis 4:11; Salmos 145:16; Romanos 11:33,36).

A Martha Rosa: mi fiel compañera de toda la vida y quien es, y ha sido, indudablemente, estímulo y fuente de inspiración para el logro de esta importante meta. A ella todo mi cariño, amor y respeto.

A mis tres hijos:

Deli Nazmín

Martha Leticia

Gustavo Ernesto

Quienes con su estímulo, consejo y apoyo me impulsaron al logro de este objetivo, a ellos mi más profundo cariño.

A mi nieta Nazím Betsabé, quien constituyó una fuerza revitalizadora, y fue sin duda fuente de luz y de alegría, y a su madre, Lizeth, con cariño.

A mi padre, Jesús Tirado Ibarra, quien no pudo ver concluido el esfuerzo de este sueño anhelado, a su memoria con profunda admiración.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por abrir sus puertas y darme la oportunidad para realizar mis estudios de doctorado, especialmente al Centro de Ciencias Básicas y a todo su amable personal, por su trato digno, apoyo y orientación constante, sin el cual no habría sido posible lograr esta importante meta.

A la Dirección General de Educación Superior Tecnológica y al Instituto Tecnológico EL Llano Aguascalientes, por que me brindaron la oportunidad y me dieron las facilidades económicas y administrativas, para realizar mis estudios de doctorado.

Al CONACyT, por su apoyo económico para mi formación académica y el desarrollo de la tercera etapa experimental.

Al Laboratorio de Microbiología Ruminal adscrito al Posgrado en Producción Animal del Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo y a su amable personal, por su apoyo en la realización de la primera etapa experimental del presente trabajo de tesis doctoral.

Al Programa de Ganadería del Colegio de Posgraduados, por brindarme las facilidades en el uso del Laboratorio de Nutrición Animal, específicamente en la técnica de cromatografía de gases, en especial al Sr. Andrés Lee, a quien agradezco su invaluable colaboración.

Al Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por las facilidades que me otorgó en el uso de sus instalaciones y ganado, así como al Laboratorio de Nutrición Animal. En especial a la M. en C. Guadalupe Acero Godínez, por su apoyo y colaboración en técnicas de análisis bromatológico y determinación de fibras.

Al CBTA No. 61 de Calvillo, Aguascalientes, por facilitar sus instalaciones, personal y alumnos para el desarrollo de la tercera etapa experimental. En especial al M. en C. Rubén Larios González, y al M. en C. Rufino Sánchez Maya, por su colaboración y atinados consejos.

Al “Rancho La Aurora” propiedad del Productor Ing. Pedro González Reynoso por facilitar el ganado ovino, necesario para la realización de la tercera etapa experimental.

A la empresa Alltech de México, quien amablemente donó producto enzimático.

Un reconocimiento especial a la M. en C. Deli Nazmín Tirado González, por su atinada asesoría e importante aportación y guía en el desarrollo integral del trabajo y análisis estadísticos durante todo el periodo doctoral.

A mis tres asesores: Dr. Fidel Guevara Lara, Ph. D. Germán David Mendoza Martínez, y Dr. Teódulo Quezada Tristán, por su excelente guía y valiosa experiencia aportada que hicieron posible la realización del presente proyecto doctoral.

También merecen un especial reconocimiento el Dr. Luis Alberto Miranda Romero, por su valiosa asesoría en la primera etapa experimental (técnica de producción de gases); y Ph. D. Ignacio Mejía Haro por su guía y colaboración durante la tercera etapa experimental.

INDICE

<i>Contenido</i>	<i>Pág.</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Definición y formulación del problema	4
3. JUSTIFICACIÓN	5
3.1. Hipótesis	8
4. OBJETIVOS	9
4.1. Objetivo general	9
4.2. Objetivos específicos	9
5. REVISIÓN DE LITERATURA	11
5.1. Factores que afectan el valor nutricional de los forrajes	11
5.1.1. Fracciones principales de la fibra	11
5.1.2. Formación de la pared celular y calidad del forraje	12
5.1.2.1. Pectinas	13
5.1.2.2. Celulosa	14
5.1.2.3. Hemicelulosa	14
5.1.2.4. Lignina	14
5.1.2.5. Lignocelulosa	16
5.1.2.6. Sílica	16
5.1.3. Grado de madurez	16
5.1.4. Especie y temperatura	18
5.1.5. Efecto de la temperatura	18
5.1.6. Efecto de la lignina sobre la degradación de la fibra	19
5.2. Degradación de las fibras en el rumen	22
5.3. La proteína cruda y la actividad de los microorganismos del rumen	24

5.4. Aplicaciones de nitrógeno no proteico	25
5.5. Fermentación en el rumen	26
5.6. Principios activos de las preparaciones enzimáticas fibrolíticas exógenas	27
5.7. Uso de enzimas fibrolíticas exógenas en alimentación animal	28
5.8. Perspectiva actual del uso de las enzimas fibrolíticas exógenas	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS	39
6.1. Etapa <i>in vitro</i>	39
6.1.1. Área de estudio	39
6.1.2. Materiales de estudio	39
6.1.3. Diseño y aplicación de tratamientos	40
6.1.4. Técnica de producción de gas	44
6.1.5. Protocolos previos a la preparación de las muestras experimentales	45
6.1.6. Elaboración de las soluciones base de la técnica de gas <i>in vitro</i>	46
6.1.6.1. Preparación del inóculo ruminal	47
6.1.7. Establecimiento del experimento	48
6.1.7.1. Toma de datos	48
6.1.7.2. Variables evaluadas	49
6.1.8. Diseño experimental y análisis de datos	55
6.2. Materiales y metodología: etapa <i>in situ</i>	56
6.2.1. Área experimental	56
6.2.3. Dieta experimental	57
6.2.4. Diseño de tratamientos	57
6.2.5. Preparación de las muestras experimentales	58
6.2.6. Procedimiento experimental <i>in situ</i>	59
6.2.6.1. Determinación de pH	60
6.2.7. Diseño experimental	60
6.3. Etapa <i>in vivo</i>	62
6.3.1. Materiales	62
6.3.2. Tratamientos y procedimiento experimental	62

6.3.3. Manejo de los animales y diseño del experimento	63
6.3.4. Toma de datos	64
6.3.5. Análisis de datos	66
7. RESULTADOS	68
7.1. Etapa <i>in vitro</i>	68
7.1. 1. Producción de gas	68
7.1.2. Perfil de producción de gas	73
7.1.3. Degradación, digestibilidad y adherencia microbiana	75
7.1.4. Digestibilidad de la materia orgánica (DMO)	78
7.1.5. Patrones de fermentación	81
7.1.5.1. Producción de ácidos grasos volátiles	81
7.1.5.2. Parámetros de la fermentación ruminal	83
7.1.5.3. Indicadores de la velocidad de fermentación ruminal	85
7.1.6. Energía metabolizable y energía neta de lactancia	86
7.1.7 Análisis de Correlación	88
7.1.7.1. Correlaciones entre principales variables a 24 h	88
7.1.7.2. Correlaciones entre principales variables de datos de incubación a 96 h.	89
7.1.8. Síntesis de los resultados	91
7.2. Resultados etapa <i>in situ</i>	93
7.2.1. Digestibilidad <i>in situ</i> (DIS) y fibra detergente neutro residual (FDNr)	93
7.2.1.1. Efecto de tratamientos	97
7.2.1.2. Contrastes no ortogonales	102
7.3. Resultados etapa <i>in vivo</i>	104
7.3.1. Comportamiento animal	104
7.3.2. Patrón de fermentación ruminal	106
7.3.5. Contenido de fibra en heces y digestibilidad por cenizas insolubles	107
7.3.7. Relaciones entre indicadores de la etapa <i>in vivo</i>	109
8. DISCUSIÓN	110
8.1. Etapa <i>in vitro</i>	110
8.1.1. Producción de gas y perfil del modelo no lineal de Vmax, S y FL	110

8.1.2. Degradación y digestibilidad de la materia seca y cinética microbiana	113
8.1.3. Digestibilidad de la materia orgánica (DMO)	116
8.1.4. Patrones de fermentación ruminal	118
8.1.5. Indicadores de la velocidad en fermentación ruminal	121
8.1.6. Energía metabolizable y energía neta de lactancia	123
8.1.7. Análisis de correlación	124
8.2. Etapa <i>in situ</i>	127
8.2.1. Efecto del tiempo de incubación sobre DIS y FDNr	127
8.2.2. Efecto de los preparados enzimáticos sobre DIS y FDNr	128
8.2.3. Sinergismo entre actividad enzimática ruminal y enzimas exógenas	130
8.2.4. Actividad de los aditivos químicos	132
8.3. Etapa <i>in vivo</i>	134
8.3.1. Discusión general	134
9. CONCLUSIONES	147
10. BIBLIOGRAFÍA	149
11. APÉNDICE	171

LISTA DE CUADROS

<i>Contenido</i>	<i>Pág.</i>
Cuadro 1. Diseño de tratamientos etapa <i>in vitro</i> .	41
Cuadro 2. Composición de las muestras experimentales por tratamiento.	43
Cuadro 3. Dieta base suministrada a los animales durante el periodo experimental <i>in situ</i> .	57
Cuadro 4. Diseño de tratamientos experimentales durante el periodo <i>in situ</i> .	58
Cuadro 5. Calendario de incubación <i>in situ</i> para %DIS y %FDN.	60
Cuadro 6. Tratamientos evaluados en la etapa experimental <i>in vivo</i> .	62
Cuadro 7. Análisis de varianza para VG, TF y VA.	68
Cuadro 8. Efecto de preparados enzimáticos y aditivos químicos sobre los indicadores de producción de gas.	69
Cuadro 9. Análisis de varianza para V, S y L a 24 horas.	73
Cuadro 10. Análisis de varianza para V, S y L a 96 horas.	73
Cuadro 11. Efecto de preparados enzimáticos y aditivos químicos sobre los perfiles no lineales de producción de gas en muestras incubadas <i>in vitro</i> .	74
Cuadro 12. Efecto de preparados enzimáticos y aditivos químicos sobre los perfiles no lineales de producción de gas en muestras incubadas <i>in vitro</i> .	75
Cuadro 13. Degradación de MS, digestibilidad, adherencia microbiana y masa microbiana.	75
Cuadro 14. Degradación de MS, digestibilidad, adherencia microbiana y masa microbiana	76
Cuadro 15. Degradación de la fibra, digestibilidad, adherencia microbiana y masa microbiana a 24 h.	77
Cuadro 16. Degradación de la fibra, digestibilidad, adherencia microbiana y masa microbiana.	78
Cuadro 17. ANOVA de la digestibilidad de la materia orgánica.	79
Cuadro 18. Digestibilidad de la materia orgánica (DMO) y fraccional (DMO/t).	80
Cuadro 19. ANOVA para ácidos grasos volátiles.	81
Cuadro 20. Comparación de medias para ácidos grasos volátiles a 24 h.	82
Cuadro 21. ANOVA de los parámetros de fermentación ruminal a 24 h.	83

Cuadro 22. Comparación de medias para los parámetros de fermentación ruminal a 24 h.	84
Cuadro 23. Coeficientes de correlación entre N-NH ₃ y porcentajes de ácidos acético, propiónico y butírico a tres tiempos.	84
Cuadro 24. Análisis de varianza para producción de gases primarios.	85
Cuadro 25. Comparación de medias para producción de gases primarios a 24 h.	86
Cuadro 26. Análisis de varianza para energía metabolizable y energía neta de lactancia.	86
Cuadro 27. Comparación de medias para energía metabolizable y neta de lactancia.	88
Cuadro 28. Análisis de correlaciones para principales variables calculadas a 24 h.	89
Cuadro 29. Resumen de diferencias significativas entre tratamientos para las principales variables de decisión.	92
Cuadro 30. Análisis de varianza para digestibilidad <i>in situ</i> .	93
Cuadro 31. Análisis de varianza de la FDNr.	94
Cuadro 32. Análisis de varianza para aditivo químico y tiempo x aditivo químico.	94
Cuadro 33. Efecto del tiempo sobre DIS y FDNr.	95
Cuadro 34. Correlación entre DIS y FDNr dentro y entre tratamientos.	96
Cuadro 35. Comparación entre preparados enzimáticos y testigos.	97
Cuadro 36. Prueba de medias de tratamientos sobre DIS y FDNr.	98
Cuadro 37. Efecto de tratamiento x tiempo sobre digestibilidad <i>in situ</i> .	99
Cuadro 38. Efecto de aditivo químico en modelo 2.	100
Cuadro 39. Efecto de tratamiento x tiempo sobre fibra detergente neutro residual.	101
Cuadro 40. Análisis de varianza mediante contrastes no ortogonales para DIS.	103
Cuadro 41. Análisis de varianza mediante contrastes no ortogonales para FDNr.	104
Cuadro 42. a) Análisis de varianza para ganancia diaria de peso (GP), consumo de alimento (CoA), conversión alimenticia (CA), peso ganado (PG).	
b) Análisis de varianza para peso final (PF).	105
Cuadro 43. Prueba de medias para GP, CoA, CA, PG y PF.	106
Cuadro 44. a) Análisis de varianza para AA, AP, AB y AGVt.	
b) pH, proporción A:P y nitrógeno amoniacal (N-NH ₃ , mg/dL).	106
Cuadro 45. Prueba de medias para pH, AA, AP, AB, AGVt y relación A:P.	107

Cuadro 46. Análisis de varianza para el porcentaje de FDA, lignina, FDN y DCI en heces.	108
Cuadro 47. Prueba de medias de tratamientos para FDA, lignina, FDN y DCI.	109
Cuadro 48. Parámetros e indicadores <i>in vivo</i> donde los tratamientos superaron a T0.	139
Cuadro 1 A. Soluciones base de la técnica de gas <i>in vitro</i> .	171
Cuadro 2 A. Ejemplo ilustrativo de programación SAS para la estimación de Vmax, S y FL.	173
Cuadro 3 A. Distribución de tratamientos por vaca y tiempo de incubación <i>in situ</i> .	174
Cuadro 4 A. Composición de las dietas experimentales para la etapa <i>in vivo</i> .	175
Cuadro 5 A. Comparación de medias para digestibilidad de la materia orgánica.	176
Cuadro 6 A. Comparación de medias para digestibilidad fraccional de la MO (DMO/t).	177
Cuadro 7 A. Principales correlaciones derivadas de datos de incubaciones <i>in vitro</i> con dos repeticiones en tiempo, a 96 h.	178
Cuadro 8 A. Principales correlaciones derivadas de datos de incubaciones <i>in vitro</i> con dos repeticiones en tiempo, a 96 h.	179
Cuadro 9 A. Correlaciones derivadas de datos de incubaciones <i>in vitro</i> con dos repeticiones en tiempo, a 96 h.	180
Cuadro 10 A. Correlaciones entre indicadores de degradación, patrones de fermentación y variables de comportamiento animal derivados de la etapa <i>in vivo</i> .	181
Cuadro 11 A. Correlaciones entre ácido acético (AA) y ácido propiónico (AP).	181
Cuadro 12 A. Correlaciones entre AA, AP, EM, CO ₂ y CH ₄ .	182
Cuadro 13 A. Correlaciones entre variables evaluadas en la etapa <i>in vivo</i> .	182

LISTA DE FIGURAS

<i>Contenido</i>	<i>Pág.</i>
Figura 1. Comportamiento del volumen de gas producido por tratamiento y tiempo de medición.	70
Figura 2. Comportamiento de producción de gas por hora, por tratamiento y tiempo de medición.	71
Figura 3. Comportamiento del VA de gas por tratamiento en los tiempos de medición.	72
Figura 1 A. Procedimiento de incubación de las muestras experimentales para producción de gas <i>in vitro</i> .	171
Figura 2 A. Procedimiento para la toma de lecturas de producción de gas y cronograma de mediciones.	172
Figura 3 A. Alimento necesario para obtener 10 kg de peso vivo.	183
Figura 4 A. Alimento adicional por cada 10 kg de peso vivo a partir del tratamiento que registró un consumo menor (F) tomado como punto cero (F=0).	183
Figura 5 A. Digestibilidad aparente de la materia seca calculada a partir del marcador interno por cenizas insolubles.	184

LISTA DE ABREVIATURAS

Mt: millones de toneladas.
 Mha: millones de hectáreas.
 PC: proteína cruda.
 MS: materia seca.
 NNP: nitrógeno no proteico.
 N-NH₃: nitrógeno amoniacal.
 FDN: fibra detergente neutro (Remanente que queda después de lavar una muestra con un detergente neutro).
 FDA: fibra detergente ácido (Remanente que queda después de lavar una muestra con un detergente ácido).
 DFDN: digestibilidad de la fibra detergente neutro.
 DFDA: digestibilidad de la fibra detergente ácido.
 DIVMS: digestibilidad *in vitro* de la materia seca.
 DV: digestibilidad *in vitro* (así definida en el presente estudio).
 LDA: lignina detergente ácido.
 LIG: lignina.
 N-NH₄: nitrógeno amonio.
 DIVMO: digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica.
 DMO: digestibilidad de la materia orgánica.
 DMO/t: digestibilidad de la materia orgánica entre tiempo (en horas)= DMO fraccional.
 TDMS: tasa de desaparición de la materia seca.
 UC: utilización de carbohidratos, con frecuencia equivalente a unidades glucosa.
 CE: carbohidratos estructurales.
 AGV: ácidos grasos volátiles.
 AGVt: ácidos grasos volátiles totales.
 AA: ácido acético ó acetato (A).
 AP: ácido propiónico ó propionato (P).
 AB: ácido butírico ó butirato (B).
 AA:AP: proporción o relación ácido acético:ácido propiónico ó acetato:propionato (A:P)
 DM: Dry matter (Materia seca, por sus siglas en Inglés).
 FPU: filter paper unity (“unidades de papel de filtro” en español). Unidad de medición de actividad enzimática principalmente para el grupo de las celulasas utilizadas en la degradación del complejo lignocelulósico.
 Ce: cenizas.
 EM: energía metabolizable.
 ENL: energía neta de lactancia.
 Ea: energía de activación.

USC: urea sugar cane por sus siglas en Inglés (caña de azúcar tratada con urea en español).

EE: extracto etéreo.

Vmax: volumen máximo de gas.- Máxima cantidad de gas producido por gramo de materia seca degradada a un tiempo específico dado por modelo de regresión no lineal.

S: tasa fraccional.- El volumen anterior entre el número de horas requeridas para alcanzarlo.

FL: fase de letargo ó lag.- Periodo transcurrido para lograr la primera producción de gas.

AM: adherencia microbiana.

MM: masa microbiana.

MSD: materia seca desaparecida (así manejada en la etapa *in vitro* del presente estudio).

DIS: digestibilidad *in situ*.

DCI: digestibilidad por cenizas insolubles (en ácido).

CI: cenizas insolubles (en ácido).

TM: tiempos de medición (de producción de gas en horas en la etapa *in vitro* en el presente trabajo).

F.V.: fuentes de variación en la tabla de análisis de varianza.

GL: grados de libertad en la tabla de análisis de varianza.

SC: suma de cuadrados en la tabla de análisis de varianza.

CM: cuadrados medios (ó varianza de cada fuente de variación).

Fcal: "F" calculada ó "F" de Fisher (razón de varianza de tratamiento/varianza del error).

P>F: Probabilidad de error estimado por Statistical Analysis System (SAS, por sus siglas en Inglés) al rechazar la hipótesis nula.

R²: coeficiente de determinación.- Relación cociente de suma de cuadrado de tratamiento entre suma de cuadrado total (indicador de precisión del experimento).

C.V.: coeficiente de variación.- Medida de precisión de un experimento (generalmente expresado en porcentaje).

ATP: adenosin trifosfato.- Medida de energía de los ciclos metabólicos celulares.

RESUMEN

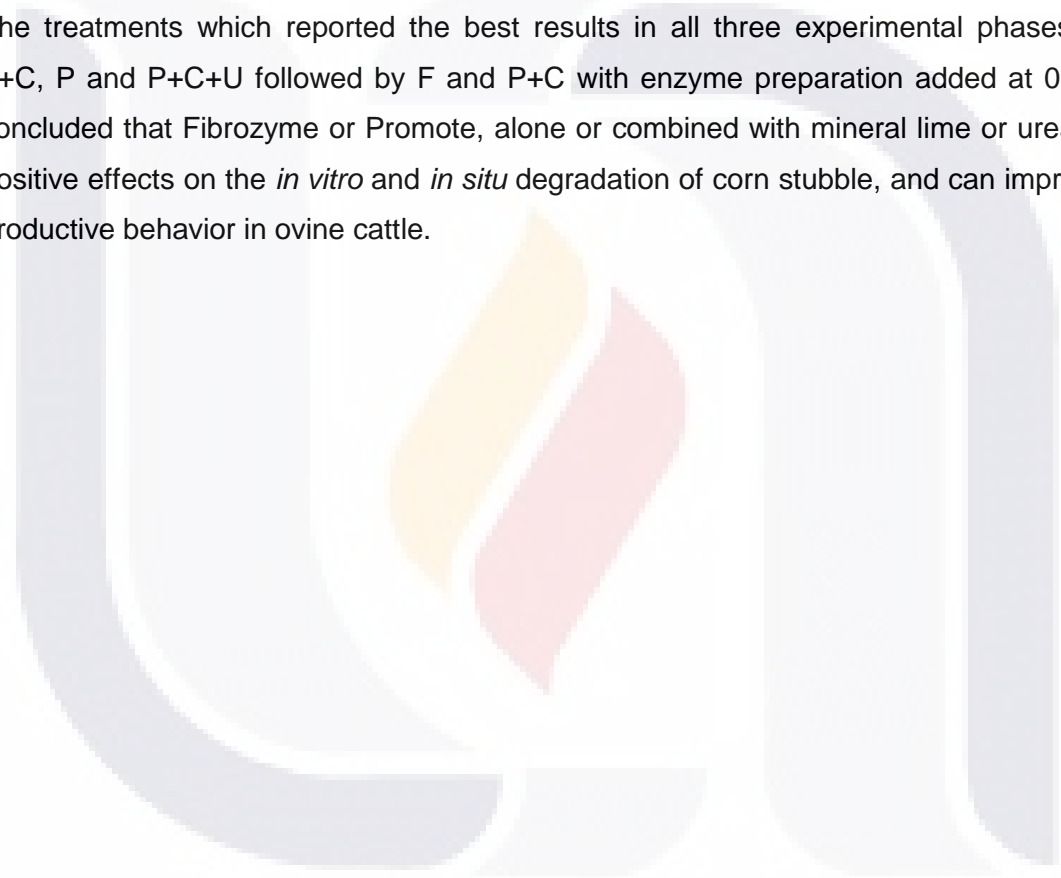
Dos preparaciones enzimáticas comerciales: Fibrozyme (F) y Promote (P) se aplicaron en forma independiente a muestras de rastrojo de maíz (RM) a dosis de $1.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $0.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de materia seca (MS), respectivamente, a 24 h ó 0 h, antes de iniciar la incubación *in vitro* en un fluido ruminal modificado. Además, se añadieron juntos o independientes a las muestras, dos aditivos químicos: urea (U) o hidróxido de calcio (cal apagada, C), 48 h antes de la incubación *in vitro* a dosis de 0.75 o 1.5%. Las combinaciones de enzimas y aditivos arrojaron 16 tratamientos (F o P solos, F+C o U, P+C o U, F+C+U o P+C+U a 24 o 0 h; T1-T16) y un testigo sin enzimas ni aditivos (T0). Mediante un diseño bloques al azar generalizado (2 corridas y 4 repeticiones por corrida) y utilizando un modelo logístico no lineal se evaluaron volumen máximo de gas (V_{\max}), tasa fraccional (S) y fase lag (FL); además se evaluaron a 24 h las producciones de CO_2 , CH_4 , $\text{CO}_2:\text{CH}_4$; además se midieron la materia seca desaparecida (MSD), fibra detergente neutro residual (FDNr), digestibilidad *in vitro* (DV) de la MS, AGVt, masa microbiana (MM) y adherencia microbiana (AM). A 24, 48, 60 y 72 h se evaluaron la degradación de la materia orgánica (DMO) y la DMO fraccional (DMO/t); a 24 y 48 h se estimaron energía metabolizable (EM) y energía neta de lactancia (ENL). Mediante un diseño completamente al azar con 4 repeticiones por tratamiento se evaluaron AGVt, AA, AP, AB, AA:AP y nitrógeno amoniacal (N-NH_3) a 24 h. Por lo general los tratamientos con aplicación enzimática a 0 h (T9-T16) superaron a T0 y al resto de los tratamientos en S, AP, MSD, FDNr, DV, AP, DMO (a 48, 60 y 72 h), DMT/t (en todos los tiempos), EM (a 48 h) y ENL (a 48 h) ($P < 0.05$). En N-NH_3 los tratamientos que incluyeron U superaron a T0 ($P < 0.05$). En el resto de las variables no hubo diferencias entre tratamientos y T0. En la etapa *in situ* se evaluaron las mismas combinaciones entre preparados enzimáticos y aditivos químicos pero únicamente se aplicaron las enzimas a 0 h y se incluyeron dos testigos, el primero: muestras de rastrojo de maíz molido + solución melaza:agua (T0) y el segundo: rastrojo de maíz solo (T00). Se midió digestibilidad a 24, 48, 72 y 96 h en arreglo factorial (10×4) y los tratamientos fueron confundidos dentro de enzimas. Se evaluaron digestibilidad *in situ* de MS (DIS) y FDNr. En la etapa *in vivo* sólo se evaluaron los tratamientos F (T1), P (T2), F+C (T3), P+C (T4), F+C+U (T5), P+C+U (T6) y un testigo [(dieta base+56% de RM+melaza:agua (T0)]. Se utilizaron 42 borregos (21 machos 19 kg y 21 hembras, 17 kg en un diseño bloque generalizado (sexo) con 3 repeticiones por sexo y seis repeticiones

por tratamiento. En DIS los tratamientos F+C y F+C+U así como P+C (a 48 h) y P+C+U (a 48 y 72 h) superaron a T0 y T00 ($P<0.05$), pero no hubo diferencias en FDNr. En la etapa *in vivo*, los siguientes tratamientos reportaron valores superiores a T0: T1, T2 y T6 en ganancia de peso; T1, T4, T5 y T6 en conversión alimenticia; T1, T2, T3, T5 y T6 en porcentaje de AA; T1, T2 y T3 en porcentaje de AP y concentración de AGVt; y, T3, T5 y T6 en digestibilidad por cenizas insolubles ($P<0.05$). En el resto de la variables: consumo de alimento, pH, porcentaje de AB, proporción AA:AP, concentración de N-NH₃, tasa de desaparición de FDN, FDA y lignina no hubo diferencias entre tratamientos y T0. Los tratamientos que mejores resultados reportaron en las tres etapas experimentales fueron: F+C, P y P+C+U seguidos por F y P+C; con aplicación enzimática a 0 h en todos los casos. Se concluye que Fibrozyme ó Promote, solos o combinados con cal o urea, tienen efectos positivos sobre la degradación del rastrojo de maíz *in vitro* e *in situ*, y pueden mejorar el comportamiento productivo en ovinos.

ABSTRACT

Two commercial enzyme preparations: Fibrozyme (F) and Promote (P) were independently added to corn stubble samples at 1.5 g·kg⁻¹ and 0.2 g kg⁻¹ of dry matter (DM), respectively, at 24 h or 0 h before *in vitro* incubation in a modified ruminal fluid. Also, two chemical additives: urea (U) or calcium hydroxide (mineral lime, C) were added together or separately to the samples, 48 h before *in vitro* incubation at levels of 0.75 or 1.5%. The combination of enzyme preparations and chemical additives resulted in 16 treatments (F or P alone, F+C or U, P+C or U, F+C+U or P+C+U at 24 h or 0 h; T1-T16) and a control without enzymes or additives (T0). Maximum gas volume (V_{max}), fractional rate (S) and lag phase (FL) were evaluated through a generalized randomized blocks design (2 runs and 4 replicates per run) using a nonlinear logistic model; in addition, CO₂, CH₄ and CO₂:CH₄ were evaluated at 24 h; also, dry matter disappearance (MSD), residual neutral detergent fiber (FDN_r), *in vitro* digestibility (DV) of MS, total volatile fatty acids (AGVt), microbial mass (MM) and microbial adherence (AM) were measured. Organic matter degradation (DMO) and fractional DMO (DMO/t) were evaluated at 24, 48, 60 and 72 h; metabolizable energy (EM) and net energy of lactation (ENL) were estimated at 24 and 48 h. AGVt, acetic acid (AA), propionic acid (AP), butyric acid (AB), AA:AP ratio and ammonia nitrogen (N-NH₃) were evaluated at 24 h using a completely randomized design and 4 replicates per treatment. In general, treatments with enzyme preparation added at 0 h (T9-T16) were better than the control and the rest of the treatments in S, AP, MSD, FDN_r, DV, AP, DMO (at 48, 60 and 72 h), DMT/t (at all times), EM (at 48 h) and ENL (at 48 h) (P<0.05). In N-NH₃, treatments with U were better than T0 (P<0.05). For the rest of the variables, there were no differences between treatments and T0. In the *in situ* phase of the study, the same combinations between enzyme preparations and chemical additives were evaluated, but enzyme preparations were added only at 0 h, and two controls were included: the first contained ground corn stubble + molasses:water solution (T0), and the second one consisted of corn stubble alone (T00). Digestibility was measured at 24, 48, 72 and 96 h in a factorial array (10x4) and the treatments were confounded within enzyme preparations. *In situ* digestibility of dry matter (DIS) and FDN_r were evaluated. In the *in vivo* phase, the only treatments evaluated were F (T1), P (T2), F+C (T3), P+C (T4), F+C+U (T5), P+C+U (T6) and a control [(basal diet+56% of RM+molasses:water (T0))]. Forty two sheep [21 males (19 kg) and 21 females (17 kg)] were utilized in a generalized

block (sex) design with 3 replicates per sex and 6 replicates per treatment. Regarding DIS, treatments F+C and F+C+U as well as P+C (at 48 h) and P+C+U (at 48 and 72 h) were better than T0 and T00 ($P<0.05$), but there were no differences in FDNr. In the *in vivo* phase, the following treatments reported values better than T0: T1, T2 and T6 in weight gain; T1, T4, T5 and T6 in feed conversion; T1, T2, T3, T5 and T6 en AA level; T1, T2 and T3 in AP and AGVt levels; and T3, T5 and T6 in digestibility by insoluble ash ($P<0.05$). For the rest of the variables: feed intake, pH, AB level, AA:AP ratio, N-NH₃ level, FDN, FDA and lignin disappearance rates, there were no differences between treatments and T0. The treatments which reported the best results in all three experimental phases were: F+C, P and P+C+U followed by F and P+C with enzyme preparation added at 0 h. It is concluded that Fibrozyme or Promote, alone or combined with mineral lime or urea, have positive effects on the *in vitro* and *in situ* degradation of corn stubble, and can improve the productive behavior in ovine cattle.



1. INTRODUCCIÓN

En la región Centro-Norte de México, la mayoría de los forrajes disponibles para los rumiantes son fibrosos, ricos en lignocelulosa, bajos en digestibilidad y pobres en proteína, minerales y energía disponibles. La digestibilidad generalmente es inferior al 60% y el contenido de proteína cruda varía entre 3 y 5%; tal es el caso de las pajas y rastrojos de los cereales (Riquelme, 1984; Leng, 1991). Por tal motivo la búsqueda de un aprovechamiento eficiente de dichos esquilmos por los rumiantes es un campo en el que continúan trabajando intensamente los investigadores en biotecnología y nutrición animal (Eun y Beauchemin, 2007a). En México, aproximadamente el 80% del rastrojo de maíz se destina a la nutrición de rumiantes. Aunque su utilización, sin el apoyo de otros suplementos, ocasiona que dicho esquilmo se aproveche sólo parcialmente cubriendo en parte las necesidades básicas de mantenimiento. Por tal motivo, recientemente se han estado evaluando diversos tipos de preparaciones enzimáticas microbianas como aditivos para mejorar el aprovechamiento de pajas y rastrojos por los rumiantes. Sin embargo, su actividad e impacto aún no se han evaluado completamente, debido a una gran variedad de tipos de preparados enzimáticos que existen actualmente, los cuales se han desarrollado a partir de diferentes géneros y especies de hongos. Así mismo, los principios activos de dichos preparados enzimáticos y su forma de acción sobre los diferentes componentes de la fibra de los forrajes han impedido hasta este momento su evaluación completa al corto plazo, sobre todo si se toma en cuenta que interactúan de manera distinta dependiendo del tipo de substrato (Gómez-Vázquez *et al.*, 2003). De esta manera los resultados son variables en lo que tiene que ver con indicadores y parámetros de descomposición y degradación de los componentes de la pared celular, con el propósito de liberar principalmente una buena cantidad de energía retenida especialmente en carbohidratos de tipo estructural. Algunos investigadores reportan efectos marginales para distintos tipos de preparaciones enzimáticas (Bergamaschine *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2006a), mientras que otros han encontrado efectos de moderados a importantes (McAllister *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2005; Dosualdo *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2006b; Colombatto *et al.*, 2007; Eun y Beauchemin, 2007a). Por otra parte, en los últimos años está cobrando vigor de nuevo la aplicación de aditivos químicos que algunas décadas atrás se habían investigado con insistencia en la degradación de forrajes fibrosos,

particularmente en rastrojo de maíz por ser el esquilmo más abundante en México. Se utilizaron con relativamente buenos resultados productos como el hidróxido de sodio (NaOH), urea, amoníaco (NH₃), entre otros. Posteriormente, se incluyeron productos orgánicos activos como los probióticos, en especial la levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) entre muchos otros productos. Sin embargo, en aquel tiempo se consideró que el uso de álcalis resultaba caro, de tal modo que quedaron fuera del alcance de los medianos y pequeños productores. Por su parte, los probióticos si bien resultaron en un aporte importante de proteína microbiana (Leng, 1991; Church y Pond, 1996), su efecto no fue significativo con relación a la degradación de la fibra de los forrajes y cuestionable desde el punto de vista económico. Lo mismo fue cierto cuando se utilizaron suplementos proteicos o fuentes energéticas y nitrogenadas, aunque en este último caso, sí se observaron incrementos moderadamente importantes en el aprovechamiento de los diferentes componentes celulares, especialmente, los de la fibra (Hernández *et al.*, 1992). No obstante, una buena cantidad de investigaciones en el campo de los forrajes fibrosos ha cobrado un nuevo impulso, pues la combinación de productos químicos adicionados previamente a los forrajes en periodos cortos o relativamente largos, ya sea a esquilmos altamente lignificados o bien, a forrajes en ensilado, o también a subproductos de la agroindustria, o distinguiendo entre forrajes de gramíneas y leguminosas, han mostrado resultados importantes en cuanto a una mayor degradación de éstos a la vez que mejoran el comportamiento animal, especialmente en rumiantes, cuando se han combinado preparaciones enzimáticas con aditivos químicos y probióticos. Todo parece indicar la existencia de sinergismo entre los productos antes referidos, ya sea porque algunos rompen de inicio algunos enlaces de alta resistencia del complejo lignocelulósico, dejando la celulosa expuesta a un ataque más directo y efectivo de enzimas del tipo de las endo y exoglucanasas y xilanasas, principalmente. Pero también, se ha encontrado que un mantenimiento del pH ruminal en niveles cercanos al óptimo adecuado (neutro, pH 7.0), favorece una proliferación de bacterias fibrolíticas del ambiente natural del rumen con un consecuente sinergismo entre las enzimas naturales y las exógenas, generalmente producidas por ciertas especies de hongos, mejorando con ello, la degradación de la fibra contenida en la pared celular. El objetivo del presente trabajo evaluar la actividad fibrolítica de algunos preparados enzimáticos comerciales (Fibrozyme® y Promote®) derivados del cultivo de algunos hongos, sobre la degradación y digestibilidad de los componentes de la pared celular del rastrojo de maíz (*Zea mays*).

Los preparados enzimáticos fueron evaluados solos o en combinación con algunos aditivos (urea y cal) buscando con ello un posible sinergismo para mejorar la digestibilidad y el aprovechamiento del rastrojo de maíz principalmente en la época de estiaje.



2. ANTECEDENTES

2.1. Definición y formulación del problema

Cuando un forraje presenta niveles de digestibilidad por debajo del 60%, o incluso en casos más críticos por debajo del 55%, con un contenido de proteína cruda (PC) menor al 5%; como es el caso de las pajas de cereales y de algunas leguminosas o bien de zacates, leguminosas y arbustivas que al alcanzar su madurez fisiológica se vuelven sumamente fibrosas e indigestibles para los rumiantes (Riquelme, 1984; Gutiérrez, 1991; Leng, 1991), entonces el tránsito digestivo especialmente en la cámara ruminal es lento, al grado de afectar negativamente el consumo voluntario del animal, impidiendo cubrir los requerimientos nutricionales con frecuencia por debajo del nivel de mantenimiento. En este sentido, es común observar pérdidas significativas de peso en animales adultos y el cese total del crecimiento en animales jóvenes, a la vez que la salida al mercado se retarda por cinco años o más (Riquelme, 1984; Reyes *et al.*, 1997). Se han realizado numerosos proyectos de investigación con el propósito de mejorar el aprovechamiento de los forrajes fibrosos, entre los que destacan el uso de álcalis para degradar los enlaces de alta resistencia, que la lignina y los silicatos crean, atrapando fuertemente a la celulosa y la hemicelulosa, así como fracciones importantes de proteína cruda de la pared celular (Riquelme, 1984; Valdéz y Nuñez, 1984; Eraso y Hartley, 1990; Hatfield, 1993a; Church y Pond, 1996). Con igual propósito, se ha investigado con cierta medida de éxito, el uso de probióticos para mejorar y potenciar los diferentes eventos de la fermentación y digestión ruminal, especialmente en esquilmos agrícolas con alto contenido de fibra (Miranda *et al.*, 1996; Jouany *et al.*, 1998). Actualmente, el uso de enzimas exógenas capaces de degradar fracciones de la pared celular está adquiriendo mayor importancia, ya que el propósito fundamental es liberar los componentes energéticos como la celulosa, hemicelulosa y pectinas. Adicionalmente, se pretende liberar la proteína retenida en el complejo lignocelulósico (Van Soest, 1982; Jung *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2006c; Medina *et al.*, 2006; Eun y Beauchemin, 2007a; Eun y Beauchemin, 2007b). Por lo tanto, el aprovechamiento eficiente de los forrajes completamente maduros, con 10% o más de contenido de lignina y silicatos continúa siendo un reto para la mayoría de los investigadores en biotecnología agrícola y en nutrición de rumiantes.

3. JUSTIFICACIÓN

En México, el rendimiento promedio anual de rastrojo de maíz estimado entre 1997-2002 fue de 48.1 Mt y el de rastrojo de sorgo fue de 6.5 Mt (FAOSTAT, 2004). Sin embargo, este enorme volumen de pajas y rastrojos, así como de las grandes reservas naturales de forrajes de gramíneas nativas y endémicas de México, aún están sin aprovecharse de manera eficiente en la producción de rumiantes. Es interesante notar que la suma de pajas, rastrojos y subproductos agroindustriales, adicionados a la producción anual estimada de forrajes nativos naturales es del orden de los 200 Mt de materia seca (MS), derivadas de una extensión aproximada de 40×10^6 ton (INEGI, 1994). A pesar de tal potencial, con frecuencia las pérdidas anuales de inventarios ganaderos por muerte son alarmantes, sobre todo en los largos estiajes de la época seca, especialmente en la región Centro-Norte del país. La ganadería en estos casos es pobre y poco competitiva, con bajos indicadores y parámetros de producción, frente a los competidores del país del norte. Aunque se estima que los esquilmos agrícolas aportan entre el 18 y 20% del total de la energía producida, tradicionalmente se han utilizado de manera poco eficiente en la alimentación del ganado. Del total de rastrojo de maíz producido, aproximadamente el 80% se utiliza en la alimentación del ganado como ingrediente predominante, sobre todo durante la época seca del año, no obstante se hace con una tecnología pobre. De esta manera el 32% del rastrojo se utiliza por el ganado en pastoreo directo, el 21% en greña, el 10% empacado, el 11% molido y sólo el 6% es incluido en dietas elaboradas a base de granos como aporte de fibra (Castañeda y Monroy, 1984; Valdéz y Nuñez, 1984). De acuerdo al volumen total estimado de forrajes fibrosos producidos cada año en nuestro país (200 Mt de materia seca, MS), sobre todo considerando el contenido de energía almacenada en ellos, se podría cubrir la necesidad de consumo alimenticio de 40 millones de unidades de rumiantes de 450 kg cada uno/año, si se estima un consumo de MS diario por animal del 3% de su peso vivo. Sin embargo, la calidad nutricional de la mayoría de estos forrajes, especialmente en términos de energía, PC y nitrógeno no proteico (NNP) disponibles es bajo y sólo podría cubrir una tercera parte del volumen de ganado indicado cuando la digestibilidad aparente de éstos es igual o menor al 55%. Más aún, tal uso potencial es posible sólo en el supuesto caso de que se colecte, se almacene y se utilice oportuna y eficientemente (Gutiérrez, 1991; Leng, 1991; Church y Pond, 1996).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A pesar de todo, la importancia de los esquilmos agrícolas en la alimentación del ganado radica principalmente en su enorme volumen disponible, ligado al hecho de que el forraje de buena calidad producido particularmente en la extensa zona de secano del Centro – Norte de México no satisface la demanda del ganado existente (Valdéz y Núñez, 1984). Además, los forrajes de buena calidad nutricional, se producen a costos mucho mayores que los esquilmos, desde el punto de vista económico y desgaste de los recursos naturales de suelo y agua. De hecho, los nuevos sistemas de producción con rumiantes, exigen la aplicación de tecnologías que hagan un uso más racional de los recursos naturales, basados en un enfoque de sustentabilidad del proceso productivo, del medio y de los recursos que se utilizan (NRC, 1989; Liebhardt *et al.*, 1990). Otros aspectos que limitan el uso eficiente de los forrajes fibrosos es su elevado costo relativo, debido a su bajo contenido de nutrientes disponibles por unidad de peso. Asimismo, se requieren grandes espacios de almacén por el gran volumen que estos ocupan. Sin embargo, se reconoce que el uso de tales recursos es una necesidad insoslayable, toda vez que de no hacerlo, éstos se convierten en basura que contamina, en pérdidas importantes de nutrientes para el humano y de materia prima para múltiples procesos industriales (Mozammel y Mostafa, 1992).

Dentro del rumen tiene lugar la digestión de la celulosa y otros polisacáridos de las plantas con que se alimentan una gran cantidad de mamíferos herbívoros. La fermentación se lleva a cabo gracias a la actividad de poblaciones microbianas. Una gran cantidad de especies de mamíferos son no rumiantes y por lo tanto, carecen de las enzimas necesarias para digerir la celulosa, que es el polisacárido más abundante en la biósfera. De este modo, el beneficio social y económico que le reportan a la humanidad algunas especies de animales domésticos como la vaca, la oveja y la cabra, entre otras, es de incalculable valor. A través de estas especies de animales, los seres humanos pueden incorporar a su dieta, enormes volúmenes de energía y proteína de excelente valor biológico, así como un aporte moderado de minerales y vitaminas mediante el consumo de una variedad de alimentos de origen animal. En este contexto, el uso de preparados enzimáticos y aditivos químicos podría contribuir a:

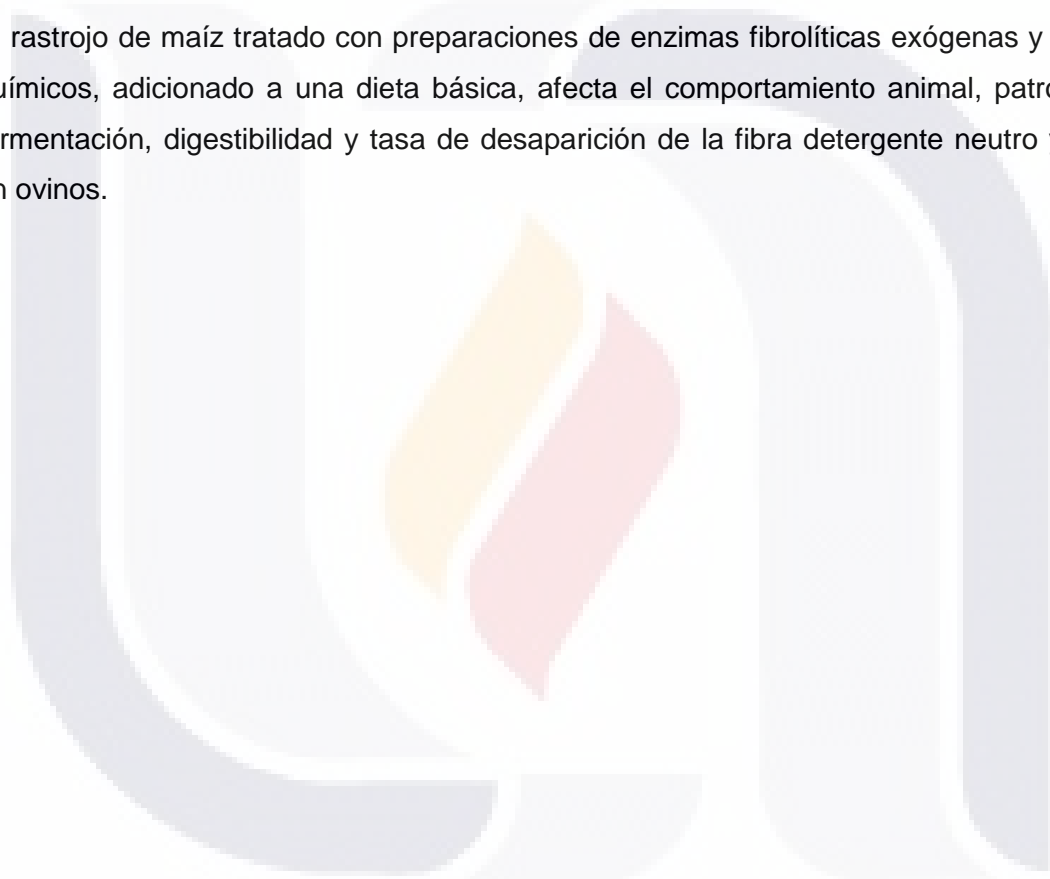
- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Hacer un uso más eficiente de los forrajes fibrosos que México produce año tras año e incorporarlos como alimentos de origen animal de elevado valor biológico al consumo de los seres humanos.
 - Evitar pérdidas de peso en la época de estiaje y crecimiento escalonado, en bovinos para carne, ovinos y caprinos.
 - Reducir costos de producción y de crianza de reemplazos y mantenimiento de vientres improductivos durante la gestación en sistemas extensivos y semi-intensivos de bovinos productores de carne, ovinos y caprinos.
 - Reducir los ciclos de producción en bovinos productores de carne a 3-4 años para hacer la ganadería de México más competitiva respecto a los Estados Unidos, Canadá y la Unión Europea.
 - Evitar las ventas masivas de animales en la época crítica del año, a precios desleales.
 - Evitar muertes masivas de ganado por inanición sobre todo en las zonas desérticas y semidesérticas de México, así como la consecuente pérdida anual de inventario ganadero.

Existe la necesidad de realizar investigaciones que conduzcan a una mejor utilización y aprovechamiento de los esquilmos agrícolas (rastros/pajas), siendo la utilización de enzimas fúngicas (tanto de preparaciones comerciales como de preparaciones novedosas) una de las estrategias más promisorias en la actualidad, en combinación sinérgica con aditivos químicos.

3.1. Hipótesis

Los tipos de preparaciones enzimáticas fibrolíticas exógenas y la adición de productos químicos modifican la tasa y velocidad de degradación de los componentes fibrosos de la pared celular, las proporciones de ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico), el patrón de nitrógeno amoniacal ($N-(NH_3)$) e incrementan la digestibilidad y tasa de desaparición de la materia seca del rastrojo de maíz bajo condiciones *in vitro* e *in situ*.

El rastrojo de maíz tratado con preparaciones de enzimas fibrolíticas exógenas y aditivos químicos, adicionado a una dieta básica, afecta el comportamiento animal, patrones de fermentación, digestibilidad y tasa de desaparición de la fibra detergente neutro y ácido, en ovinos.



4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de preparaciones enzimáticas fibrolíticas exógenas y aditivos químicos sobre la degradación de los componentes de la pared celular de la fibra de rastrojo de maíz, los patrones e indicadores de la fermentación ruminal mediante la producción de gas *in vitro*, la tasa de desaparición de la fibra y digestibilidad *in situ* y el comportamiento *in vivo* en borregos.

4.2. Objetivos específicos

1. Evaluar *in vitro* la tasa de degradación y digestibilidad del rastrojo de maíz tratado con preparaciones enzimáticas fibrolíticas exógenas a diferentes tiempos, solas o en combinación con aditivos químicos, en comparación con el testigo del mismo sustrato.
2. Evaluar *in vitro* el efecto de tratar el rastrojo de maíz con preparados enzimáticos y aditivos químicos sobre indicadores y patrones de la fermentación ruminal, cinética de la biomasa microbiana e indicadores de la liberación de energía, mediante la técnica de producción de los gases.
3. Evaluar la digestibilidad *in situ* a diferentes periodos de incubación ruminal de la materia seca (MS) y tasa de desaparición de la fibra detergente neutro (FDN) del rastrojo de maíz con y sin tratamiento enzimático y químico.
4. Evaluar los efectos de la actividad enzimática exógena y aditivos químicos sobre el rastrojo de maíz tratado y adicionado a una dieta base sobre el comportamiento productivo en ovinos, patrones de concentración de ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal, tasa de degradación de las fracciones residuales de la fibra y digestibilidad por cenizas insolubles, en ovinos.

5. Correlacionar los resultados de digestibilidad y tasas de degradación de los componentes fibrosos de la pared celular, derivados de las etapas *in vitro* e *in situ* con las variables de comportamiento animal medidas en la etapa *in vivo*.



5. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1. Factores que afectan el valor nutricional de los forrajes

5.1.1. Fracciones principales de la fibra

Existe una gran variación en la composición física y química de los forrajes, y ésta a su vez, tiene efectos marcados sobre el grado de aprovechamiento por el animal. Sin embargo, la mayoría de los investigadores concuerdan en que el grado de madurez, la especie forrajera y algunos elementos climáticos especialmente la temperatura, afectan considerablemente la calidad nutricional de la mayoría de los forrajes (Villanueva, 1998). Dichos factores deben ser tomados en cuenta si se desea hacer un uso más eficiente del potencial nutricional de los forrajes.

Un análisis detallado sobre las diferentes fracciones de la fibra fue propuesto por Van Soest y Robertson (1985) donde se utilizan dos tipos de sustancias para separar y cuantificar los diferentes componentes estructurales de la fibra. La porción que es insoluble en detergente neutro, según estos autores, está compuesta básicamente por celulosa, hemicelulosa, lignina, cutina y sílice, a la cual se denomina fibra detergente neutro (FDN), ésta, constituye esencialmente la pared celular y correlaciona inversamente con el consumo voluntario del animal. La porción que es insoluble en un detergente ácido, constituida básicamente por celulosa, lignina, cutina y sílice, después que la hemicelulosa fue disuelta, recibe apropiadamente el nombre de fibra detergente ácido (FDA), ésta, correlaciona inversamente con digestibilidad. Ambas fracciones de la fibra se determinan al hervir en un digestor, una muestra de materia seca del forraje o del alimento previamente pesada durante una hora, y al final por diferencia de peso, se obtiene la materia seca desaparecida (MSD) y la materia seca residual (MSR).

Por lo tanto, mejorar la digestibilidad de los forrajes es uno de los principales objetivos de los programas de mejoramiento genético (Méchin *et al.*, 2001). Por mucho tiempo la estimación de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y digestibilidad

han servido como parámetros decisivos en la calidad de los forrajes. En muchos estudios se ha encontrado una correlación alta y negativa entre la fibra detergente neutro con la digestibilidad, motivo por el cual, FDN es el predictor más fácilmente medible de la ingesta animal. Dado que aproximadamente el 70% de la variación en la producción animal se atribuye a las diferencias en el potencial de la ingesta del ganado (Stendal *et al.*, 2006), la selección dirigida a reducir la concentración de FDN se ha usado como un mecanismo para mejorar la capacidad de ingesta de los rumiantes (Casler, 2005). La pared celular no es completamente digestible debido a muchos procesos que se llevan a cabo dentro de ella, pero la digestión está más inversamente correlacionada con el porcentaje de lignificación que ocurre durante su desarrollo (Hatfiel y Fukushima, 2005). La lignina se ha reconocido como un indicador de baja calidad especialmente en pastos tropicales y subtropicales, los cuales tienen menor digestibilidad que los pastos de climas templados (He *et al.*, 2003); se sabe que la digestibilidad de la celulosa varía inversamente al contenido de lignina, por lo tanto FDA, está correlacionada negativamente con la digestibilidad. Una dieta rica en lignina es poco digestible y se considera de baja calidad. No obstante, los forrajes de pastos, los de gramíneas cultivadas como el maíz y los de leguminosas como la alfalfa, cuando presentan bajo contenido de lignina, favorecen la producción animal reduciendo los costos.

5.1.2. Formación de la pared celular y calidad del forraje

El contenido celular es el material no lignificado fácilmente solubilizado en detergente neutro; constituye la parte más disponible del forraje para el animal; está compuesto por lípidos, azúcares, ácidos orgánicos, nitrógeno no proteico, proteína soluble y pectinas (Van Soest, 1982).

Las paredes celulares de las plantas son los mayores reservorios de carbono fijado en la naturaleza, la pared celular forma tres capas morfológicamente bien diferenciadas denominadas: pared primaria, lámina media y pared secundaria. Estas le confieren rigidez y estructura a los forrajes.

- La pared primaria contiene de 9 a 25% de celulosa. Largas moléculas no ramificadas de celulosa se enlazan para formar fibras cilíndricas llamadas microfibrillas, las cuales

están inmersas en una matriz de otros materiales, como hemicelulosa (que constituye el 25-50% de la pared primaria), sustancias pécticas (10-35%) y proteínas (10%).

- La pared secundaria, está conformada por tejidos xilemáticos, que cuando maduran dan sostén a la planta; esta pared es mucho más gruesa que la primaria y está compuesta por celulosa (41-45%), hemicelulosa (30%) y lignina (22-28%). Las sustancias pécticas se mantienen adheridas a células adyacentes y forman la lámina media.

El decremento de la degradabilidad de la pared celular durante la maduración limita el valor nutricional de los alimentos para los rumiantes. Los tallos maduros están formados principalmente por un tipo de xilema no degradable y la pared celular es compuesta por polisacáridos. La degradabilidad de la pectina permanece aún en estados de madurez, pero la degradabilidad de la celulosa y hemicelulosa se declina al tiempo en que el xilema secundario crece. La digestibilidad de la alfalfa, por lo tanto, se incrementaría si la lignificación del xilema secundario se redujera (Jung *et al.*, 2002).

Además, la arabinosa y xilosa (pentosas); glucosa, galactosa y manosa (hexosas); ramnosa y fructosa (6-desoxihexosas) y los ácidos galacturónico, glucurónico y 4-O-metil glucurónico (ácidos urónicos); y las ramnogalacturonanas, glucanos, mananos, xilanas y glucuromananas son los carbohidratos más abundantes de la pared celular (Miranda, 1998).

5.1.2.1. Pectinas

Son compuestos que se encuentran inmersos en la pared primaria celular y lámina media y están conformados por cadenas de ramnogalacturonana (I y II; constituida por residuos de 4, α -D-galacturónico y 2, α -L-ramnosa) y homogalacturonana (que contiene uniones de residuos de 4, α -D-galacturónico cuyos grupos carboxilo están esterificados).

5.1.2.2. Celulosa

Es el polímero más abundante en las paredes celulares y está formada por unidades de glucopiranosilo con enlaces β (1-4); sus cadenas son planas con numerosos puentes de hidrógeno que le confieren sus propiedades físicas y químicas. El número de glucosas en una molécula de celulosa puede ser entre 50 y 15 000; cada una está en conformación de silla. Las cadenas de celulosa están unidas mediante puentes de hidrógeno formando microfibrillas que se agrupan en fibras, unidas por interacciones de van der Waals. En las paredes celulares de las plantas, las fibrillas de celulosa están muy densamente empaquetadas y dispuestas en haces paralelos; rodean la célula constantemente formando capas cruzadas. Estas fibrillas se hallan aglutinadas por una matriz de otros polímeros: hemicelulosa, pectina y extensina (Vilches, 2002; Macarron, 1992).

5.1.2.3. Hemicelulosa

Está constituida por varios heteropolisacáridos, los más abundantes son: xilanas, mananos y glucanos. Su función es unir la lignina a la celulosa (La Grange *et al.*, 2001; Macarron, 1992). Este grupo amplio de polisacáridos se une a la celulosa mediante múltiples puentes de hidrógeno. La porción principal de la hemicelulosa está constituida por xilanas (cadenas lineales de xilosas unidas por enlaces β (1-4) y cadenas laterales de residuos de arabinosa, ácido glucurónico y ácido 4-O-metil-glucurónico. Las β -1,4-xilanas son encontradas en la mayoría de las paredes secundarias de las plantas y representan más del 35% del total del peso seco de ciertas plantas.

Las xiloglucanas son cadenas de D-glucosa unidas por enlaces β (1-4), sustituidos por cadenas laterales de xilosa, galactosa y fructosa; las xiloglucanas se asocian a las microfibrillas de celulosa. Su disponibilidad es variable y su determinación se logra con la acción combinada de FDN y FDA.

5.1.2.4. Lignina

Es un polímero grande de elevado peso molecular que se forma por deshidrogenación enzimática de alcoholes derivados del fenilpropano. Las enzimas mediadoras que la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

forman, acoplan los monolignoles en las paredes celulares y funciona como mecanismo de soporte, transporte de agua y minerales y defensa vascular de plantas terrestres (Hatfield y Fukushima, 2005). Se puede decir por lo tanto que el papel de la lignina es cementar los polisacáridos de la pared vegetal y actuar como barrera contra la degradación microbiana del material lignocelulósico (Macarron, 1992).

No obstante, dado a que su propia hidrólisis requiere varias condiciones debido a su complejidad química, la lignina limita la utilización de la biomasa de la planta, reduciendo la digestibilidad del forraje (He *et al.*, 2003); después de su oxidación se obtienen derivados alcohólicos que pueden clasificarse en tres grupos: *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico. De los primeros se derivan los ácidos *p*-cumárico y ácido ferúlico, de los cuales se sintetiza la lignina. En otros estudios, la lignina es formada por una polimerización rápida de monolignoles que tiene resultados similares en la degradabilidad, mientras que en la oxidación se acoplan xilanas a la lignina (Grabber, 2005).

Algunos estudios indican que el ácido ferúlico impacta negativamente la degradación de la pared celular especialmente de tejidos jóvenes, lo que sugiere que la concentración de ácido ferúlico en uniones estéricas de los polisacáridos de la pared celular primaria provee la iniciación de los sitios de unión de la lignina (Jung *et al.*, 1998; Morrison *et al.*, 1998). Por otra parte, cada unidad de lignina disminuye en dos unidades la degradabilidad de la pared celular, en consecuencia, una reducción en la concentración de lignina o ácido ferúlico se asocia a un incremento en la digestibilidad del forraje (Delgado *et al.*, 2002; Grabber, 2005). En pastos el papel que juegan los enlaces de ácido ferúlico en las uniones con los xilanos y la lignina, resulta en paredes menos degradables (Hatfield *et al.*, 1999).

Debido a la complejidad de la biosíntesis de la pared celular de las plantas, aún es pobremente conocido el mecanismo en que la lignina restringe la degradación de la fibra (Grabber, 2005); esto limita el progreso en el desarrollo de cultivares con mejor digestibilidad.

Dado que la lignina es un polímero altamente resistente a la degradación y generalmente pasa a través del rumen sin modificaciones, es difícilmente medida en los forrajes (Hatfield

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y Fukushima, 2005). Numerosos métodos han sido diseñados para medir los niveles de lignina en diferentes especies de plantas, su determinación y valoración se puede realizar mediante el uso de permanganato dando lugar a la llamada lignina permanganato, o bien usando ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 72%, para separarla de la celulosa, lo que comúnmente se conoce como lignina detergente ácido (LDA). Recientemente, el uso del bromuro de acetilo ha recibido especial atención como método de determinación. Actualmente se determina a partir del residuo que queda después de la determinación de la fibra detergente ácido, es decir, después de remover la hemicelulosa (Van Soest y Robertson, 1985).

5.1.2.5. Lignocelulosa

Es insoluble en detergente ácido (FDA). Se compone de celulosa, lignina y compuestos nitrogenados de reacciones de Maillard (los cuales son producidos entre proteínas y carbohidratos a causa de un calentamiento excesivo).

5.1.2.6. Sílica

Este componente reduce considerablemente la digestibilidad de la fibra. Se determina por tratamientos de cenizas insolubles en ácido bromhídrico (HBr).

5.1.3. Grado de madurez

El grado de madurez en muchos casos está correlacionado con la época del año, sobre todo en gramíneas. En el caso del rastrojo de maíz el proceso de madurez es rápido, pues se asocia con el fin del ciclo productivo, ya que al llenar el grano se translocan los nutrientes de la biomasa vegetal al grano, entonces sobreviene un proceso acelerado de madurez fisiológica. No obstante, aún en especies perennes ocurre una senescencia de gran parte del material vegetativo y su calidad disminuye. En un experimento donde se evaluó el rendimiento de PC ($kg\ ha^{-1}$) para cuatro especies de gramíneas, se observó en todos los casos una reducción considerable al pasar de una época a otra dentro del mismo año. Los zacates Rhodes (*Chloris gayana*, Kunth), anual sin riego; Buffel

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(*Cenchrus ciliare* L.), perenne sin riego; y *Lolium* (*Lolium multiflorum*), anual con dos riegos de auxilio, tuvieron descensos de 1600, 1200 y 1550 a 700, 400 y 1050 kg de PC para las tres especies en el orden indicado. Sólo en el caso del zacate Ballico (*Lolium perenne*) con riego constante ocurrió un ligero aumento al pasar de otoño-invierno a primavera-verano, por estar siempre bajo riego. Los autores concluyeron que el contenido de PC fue significativamente superior ($p < 0.01$) en la época otoño-invierno, puesto que gran parte de la cosecha se realizó entre septiembre y diciembre, mientras que en las mediciones realizadas entre febrero y abril (reportadas como primavera-verano) el contenido de PC fue considerablemente menor. Ellos también señalaron que las especies *Chloris gayana* y *Cenchrus ciliare* fueron mucho más afectadas que las de *Lolium*, encontrándose una interacción época x especie significativa ($P < 0.01$) y de igual manera la interacción de ambas especies de *Lolium* por época también resultó significativa ($P < 0.01$). Estos resultados indican que la calidad, en este caso medida en función del contenido de PC, fue afectada por la época del año, el tipo de especie forrajera y el nivel de humedad disponible (Tirado *et al.*, 1999).

Resultados parecidos fueron reportados por Chávez *et al.* (1984) quienes evaluaron algunos indicadores de la composición química, digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO) y el promedio de energía metabolizable (EM), en muestras aleatorias de la dieta que consumían bovinos productores de carne en un rancho en el norte de México. Los resultados indican la tendencia general a disminuir el contenido de PC, la EM (Mcal kg^{-1} de MS) y la DIVMO, en tanto que el porcentaje de FDN, celulosa y lignina aumentaron al pasar por las etapas de crecimiento, floración, madurez y latencia. Otros investigadores han encontrado resultados similares. Estos resultados destacan las variaciones de comportamiento en la composición química para algunos componentes celulares, la DIVMS, DIVMO y contenido de EM (Mcal kg^{-1} de MS). Sin embargo, en un primer caso se trató de bovinos pastoreando en un matorral inerme parvifolio, mientras que en el otro caso se trató de un pastizal amacollado arborescente. De todos modos, las tendencias resultaron muy parecidas aún tratándose de indicadores distintos. Finalmente, ya que el contenido de lignina se incrementa con el tiempo de duración del depósito, se han encontrado correlaciones negativas entre el tiempo de maduración y los parámetros de calidad relacionados con la fibra (Braden y Smith, 2004).

5.1.4. Especie y temperatura

Existe una gran variación también en la composición química de los forrajes debido a la especie y la temperatura. Los pastos perennes de zonas cálidas generalmente presentan mayores contenidos de carbohidratos estructurales (CE) que aquéllos que son de climas fríos (Van Soest, 1982). No obstante, el contenido de almidón y pectina es considerablemente mayor en las leguminosas que en los pastos de gramíneas, en tanto que los pastos presentan un contenido considerablemente mayor de hemicelulosa y un contenido de celulosa moderadamente más alto. Esto indica que existen diferencias marcadas entre gramíneas y leguminosas y entre zonas climáticas. Windham *et al.* (1983) realizó un estudio comparativo entre tres pastos de gramínea de clima cálido y tres de clima frío. Encontró que las concentraciones de celulosa resultaron más altas en las especies de clima cálido que en las de climas fríos variando de 319 g kg⁻¹ a 251 g kg⁻¹ de MS. Las concentraciones de hemicelulosa promediaron 354 g kg⁻¹ y 245 g kg⁻¹ de MS, para los climas cálidos y frío, respectivamente. Sin embargo, no se observó una tendencia clara en la proporción de hemicelulosa a celulosa entre especies, las cuales fueron de 0.76 para zacate Bermuda [(*Cynodon dactylon* (L.), Pers.)] y de 1.18 para el zacate Orchard (*Dactylis glomerata* L.) para ambos tipos de clima cálido y frío. Resultados semejantes fueron reportados por Cherney *et al.* (1988). Por su parte Buxton *et al.* (1987) encontraron que la proporción de hemicelulosa a celulosa varió de 0.57 a 0.70 en pastos maduros de climas templados y de 0.32 a 0.40 en leguminosas maduras.

5.1.5. Efecto de la temperatura

Respecto al efecto particular de la temperatura, se presume que el punto inicial de incidencia sobre el proceso de formación de carbohidratos estructurales y otros componentes menos digestibles durante la formación de la pared celular, lo hace mediante condicionar la actividad de las enzimas implicadas en la producción de fotosintatos y en la derivación de éstos, ya sea a la estructuración de las paredes celulares, o a la acumulación de metabolitos del contenido celular. Debido a que existen reacciones que determinan la síntesis de los constituyentes de la pared celular, se presume que éstas son reguladas por enzimas (Nishitani y Masuda, 1979). Se sabe en

general que la función de una enzima es reducir la energía de activación (E_a) requerida para la reacción de un proceso. Todas las enzimas actúan a una temperatura óptima, aunque por encima de ésta, probablemente interfiere con la afinidad y unión enzima-sustrato, al cambiar la conformación tridimensional de ellas (Nobel, 1988). Es posible que la temperatura influya en las concentraciones de varios constituyentes de la pared celular y las uniones entre ellos. Lamentablemente, no existe virtualmente información disponible, concerniente a los efectos directos de la temperatura sobre las reacciones que provocan la formación de las paredes celulares en las plantas. No obstante, existe un conjunto de evidencias circunstanciales, como por ejemplo, la relación generalmente positiva que se da entre la temperatura y las concentraciones de material estructural (Wilson *et al.*, 1991), las cuales sugieren la existencia de pasos de control, dependientes de la temperatura, para discriminar entre fotosintatos a la pared celular y al contenido celular.

Dirven y Deinum (1977) mostraron un descenso de 80 g kg^{-1} de MS en la DIVMS en zacate Festuca (*Festuca arundinaceae* Schreb.) cuando la temperatura aumentó de entre 10 y 15°C a entre 20 y 25°C . Wilson y Minson (1980) resumieron los resultados de varios experimentos relacionando temperatura:digestibilidad y concluyeron que las hojas de pastos de zonas frías mostraron en promedio un descenso de 6.6 g kg^{-1} en DIVMS por cada grado centígrado de incremento en la temperatura durante el crecimiento de las plantas. Generalmente, los resultados tienden a evidenciar el hecho de que al aumentar la temperatura en la zona de crecimiento de las plantas, sobre todo en estados más avanzados de edad, suele aumentar la velocidad de formación de los componentes indigestibles de la pared celular en la mayoría de los forrajes.

5.1.6. Efecto de la lignina sobre la degradación de la fibra

La digestión de polisacáridos que forman parte de la pared celular en los forrajes fibrosos se ve fuertemente limitada por la presencia de compuestos polifenólicos (Akin y Chesson, 1990). Consisten primariamente de lignina y ácidos fenólicos que están químicamente ligados a la lignina o directamente a polisacáridos de la pared celular o a ambos (Ralph y Helm, 1993). La lignina es el principal componente no polisacárido de la pared celular en las plantas. Es considerada prácticamente indigestible por los rumiantes (Church y Pond, 1996) a la vez que está implicada en limitar la digestión de otros polisacáridos y proteínas

estructurales de la pared celular (Jung y Ralph, 1990). Las ligninas en los forrajes han sido llamadas tradicionalmente lignina medular (*core lignin*) y son polímeros fenilpropanoides altamente condensados formados a partir de una polimerización deshidrogenativa de los alcoholes precursores primarios *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico durante la formación de la pared secundaria (Dean y Eriksson, 1992). Por otra parte, la denominada lignina no medular (*non-core lignin*) incluye ácidos fenólicos esterificados y eterificados, los cuales pueden estar unidos a la lignina medular o directamente a los polisacáridos de la pared celular (Jung y Deetz, 1993). La lignina no medular se puede extraer de la pared celular mediante el uso de álcalis o ácidos, mientras que las ligninas medulares son resistentes a tales reactivos. Para Jung y Deetz (1993) la lignificación es la deposición general de fenilpropanoides en el desarrollo de la pared celular de la planta. Es este proceso biosintético el elemento clave para entender cómo los tipos de lignina limitan la degradabilidad de los polisacáridos de la pared celular en el rumen.

La correlación negativa entre la concentración de lignina y digestibilidad del forraje es bien conocida, sobre todo dentro de una misma especie en varios estados de crecimiento (Reeves, 1987). Sin embargo, dicha relación no siempre se mantiene entre especies diferentes o entre especies a un mismo estado de desarrollo (Jung y Casler, 1991; Jung y Russell, 1991). Por ejemplo, se ha encontrado que la concentración de lignina generalmente es mayor en leguminosas que en los zacates a estados similares de desarrollo, pero a concentraciones iguales de lignina las leguminosas son más digestibles que las gramíneas. Un estudio conducido por Buxton y Russell (1988) evaluó la relación entre contenido de lignina y digestibilidad de la pared celular en zacate Bromo Suave (*Bromus inermis* Lyss.), zacate Orchard (*Dactylis glomerata* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), trébol Pata de Pájaro (*Lotus corniculatus* L.) y trébol rojo (*Trifolium pratense* L.). Ellos concluyeron que el efecto inhibitorio de la lignina permanganato sobre la extensión de la digestibilidad de la FDN fue 62% mayor en zacates que en las leguminosas. Cuando se usó un análisis de correlación para describir por separado la relación entre contenido de LDA y MS digestible para zacates y leguminosas, se obtuvieron asociaciones de correlación negativa, sugiriendo una relación distinta entre gramíneas y leguminosas respecto a lignina y digestibilidad (Van Soest, 1964). Se observó que generalmente a

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

niveles similares de digestibilidad, los niveles de LDA en las leguminosas fueron dos veces mayores a los observados en las gramíneas.

Aunque aún no se entiende completamente el mecanismo por el cual la degradación de la celulosa y la hemicelulosa en el rumen es limitada por los compuestos fenólicos, se cree que la estrecha asociación física que la lignina guarda con estos componentes, así como la cantidad de enlaces covalentes que entre ellos se establecen, son los factores principales que limitan el acceso de las enzimas hidrolasas producidas por los microorganismos del rumen a los sustratos de forrajes fibrosos (Chesson, 1993). Se ha demostrado que con el uso de materiales mutantes de sorgo, maíz y mijo perla [*Pennisetum glaucum* (L). R. Br.] bajos en lignina, en comparación con sus isólinas normales, se produce una relación negativa entre la concentración de lignina y la digestibilidad del forraje; indicando además, que los mutantes de nervadura marrón son típicamente bajos en concentración de lignina y más digestibles que sus respectivas líneas normales (Weding *et al.*, 1989). Sin embargo, debe puntualizarse que las diferencias entre los genotipos mutantes y los normales, con relación a la tasa de degradación de los componentes de la pared celular, son tanto cualitativas (tipo de conformación física entre lignina y carbohidratos estructurales) como cuantitativas (cantidad de enlaces covalentes entre lignina y carbohidratos estructurales (Fritz *et al.*, 1990). También cuando se ha delignificado el forraje mediante algunos agentes químicos oxidativos se ha incrementado la digestibilidad de otros constituyentes de la pared celular. Se han usado con ese propósito permanganato de potasio y peróxido de hidrógeno (Fahey *et al.*, 1993).

El punto de mayor atención son los ácidos fenólicos de la matriz de la pared celular, especialmente los ácidos *p*-cumárico y ferúlico. Ambos existen como monómeros unidos por enlaces ésteres y éteres y como dímeros (Hartley y Ford, 1989). Cuando se han evaluado las concentraciones de estos ácidos fenólicos esterificados en zacates se observa que éstos aumentan con la maduración fisiológica de los pastos, pero en la mayoría de los casos es atribuible al aumento en concentración de los niveles del ácido *p*-cumárico (Iiyama y Lam, 1990). En el caso del ácido ferúlico se han observado concentraciones iguales de enlaces ésteres y éteres cuando se trata de pastos de gramíneas, en cambio es mucho menor la concentración de residuos esterificados para el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ácido *p*-cumárico. Por su parte, Jung y Deetz (1993) en una revisión de varios autores, sobre las concentraciones de lignina no medular en el forraje de diversas especies de gramíneas, cultivadas y no cultivadas, observaron mayor concentración de ácido *p*-cumárico esterificado para la mayoría de las especies cuando se trata del tallo, siendo comparativamente menor la concentración de ácido ferúlico esterificado, excepto en los casos de las láminas de las hojas e internudos superiores de zacate Bromo Suave, zacate Switch y trigo. Sobresalió especialmente la alta concentración de ácido *p*-cumárico en el tallo del maíz, que además no posee formas esterificadas para ambos ácidos ferúlico y *p*-cumárico, pero sí contiene los dos tipos de enlace que se conjuntan en el ácido dehidroferúlico. Esto sugiere que la digestibilidad del rastrojo de maíz podría ser comparativamente menor, sobre todo cuando la relación hoja:tallo sea muy baja. Estudios posteriores mostraron que el ácido *p*-cumárico fue el responsable por la correlación negativa con la digestibilidad de los forrajes, y permitió concluir a algunos investigadores, que su forma esterificada tiene mayor poder para inhibir la degradación de la pared celular de los forrajes, que el ácido ferúlico (Buxton, 1989; Fritz *et al.*, 1990); aunque tal conclusión no ha sido consistente e incluso ha llegado a ser cambiada o revertida (Jung y Ralph, 1990). Más bien, es posible que los residuos de ácido ferúlico implicados en los puentes de enlaces éteres y ésteres entre arabinoxilanas y lignina medular, estén en mayor proporción en los genotipos menos digestibles que en aquéllos más digestibles. Chesson (1988) propone que el sitio preciso de ubicación de los enlaces ésteres en el complejo arabino-xilanas es el factor principal que explica la digestibilidad aumentada de los forrajes de gramíneas cuando han sido tratados con álcalis.

5.2. Degradación de las fibras en el rumen

El rumen es una auténtica cámara de fermentación para las pajas y rastrojos, ya que posee una población abundante y variada de microorganismos, principalmente bacterias y algunos hongos (Hungate, 1966; Bauchop, 1981; Hobson *et al.*, 1988) que producen ciertas enzimas con actividad fibrolítica en condiciones anaerobias, temperatura estable (alrededor de 40° C) y pH adecuado (entre 6.5 y 7.5). La alteración de estos estándares por cambios bruscos, especialmente del tipo de alimentación reduce notablemente la actividad microbiológica, con la consiguiente pérdida de degradación del sustrato. La celulosa es degradada principalmente por las especies de bacterias *Ruminococcus*

flavafaciens, *R. albus* y *Fibrobacter succinogenes* (Bryant, 1973). En el caso de la hemicelulosa son esencialmente las mismas especies, sólo se añade la especie *Butyrivibrio fibrisolvens*, la cual tiene importancia menor en la degradación de celulosa, pero juega un papel importante en la degradación de xilanas.

La degradación de la celulosa se produce por contacto directo de las bacterias celulolíticas con el sustrato cuando éstas se adhieren a la superficie de la pared celular, colocando las enzimas que producen en contacto estrecho con el sustrato. La hidrólisis completa de la celulosa se alcanza mediante la acción de varias enzimas extracelulares que se encuentran ya sea en la superficie del organismo o son secretadas al medio circundante. Estas enzimas pueden ser endo β (1-4) glucanasas que rompen en forma aleatoria en sitios clave los polisacáridos en oligosacáridos, liberando celobiosa; exo β (1-4) glucanasa que atacan los oligosacáridos terminales no reducidos, liberando celobiosa; y β (1-4) glucosidasa, que degrada la celobiosa a glucosa. La celulosa aislada es degradada completamente por los microorganismos del rumen, pero se limita su aprovechamiento total cuando está asociada con la lignina. La formación de una red compleja celulosa-lignina crea una celulosa cristalinizada o cristalina que reduce notablemente el acceso del ataque enzimático a la celulosa, lo cual disminuye su degradación y aprovechamiento en forma proporcional al grado de cristalización al compararla con sustratos purificados (Coughlan, 1992). No obstante, esto último no debe tomarse como un patrón establecido (Hatfield, 1993b).

Para degradar la hemicelulosa actúan las enzimas endo y exo-glucanasas que depolimerizan y solubilizan las cadenas principales del polisacárido. Enseguida los residuos hemicelulósicos son degradados mediante un grupo específico de glicosidasas (Dehority, 1993). Su degradación generalmente es parcial, pues los residuos de xilosa se reportan como menos digestibles que la arabinosa, y el complejo xilosa:arabinosa, se correlaciona negativamente con la digestibilidad del forraje y hasta es usado como un indicador de la calidad del mismo (Albrecht *et al.*, 1987).

Las pectinas son degradadas dentro del rumen por enzimas de actividad pectínolíticas y pectínesterasas (White *et al.*, 1993). En adición a las bacterias celulolíticas que degradan

las pectinas, la especie *Lachnospira multiparus* es considerada como la pectinolítica más importante (Dehority, 1993).

5.3. La proteína cruda y la actividad de los microorganismos del rumen

La PC es considerada como uno de los nutrientes más importantes en la dieta de los animales, puesto que pequeñas variaciones en contenido de proteínas en los alimentos, produce fuertes efectos en los procesos fisiológicos como la reproducción, crecimiento y/o engorda y lactancia (Gutiérrez, 1991). La mayoría de los esquilmos agrícolas son generalmente bajos en este nutriente e incluso también lo son en el contenido de nitrógeno no proteico (NNP), lo cual constituye una fuerte limitante para la utilización eficiente de esta clase de forrajes (Gutiérrez, 1991). Cuando el nivel de nitrógeno en el líquido ruminal es deficiente, la población de microorganismos disminuye, incluyendo las bacterias fibrolíticas, lo cual hace que se reduzca la degradación de los componentes de la pared celular y por consecuencia, disminuye el grado en que el alimento es digerido, la tasa de paso del alimento a través del tracto digestivo y el consumo de alimento.

Para que la población microbiológica del rumen continúe creciendo y se mantenga en la cantidad apropiada para realizar una actividad eficiente, se requiere que el nivel de amonio al interior del rumen, se mantenga por encima de los 200 mg de N L⁻¹ por un periodo considerable de días para asegurar una alta tasa de crecimiento microbiana, a la vez que paralelamente se incrementa la digestión del forraje (Leng, 1991; Church y Pond, 1996). Por su parte Satter y Slyter (1974) sugirieron que entre 50 y 80 mg de nitrógeno amonio (N-NH₄) L⁻¹ de fluido ruminal, es el valor óptimo para mantener al máximo el crecimiento microbiano, dato que ha sido ampliamente aceptado. Sin embargo, otros estudios realizados en Australia han indicado que el nivel óptimo de amonio en el fluido ruminal debe ser alrededor de 200 mg de N L⁻¹ para forrajes de baja digestibilidad; incluso hasta cuando la digestibilidad del forraje en bolsas nylon alcanzó su punto óptimo a los 100 mg de N-NH₃ L⁻¹ (Perdok *et al.*, 1988). El contenido de PC y/o NNP varía en función de la especie forrajera, la edad de la planta, época del año y condiciones climáticas. Por ejemplo, existen evidencias de que las especies de pastos de gramíneas de metabolismo C4 tienen comparativamente mayores concentraciones de carbohidratos estructurales y

menor cantidad de PC que las de metabolismo C3. Respecto a las condiciones climáticas se ha encontrado que las especies forrajeras de climas cálidos tienden a depositar una mayor cantidad de carbohidratos estructurales en sus paredes celulares que se correlaciona con un menor contenido de PC (Thorvaldsson, 1992). Por otra parte, las épocas del año en que se induce la floración y la senescencia de las especies forrajeras, o bien, cuando la especie en forma natural alcanza su estado de madurez fisiológica por edad, también se correlacionan con una menor disponibilidad de PC y mayor cantidad de carbohidratos estructurales y compuestos lignocelulósicos (Villanueva, 1998). De modo que, cualesquier factor que provoca una disminución en el contenido de PC y del contenido de NNP, impacta en forma negativa el crecimiento en las poblaciones bacterianas en el rumen y por consecuencia limita la producción de enzimas fibrolíticas, lo que ocasiona una reducción en el aprovechamiento de las fibras de los forrajes.

5.4. Aplicaciones de nitrógeno no proteico

Una cantidad importante de trabajos de investigación reportan efectos positivos sobre la aplicación de nitrógeno a las dietas ricas en forrajes con elevados contenidos de fibra, principalmente pajas de cereales y rastrojo de maíz, en las décadas de los 70 y los 80. Probablemente la práctica más difundida es la amonificación del forraje, porque aumenta la cantidad de N disponible en el alimento, lo que a su vez mejora la digestibilidad y el consumo de MS por el animal. Corah (1990) revisó los resultados de varios trabajos sobre amonificación de pajas en Estados Unidos y Canadá y reportó un doble efecto positivo, se incrementó el contenido de N y el consumo de alimento. Sundstol (1991) reportó incrementos porcentuales en digestibilidad de la materia orgánica (DMO) y consumo de MS de forrajes tratados con urea, amonio e NaOH, respecto a forrajes no tratados. Estos y muchos otros resultados dejan bien establecido el papel importante que juega el contenido de PC y de NNP, sobre la degradación de los forrajes a nivel del rumen. Por lo tanto, existe la necesidad de liberar la mayor cantidad posible de compuestos nitrogenados de la pared celular de los forrajes, para mejorar la degradación de los carbohidratos estructurales e incrementar adicionalmente el aporte de energía.

5.5. Fermentación en el rumen

Dentro del rumen (también conocido como panza o herbario) tiene lugar la digestión de la celulosa y otros polisacáridos de las plantas con que se alimentan una gran cantidad de mamíferos herbívoros. La fermentación se lleva a cabo gracias a la actividad de poblaciones microbianas. Una gran cantidad de especies de mamíferos son no rumiantes y por lo tanto, carecen de las enzimas necesarias para digerir la celulosa que es el polisacárido más abundante en el reino vegetal, de este modo el beneficio social y económico que le reportan a la humanidad algunas especies de animales domésticos como la vaca, la oveja y la cabra, entre otras, es de incalculable valor. A través de estas especies de animales, los seres humanos pueden incorporar a su dieta enormes volúmenes de energía y proteína de excelente valor biológico, así como un aporte moderado de minerales y vitaminas mediante el consumo de una variedad de alimentos de origen animal.

El alimento permanece en el rumen alrededor de 9 horas. Durante este periodo el conjunto de enzimas hidrolasas que liberan las bacterias y protozoarios celulolíticos, descomponen la celulosa en disacáridos de celobiosa y unidades de glucosa libre. La glucosa ahora experimenta una fermentación bacteriana produciendo AGV principalmente acético, propiónico y butírico y otros gases como bióxido de carbono y metano. Posteriormente los AGV pasan a través de la pared del rumen al torrente sanguíneo y luego el animal los oxida como su fuente principal de energía. Los niveles de AGV en un rumen estable son 60 mM de acetato, 20 mM de propionato y 10 mM de butirato (Bruck *et al.*, 1987). Un incremento en la tasa de descomposición de la celulosa y de todo el complejo de la matriz de la pared celular es deseable, si se quiere utilizar de manera más completa y eficiente la energía potencial de los forrajes fibrosos, en particular el rastrojo de maíz, las pajas de cereales y otros subproductos de cosechas y subproductos agroindustriales.

5.6. Principios activos de las preparaciones enzimáticas fibrolíticas exógenas

Independientemente de la mezcla básica y de la forma que tome el producto final, se pueden señalar específicamente dos grupos de enzimas que forman parte de las preparaciones fibrolíticas disponibles en el mercado: 1) Celulasas. Son una mezcla compleja de proteínas que actúan para hidrolizar enlaces β (1-4) en las cadenas de celulosa de la pared celular; 2) Xilanasas. Actúan para separar los xilanos que se encuentran enganchados por enlaces éster a las cadenas de hemicelulosa a través de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico.

Hipotéticamente, estas preparaciones comerciales de enzimas exógenas pueden actuar iniciando la degradación de polisacáridos estructurales, previo a la digestión ruminal, o complementando la actividad de enzimas fibrolíticas producidas por los microorganismos del rumen (Dawson y Tricarico, 1999).

Algunos autores resumen la actividad de estas enzimas de la siguiente manera (Murrieta *et al.*, 2002; Idareta, 2004; Pastor, 2004; Redondo, 2004):

- **Endo- β -glucanasas (E.C. 3.2.1.4):** Rompen los enlaces β -glucosídicos en forma aleatoria, principalmente enlaces internos de las moléculas de celulosa en regiones amorfas, promoviendo un rápido decremento en la longitud de la cadena, un lento incremento de los grupos reductores libres y en consecuencia, sitios de ataque para las exoglucanasas.
- **Exo- β -glucanasas (Celobiohidrolasas; CBH; E.C. 3.2.1.91):** Atacan gradualmente las moléculas de celulosa por los extremos, liberando subunidades de celobiosa, dando como resultado un incremento rápido en los azúcares o grupos reductores y poco cambio en el tamaño del polímero. Dentro de las celobiohidrolasas, se distinguen dos tipos: celobiohidrolasas de tipo I (CBH I) y celobiohidrolasas de tipo II (CBH II), que se diferencian en su especificidad por el extremo de la molécula de celulosa que atacan. Mientras las CBH I actúan sobre los extremos reductores, las CBH II liberan unidades de celobiosa a partir de los extremos no reductores (Goikotxea, 2005).

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- **β -glucosidasas (E.C. 3.2.1.21):** Hidrolizan la celobiosa producida en pasos anteriores y celodextrinas de bajo peso molecular y participan indirectamente en la degradación de la celulosa al hidrolizar la celobiosa que inhibe las celobiohidrolasas.

La degradación total de la celulosa involucra el sinergismo entre los tres componentes enzimáticos: las endoglucanasas atacan las regiones amorfas de las fibras de celulosa creando así sitios de acción para las exoglucanasas que actúan sobre las regiones cristalinas de la fibra. Las β -glucosidasas ejecutan el último paso de la hidrólisis e impiden la acumulación de celobiosa (Vilches, 2002).

Además de las celulasas, las xilanasas son enzimas hidrolíticas que también participan en el rompimiento de enlaces glicosídicos β (1-4) de la celulosa y hemicelulosa. Los xilanos son heteropolisacáridos formados por un esqueleto de β -D (1-4) xilopiranosido, cuya degradación ocurre por la acción sinérgica de un grupo de enzimas (Ponce y Pérez, 2002; La Grange, 2001):

- **Arabinofuranosidasa (E.C. 3.2.1.55):** Hidroliza las cadenas laterales de arabinosa.
- **Acetil xilan esterasas (E.C. 3.1.1.72):** Liberan grupos acetatos.
- **Glucuronidasa (E.C. 3.2.1.139):** Remueve las cadenas laterales de ácido glucurónico a partir de unidades de xilosa.
- **β -xilanosidasas (E.C. 3.2.1.37):** Actúan sobre oligosacáridos cortos, llevando a cabo la hidrólisis de los enlaces β (1-4) aril-xilopiranosido para producir xilosa.
- **Endo- β -xilanasas (E.C. 3.2.1.8)** actúa sobre los xilanos y xilooligosacáridos produciendo una mezcla de xilooligosacáridos.

5.7. Uso de enzimas fibrolíticas exógenas en alimentación animal

Recientemente se han producido una gran cantidad de preparaciones enzimáticas comerciales a través de procesos de fermentación y de la biotecnología, que son

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

biológicamente activas y pueden ser agregadas a la dieta de los rumiantes para estimular y mejorar la digestión de los componentes fibrosos (Dawson y Tricarico, 1999). Actualmente ha crecido el interés por utilizarlas como suplementos en las dietas para rumiantes (Dawson, 1993). No obstante, se reconoce que la investigación sobre la aplicación de la tecnología de enzimas, para usarse en la producción de rumiantes, se encuentra en su etapa inicial. Recientemente se han realizado algunos estudios, para definir primero, las condiciones bajo las cuales las enzimas exógenas son más capaces de potenciar una respuesta positiva en producción. No obstante, aún no se sabe con exactitud si el mayor beneficio de la aplicación de enzimas ocurre en el pretratamiento del forraje con algún periodo largo de almacenamiento antes de usarse, o en el tratamiento previo de éste al momento de alimentar al animal o después de que el alimento ha entrado al animal (Howes, 1998).

Son numerosos los estudios realizados *in vitro* que han demostrado el efecto positivo de las preparaciones de enzimas fibrolíticas para mejorar los procesos asociados con la digestión de las fibras. Estos efectos generalmente están relacionados con un incremento en la tasa inicial de desaparición de la MS y en particular de la FDN. Cuando muestras de forrajes fibrosos son inoculados con bacterias de líquido ruminal de animales suplementados con enzimas, previamente o adicionando dosis de enzimas al cultivo *in vitro*, en la mayoría de los casos los efectos de aumento en la tasa de desaparición de la MS (TDMS) se observan entre 6 y 12 h (Dawson y Tricarico, 1999). Parece que tanto las enzimas naturales producidas por los microorganismos ruminales inoculados, como las exógenas añadidas, siguen el mismo patrón de comportamiento que se da en el ambiente ruminal de animales alimentados con forrajes fibrosos (Van Soest, 1994).

En un estudio realizado por Dawson y Tricarico (1999) donde se evaluó el efecto de añadir una preparación de enzimas fibrolíticas exógenas al cultivo *in vitro* de un sustrato fibroso, ellos observaron que la desaparición de la MS por hora se incrementó en un 17.1% durante las primeras 12 h, superando al testigo (4.25 contra 3.63%). En cambio a 18 h, el aumento sólo fue del 3.8% (2.90 contra 3.01%). Todo parece indicar que cuando se trata de sustratos altos en fibra, las enzimas exógenas potencian la digestión inicial de la actividad enzimática natural, pero después de 12 h, ocurre un fenómeno de compensación al inactivarse la enzima añadida. Ellos también evaluaron los procesos de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fermentación mediante la aplicación de tres preparaciones enzimáticas (celulasa, xilanas y celulasa + xilanas) a cultivos de sustrato de heno de *Festuca in vitro* contra un tratamiento testigo (líquido ruminal sin enzima). Se midieron los niveles de AGV totales, de acetato, de propionato, de butirato, utilización de carbohidratos (UC) y la proporción acetato:propionato. En general los tratamientos de enzima fueron superiores al testigo ($P < 0.05$) excepto en producción de acetato con la enzima celulasa y la tasa acetato:propionato con la enzima xilanas. Estos resultados muestran que la adición de enzimas afecta los patrones de fermentación *in vitro*.

En otro estudio, Tricarico *et al.* (1998) demostraron que tanto la TDMS como la UC fue superior ($P < 0.10$) en cultivos *in vitro* sobre heno de *Festuca* suplementado con Fibrozyme más líquido ruminal procedente de animales alimentados exclusivamente con heno de *Festuca* sin suplemento enzimático, en comparación con cultivos similares pero sin añadir enzimas al medio, aunque sólo hubo efecto a 12 h y no a 18 h. En otra fase de este mismo estudio la desaparición *in vitro* de la materia seca (DIVMS) fue mayor ($P < 0.05$) a 12 h, en los cultivos *in vitro* de heno de *Festuca*, inoculados con líquido ruminal de animales alimentados sólo con heno de *Festuca* suplementado con enzimas (Fibrozyme), en comparación con los cultivos que recibieron inóculos de animales alimentados con la misma dieta pero sin enzimas (testigo). Sin embargo, no mejoró la UC ni hubo efectos a 24 h. En cambio en otra dieta a base de heno de *Festuca* + 50% de concentrado no hubo diferencias entre tratamientos y testigo para la DIVMS ni a 12 ni 24 h. Sin embargo, la UC fue mejor ($P < 0.05$) tanto a 12 como a 24 h. Se observan efectos de especificidad de las enzimas fibrolíticas hacia dietas fibrosas. Aunque en ambos casos el efecto sobre la estimulación en la degradación de los componentes de la pared celular del forraje no son lineales respecto al tiempo ni al tipo de dieta. En la fase *in situ* de este estudio no se registró ningún efecto significativo sobre las mismas variables, incluyendo el pH.

Pinos-Rodríguez (1999) reportó incrementos significativos ($P < 0.05$) en la desaparición de la MS de alfalfa y ballico con la inclusión de dosis crecientes de enzima con líquido ruminal a 48 y 72 h; igualmente se registró un aumento en la desaparición de la FDN (DFDN) en ambas especies de 6 a 72 h así como la desaparición de la fibra detergente ácido (DFDA) de ballico de 3 a 12 h y la de alfalfa de a 3, 12, 24, 48 y 72 h ($P < 0.05$). La desaparición neta de la FDN de la alfalfa aumentó entre 48 y 72 h ($P < 0.05$), pero la de la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

FDA del ballico disminuyó a las 12 h ($P < 0.05$). Los resultados en general, muestran efectos no lineales sobre los parámetros estudiados cuando se combinan los factores: especie forrajera con tiempo y niveles de enzima.

Comportamientos parecidos a los indicados anteriormente fueron reportados por Beauchemin *et al.* (1995) quienes con dosis de inclusiones crecientes de enzimas sobre una dieta de alfalfa los promedios de ganancia diaria de peso en ganado siguieron una tendencia de tipo cuadrática, con valores mayores en niveles intermedios de inclusión de enzimas.

Resultados semejantes en estudios de laboratorio fueron reportados por Gwayumba y Christensen (1996), quienes también trabajaron con combinaciones de celulasa y xilanasas. La FDA disminuyó significativamente ($P < 0.05$) entre los forrajes tratados y el testigo. En heno de alfalfa (30.9 contra 19.9%), en el heno de pasto (36.1 contra 26.1%), paja de avena (55.7 contra 39%), grano molido (26 contra 20.7 %), ensilaje de cebada (27.7 contra 21%) y fenogreco maduro (57.0 contra 42.3%), respectivamente. En este mismo estudio, la fracción de la FDN decreció de manera similar ($P < 0.05$); en tanto que la proporción de proteína y carbohidratos disponibles aumentó considerablemente. Esto significa que se incrementó la disponibilidad de las diferentes fracciones de la pared celular de los forrajes referidos, a medida que las enzimas fibrolíticas degradaron tanto la porción de la FDA como la FDN.

Diversos estudios han sugerido que el uso de enzimas del tipo de la celulasa y xilanasas, pueden tener un efecto importante sobre la degradación de la celulosa y otros componentes adicionales de la pared celular, de modo que una mejora en la digestión del forraje, se traduce en una mayor velocidad de paso, y por lo tanto, una tasa de desaparición más rápida de los forrajes fibrosos del tracto ruminal (Lewis *et al.*, 1996).

En un estudio realizado, novillos de engorda recibieron heno de pasto o paja de cebada tratada con enzimas fibrolíticas suministrada a una tasa de 1.65 mL/kg de materia seca del forraje. En este caso mejoraron las digestibilidades de la materia seca (DMS), de la fibra detergente neutro (DFDN), y de la fibra detergente ácido (DFDA) (Lewis *et al.*, 1996). Algo semejante fue lo reportado por Feng *et al.* (1996) quienes observaron que mejoraron

significativamente las digestibilidades de la MS, FDN y FDA cuando novillos productores de carne fueron alimentados en forma directa con enzimas fibrolíticas.

Por otra parte, Fredeen y McQueen (1993) reportaron un incremento de la digestibilidad del 4.9% en un ensilado de una mezcla de leguminosa (alfalfa) y gramínea (Timothy) al cual se añadió una preparación de enzimas y luego se administró a borregos.

En un estudio metabólico realizado por Pinos-Rodríguez (1999), donde se aplicaron dosis crecientes de enzimas (Fibrozyme) vía cánula ruminal a cuatro borregos, se encontró una mejora ($P<0.05$) en la digestibilidad *in situ* de la MS, FDN y FDA. Además, mejoró la digestibilidad aparente de los nutrientes nitrogenados en alfalfa, así como el N retenido para ambos forrajes ($P<0.05$). También, aumentó la concentración de AGV totales por efecto de las enzimas a 3 y 6 h en ambos forrajes, disminuyó el porcentaje de acetato y la proporción acetato:propionato a 3 h con ballico y el butirato a 12 h con alfalfa y aumentó el propionato y butirato a 3 h con ballico ($P<0.05$).

Zinn y Salinas (1998) evaluaron la influencia del Fibrozyme sobre la digestión de la fibra en un primer experimento (E1) y su correlación con el consumo y crecimiento de novillos alimentados con una dieta para crecimiento con 78% de concentrado en un segundo experimento (E2). En E1 se trataron novillos vía cánula rumen/duodenal. En E1 se incrementó la digestión ruminal de la FDN en un 23% con la adición de la enzima (Fibrozyme) y también mejoró en 5% la digestión ruminal del nitrógeno ($P<0.05$). En E2 aumentó el peso final en 3%, el promedio de ganancia diaria de peso en 6% y el consumo de materia seca en 4.5%. Concluyen que un aumento en consumo es el reflejo del incremento en la digestión de la FDN. Además, concluyeron que en dietas altas en energía la adición de enzimas puede estimular la digestión de la fibra y por consecuencia mejorar el consumo de MS y el crecimiento animal.

En otro estudio realizado por Lewis *et al.* (1996) señalan que aunque la tasa de desaparición de la MS no difirió significativamente entre sustratos *in situ*, la tasa de desaparición de la FDN sí fue más rápida para los pastos tratados con enzimas que en los no tratados. Anteriormente Stokes (1987) ya había obtenido resultados semejantes a los reportados por Lewis *et al.* (1996), al utilizar el ensilado de pasto-leguminosa tratado con

enzimas. Además, Feng *et al.* (1996) obtuvieron resultados similares a los consignados anteriormente, cuando aplicaron enzimas directamente a pasto seco antes de la alimentación. Por otro lado, cuando el sustrato de pasto no fue tratado con enzimas, las tasas de desaparición de la MS y de la FDN no difirieron entre tratamientos, indicando una menor degradación de la fibra del forraje (Lewis *et al.*, 1996).

Por otra parte, cuando se emplearon enzimas fibrolíticas en dietas ricas en grano, se observó una importante interacción entre éste y el tipo de forraje fibroso; denotando además, que no hubo una mejora sustantiva en la digestión de los ingredientes, lo cual indicó a su vez una alta especificidad de las enzimas para actuar sobre determinados componentes de la dieta (Beauchemin *et al.*, 1997). Sin embargo, al usar enzimas específicas para fibras en dietas altas en ésta, el comportamiento es diferente. Treacher *et al.* (1996), en el segundo de tres experimentos al alimentar 98 novillos Simmental x Charolais durante 120 días, usando una mezcla de celulasas y xilanasas a cuatro niveles de concentración sobre el ensilaje de cebada y cebada rolada, registraron un incremento significativo lineal en el peso de los animales a medida que aumentó el nivel de la mezcla de enzimas. Además, los efectos cuadráticos sobre el promedio de ganancia diaria, eficiencia en conversión alimenticia y digestibilidad de la materia seca también fueron importantes a medida que cambió el nivel de enzimas en la dieta.

Maki *et al.* (1998) no encontraron efecto alguno sobre la desaparición de la MS y el pH *in situ* para la interacción de tiempo de medición x niveles de enzima en cebada rolada y entera, sin embargo, en la cebada rolada+enzima (2.4 L/t de MS) se incrementó significativamente la digestibilidad de la MS, lo cual se reflejó en un pH más bajo. En este sentido existen evidencias de que las enzimas fibrolíticas exógenas pueden servir para minimizar las depresiones en la digestión de la fibra en periodos de bajo pH ruminal (Lewis *et al.*, 1996; Dawson y Tricarico, 1999). No obstante, respecto a esta variable los resultados son inconsistentes pues una gran cantidad de investigadores no han encontrado alteraciones por la aplicación de enzimas, aunque es más común que disminuya cuando se incrementa la degradación de la fracción neutra de la fibra.

Yescas *et al.* (2004) al evaluar dos dosis (0 y 1 g kg⁻¹) de la enzima comercial Fibrozyme, la cual contiene particularmente xilanasas y endoglucanasas, en rastrojo de maíz y avena,

encontraron que la concentración de aminoácidos fue mayor a las 12 h para los tratamientos sin enzima que en los tratamientos con enzima. Así mismo, se han reportado respuestas positivas a la cantidad de Fibrozyme, asociada al incremento de consumo y mayor digestibilidad de la materia seca en becerros alimentados con diferentes dietas. Otros autores indican que Fibrozyme puede incrementar la ingesta de nutrientes de la caña de azúcar lo que mejora la ganancia diaria de peso (Gómez-Vázquez *et al.*, 2003). Además, la adición de enzimas exógenas en la ingesta directa en borregos, puede incrementar la digestibilidad de la proteína cruda, hemicelulosa y FDN en heno de alfalfa y Rye Grass, mejorar el balance de N e incrementar la concentración de AGV (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002). Todo lo anterior indica que las enzimas fibrolíticas pueden cambiar la fermentación ruminal, la ingesta y digestibilidad de los forrajes con diferentes valores nutritivos.

Por otra parte, Tricarico y Dawson (2005) emplearon dos preparaciones de enzimas comerciales Allsyme PT y Allsyme C, y sus combinaciones para probar la producción de AGV *in vitro* en varias dietas. Estos autores encontraron que la adición de xilanasas incrementó la producción de AGV totales en una dieta a base de heno de festuca ($P < 0.05$) sin cambio en la proporción acetato:propionato. Por otra parte, la adición de endoglucanasa incrementó la producción total de AGV en una dieta basada en heno de festuca en un 36%. La combinación xilanasas+endoglucanasa aumentó la producción de AGV y redujo la proporción de acetato:propionato; los efectos de la suplementación de dichas enzimas en la producción de AGV *in vitro* variaron dependiendo de los sustratos utilizados; la suplementación con endoglucanasa redujo consistentemente la proporción acetato:propionato en todos los sustratos probados. Estos resultados sugieren que la actividad de la xilanasas puede ser más importante en dietas que contienen alfalfa y la actividad de la endoglucanasa puede ser más importante en dietas que contienen heno de pasto o maíz. Se observó que el efecto de la combinación de ambas enzimas fue generalmente más alto que el de las enzimas individuales; la actividad de la endoglucanasa y xilanasas difieren en la capacidad para afectar la producción de AGV en el rumen. Por lo que la endoglucanasa mejora la eficiencia de la fermentación pero reduce la proporción acetato:propionato.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Eun *et al.* (2007a) evaluaron las actividades de productos enzimáticos que contenían endoglucanasas y xilanasas sobre heno de alfalfa. Estos productos tienen un rango amplio de actividad de endoglucanasas y xilanasas en sustratos puros y condiciones típicas del rumen. Se determinaron la degradabilidad de la materia orgánica y la concentración de AGV a 18 h de incubación y se encontró correlación entre la actividad de las endoglucanasas y la degradabilidad de la materia orgánica ($r=0.71$; $P<0.01$). La producción de AGV no fue afectada por los tratamientos con las enzimas, no obstante que se observaron cambios en la proporción acetato:propionato. Yang *et al.* (2002) encontraron resultados similares al evaluar el efecto del pH y la adición de enzimas fibrolíticas en dietas de vacas lecheras sobre tasas de fermentación, digestibilidad y síntesis de proteína bacteriana. Encontraron que la concentración total de AGV y sus proporciones molares se incrementaron de manera lineal con el pH; la degradación de la materia seca, orgánica y fibra (a excepción de PC) fueron afectadas por el pH. Al igual que en el caso anterior la suplementación con enzimas no modificó la concentración total de AGV, aunque sí se incrementaron las proporciones molares del acetato y se redujeron las del propionato como resultado de la degradación de la FDN y FDA. En este mismo estudio, hubo una interacción entre el pH y el nivel de suplementación con enzimas para la digestión de la fibra.

5.8. Perspectiva actual del uso de las enzimas fibrolíticas exógenas

El uso de enzimas exógenas como aditivos para el mejoramiento de la degradabilidad de la materia seca, orgánica y fibras de los forrajes de baja calidad aún es objeto de estudio; algunos autores no han observado efectos de enzimas fibrolíticas producidas por hongos o provenientes de bacterias, sobre la degradación de la materia orgánica (Ferreira *et al.*, 2006; Bergamaschine *et al.*, 2006). Sin embargo, hay reportes aparentemente contradictorios en muchos de los trabajos, por lo que no hay resultados concluyentes (Souza *et al.*, 2006 a, b y c). Algunos autores reportan incrementos lineales en la producción de gases, AGV totales y digestibilidad de la materia orgánica con respecto a la dosis al utilizar preparados con endoglucanasas y xilanasas en diferentes proporciones (Tricarico y Dawson, 2005; Colombatto *et al.*, 2007).

OTROS TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Otros preparados que combinan diferentes dosis y tipos de estas polisacaridasas, han demostrado, en pruebas *in vitro* que emulan condiciones típicas del rumen (pH 6.0 a 39°C), que tales enzimas pueden incrementar la digestibilidad de la materia orgánica y la producción total de gases y que estas variables correlacionan con la actividad de endoglucanasas ($r=0.71$; $P<0.01$), por lo que experimentalmente, las endoglucanasas y las xilanasas aplicadas por separado pueden mejorar sustancialmente la degradación de sustratos como el heno de alfalfa, lo cual no ocurre al combinar ambas enzimas (Eun y Beauchemin, 2007b). Al respecto, Eun *et al.* (2007b) al probar *in vitro* la adición de 1.4 mg/g MS de diferentes productos de enzimas fibrolíticas (con distintas proporciones de endoglucanasas y xilanasas por gramo de MS, tanto en heno de alfalfa como en ensilado de maíz, encontraron mejoras en la degradabilidad de la FDN tanto para el heno de alfalfa como para ensilado de maíz (20.6 y 60.3%, respectivamente), efecto asociado con la actividad de las endoglucanasas y exoglucanasas, pero no con la actividad de las xilanasas, lo cual sugiere que tanto la dosis de la enzima suplementada como la proporción de endoglucanasas y xilanasas son de importancia crítica para el mejoramiento de la degradabilidad de las fibras.

Los cocteles multienzimáticos también pueden resultar útiles para mejorar la calidad de ciertos sustratos. Yu *et al.* (2005) al evaluar un coctel multienzimático (ácido ferúlico esterasa, xilanasas y celulasas, endo-glucanasas (I y II) y β -glucanasas), encontraron que la adición de este coctel a los forrajes incrementó la degradabilidad *in vitro* con líquido ruminal: en cáscara de avena: 12%; en paja de trigo: 5%; y en alfalfa: 2%. Eun y Beauchemin (2007b) probaron diferentes preparados enzimáticos que contenían endoglucanasas, exoglucanasas, xilanasas y proteasas en heno de alfalfa y ensilado de maíz, observaron incrementos cuadráticos en la producción de gas y degradación de la materia seca, siendo mayor el efecto de las polisacaridasas en ensilados de maíz que el de las proteasas; así mismo, la combinación de polisacaridasa y enzimas proteolíticas de los preparados han mostrado incrementos en la degradación de la FDN del ensilado de maíz.

Por otra parte, existen evidencias de que el tiempo de pretratamiento o momento de aplicación de la enzima tiene efectos sobre las digestibilidades de la materia seca y de las fibras. Por ejemplo, McAllister *et al.* (1999) al evaluar un preparado comercial enzimático

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aplicado al momento del ensilaje o directamente en el rumen, encontraron que las digestibilidades de la materia seca y de la FDN fueron menores cuando las enzimas se aplicaron en el rumen directamente; en cambio, al suministrar en la dieta un 82.5% de ensilado de cebada tratado con el preparado de enzimas (0, 1.25, 3.5 y 5 L/t MS) se observó un efecto lineal en el aumento de peso de 24 becerros evaluados entre 0 y 56 días (ganancia diaria de peso: 0.06 kg; consumo: 0.04 kg; eficiencia alimenticia: 0.03 kg), con efecto cuadrático con las concentraciones de enzima. Dosualdo *et al.* (2006) reportaron resultados similares cuando al evaluar tres tipos de ensilado, uno sin enzimas y dos con preparados enzimáticos bacterianos comerciales (Maize All de Alltech y Biomax de Christian Hansen) y seis periodos de fermentación (0, 3, 7, 14, 28 y 56 días) observaron efectos de la interacción entre inoculante y tiempo de fermentación sobre los contenidos de materia seca y proteína cruda, siendo estos mayores para los ensilados con enzimas. Así mismo, los contenidos de FDN y FDA tuvieron decrementos de 0.302 y 0.063 unidades porcentuales por día, respectivamente mientras que la digestibilidad *in vitro* de la materia seca se incrementó con el tiempo de fermentación a razón de 0.054 unidades/día. También se han encontrado incrementos de la degradación de las fibras y hemicelulosa cuando enzimas comerciales (Liquicell 2500, Specialty Enzyme and Biochemicals, Fresno, CA, USA) son evaluadas a pH ruminal casi neutro (Colombatto *et al.*, 2007).

Souza *et al.* (2006a, b) no encontraron efectos en la digestibilidad de la materia orgánica, pH ruminal o promedio de nitrógeno amoniacal de bovinos alimentados con Tifton 85 (*Cynodon sp.*) y suplementados con 12 g/día/animal de un complejo enzimático de los hongos *Aspergillus niger* y *Trichoderma longibrachiatum*. No obstante, estos mismos autores sí reportaron incrementos de la digestibilidad aparente total de la FDN, FDA y celulosa (de 36.9, 36.2 y 46.9% a 41.2, 40.0 y 50.5%, respectivamente) al utilizar la misma enzima y misma dosis en ensilado de maíz (Souza *et al.*, 2006c). Esto muestra que el tipo de sustrato también puede afectar la actividad de las enzimas. Gómez-Vazquez *et al.* (2003) al evaluar el efecto de Fibrozyme (Alltech; complejo enzimático comercial de *Aspergillus niger* y *Trichoderma longibrachiatum*) sobre la ganancia de peso de becerros alimentados con caña de azúcar tratada con urea (USC) observaron una respuesta positiva relacionada al nivel de enzima (dieta control con Stargrass: 484; USC+0: 584; USC+15: 634 y USC+30: 776 kg, respectivamente) asociada al incremento

del consumo de la caña de azúcar y mayor digestibilidad de la MS que del grupo control (dieta control: 65%; USC+0: 73.4%; USC+15: 71.4% y USC+30: 72%). Sin embargo, esto también muestra que puede existir sinergismo entre el nivel de enzima y otros aditivos nitrogenados. Eun *et al.* (2006) evaluaron la capacidad de de las enzimas EX (endoglucanasas y xilanasas) y PROT (proteasas) para incrementar la degradación *in vitro* de la cáscara de arroz tratada y no tratada con amoníaco. En este trabajo, tanto la producción de gas como la degradabilidad de la cáscara de arroz se incrementaron por la amonificación. Este sinergismo puede indicar que la amonificación remueve compuestos fenólicos, rompiendo complejos lignina-carbohidratos y por lo tanto, incrementado la accesibilidad de la enzima a su sustrato. Finalmente, se puede concluir que el efecto de las enzimas varía de acuerdo a condiciones tales como dosis de la enzima, combinación de las enzimas contenidas en el aditivo, tipo de sustrato, momento de aplicación de la enzima, pretratamiento, pH ruminal y el efecto sinérgico que puede existir entre la enzima y otros aditivos químicos y orgánicos que pueden hacer más disponibles a sustratos como la celulosa, hemicelulosa y proteínas para polisacaridasas y proteasas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Etapa *in vitro*

6.1.1. Área de estudio

El trabajo se desarrolló en el Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags., México, contando con la colaboración del Laboratorio de Microbiología Pecuaria del Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Edo. de México, México. Además, se contó con la colaboración del Laboratorio de Nutrición Animal del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Jesús María, Ags., México y el Laboratorio de Nutrición Animal del Programa de Ganadería del Colegio de Posgraduados, Montecillo, Edo. de México, México.

6.1.2. Materiales de estudio

En el presente trabajo se evaluaron dos preparaciones enzimáticas comerciales:

1) Fibrozyme® (Alltech, Inc., Nicholasville, KY, USA) producida a partir del cultivo de *Aspergillus niger* y *Trichoderma viride*, cuya actividad principal es xilanasa y en menor escala celulasa, es decir atacan los enlaces que existen entre los heteropolímeros de hemicelulosa (xilosas, manosas, pectinas y celulosa, entre otros). Su actividad enzimática fue ampliamente evaluada por Ranilla *et al.* (2008) a pH 6.5 y 39° C; donde 1 g de preparado enzimático liberó 583 µmol de xilosa por minuto a partir de xilano de cascarilla de avena y 163 µmol de glucosa por minuto a partir de carboximetilcelulosa.

2) Promote® (N.E.T., Cargill Inc., Agribands Int., St. Louis, MO, USA) es una preparación enzimática de tipo líquido, con actividad celulasa y xilanasa producida por extracto de fermentación de *Trichoderma longibrachiatum*. La actividad enzimática, medida como

micromoles de azúcares reductores liberados por minuto a partir de celulosa, pH 5.0, 40°C, fue de 1200 unidades de actividad celulasa (ACU por sus siglas en Inglés) por gramo de preparación enzimática (Balci *et al.*, 2007).

Los aditivos químicos utilizados en este trabajo fueron el hidróxido de calcio (calhidra Calpac®) y urea (FOGASA, filial del Grupo Industrial Lechero, S. A. del Estado de Aguascalientes, México). También se adquirió en esta empresa la melaza empleada en la preparación de una solución melaza: agua, que se usó como vehículo de aplicación de los aditivos químicos y los preparados enzimáticos a las muestras experimentales de rastrojo de maíz. Además se utilizó rastrojo de maíz proveniente de la región de las cosechas de 2007 y 2008 y adquirido comercialmente. Originalmente, éste fue molido en malla de ½ pulg., y posteriormente se molió de nuevo en malla de 1 mm, en molino Wiley (Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA, USA) para ser utilizado en las muestras experimentales de la etapa *in vitro* como se describió previamente. Se utilizó una técnica diferente para evaluar la digestibilidad y utilizarla posteriormente en la estimación del valor nutricional del rastrojo de maíz, por lo tanto el protocolo fue ajustado a la nueva metodología y se requirió una cantidad considerablemente menor de sustrato al previsto originalmente (10 kg de rastrojo de maíz), para la primera etapa experimental.

6.1.3. Diseño y aplicación de tratamientos

Se aplicó 1.5 g de Fibrozyme por kilogramo de materia seca a muestras de 50 g de rastrojo de maíz molido en malla de 1 mm y el equivalente de 2 g de Promote por cada 10 kg de rastrojo de maíz en base seca. En este caso se tomaron muestras de 80 g de rastrojo de maíz, para evitar errores por variaciones en vista de la cantidad tan pequeña que se utilizó de Promote. En el caso de los aditivos químicos, tanto de urea como de hidróxido de calcio (calhidra), se aplicó la proporción del 1.5 % sobre la base seca del rastrojo de maíz molido. Se evaluaron 17 tratamientos que a continuación se describen:

1. Muestras de rastrojo de maíz sin aplicación de aditivo químico ni preparado enzimático; éste fue el testigo (T0).

2. Muestras de rastrojo de maíz que recibieron Fibrozyme o Promote sin aplicación de aditivos químicos, a dos tiempos de aplicación: 24 o 0 h antes de la incubación *in vitro*.
3. Muestras de rastrojo de maíz que fueron primero tratadas con los aditivos químicos 48 h antes de la incubación *in vitro* y posteriormente recibieron los preparados enzimáticos a 24 h o 0 h, previo a la incubación *in vitro*, como se describe en el punto anterior.

Los aditivos se aplicaron en combinaciones fijas con Fibrozyme o Promote en forma independiente, ya que en ningún caso se combinaron los dos preparados enzimáticos, aunque sí se combinaron los dos aditivos químicos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diseño de tratamientos etapa *in vitro*.

No.	Tratamiento	Dosis %	Total %	No.	Tratamiento	Dosis %	Total %
T0	Testigo	0	0.0	T9	F0+U	0.15+1.5	1.65
T1	F24	0.15	0.15	T10	F0+C	0.15+1.5	1.65
T2	F24+U	0.15+1.5	1.65	T11	F0+C+U	0.15+0.75+0.75	1.65
T3	F24+C	0.15+1.5	1.65	T12	P0+U	.02+1.5	1.52
T4	F24+C+U	0.15+0.75+0.75	1.65	T13	P0+C	.02+1.5	1.52
T5	P24	.02	0.02	T14	P0+C+U	.02+0.75+0.75	1.52
T6	P24+U	.02+1.5	1.52	T15	F0	0.15	0.15
T7	P24+C	.02+1.5	1.52	T16	P0	0.02	0.02
T8	P24+C+U	.02+0.75+0.75	1.52				

T0=testigo, C=hidróxido de calcio, U=urea. F24 ó P24: Aplicación de las enzimas 24 h antes de la incubación *in vitro*, F0 ó P0: Aplicación de las enzimas a 0 h (al iniciar la incubación *in vitro*).

Los tratamientos químicos y enzimáticos fueron aplicados a las muestras de rastrojo de maíz mediante una solución que contenía 8 partes de agua más 2 partes de melaza y el equivalente de solución líquida aplicada fue del 50% de agua por unidad de peso seco de rastrojo de maíz, realizando previamente el ajuste correspondiente del contenido de humedad del rastrojo de maíz para aplicar la humedad complementaria al 50%, así como de los pesos específicos del rastrojo del maíz y de la solución vehículo para hacer finalmente el ajuste de peso/peso; por ejemplo en el testigo (T1): Rastrojo + solución melaza:agua, se usaron 25 g de rastrojo en base seca, y por lo tanto el equivalente de

agua destilada fue de 12.5 mL, que corresponde al 50% previamente establecido, de modo que el ajuste correcto de la solución melaza:agua aplicada se hace mediante la relación:

Si en 1 mL de sol. melaza:agua ----- hay 0.8 mL de agua destilada
Cuánto se necesitará (x) ----- para 12.5 mL de agua destilada?

De modo que: $x = (1 \times 12.5)/0.8$, de donde se deduce que $x = 15.625$ mL de solución melaza:agua. Este procedimiento se repitió en todos los tratamientos, realizando en cada caso el ajuste de la cantidad de solución melaza:agua de acuerdo a la cantidad de rastrojo utilizado en cada muestra y de acuerdo a cada tratamiento (Cuadro 2).

Para el testigo (T0) al principio se realizó la aplicación total de dicha solución sobre las muestras de rastrojo molido, luego se procedió a mezclarlos cuidadosamente hasta lograr una distribución homogénea de la solución con el sustrato, evitando a todo tiempo la formación de grumos; este procedimiento mecánico de mezclado y homogenización sustrato-solución se repitió en todos los tratamientos. Finalmente las muestras preparadas fueron guardadas en bolsas Ziploc. En los tratamientos que incluyeron únicamente las preparaciones enzimáticas (F ó P), el total de la solución melaza:agua se aplicó 24 h (F24 y P24) ó 0 h (F0 y P0) antes de la incubación *in vitro*. En el caso de los tratamientos que incluyeron tanto preparaciones enzimáticas como aditivos químicos, el volumen total de la solución melaza:agua se dividió en dos partes iguales; se utilizó la mitad para aplicar primero el aditivo químico (C, U ó C+U) el cual se mezcló hasta lograr su homogenización completa; esto se hizo 48 h antes de la incubación *in vitro*. Posteriormente, a 24 h o a 0 h se llevó a cabo la aplicación de las preparaciones enzimáticas, utilizando la mitad restante y bajo el mismo cuidado. La melaza tuvo el propósito de aportar energía en previsión y para amortiguar los efectos de los aditivos ricos en NNP; además la melaza se usó como un adherente para favorecer un mayor contacto tanto de los aditivos químicos como de los preparados enzimáticos a las partículas del forraje en estudio.

Cuadro 2. Composición de las muestras experimentales por tratamiento.

<p>Tratamiento 0 (Testigo): Rastrojo + solución melaza:agua (T0) Rastrojo: 25 g en base seca (BS) Solución melaza:agua=15.625 mL</p>	<p>Tratamiento 6: Rastrojo + P24 + Urea (P24+U) Rastrojo: 80 g BS Promote: 0.014 mL Urea: 1.2 g Solución melaza:agua =50 mL</p>
<p>Tratamiento 1: Rastrojo + Fibrozyme 24 h (F24). Rastrojo: 50 g BS Fibrozyme: 0.075 g Solución melaza:agua =31.25 mL</p>	<p>Tratamiento 7: Rastrojo + P24 + Cal (P24+C) Rastrojo: 80 g BS Promote: 0.014 mL Cal: 1.2 g Solución melaza:agua =50 mL</p>
<p>Tratamiento 2: Rastrojo + F24 + Urea (F24+U) Rastrojo: 50 g BS Urea: 0.75 g Fibrozyme: 0.075 g Solución melaza:agua =31.25 mL</p>	<p>Tratamiento 8: Rastrojo + P24 + Urea + Cal (P24+U+C) Rastrojo: 80 g BS Promote: 0.014 mL Urea: 0.6 g Cal: 0.6 g Solución melaza:agua =50 mL</p>
<p>Tratamiento 3: Rastrojo + F24 + Cal (F24+C) Rastrojo: 50 g BS Fibrozyme: 0.075 g Cal: 0.75 g Solución melaza:agua =31.25 mL</p>	<p>Tratamientos con Fibrozyme a 0 h (F0)^a Tratamiento 9: mismo que el 3 Tratamiento 10: mismo que el 4 Tratamiento 11: mismo que el 5 Tratamiento 15: mismo que el 2</p>
<p>Tratamiento 4: Rastrojo + F24 + Urea + Cal (F24+U+C) Rastrojo: 50 g BS Fibrozyme: 0.075 g Urea: 0.375 g Cal: 0.375 g Solución melaza:agua =31.25 mL</p>	<p>Tratamientos con Promote a 0 h (P0)^b Tratamiento 12: mismo que el 7 Tratamiento 13: mismo que el 8 Tratamiento 14: mismo que el 9 Tratamiento 16: mismo que el 6</p>
<p>Tratamiento 5: Rastrojo + Promote 24 h (P24). Rastrojo: 80 g BS Promote: 0.014 mL Solución melaza:agua =50 mL</p>	

^aCorresponden a los mismos componentes de los tratamientos indicados, pero Fibrozyme fue aplicado al momento de iniciar la incubación *in vitro*; ^bCorresponden a los mismos componentes de los tratamientos indicados, pero Promote fue aplicado al momento de iniciar la incubación *in vitro*.

6.1.4. Técnica de producción de gas

La técnica de producción de gas *in vitro* (Menke y Steingass, 1988) se propuso en el presente trabajo como una alternativa a la técnica tradicional de digestibilidad *in vitro* de Tilley y Terry (1963). Se juzgó conveniente sustituir la técnica de digestibilidad *in vitro* por la técnica de evaluación de la cinética ruminal de producción de gases, ya que ésta aporta una cantidad considerablemente mayor de información, en comparación con la primera que sólo evalúa una variable (digestibilidad *in vitro* a un tiempo específico). El propósito fue lograr una mayor eficiencia, al obtener mayor información a partir de este protocolo.

La técnica de producción de gas mide la cantidad de gas liberado directamente como un producto de la fermentación e indirectamente desde el fluido ruminal neutralizado, ya que la energía que requieren los microorganismos del rumen para su crecimiento deriva de la fermentación de los carbohidratos, principalmente almidón y celulosa, cuya digestión anaerobia produce ácidos grasos volátiles (AGV), succinato, formato, lactato, etanol, dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), y trazas de hidrógeno (H₂); sin embargo, ellos también aportan esqueletos de carbono esenciales para la síntesis de biomasa microbiana (Schofield *et al.*, 1994). La producción de metano ocurre sólo a expensas de la síntesis de ácido acético y butírico, ya que de acuerdo con la estequiometría de Hungate (1966) a partir de un mol de glucosa se obtienen 2 acetatos + 2 CO₂ + 8 H⁺; a su vez un mol de glucosa produce un butirato + 2 CO₂ + 4 H⁺; mientras que un mol de glucosa + 4 H⁺ produce 2 propionatos + 2 H₂O. Por lo tanto, el gas es producido principalmente cuando el sustrato es fermentado hasta acetato y butirato. La fermentación del sustrato hasta propionato produce gas solamente desde la neutralización del ácido; por consiguiente, una menor producción de gas se asocia con la fermentación propiónica, de modo que dietas altas en granos son más eficientes en aportar energía a los rumiantes, debido a una mayor producción de propionato, y consecuentemente, una menor producción de acetato, butirato y CH₄; mientras que dietas altas en forrajes fibrosos, provocan una mayor producción de CH₄, a expensas de una mayor producción de acetato y butirato (Getachew *et al.*, 1998). Por otra parte, la producción de gas desde la fermentación de la proteína es relativamente pequeña y la derivada desde la grasa es insignificante (Makkar, 2001).

Por lo tanto, las moles de CO₂ producidas pueden ser calculadas desde la cantidad y proporción molar de acetato (a), propionato (p) y butirato (b), y una vez las moles de CO₂ son conocidas, se pueden calcular las moles de CH₄ (Blümmel *et al.*, 1997; Makkar, 2001). De acuerdo con la estequiometría de Wolin (1960) se asume que el balance de oxidación neta de todos los productos es igual a cero ($a+p+b+CO_2+CH_4=0$), que el CO₂ y el CH₄ son producidos únicamente desde el acetato y el butirato y que aproximadamente, el doble de la cantidad de CO₂ y CH₄ es generada desde la formación de butirato ($CO_2+CH_4=a+2b$). Después de algunas sustituciones, la ecuación resultante es: $CO_2=a/2+p/4+1.5*b$. Una vez las moles de CO₂ son conocidas, las moles de CH₄ pueden ser calculadas de acuerdo a: $CH_4=(a+2b)-CO_2$ (Blümmel *et al.*, 1997; Makkar, 2001).

6.1.5. Protocolos previos a la preparación de las muestras experimentales

Antes de realizar las aplicaciones de los preparados enzimáticos y los aditivos químicos a las muestras de rastrojo de maíz molido en cada uno de los tratamientos diseñados, se determinó primero el contenido de humedad del sustrato, para lo cual se colocaron en estufa cinco muestras de rastrojo de maíz previamente pesadas a 68° C durante 48 h, las cuales se pesaron al final y con el dato de humedad obtenido se realizó el ajuste a la base seca del sustrato y a su vez se determinó la aplicación correspondiente de la solución melaza:agua en la proporción ajustada. Enseguida se llevó a cabo un ensayo por duplicado de aplicación de aditivos químicos y preparados enzimáticos, conforme a los tratamientos diseñados utilizando la solución melaza:agua, la cual se aplicó a muestras piloto de 20 g cada una. Posteriormente se registraron los pesos de las muestras húmedas recién preparadas. Después se tomaron muestras por triplicado de cada tratamiento y se colocaron en estufa a 68° C por 48 h. Al final se registraron de nuevo los pesos secos y se obtuvo la humedad acumulada del rastrojo más la aplicada con la solución vehículo de melaza:agua. Este dato fue importante para calcular el equivalente de muestra húmeda que habría de pesarse más tarde para obtener el equivalente a una muestra de 0.5 g en base seca de cada tratamiento, las cuales se colocaron en los frascos color ámbar y se incubaron *in vitro*.

6.1.6. Elaboración de las soluciones base de la técnica de gas *in vitro*

Para preparar el inóculo estandarizado que esta técnica requiere se elaboraron cinco soluciones (Cuadro 1 A):

1. Carbonato de sodio al 8% (p/v) en agua destilada.
2. Solución mineral I [fosfato monoácido de potasio 0.6% (p/v) en agua destilada].
3. Solución mineral II [(fosfato diácido de potasio 0.6% (p/v); sulfato de amonio al 0.6% (p/v); cloruro de sodio al 1.2% (p/v); sulfato de magnesio 0.245% (p/v) y cloruro de calcio monohidratado 0.1% (p/v) en agua destilada].
4. Solución de resazurina al 1% (p/v).
5. Solución reductora de hidróxido de sodio 1 N al 4% (p/v): sulfuro de sodio al 1% (p/v): cisteína al 1% (p/v): 1 gota de solución de resazurina (1%) [50µL (v/v), en 50 mL de agua destilada]

El procedimiento sugerido consistió en preparar anticipadamente las primeras cuatro soluciones y guardarlas en refrigeración en tanto se prepararon las muestras experimentales del sustrato en estudio, que en nuestro caso fue el rastrojo de maíz con los tratamientos descritos. La solución reductora se preparó al final cuando ya se habían colocado las muestras de sustrato en los frascos color ámbar al momento de iniciar la fase de incubación *in vitro*. En el presente trabajo todas las soluciones se prepararon juntas porque se contó con suficiente personal. Es importante aclarar que el proceso completo de elaborar las soluciones y preparar el inóculo estandarizado para correr la fase de incubación *in vitro*, debe hacerse en forma rápida (1 hora o menos) para evitar errores por tiempo. En este caso dicho proceso se realizó en 50 minutos.

En forma paralela se calibró el baño María a 40° C y se colocó la combinación de las primeras cuatro soluciones en las siguientes proporciones por litro de solución mineral

reducida (SMR): 50 mL de Na₂CO₃: 75 mL de solución mineral I: 75 mL de solución mineral II: 750 mL de agua destilada: 50 mL de solución reductora.

6.1.6.1. Preparación del inóculo ruminal

1. Se preparó una cantidad suficiente de solución mineral reducida (SMR) en frascos de plástico con tapas equipadas con conductos adaptados para la aplicación de CO₂, se tomó en consideración la proporción de nueve partes de SMR por cada parte de líquido ruminal, así como la aplicación de 100 mL de esta mezcla a cada frasco para incubación *in vitro*.

2. Se prepararon 7.5 litros de SMR respetando las proporciones equivalentes por litro descritas anteriormente y disueltas en la parte proporcional de agua destilada. Al final se adicionaron 7 gotas de solución de resazurina, que correspondió a 1% p/v por litro de solución como señala la técnica. Esta se utilizó como indicador de óxido-reducción.

3. La SMR se colocó en dos frascos de plástico y en baño María bajo flujo continuo de bióxido de carbono con el fin de excluir el oxígeno disuelto y el aire del contenedor.

4. En seguida se adicionaron 50 mL de la solución reductora y se esperó hasta que desapareció el color característico de la resazurina (azul-rosa), antes de adicionar el líquido ruminal. La solución reductora se preparó en un matraz Erlenmeyer colocado sobre un agitador magnético con parrilla y se mantuvo caliente mientras se adicionaron los reactivos. La solución estuvo lista para adicionarse a la SMR (punto 3) cuando se volvió incolora.

5. Mientras este proceso estaba en marcha se procedió a extraer el líquido ruminal para la elaboración del inóculo. Se contó con líquido ruminal de dos muestreos sucesivos múltiples de diferentes estratos del rumen de una vaca fistulada (de aproximadamente 650 kg de peso) para garantizar la representación y proporción real de las diferentes especies de bacterias y de protozoarios de toda la cámara ruminal. Las dos muestras extraídas se mantuvieron en un termo cerrado para evitar su contacto con el aire durante su transporte al laboratorio. Posteriormente se procedió a mezclar ambas muestras piloto

de líquido ruminal, se filtró con la bolsa de gasa de ocho capas, se estabilizó y se homogenizó. Finalmente, se adicionó la proporción de 1:9 de líquido ruminal:SMR.

6.1.7. Establecimiento del experimento

Se aplicaron 100 mL del inóculo completo a cada frasco de color ámbar que contenía 0.8 g de rastrojo molido y se colocaron el tapón de látex y el arillo metálico de aluminio y se fijó con engargoladora. Al final todos los frascos fueron colocados en baño maría e inició el proceso de fermentación *in vitro*. Se inocularon 68 frascos, en número de cuatro repeticiones por tratamiento incluyendo al testigo (T0). Además, se incluyeron cuatro frascos que correspondieron a los blancos los cuales recibieron únicamente el inóculo sin muestra, por lo que se utilizaron un total de 72 frascos. Los frascos experimentales recibieron una muestra tomada al azar de cada una de las cuatro bolsas de rastrojo de maíz tratadas de acuerdo a los 17 tratamientos diseñados (Figura 1 A, ver Apéndice).

6.1.7.1. Toma de datos

Las mediciones de producción de gas se realizaron a 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 16, 21, 26, 34, 42, 50, 62, 74 y 96 h, respectivamente. Se utilizó para tal efecto, un manómetro de presión adaptado con aguja hipodérmica y válvula de paso de control manual. Se registró el valor de presión de cada uno de los 72 frascos en la escala de kg/cm^2 (Figura 2 A). También se determinó la proteína cruda (PC) de las muestras iniciales de rastrojo de maíz tratadas antes de la incubación *in vitro*. Se utilizó el método Dumas de combustión interna (aparato LECO FP-528, de cuatro plazas), el cual al quemar la muestra arrastra mediante gas helio el nitrógeno liberado; éste se cuantifica y aplica el factor 6.25, proporcionando de esta forma, el valor de proteína cruda del sustrato. Para este mismo material se determinaron cenizas (Ce) y extracto etéreo (EE), los cuales fueron utilizados para realizar diversos cálculos requeridos en algunas de las variables estudiadas en el presente proyecto. Estas determinaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Nutrición Animal del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, donde además, se realizó la determinación de FDN en los residuos

obtenidos, después que concluyó la fermentación *in vitro* en cada una de las repeticiones de los tratamientos evaluados, de acuerdo con Van Soest *et al.* (1991).

La producción de AGV se determinó de acuerdo con la técnica descrita por Erwin *et al.* (1961) y para la producción de nitrógeno amoniacal se utilizó la técnica propuesta por McCollough (1967). Todas las variables relacionadas con producción de gas: producción total de gas, producción de gas ajustado, volumen fraccional, tasa fraccional, volumen acumulado, volumen fraccional de gas a 3 h, volumen fraccional de gas a 16 h y volumen fraccional de gas a 42 h, se determinaron de acuerdo con Menke y Steingass (1988).

6.1.7.2. Variables evaluadas

Volumen de gas (VG) (mL/g de MS): esta variable se midió para cada repetición y por cada tratamiento y en los tiempos indicados anteriormente en la toma de datos. El VG mide la presión del gas acumulado como producto de la fermentación *in vitro* en cada tiempo de medición (producción de gas en bruto: VGb), la cual se ajusta primero por la presión promedio de los blancos y la materia seca inicial de la muestra incubada, mediante el modelo: $VGb = (lectura\ de\ muestra - lectura\ del\ blanco) / MS\ inicial = P$ (kg/cm²/g).

En el presente trabajo la muestra de materia seca inicial fue de 0.200 g y cuando los resultados de VG se ajustaron a 1 g de materia seca, se utilizó el siguiente factor de corrección: $1/0.200 = 5$ y el volumen de gas en bruto por gramo de materia seca (VGb/g de MS) se obtuvo mediante el modelo: $VG/g\ de\ MS = (VGb) \times 5$. Posteriormente, de acuerdo con Menke y Steingass (1988) se obtuvo una curva patrón, para lo cual se crearon nueve grupos de cinco frascos cada uno con capacidad de 120 mL, a los cuales se les añadieron 100 mL del inóculo ruminal estandarizado y entonces se cerraron herméticamente, luego a cada grupo se aplicaron volúmenes crecientes de gas con jeringa graduada. Los niveles aplicados fueron: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 mL, respectivamente; en seguida se extrajo el gas de cada frasco y se registraron las presiones (kg/cm²) por nivel de gas aplicado. Posteriormente, se estimó la presión promedio por nivel (P). Con los valores de los volúmenes de gas aplicados (x) y los valores de P (y), se realizó un análisis de regresión lineal y se calcularon los parámetros

B_1 (coeficiente de regresión lineal) B_0 (ordenada al origen), donde B_1 es la pendiente de la recta de regresión (m) y B_0 se denomina (a). Finalmente P , m y a se utilizaron para transformar los valores de las lecturas originales de presión de gas por tratamiento y por tiempo (kg/cm^2) a volumen de gas (mL/g de MS) mediante el modelo:

$$VG: (P+a)/m$$

Tasa fraccional (TF) ($\text{mL}/\text{g}/\text{h}$): se obtiene al dividir el volumen de gas obtenido anteriormente entre el número de horas transcurrido en cada periodo de tiempo de medición, mediante el modelo:

$$TF= VG/h \text{ (por periodo de medición)}$$

Volumen acumulado (VA) (mL/g): esta variable se define como la suma consecutiva de los valores de volúmenes de gas (VG) por tiempo de medición, desde el tiempo 1 (T_1) hasta el tiempo final (T_n), mediante la secuencia iterativa:

$$VA= [VG_1=P_1, VG_2=P_2+P_1, \dots, VG_n=P_n+P_{n-1} (\sum_{(i=1, \dots, n)} \text{mL}/\text{g}/t_i)]$$

Materia seca desaparecida (MSD) (%): se obtuvo mediante filtrar el contenido de los frascos después de que se realizó la lectura final de producción de gas *in vitro*. Posteriormente se obtuvo el peso final del residuo en base seca y se calculó el porcentaje de la materia seca desaparecida mediante el siguiente modelo:

$$\%MSD= [(\text{gramos de MS en la muestra inicial} - \text{gramos de MS del residuo final}) / \text{gramos de MS en la muestra inicial}] \times 100$$

Fibra detergente neutro residual (FDNr) (%): es la fracción complementaria de la MSD, estimada de acuerdo con la técnica propuesta por Van Soest *et al.* (1991). La estimación de la fibra detergente neutro residual se obtuvo mediante el siguiente modelo:

$$\%FDNr= (\text{gramos de MS residual} / \text{gramos de MS en la muestra inicial}) \times 100$$

Concentración de ácidos grasos volátiles totales (AGVt) (mmol/L): para la determinación de los ácidos grasos volátiles totales (AGVt), se tomaron muestras de 1mL de líquido de cada uno de los frascos a las 24, 36 y 48 h después de iniciar la incubación. A cada muestra obtenida se añadió una solución de ácido metafosfórico y agua, en la proporción 1:5 (p/v). La proporción de la mezcla de líquido ruminal a solución de ácido metafosfórico fue de 1:4 (v/v). Las muestras preparadas se conservaron en refrigeración a 4 °C hasta su análisis mediante cromatografía de gases. Se determinaron las concentraciones de ácido acético (AA: mmol/L), ácido propiónico (AP: mmol/L) y ácido butírico (AB: mmol/L), de acuerdo con la técnica propuesta por Erwin *et al.* (1961). La concentración total de ácidos grasos volátiles se obtuvo mediante la suma de las concentraciones de los tres ácidos grasos estimados (acético, propiónico y butírico), y el porcentaje de los ácidos grasos individuales se obtuvo como una proporción del total, mediante los modelos:

$$\text{mmol/L AGVt} = \text{mmol/L AA} + \text{mmol/L AP} + \text{mmol/L AB}$$

$$\%AA = [(\text{mmol/L AA})/(\text{mmol/L AGVt})] \times 100$$

$$\%AP = [(\text{mmol/L AP})/(\text{mmol/L AGVt})] \times 100$$

$$\%AB = [(\text{mmol/L AB})/(\text{mmol/L AGVt})] \times 100$$

Nitrógeno amoniacal (N-NH₃) (g/dL). Para la determinación de esta variable, se usaron las mismas muestras utilizadas en la determinación de ácidos grasos volátiles. La preparación de las muestras para lectura se hizo siguiendo la técnica sugerida por McCullough (1967).

Digestibilidad verdadera (DV) (%): se determinó después de que se obtuvo la fibra detergente neutro en las muestras finales, mediante el siguiente modelo:

$$\%DV = [(MS_{\text{inicial}} - FDN_{\text{final}})/MS_{\text{inicial}}] \times 100.$$

Adherencia microbiana (AM) (mg): las muestras finales obtenidas después de que concluyó la incubación *in vitro*, fueron filtradas y el residuo se secó en estufa con presión de aire a 60 °C durante 48 h, en seguida se pesaron en balanza analítica y su peso se registró. Posteriormente, los residuos fueron lavados con detergente neutro en digestor (Ankom F57), por una hora, en seguida se secaron en estufa con aire a presión, siguiendo

el mismo procedimiento descrito anteriormente y de acuerdo a la técnica descrita por Van Soest *et al.* (1991). De esta forma el diferencial de peso entre el residuo obtenido de la incubación *in vitro* (materia seca final) y el obtenido después que se lavaron las muestras residuales con ácido detergente neutro (fibra detergente neutro final) estima la cantidad de microorganismos adheridos a la fibra, mediante el siguiente modelo:

$$AM \text{ (mg)} = (\text{mg de MS final} - \text{mg de FDN final}) \text{ ó}$$

$$AM \text{ (mg)} = (\text{mg de MS final} - \text{mg de FDNr})$$

Energía metabolizable (EM): en el método de Menke *et al.* (1979), las fermentaciones son conducidas en geringas de vidrio con capacidad de 100 mL conteniendo muestras de alimento o forraje y una solución de líquido ruminal y solución mineral reductora (SMR). El gas producido en 200 mg de muestra seca después de 24 h de incubación junto con los niveles de otros constituyentes químicos son usados para predecir la la digestibilidad de la materia orgánica y la energía metabolizable *in vivo* [(MJ/kg DM) donde DM= materia seca, por sus siglas en Ingles)]. En el presente trabajo la EM se evaluó a 24 y 48 h, mediante el siguiente modelo:

$$\%EM = (2.20 + 0.136Gp + 0.057PC, R^2 = 0.94) \times 100$$

Donde Gp es la la cantidad de gas producido a 24 h y PC es el porcentaje de proteína cruda, además se utilizó es el coeficiente de determinación ($R^2 = 0.94$). En nuestro caso el Gp fue ajustado a 200 mg de sustrato utilizado en el presente trabajo, en lugar de 500 mg como sugiere el modelo.

Digestibilidad de la materia orgánica (DMO) (%): en el método de Menke *et al.* (1979), las fermentaciones son conducidas en jeringas de vidrio graduadas con capacidad de 100 mL, que contienen 200 mg de muestra de alimento o forraje en base seca, tratada con un inóculo que contiene una parte de líquido ruminal por 9 partes de una solución buffer (SMR). El gas producido por los 200 mg de MS del alimento después de 24 h de incubación *in vitro*, junto con los niveles de otros constituyentes químicos son usados para predecir la digestibilidad de la material orgánica (DMO), mediante el siguiente modelo:

$$\% DMO = (14.88 + 0.889Gp + 0.45PC + 0.0651Ce; R^2 = 0.9) \times 100$$

Donde Gp es el gas producido a 24 h (VG a 24 h), PC es el porcentaje de proteína cruda estimado de las muestras de rastrojo de maíz tratadas y Ce es el porcentaje de cenizas. La DMO se estimó a 24, 40, 48, 60 y 72 h.

Digestibilidad fraccional de la materia orgánica (DMO/tiempo=DMO/t) (%): los valores de DMO estimados a 24, 40, 48, 60 y 72 h para todos los tratamientos estudiados, se dividieron entre el número de horas transcurridos en cada periodo, utilizando el siguiente modelo:

$$\text{DMO/t} = [(14.88 + 0.889G_p + 0.45PC + 0.0651Ce; R^2 = 0.9)/h \text{ (por periodo)}]$$

Producción de dióxido de carbono (CO₂) (moles): se estimó de acuerdo a la estequiometría de Wolin (1960), mediante el modelo:

$$\text{CO}_2 = A/2 + P/4 + 1.5B$$

Donde A, P y B son moles de acetato, propionato y butirato, respectivamente, determinados previamente por cromatografía de gases (Erwin *et al.*, 1961).

Producción de metano (CH₄) (moles): se estimó utilizando la estequiometría de Wolin (1960) mediante el modelo:

$$\text{CH}_4 = (A + 2B) - \text{CO}_2$$

Donde A y B son moles de acetato y butirato, respectivamente, y CO₂ son los moles calculados previamente.

Proporción CO₂:CH₄: molesCO₂/molesCH₄.

Masa microbiana (MM) (mg): las medidas de gas *in vitro* reflejan únicamente mediciones de ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGVcc). La relación entre AGVcc y la producción de MM no es constante y la explicación de esto reside en la variación de producción de biomasa por unidad de ATP generada. Esto puede inducir una relación

inversa entre volumen de gas (o producción de AGVcc) y la producción de MM, particularmente cuando ambos son expresados por unidad de sustrato verdaderamente degradado. Esto implica que seleccionar forrajes fibrosos únicamente por el método de producción de gas *in vitro*, resultaría en una selección en contra de la producción máxima de MM. Blümmel *et al.* (1997) han demostrado como una combinación de la medición de la producción de gas *in vitro* con una cuantificación concomitante del sustrato verdaderamente degradado, provee información importante acerca de la partición de los productos de la fermentación, y la producción de la MM *in vitro* puede ser calculada como:

$$\text{MM (mg)} = \text{mg de sustrato verdaderamente degradado} - (\text{mL de VG} \times \text{factor estequiométrico})$$

Para forrajes fibrosos, el factor estequiométrico es 2.20.

Energía neta de lactancia (ENL) (Mcal/kg MS): el valor de energía de un forraje puede ser calculado de la cantidad de gas producido a 24 h de incubación *in vitro* introduciendo análisis suplementarios de proteína cruda (PC) y contenido de grasa (EE). Este método fue desarrollado en Hohenheim (Alemania) por Menke *et al.* (1988). El modelo original estimó la energía metabolizable (EM, MJ/kg de MS) pero después fue modificado para estimar la energía neta de lactancia (ENL). En el presente trabajo la ENL se evaluó a 24 y 48 h utilizando los valores de gas producido (mL/g de MS) para dichos tiempos, mediante el siguiente modelo:

$$\text{ENL} = (1.64 + 0.0269\text{GP} + 0.00078\text{GP}_2 + 0.0051\text{PC} + 0.01325\text{EE}) / 4.186$$

Donde GP es volumen de gas a 24 h, GP₂ es el VG a 48 h, PC es el porcentaje de proteína cruda del forraje y EE el porcentaje de grasa. El resto de los valores son constantes del propio modelo.

Los datos producción de gas (VG) por tiempo (t) se introducen al modelo logístico reportado por Almaraz *et al.* (2010): $V(t) = VF / (1 + \exp [2 + 4R(L - t)])$, donde V representa el volumen de gas producido de la fracción digerida al tiempo t, R es su respectiva tasa de producción de gas y L es el tiempo de retardo para la obtención del volumen de gas inicial. El análisis anterior se realizó mediante un modelo de regresión no lineal ('NLIN')

procedure; SAS, 2002; Cuadro 2 A). Las constantes estimadas por tratamiento fueron volumen máximo de gas (V_{max}), tasa de producción de gas (S) y el tiempo de retardo o fase Lag (FL).

6.1.8. Diseño experimental y análisis de datos

Para las variables volumen de gas (VG), tasa fraccional (TF) y volumen acumulado (VA) se utilizó un diseño en bloques generalizados (2 corridas) al azar con arreglo factorial de 17 tratamientos (T) x 16 tiempos de medición (TM) de gas y cuatro repeticiones por tratamiento por bloque, de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + T_iP_j + \beta_k + E_{ijk}$$

Y_{ijk} = Variable de respuesta.

T_i = Efecto de tratamiento (17 T_i).

P_j = Efecto de tiempo o periodo de medición de gas (16 P_j).

T_iP_j = Efecto de la interacción $T \times P$.

β_k = Efecto de bloque.

E_{ijk} = Error experimental.

Para las variables AA , AP , AB , $AA:AP$, AGV_t , $N-NH_3$, CO_2 , CH_4 y $CO_2:CH_4$: se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 17 $T \times 3$ periodos de muestreo ($P= 24, 36$ y 48 h) y cuatro repeticiones por tratamiento de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + P_j + T_iP_j + E_{ij}$$

Y_{ij} = Variable de respuesta.

T_i = Efecto de tratamiento (17 T_i).

P_j = Efecto de tiempo o periodo de muestreo (3 P_j).

T_iP_j = Efecto de la interacción $T \times P$.

E_{ij} = Error experimental.

Para las variables MSD , FDN_r , DV y AM se utilizó un diseño completamente al azar con 4 repeticiones por tratamiento y fueron evaluadas a 24 h. Además se utilizó un diseño

completamente al azar para las variables Vmax, S, FL y MM, con 2 repeticiones por tratamiento, las cuales fueron evaluadas a 24 h, de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_i = \mu + T_i + E_i$$

Y_i = Variable de respuesta.

T_i = Efecto de tratamiento (17 T_i).

E_i = Error experimental.

Para las variables MSD, FDNr, DV, AM, Vmax, S, FL y MM a 96 h, y además se evaluaron también EM y ENL a 24 y 48 h, todas en un diseño de bloques al azar con dos bloques y cuatro repeticiones por tratamiento por bloque, de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + E_{ij}$$

Y_{ij} = Variable de respuesta.

T_i = Efecto de tratamiento (17 T_i).

β_j = Efecto de bloque.

E_{ij} = Error experimental.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete de cómputo Statistical Analysis System (SAS, 2002) y se usó prueba de medias de Tukey.

6.2. Materiales y metodología: etapa *in situ*

6.2.1. Área experimental

La etapa experimental *in situ* se llevó a cabo en la Posta Zootécnica del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, en la Unidad de Bovinos de Carne, del 10 de octubre de 2008 al 31 de marzo de 2009. Ubicada en el centro de México, a 9 km al noroeste de la ciudad de Aguascalientes, latitud de 21° 57' 40'' y longitud 102° 22' 30'', en una área rural a 1936 msnm, bajo condiciones de clima

templado-seco, la temperatura media anual es de 16.9 °C, con 475 mm de precipitación media anual.

6.2.3. Dieta experimental

Esta se aplicó con el propósito de mantener a los animales estabilizados al interior del rumen. La dieta consistió en 76% de paja de cebada con grano, cosechada en fresco y henificada y el resto (24%) de concentrado para terneras de reemplazo y novillos de engorda de la Unidad de Bovinos del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (Cuadro 3). El periodo de adaptación y estabilización de las vacas fistuladas a la dieta base fue de 15 días previo al inicio de la fase experimental *in situ*. El alimento se administró a los animales el 50% por la mañana y 50% por la tarde.

Cuadro 3. Dieta base suministrada a los animales durante el periodo experimental *in situ*.

Ingrediente	BS Kg	BH kg	BS %	FDN %BS	PC %BS	FC kg	PC kg
Paja de cebada c/grano	76.0	84.5	76.0	58.0	10.0	44.1	7.60
Concentrado	24.0*	27.3	24.0	22.4	16.0	5.4	3.84
Total	15.0	16.7	100			49.5	11.40

BH: base húmeda; BS: base seca; FDN; PC: proteína cruda; * se incluyó balanceado preparado por la UAA para terneras de reemplazo y novillos de engorda.

6.2.4. Diseño de tratamientos

Se definieron 8 tratamientos derivados de los resultados de la etapa *in vitro* considerando principalmente la digestibilidad *in vitro*, fibra detergente neutro residual y la materia seca desaparecida, los cuales correspondieron a los tratamientos que recibieron la aplicación de los preparados enzimáticos a 0 h. También se incluyó el testigo (T0: rastrojo de maíz molido más melaza; (Cuadro 1). Además, se incluyó un segundo testigo (T00: rastrojo de maíz sin melaza). Las dosis de preparados enzimáticos, de los aditivos químicos y sus respectivas combinaciones se mantuvieron tal como inicialmente fueron diseñados para la etapa *in vitro* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Diseño de tratamientos experimentales durante el periodo *in situ*.

Número	Tratamiento	Dosis %	Total %
T1	F	0.15	0.15
T2	P	0.02*	0.02
T3	F + C	0.15+1.5	1.65
T4	F + U	0.15+1.5	1.65
T5	F + U + C	0.15+0.75+0.75	1.65
T6	P + C	0.02+1.5	1.52
T7	P + U	0.02+1.5	1.52
T8	P + U + C	0.02+0.75+0.75	1.52
T0	rastrojo+melaza	0.0	0.0
T00	rastrojo sin melaza	0.0	0.0

F= enzima Fibrozyme; P= enzima Promote; C= hidróxido de calcio (cal); U= urea; T0= testigo; T00=testigo; * Se estimó en 2 g de Promote en 10 kg /día de materia seca de forraje.

6.2.5. Preparación de las muestras experimentales

Se realizó un procedimiento similar al empleado en la etapa *in vitro* para la producción de gases. Se utilizó rastrojo de maíz molido en malla de 1 mm en molino Wiley (Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA, USA), al cual previamente se determinó el contenido de humedad y se estimó la faltante para alcanzar el equivalente al 50% del peso seco de un kilogramo de sustrato en base seca. Enseguida se realizó un ensayo que permitió determinar la base seca de las muestras experimentales después de aplicar los preparados enzimáticos y los aditivos químicos mediante la solución melaza:agua. Con el resultado de este ensayo se calculó el peso húmedo que debía tener cada muestra de rastrojo tratado para obtener una muestra experimental equivalente a 2 g en base seca. Dicha muestra es la que se depositó en las bolsas de Nylon para llevarlas a incubación *in situ*, para todos los tratamientos evaluados y en número de dos subrepeticiones por vaca. El tamaño de la muestra experimental del rastrojo de maíz tratado fue igual al descrito en el Cuadro 2 del protocolo *in vitro*. Al igual que en la etapa *in vitro*, los aditivos químicos se aplicaron 48 h antes de iniciar la incubación *in situ*, en tanto que las preparaciones enzimáticas se aplicaron al momento de iniciar dicha incubación (0 h). En esta etapa se omitieron las aplicaciones enzimáticas a 24 h porque los resultados de la etapa experimental *in vitro* consignaron valores significativamente menores al tratamiento

enzimático a 0 h y fueron iguales al testigo, sobre todo, en volumen y volumen tasa fraccional de gas a 42 h, que correspondió a la degradación de los carbohidratos estructurales de difícil digestión.

6.2.6. Procedimiento experimental *in situ*

Después de lograr la estabilización de las vacas fistuladas a la dieta experimental (Cuadro 3) se procedió a la incubación de cada uno de los tratamientos diseñados para esta etapa experimental, de acuerdo a lo descrito por Orskov y McDonald (1979). Se determinaron cuatro periodos de incubación *in situ* (24, 48, 72 y 96 h). Se utilizaron bolsas de Nylon y se colocaron dos repeticiones por tratamiento y para cada uno de los periodos de incubación, lo que a su vez se repitió en ambas vacas fistuladas. La totalidad de bolsas se introdujeron al rumen de ambas vacas al mismo tiempo (tiempo 0) en bolsas contenedoras que contenían dos bolsas de cada tratamiento (Cuadro 3 A). Posteriormente se procedió a extraer cada bolsa contenedora de manera inversa, las cuales fueron marcadas para cada tiempo antes de ser introducidas al rumen para la incubación *in situ*. La primera extracción correspondió a 24 h, la segunda a 48 h, la tercera a 72 h y la cuarta a 96 h (Cuadro 5). Al final, las muestras fueron lavadas, secadas en estufa con aire de presión por 72 h a 65° C; posteriormente se pesaron las bolsas y calculó el porcentaje de digestibilidad *in situ* (%DIS). Las bolsas derivadas de la digestibilidad *in situ* fueron sometidas a lavado con detergente neutro. Finalmente, se obtuvieron los valores de fibra detergente neutro de la fracción residual (FDNr), de acuerdo con Van Soest *et al.* (1991).

Cuadro 5. Calendario de incubación *in situ* para %DIS y %FDN.

Tratamiento	V1	V1	V1	V1	V2	V2	V2	V2
T0	24 h	48 h	72 h	96h	24 h	48 h	72 h	96h
T00	24 h	48 h	72 h	96h	24 h	48 h	72 h	96h
F	24 h	48 h	72 h	96h	24 h	48 h	72 h	96h
P	24 h	48 h	72 h	96h	24 h	48 h	72 h	96h
F+C	24 h	48 h	72 h	96h	24 h	48 h	72 h	96h
F+U	24 h	48 h	72 h	96h	24 h	48 h	72 h	96h
F+C+U	24 h	48 h	72 h	96h	24 h	48 h	72 h	96h
P+C	24 h	48 h	72 h	96h	24 h	48 h	72 h	96h
P+U	24 h	48 h	72 h	96h	24 h	48 h	72 h	96h
P+C+U	24 h	48 h	72 h	96h	24 h	48 h	72 h	96h

T0, T00 y 8 tratamientos se incubaron en cuatro tiempos y dos repeticiones por vaca= 10x4x2x2= 160 determinaciones para cada variable de estudio (%DIS y %FDNr); V1=vaca 1, V2=vaca 2.

6.2.6.1. Determinación de pH

Con la ayuda de un potenciómetro se realizaron dos determinaciones del pH del líquido ruminal, al inicio de la incubación *in situ* y a las 48 h.

6.2.7. Diseño experimental

Para evaluar el efecto del tratamiento enzimático y de los aditivos químicos sobre la digestibilidad *in situ* (DIS) y la fibra detergente neutro residual (FDNr), posterior a la incubación de las muestras *in situ* fue necesario realizar un análisis de varianza mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial incompleto, donde los tratamientos químicos asociados a los preparados enzimáticos, así como los testigos con y sin solución melaza:agua (T0 y T00, respectivamente) fueron anidados dentro de cada uno de los preparados enzimáticos, incluyendo los tratamientos con preparaciones enzimáticas sin aditivos químicos de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \text{Trat}_i + T_j + E_{z_k} + T_j \times E_{z_k} + \text{Trat}_i(E_{z_{1k}}) + T_j \times \text{Trat}_i(E_{z_{2k}}) + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta (%DIS, %FDNr).

μ = Media general.

Trat_i = Efecto del i-esimo tratamiento (10).

T_j = Efecto del j-esimo tiempo de medición (4).

E_{z_k} = Efecto de la k-esima enzima (2).

$\text{trat}_i(E_{z_k})$ = Efecto del i-esimo tratamiento anidado en la k-esima enzima.

$T_j \times \text{Trat}_i(E_{z_k})$ = Efecto de la interacción $T_j \times \text{Trat}_i$ anidado en la k-esima enzima.

ε_{ijk} = Efecto de error.

El efecto del tipo de aditivo químico anidado en cada uno de los preparados enzimáticos fue desagregado del modelo 1 en análisis de varianza simple donde además se incluye la interacción tiempo x aditivo químico (T x Q) de acuerdo con el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + Q_j + T_i \times Q_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable de respuesta (%DIS, %FDNr).

μ = Media general.

T_i = Efecto del i-esimo tiempo.

Q_j = Efecto de tiempo del j-esimo aditivo químico.

$T_i \times Q_j$ = Efecto de la interacción tiempo x aditivo químico.

ε_{ij} = Efecto de error.

Contrastes no ortogonales (prueba de Scheffé)

Se aplicaron para validar los resultados obtenidos a partir del modelo completo y para discriminar algunas tendencias entre los diferentes factores y sus respectivos niveles estudiados en la etapa *in situ*. Fueron aplicados en forma independiente para DIS y para FDNr en N-1 contrastes no ortogonales (prueba de Scheffé; Steel y Torrie, 1988).

6.3. Etapa *in vivo*

6.3.1. Materiales

La etapa experimental *in vivo* se realizó en una unidad experimental diseñada y creada en el Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 61 (CBTA No. 61) del Municipio de Calvillo, al sudoeste del Estado de Aguascalientes, México, del 10 de octubre de 2008 al 31 de marzo de 2009. Se localiza geográficamente entre 22° 07' y 21° 43' de latitud norte, y entre 102° 32' y 102° 53' de longitud oeste. La altitud promedio es de 1702 msnm con una precipitación promedio anual de 550 mm que se concentra en verano y la temperatura media anual oscila entre 18 y 20° C; el clima es templado semiseco (Hernández-López, 2002).

6.3.2. Tratamientos y procedimiento experimental

En esta etapa experimental se abordó el cuarto objetivo del proyecto doctoral. Se evaluaron seis tratamientos y un testigo derivados de los 10 tratamientos que fueron evaluados en la etapa experimental *in situ*, los cuales fueron seleccionados tomando en cuenta los indicadores de digestibilidad y los valores de la fibra detergente neutro residual de las muestras previamente incubadas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Tratamientos evaluados en la etapa experimental *in vivo*.

Número	Tratamiento	Dosis %	total %
T1	F	0.15	0.15
T2	P	0.02*	0.02
T3	F + C	0.15 + 1.5	1.65
T4	P + C	0.02* + 1.5	1.52
T5	F + C + U	0.15 + 0.75 + 0.75	1.65
T6	P + C + U	0.02 + 0.75 + 0.75	1.52
T0	rastrojo + melaza	0.0	0.0

F= enzima Fibrozyme; P= enzima Promote; C= hidróxido de calcio (cal); U= urea; T0= testigo; * Se estimó en 2 g de Promote en 10 kg/día de materia seca de forraje.

Se elaboró una dieta base para todos los tratamientos y sólo varió en los casos en que se aplicaron los preparados enzimáticos y aditivos químicos. El testigo (T₀), así como los tratamientos que incluyeron los preparados enzimáticos Fibrozyme y Promote (F y P) sin aditivos químicos recibieron la misma dieta base, en tanto que F+C, P+C, F+C+U y P+C+U contenían la misma dieta base, pero variaron respecto a los anteriores por las pequeñas cantidades de cal y urea aplicados (Cuadro 4 A).

Las dosis de Fibrozyme, Promote, cal y urea fueron similares a las usadas en las etapas *in vitro* e *in situ*. Los aditivos químicos fueron aplicados al rastrojo de maíz molido mediante una solución melaza:agua, cuya proporción varió entre 1:2.5 y 1:2.2 v/v entre las dietas que recibieron aditivos y aquéllas que no los recibieron (Cuadro 4 A). Se añadió un testigo (T₀) que incluyó sólo la dieta base y rastrojo de maíz al que previamente se aplicó la solución melaza:agua, sin aditivos químicos ni preparados enzimáticos. Los aditivos químicos se aplicaron al rastrojo de maíz molido al momento de elaborar la dieta de cada tratamiento (cada siete días) durante la etapa experimental que duró 56 días. Las enzimas se aplicaron diariamente por la mañana al alimento al momento de servirlo a los animales.

6.3.3. Manejo de los animales y diseño del experimento

Se utilizaron 42 borregos Black Belly x Dorper, 21 machos y 21 hembras, siendo los primeros de un peso promedio de 21 kg y un coeficiente de variación (C.V.) de 7.8%, en tanto que las hembras consignaron un peso promedio de 19 kg y un C.V. de 5.8%.

A la recepción los animales fueron pesados, desparasitados y recibieron una dosis única de vitaminas A, D, E así como de selenio. Posteriormente fueron sometidos a las dietas experimentales durante un periodo de adaptación de 15 días. Los animales se dividieron en grupos de 6 borregos y cada grupo contenía 3 hembras y 3 machos; los pesos de los machos y las hembras fueron aleatorizados para cada grupo experimental. Cada grupo fue asignado aleatoriamente a cada uno de los 7 tratamientos diseñados; al final, se obtuvieron 6 repeticiones por tratamiento, considerando el sexo como un bloque y 3 subrepeticiones por bloque.

6.3.4. Toma de datos

La fase experimental duró 56 días y las variables evaluadas fueron consumo de alimento (CoA), ganancia de peso (GP), peso ganado (PG), peso final (PF), conversión alimenticia (CA), ácidos grasos volátiles totales (AGVt), ácido acético (AA), ácido propiónico (AP), ácido butírico (AB), proporción acetato:propionato (A:P), nitrógeno amoniacal (N-NH₃), pH, fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), contenido de lignina (LIG) y digestibilidad por cenizas insolubles (DCI).

Consumo (CoA) (kg): se evaluó diariamente, considerando la materia seca total ofrecida menos la materia seca rechazada. El ajuste de la materia seca se realizó mediante la evaluación previa en las dietas experimentales después de su elaboración. Asimismo, se realizaron muestreos del material rechazado durante fase experimental para hacer los ajustes correspondientes, debido a los cambios de humedad en el ambiente.

Ganancia diaria de peso (GP) (kg): se tomó el peso de los borregos antes y después del periodo de adaptación, posteriormente los animales se pesaron cada 11 días durante el tiempo de prueba de los tratamientos y al final del experimento se realizaron dos pesadas sucesivas y el promedio de ellas se tomó como peso final. La diferencia entre el peso final y el peso inicial (peso ganado) por animal se dividió entre el número de días que duró el periodo experimental y se obtuvo la GP, mediante el modelo:

$$GP = (\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{días de duración del experimento}$$

Peso ganado (PG) (kg): se obtuvo por diferencia entre el peso inicial y el peso final para cada unidad experimental, utilizando el peso inicial como covariable.

Peso final (PF) (kg): se determinó como un promedio de dos pesadas sucesivas de cada borrego al final del experimento.

Conversión alimenticia (CA) (kg): se evaluó tomando como base la ganancia de peso obtenida durante el periodo experimental dividido entre el total de kilogramos de materia seca consumidos por cada borrego en el mismo periodo.

Ácidos grasos volátiles totales (AGVt) (mmol/L): Se preparó una solución de líquido ruminal y ácido metafosfórico en la proporción de 4:1 (v/p), en tanto que la solución de ácido metafosfórico se preparó en la proporción de una parte de ácido metafosfórico por cinco partes de agua destilada (1:5) p/v. Posteriormente, las muestras de líquido ruminal tratado se conservaron en refrigeración a 4 °C, hasta el momento de determinar mediante cromatografía de gases las concentraciones de los ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) de acuerdo con Erwin *et al.* (1961). El porcentaje de cada uno de ellos se estimó usando el mismo procedimiento empleado en la etapa *in vitro*:

Ácido acético (AA) (%) = [(mmol/L AA)/(mmol/L AGVt)] x 100

Ácido propiónico (AP) (%) = [(mmol/L AP)/(mmol/L AGVt)] x 100

Ácido butírico (AB) (%) = [(mmol/L AB)/(mmol/L AGVt)] x 100

Proporción ácido acético:ácido propiónico (A:P): se determinó como un indicador del incremento del AP a medida que los tratamientos enzimáticos y las combinaciones de preparados enzimáticos con los aditivos químicos actúan sobre los componentes fibrosos de la pared celular del rastrojo de maíz, liberando una mayor cantidad de contenido celular y aumentando la energía disponible para los rumiantes.

Nitrógeno amoniacal (N-NH₃) (mg/dL): A partir de las muestras preparadas para la determinación de ácidos grasos volátiles se realizó también la determinación de N-NH₃, utilizando la técnica de McCullough (1967).

pH: se evaluó usando un potenciómetro al momento de obtener la muestra de líquido ruminal individual en un solo muestreo durante la última semana del experimento *in vivo*. El muestreo se realizó 4 h después de suministrar el alimento en cada uno de los tratamientos por la mañana. Se obtuvo un promedio de 150 mL de líquido ruminal por animal utilizando un extractor conectado vía oral al rumen mediante manguera industrial con diámetro interior de 0.5 pulg.

Fibra detergente neutro y ácido (FDN y FDA) y contenido de lignina (LIG) (%): Fueron determinadas sobre las muestras de heces individuales en cada uno de los

tratamientos utilizando la técnica de Van Soest *et al.* (1991). Las heces de cada animal fueron molidas en malla de 1 mm, así como también una muestra piloto de cada una de las dietas experimentales, después de haber sido secadas en estufa con aire de presión a 65o C durante 72 h. También se determinaron ambos tipos de fibras sobre muestras de alimento de las dietas experimentales.

Digestibilidad mediante cenizas insolubles (DCI) (%): Se realizaron tres colectas de heces por borrego mediante estímulo directo el día lunes de las últimas tres semanas del experimento. El primer muestreo se obtuvo por la mañana antes de ofrecer el alimento (a las 8 h), el segundo tres horas después de ofrecido el alimento (al mediodía a las 12:30 h) y el tercero por la tarde 9 h después de ofrecer el alimento por la tarde, el cual se ofreció siempre a las 15 h durante todo el periodo experimental. La mitad del alimento ofrecido por animal por día se suministró por la mañana y la otra mitad por la tarde. Se obtuvo una muestra piloto de 100 g a partir de los tres muestreos lo que dio un promedio de 40 g en base seca. La determinación de las cenizas insolubles y la estimación de la DCI se realizó según Keulen y Young (1977), usando los siguientes modelos:

$$\% \text{ de CI} = (\text{peso de CI} / \text{peso de muestra inicial}) \times 100$$

$$\text{DCI} = (\% \text{ de CI en ingrediente} - \% \text{ de CI en heces} / \% \text{ de CI en heces}) \times 100$$

6.3.5. Análisis de datos

Se evaluaron siete tratamientos incluyendo el testigo, se utilizó el sexo como bloque con tres repeticiones por bloque en un diseño bloques al azar generalizado, de acuerdo con el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \text{Sexo}_i + \text{Rep}(\text{Sexo})_{ij} + \text{Trat}_k + (\text{Sexo} * \text{Trat})_{ik} + E_{ijk}$$

Y_{ijk} = variable de respuesta (CoA, GP, PG, PF, CA, AGVt, AA, AP, AB, A:P, N-NH₃, pH, FDN, FDA, LIG y DCI).

Sexo_i = Efecto del i-ésimo sexo.

$\text{Rep}(\text{Sexo})_{ij}$ = Efecto de la j-ésima repetición dentro del i-ésimo sexo.

Trat_k = Efecto del k-ésimo tratamiento.

$(\text{Sexo} \times \text{Trat})_{ik}$ = Efecto del i-ésimo sexo por la k-ésima repetición.

E_{ijk} = Efecto del error aleatorio.

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el paquete de cómputo SAS (2002) y se aplicó la prueba de Tukey para la comparación de medias.



7. RESULTADOS

7.1. Etapa *in vitro*

7.1. 1. Producción de gas

El volumen de gas producido (VG), tasa fraccional (TF) y volumen de gas acumulado (VA) fueron afectados por el tratamiento (T), el tiempo de medición de gas (TM) y la interacción T x TM ($P < 0.0001$) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis de varianza para VG, TF y VA.

Producción de gas a 96 h							
F. V.	GL	VG		TF		VA	
		CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F
T	16	172.02	0.0001	16.10	0.0001	7465.07	0.0001
TM	15	12869.73	0.0001	8391.98	0.0001	2672907.12	0.0001
Rep (Bloque)	7	439.28	0.0001	224.92	0.0001	85717.69	0.0001
T x TM	240	71.29	0.0001	6.42	0.0001	676.45	0.0001
Error	1897	15.19		2.78		285.48	
R ²		0.882		0.96		0.987	
C. V. (%)		14.97		16.95		7.41	

F.V.= fuentes de variación; GL= grados de libertad; CM= cuadrados medios; C. V.= coeficiente de variación.

La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). En VG los mejores resultados se obtuvieron con la aplicación de los preparados enzimáticos a cero horas (0 h) antes de la incubación *in vitro* (F0+U, F0+C, F0+C+U, P0+U y P0+C), los cuales fueron superiores al testigo (T0) ($P < 0.05$). En este caso se observó sinergismo entre los preparados enzimáticos y los aditivos químicos evaluados, ya que en ninguno de los tratamientos que sólo contenían preparados enzimáticos (F0, P0 ó F24, P24) hubo efecto significativo. Por otra parte F24, P24, F0 y P0, registraron un valor intermedio en VG y no mostraron diferencias con T0 ni con el resto de los tratamientos, aunque T0 junto con los tratamientos F24+C, F24+C+U, P24+C y P24+C+U registraron valores menores al resto de los tratamientos excepto P24+U que fue el más bajo de todos. Cabe señalar que

no hubo diferencia entre el tipo de aditivo químico sobre VG, aunque existe una tendencia marcada a que F0+C es superior a todos los tratamientos no sólo en VG, sino también en TF y VA, y como se observa, incluye C (hidróxido de calcio). No obstante, debe notarse que este tratamiento fue seguido por F0+U+C y F0+U, de los cuales el primero incluye C y U, mientras que el segundo, incluye sólo U. En todo caso, estos tres tratamientos fueron los que mostraron superioridad en las tres variables (VG, TF y VA, respectivamente), seguidos por P24 quien mostró superioridad tanto en TF como en VA y, U+P0 y C+P0, quienes mostraron superioridad en VG y TF, respectivamente, mientras que el tratamiento P24+U fue el que mostró el más bajo comportamiento en las tres variables (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto de preparados enzimáticos y aditivos químicos sobre los indicadores de producción de gas.

Tratamientos	VG	TF	VA
	mL/g MS	mL/g MS/h	mL/g MS
T0	25.2 def	10.0 abcd	227.5 defg
F24	26.0 bcde	10.2 ab	234.1 bcd
F24+U	25.6 bcde	10.0 abcd	229.8 bcde
F24+C	24.9 def	9.8 abcdef	225.5 efgh
F24+C+U	25.3 def	10.2 abc	231.4 bcde
P24	26.0 bcde	10.3 a	235.4 abc
P24+U	24.0 f	9.2 e	214.0 i
P24+C	24.6 def	9.6 abcdef	221.9 fgh
P24+C+U	24.9 def	9.6 bcde	222.3 fgh
F0+U	27.2 abc	10.1 abcd	236.6 ab
F0+C	28.2 a	10.3 a	242.1 a
F0+C+U	27.4 ab	10.1 abc	236.9 ab
P0+U	27.4 ab	9.8 abcdef	230.4 bcde
P0+C	27.2 abc	9.8 abcdef	228.2 chef
P0+C+U	26.2 bcde	9.4 de	219.4 hi
F0	26.0 bcde	9.5 cde	219.6 hi
P0	26.3 bcd	9.4 de	220.6 ghi
Tukey=0.05	1.69	0.72	7.4

Medias de tratamientos con letras distintas por columna difieren estadísticamente.

Finalmente, los tratamientos que recibieron la aplicación del preparado enzimático (F ó P) a 0 h fueron superiores al resto de los tratamientos, excepto para F24, F24+U y P24, aunque entre 26 y 42 h durante la incubación *in vitro* los tratamientos que contenían

preparado enzimático aplicado a 0 h, ya sea solos o combinados con aditivos químicos, fueron superiores a los que recibieron la misma aplicación pero a 24 h (Figura 1).

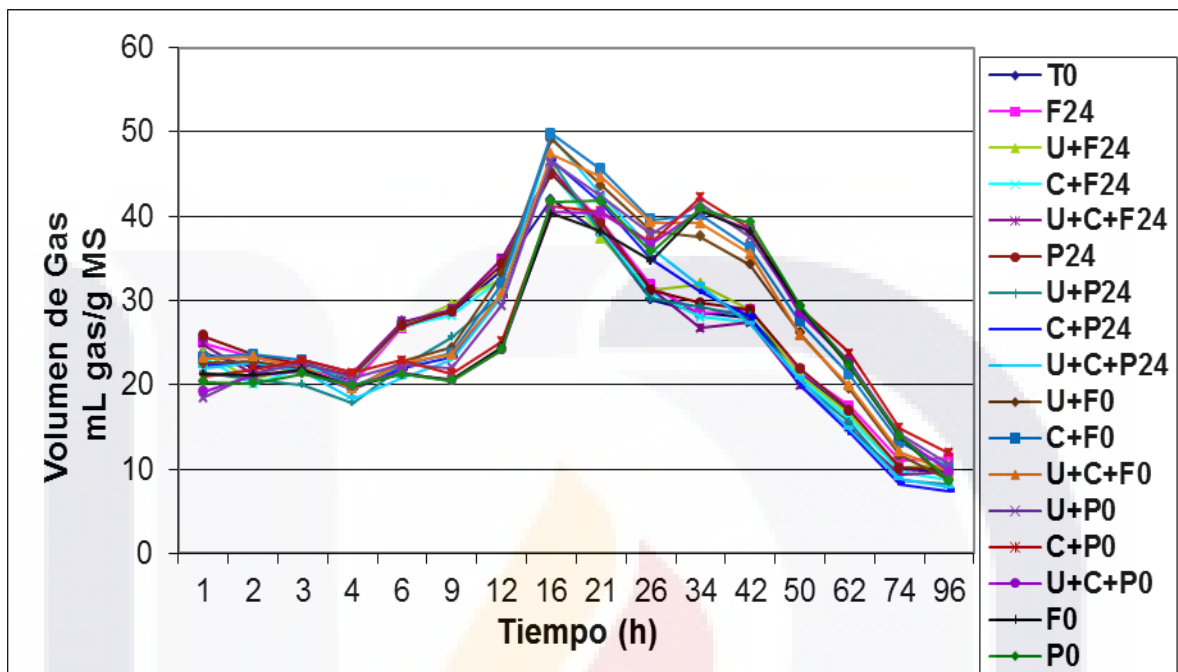


Figura 1. Comportamiento del volumen de gas producido por tratamiento y tiempo de medición.

Este resultado sugiere un incremento en la degradación de los carbohidratos estructurales de alta resistencia en mayor proporción en los tratamientos enzimáticos a 0 h solos o en combinación con urea o cal (U ó C), lo cual se traduce en un mayor volumen de gas (VG), principalmente después de 34 h. Sin embargo, en la tasa fraccional de gas (TF) la mayoría de los tratamientos fueron iguales al testigo, excluyendo a P24+U, P24+C+U, P0+C+U, F0 y P0, quienes mostraron un comportamiento inferior ($P < 0.05$). Sin embargo, P24, F0+C y F24, reportaron las mayores TF de gas por hora, seguidos por F24+C+U y F0+C+U. No hubo diferencias entre los tiempos de aplicación de los preparados enzimáticos en cuanto a la TF, incluso se presentó una proporción casi igual de tratamientos que recibieron el tratamiento enzimático 24 h antes de la incubación *in vitro*, respecto de aquéllos que recibieron dicho tratamiento a 0 h. Sin embargo, entre 36 y 42 h, de nuevo los tratamientos que recibieron la aplicación de los preparados de enzimas, solos o en combinación con los aditivos químicos (U ó C) superaron a los que recibieron dicho tratamiento a 24 h (Figura 2). Por otra parte, la cantidad de tratamientos que incluían F y que mostraron significancia fue mayor a la de aquéllos que incluyeron P y que

también mostraron significancia (7 vs. 4), denotando un efecto mayor de F sobre P en volumen acumulado de gas producido. En lo que respecta al efecto del tiempo, se observó de nuevo que entre 34 y 48 h hubo una separación notable especialmente entre los tratamientos que recibieron la aplicación de los preparados enzimáticos a 0 h, los cuales resultaron superiores a aquéllos que lo recibieron a 24 h ($P < 0.05$).

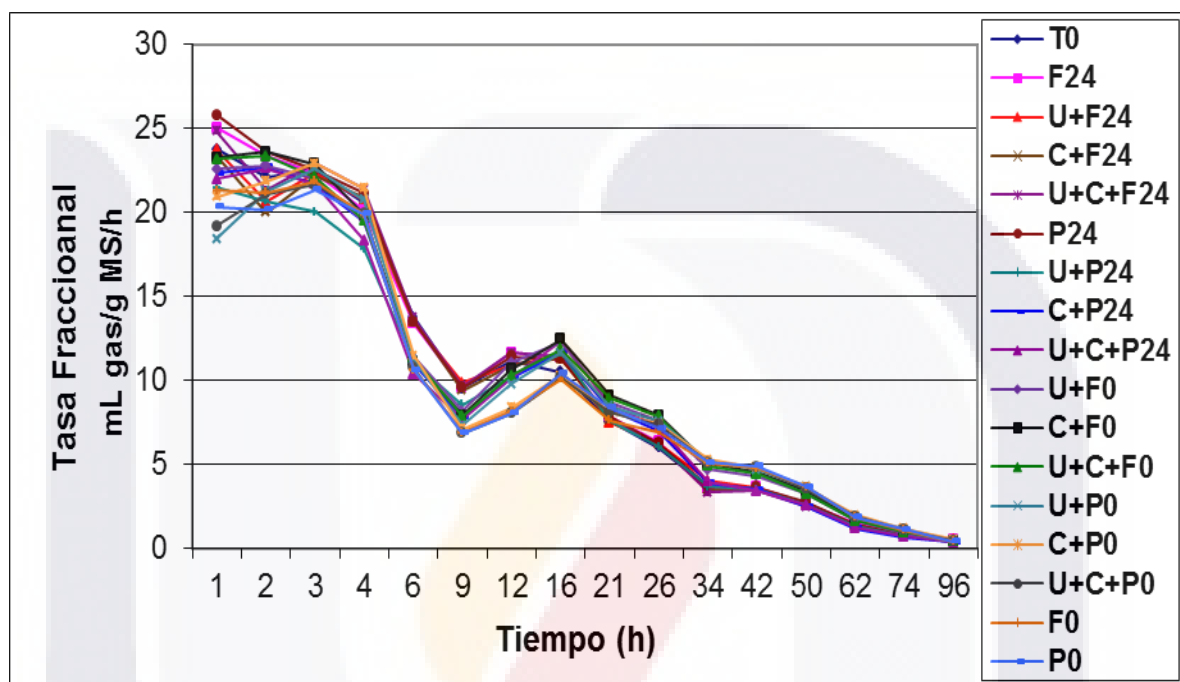


Figura 2. Comportamiento de producción de gas por hora, por tratamiento y tiempo de medición.

En VA de nuevo se observó que la aplicación de los preparados enzimáticos a 0 h superaron a aquéllos cuya aplicación se realizó a 24 h. Los tratamientos F0+U, F0+C, F0+C+U y P24, fueron los que consignaron los valores más altos en esta variable, superando al resto de los tratamientos e incluyendo a T0 ($P < 0.05$). Es importante señalar que tres de los cuatro tratamientos que mostraron los valores más altos de VA incluyeron F y sólo uno de ellos incluyó P. No existió diferencia entre los aditivos químicos (U ó C) en esta variable. Los tratamientos que siguieron a los anteriores fueron F24, F24+U, F24+C+U y P0+U, respectivamente, los cuales no fueron diferentes a los tratamientos F0+U y F0+C+U, donde tres de ellos incluyeron F y sólo uno incluyó P.

La interacción tratamiento x tiempo de medición se aprecia cuando se analizan las tendencias de los gráficos para VG y TF, las cuales ya fueron discutidas estadísticamente (Figuras 1 y 2). Inicialmente se tiene una ligera fase de crecimiento lento (fase lag),

aunque la máxima tasa fraccional de gas por hora se obtuvo en las primeras 3 h; posteriormente ocurrió un decremento a 9 h y el pico máximo se obtuvo entre 16 y 18 h, donde prácticamente todos los tratamientos son iguales, lo cual se sostiene hasta alrededor de las 30 h. Sin embargo, al principio, entre 4 y 12 h los tratamientos que recibieron la aplicación de los preparados enzimáticos 24 h antes, fueron superiores a los de aplicación enzimática a 0 h ($P < 0.05$), aunque no fueron diferentes a T0. No obstante, después de las 30 h el proceso se invierte hasta alrededor de las 72 h. Cabe señalar que a partir de las 72 h no existen diferencias entre los tratamientos incluyendo a T0, incluso, ocurre un nuevo cruzamiento entre los tratamientos con aplicación enzimática a 0 h y los de 24 h; lo anterior, explica la significancia de la interacción TxTM (Cuadro 7). Esta tendencia se percibe en VG y en TF de gas y se describe con claridad en volumen acumulado de gas (VA) describiendo una sigmoide (Figura 3).

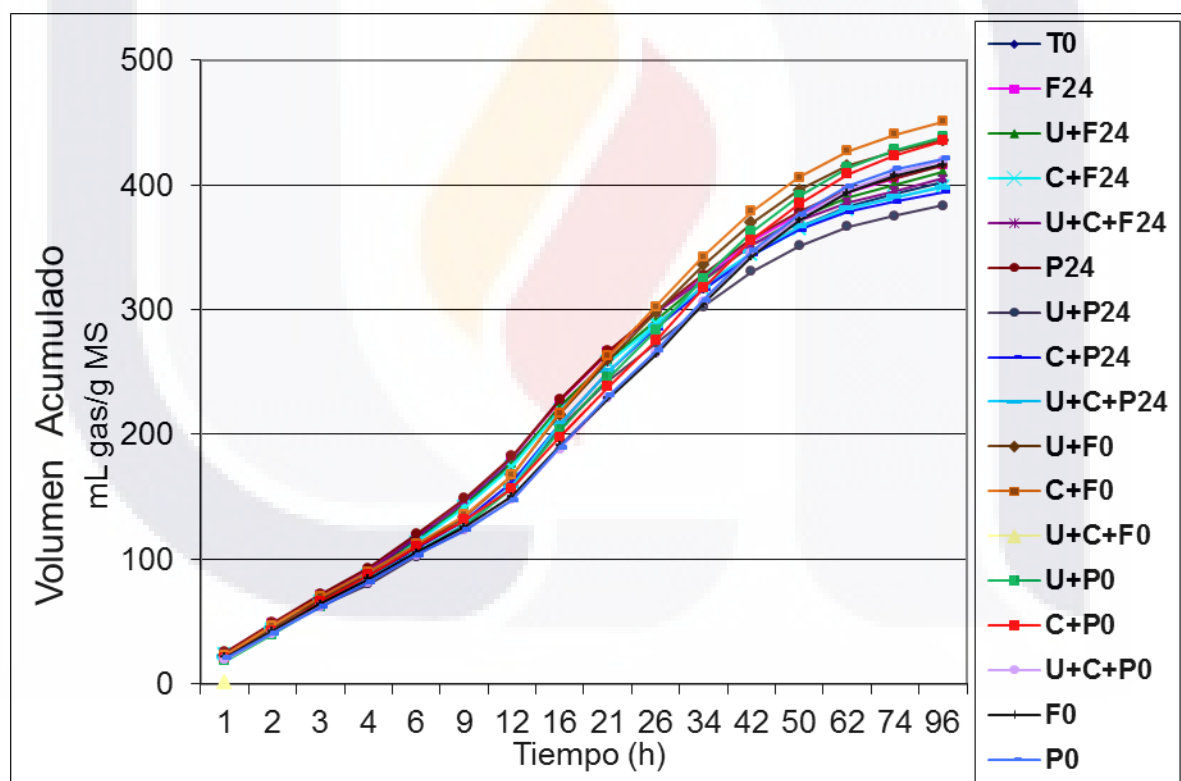


Figura 3. Comportamiento del VA de gas por tratamiento en los tiempos de medición.

7.1.2. Perfil de producción de gas

El modelo no lineal: $V(t) = VF/1 + \exp [2+4R (L - t)]$, propuesto por Schofield *et al.* (1994), permite cuantificar los perfiles de la producción de gas, a partir de éste se calcularon por tratamiento: 1) volumen máximo de producción de gas (V_{max}), 2) tasa fraccional promedio (S) y 3) fase de letargo o lag (FL). Tanto a 24 como a 96 h se encontraron diferencias significativas para V_{max} , S, FL y masa microbiana (MM), a excepción de FL, en el resto de las variables se observaron coeficientes de variación bajos (Cuadros 9 y 10).

Cuadro 9. Análisis de varianza para V, S y L a 24 horas.

F.V.	GL	V		S		L	
		CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F
Tratamiento	16	56787.8	0.0001	0.032	0.0001	1.27	0.0001
Error	17	1172.4		0.002		.11	
R ²		0.98		0.95		0.92	
C.V. (%)		4.97		8.41		29.12	

Cuadro 10. Análisis de varianza para V, S y L a 96 horas.

F.V.	GL	V		S		L	
		CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F
Tratamiento	16	3105.5	0.0001	0.00005	0.0001	0.88	0.0001
Rep(Bloque)	7	3437.1	0.0001	0.00009	0.0001	1.5	0.0001
Error	112	504.2		0.0000027		0.318	
R ²		0.56		0.86		0.41	
C.V. (%)		5.65		5.19		30.7	

Los datos que se obtuvieron para las variables V_{max} y S a 24 y 96 h muestran una interacción cruzada, en la que se observa claramente el efecto del pretratamiento enzimático (Cuadros 11 y 12). Los valores mayores V_{max} a 24 h los consignaron el testigo (T0) y los tratamientos F24 y F24+U. No obstante, los mayores valores para S a 24 h los consignaron los tratamientos P24+C, P0+U, P0+C, P0+C+U, F0 y P0. En FL el valor menor a 24 h lo consignó P24+C+U, pero contrariamente los tratamientos P0+U, P0+C, P0+C+U, F0 y P0 reportaron la mayor FL.

Cuadro 11. Efecto de preparados enzimáticos y aditivos químicos sobre los perfiles no lineales de producción de gas en muestras incubadas *in vitro*.

24 h			
Tratamientos	Vmax (mL)	S (mL/h)	FL (h)
T0	231.7 a	0.11 c	-1.5 cdef
F24	225.1 a	0.10 c	-1.6 cdef
F24+U	226.8 a	0.10 c	-1.3 abcdef
F24+C	199.9 b	0.12 bc	-0.8 abcde
F24+C+U	219.7 b	0.10 c	-1.5 cdef
P24	219.4 b	0.10 c	-1.6 cdef
P24+U	154.8 b	0.08 c	-2.3 f
P24+C	132.9 bc	0.16 ab	-0.4 abcd
P24+C+U	148.1 b c	0.09 c	-1.8 ef
F0+U	154.9 b	0.09 c	-2.0 ef
F0+C	142.3 bc	0.09 c	-2.2 ef
F0+C+U	136.0 bc	0.11 c	-1.5 cdef
P0+U	136.0 bc	0.15 ab	-0.2 ab
P0+C	132.7 bc	0.16 ab	-0.1 a
P0+C+U	123.5 bc	0.16 ab	-0.1 a
F0	134.0 bc	0.16 ab	-0.2 ab
P0	120.8 c	0.16 ab	-0.2 abc
Tukey=0.05	33.32	0.041	1.33

Medias de tratmientos con letras distintas difieren estadísticamente.

De forma contraria, a 96 h todos los tratamientos que recibieron la aplicación de las enzimas a 0 h consignaron el mayor Vmax, pero fueron los que reportaron los menores valores para S y mostraron un comportamiento opuesto a aquéllos tratamientos con la aplicación de la enzima a 24 h. finalmente, a 96 h todos los tratamientos incluyendo a T0 mostraron una FL similar, excepto P0+U, quien consignó el valor más alto de FL.

Cuadro 12. Efecto de preparados enzimáticos y aditivos químicos sobre los perfiles no lineales de producción de gas en muestras incubadas *in vitro*.

96 h			
Tratamientos	Vmax (ML)	S (mL/h)	FL (h)
T0	378.9 def	0.0297 ab	-2.26 b
F24	391.1 abcdef	0.0295 ab	-2.22 ab
F24+U	386.2 bcdef	0.0295 ab	-1.91 ab
F24+C	376.1 ef	0.0302 a	-1.88 ab
F24+C+U	381.4 cdef	0.0311 a	-1.96 ab
P24	392.0 abcdef	0.0292 ab	-2.42 b
P24+U	363.1 f	0.0294 ab	-1.65 ab
P24+C	373.0 ef	0.029 abc	-1.84 ab
P24+C+U	392.6 abcdef	0.029 abc	-1.47 ab
F0+U	417.5 abc	0.0274 bcd	-1.43 ab
F0+C	430.8 a	0.0264 cd	-1.53 ab
F0+C+U	422.5 ab	0.0265 cd	-1.58 ab
P0+U	419.5 ab	0.0255 de	-1.23 a
P0+C	416.9 abcd	0.0236 f	-2.18 ab
P0+C+U	403.0 abcd	0.0239 def	-1.77 ab
F0	404.9 abcd	0.0239 ef	-2.13 ab
P0	405.4 abcd	0.0239 ef	-1.78 ab
Tukey=0-05	39.74	0.0025	0.998

Medias de tratamientos con letras distintas difieren estadísticamente.

7.1.3. Degradación, digestibilidad y adherencia microbiana

La materia seca desaparecida (MSD), fibra detergente neutro residual (FDNr), digestibilidad verdadera (DV), adherencia microbiana (AM) y masa microbiana (MM) fueron afectadas por los tratamientos a 24 y 96 h ($P < 0.0001$) (Cuadros 13 y 14).

Cuadro 13. Degradación de MS, digestibilidad, adherencia microbiana y masa microbiana.

ANOVA 24 h											
F.V.	GL	%MSD		%FDNr		%DV		AM		MM	
		CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F
Trat	16	208.9	.0001	18.9	.0001	83.3	.0001	.0007	.0001	2284	.0001
Error	17	3.9		1.1		3.6		.00001		79.4	
R ²		0.98		0.94		0.96		0.98		0.96	
C.V. (%)		5.33		1.28		3.83		5.66		3.79	

Cuadro 14. Degradación de MS, digestibilidad, adherencia microbiana y masa microbiana

ANOVA 96 H											
F.V.	GL	%MSD		% FDNr		%DV		AM		MM	
		CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F
Trat.	16	285.9	.0001	31	.0001	173.1	.0001	.002	.0001	4851	.0001
Rep(Bloq)	7	151.7		271		12.7		.009		1504	
Error	112	17.3		8.5		9.4		.0004		302.3	
R ²		0.74		0.71		0.73		0.71		0.82	
C.V. (%)		7.05		3.5		4.63		27.03		5.13	

Todos los tratamientos que recibieron los preparados enzimáticos (F y P) a 0 h, así como P24+U, P24+C y P24+C+U reportaron porcentajes promedio de MSD y DV superiores a T0 ($P < 0.05$), el resto fueron iguales a T0, a 24 h de incubación *in vitro*. La variable MM mostró un comportamiento similar a MSD y DV, a excepción del tratamiento P0+C que tampoco difirió de T0. En el caso de FDNr los tratamientos P24+U, P24+C+U, F0+U, P0+U, P0+C, P0+C+U, F0 y P0 fueron iguales entre sí pero superaron al testigo T0; el resto de los tratamientos fueron iguales a T0. En adherencia microbiana (AM) los tratamientos F24+U, F24+C y F24+C+U mostraron valores similares a T0 y fueron superiores al resto de los tratamientos indicando un comportamiento inverso al mostrado por MSD, DV, FDNr y MM, éstas últimas mostraron una tendencia altamente correlacionada, donde todos los tratamientos con aplicación de enzimas a 0 h y además, P+U, P+C y P+C+U, reportaron los mejores comportamientos, superando al T0 (Cuadro 15). Cuando el análisis se realizó a 96 h (Cuadro 16) para las variables MSD, DV y MM mostraron un comportamiento similar al reportado a 24 h, donde T0 el valor más bajo y todos los tratamientos con P o F aplicado a 0 h superaron al resto de los tratamientos incluyendo a T0. Esto sugiere que a medida que va desapareciendo el material fibroso de mayor degradabilidad entonces sólo los tratamientos a 0 h son capaces de remover compuestos fibrosos de mayor resistencia. Lo anterior encuentra mayor sustento si se observa que en el caso de FDNr y de AM a 96 h prácticamente todos los tratamientos tuvieron un comportamiento similar y no resultaron diferentes a T0. Además, no parecen existir suficientes evidencias para establecer parámetros de calidad nutricional en un forraje, tratado o sin tratar (como en el caso del rastrojo de maíz en el presente trabajo), a periodos de tiempo superiores a 72 h, ya que una mayor exposición de tiempo del forraje a la actividad enzimática microbiana ruminal, termina por degradar la máxima proporción permisible de un forraje fibroso, haciendo que tratamientos y testigo presenten un

comportamiento similar, pero además tiene poco valor práctico encontrar alta degradación a periodos muy prolongados de tiempo, pues lo que se busca es lograr una tasa de degradación a menor tiempo para favorecer un tránsito más rápido de los forrajes fibrosos, especialmente en el tracto ruminal y mejorar con ello la tasa de consumo voluntario en rumiantes.

Cuadro 15. Degradación de la fibra, digestibilidad, adherencia microbiana y masa microbiana a 24 h.

Trat	MSD (%)	FDNr (%)	DV (%)	AM (mg)	MM (mg)
T0	20.5 b	77.4 def	38.5 d	0.090 a	192.4 f
F24	24.5 b	79.9 cde	39.7 d	0.076 bc	199.4 f
F24+U	23.5 b	77.7 def	40.6 d	0.085 ab	201.2 f
F24+C	24.5 b	74.4 f	43.8 cd	0.093 a	210.2 ef
F24+C+U	27.4 b	76.9 df	44.2 bcd	0.083 abc	217.3 def
P24	23.6 b	81.1 abad	38.0 d	0.071 c	186.5 f
P24+U	43.2 a	82.6 abc	53.1 a	0.049 d	262.4 abc
P24+C	41.4 a	81.4 abad	52.3 a	0.051 d	244.5 bcde
P24+C+U	40.4 a	83.0 abc	50.5 abc	0.050 d	247.5 abcd
F0+U	44.3 a	85.2 a	52.5 a	0.041 d	263.5 abc
F0+C	46.2 a	81.5 abad	56.2 a	0.049 d	275.0 abc
F0+C+U	44.9 a	81.0 bcde	55.3 a	0.051 d	267.8 abc
P0+U	47.4 a	84.5 ab	55.5 a	0.041 d	278.7 ab
P0+C	41.3 a	82.4 abc	51.7 ab	0.048 d	240.1 cdef
P0+C+U	47.4 a	84.0 ab	55.8 a	0.042 d	276.0 abc
F0	44.1 a	83.2 abc	53.5 a	0.047 d	268.9 abc
P0	45.7 a	84.5 ab	54.1 a	0.044 d	283.7 a
Tukey=0.05	7.92	4.17	7.56	0.014	24.03

Medias de tratamientos con letras distintas difieren estadísticamente.

Al igual que en el caso anterior (DV a 24 h), la DV a 96 h también mostró un comportamiento similar y consistente al de la MSD, lo cual corrobora el hecho de que a medida que los tratamientos con aplicación enzimática a 0 h aumentaron la desaparición de la MS, también se incrementó paralelamente la DV, a excepción del tratamiento F24+C el cual mostró un comportamiento similar a los tratamientos antes indicados (Cuadro 16). En masa microbiana, se encontró que todos los tratamientos con la aplicación de F o P a 0 h a excepción de P0+C, tanto a 24 como a 96 horas registraron el mayor crecimiento de microorganismos. Esto es importante, pues se sabe que un mayor

crecimiento microbiano puede favorecer una mejor degradación de la fibra y por lo tanto, un mayor aprovechamiento de la energía disponible.

Cuadro 16. Degradación de la fibra, digestibilidad, adherencia microbiana y masa microbiana.

Corridas 1 y 2 a 96 h					
Tratamiento	MSD (%)	FDNr (%)	DV (%)	AM (mg)	MM (mg)
T0	50.8 d	84.4 abc	58.7 c	0.041 abcde	308.4 e
F24	51.4 d	82.4 abcd	60.2 c	0.046 abc	320.7 de
F24+U	53.0 d	82.2 abcd	61.8 c	0.045 abcd	319.8 de
F24+C	51.8 d	79.2 d	62.4 c	0.053 a	316.7 de
F24+C+U	54.2 d	79.6 cd	64.0 ab	0.050 ab	329.5 cde
P24	54.2 d	83.6 abcd	62.0 c	0.039 abcde	316.2 de
P24+U	55.5 cd	84.4 abc	62.5 c	0.036 abcde	316.8 de
P24+C	56.2 cd	84.1 abcd	63.1 c	0.035 bcde	318.1 de
P24+C+U	58.0 bcd	86.9 a	63.5 c	0.028 de	318.4 de
F0+U	63.8 ab	85.5 ab	69.9 ab	0.027 de	356.2 abc
F0+C	63.6 ab	81.7 bcd	70.3 a	0.035 bcde	360.2 abc
F0+C+U	64.7 ab	82.5 abcd	70.9 a	0.032 cde	360.0 abc
P0+U	67.9 a	85.1 abc	72.7 a	0.025 e	378.4 a
P0+C	63.4 abc	83.4 abcd	69.6 a	0.030 cde	342.8 bcd
P0+C+U	66.8 a	84.0 abcd	72.1 a	0.027 e	365.4 ab
F0	64.0 ab	82.8 abcd	70.2 a	0.033 bcde	373.1 ab
P0	64.7 ab	84.38 abc	70.3 a	0.030 cde	370.5 ab
Tukey=0.05	7.92	4.17	7.56	0.014	30.77

Medias con letras distintas difieren estadísticamente.

7.1.4. Digestibilidad de la materia orgánica (DMO)

La digestibilidad de la materia orgánica (DMO) fue afectada por el tipo de tratamiento (T), el tiempo de medición (TM= 24, 36, 48, 60 y 72 h) y la interacción TxTM ($P < 0.0001$), mientras la digestibilidad de la materia orgánica fraccional (DMO/tiempo=DMO/T), fue afectada por T y por TM ($P < 0.0001$), pero no por la interacción TxTM (Cuadro 17). Los resultados se discuten comparativamente contra T0 (Cuadro 18). Los resultados indican que a 24 h ninguno de los tratamientos superó a T0 en DMO, incluso P0+C+U, P0 y F0 fueron inferiores a T0 y al resto de los tratamientos ($P < 0.05$); a 40 h F0+U, F0+C, F0+C+U y P0+U superaron a T0 en DMO con incrementos de 7.1, 7.7, 6.5 y 5.5%,

respectivamente; a 48 h, estos mismos tratamientos además de P0+C reportaron incrementos sobre T0 para DMO de 7.8, 8.7, 7.2, 6.9 y 3.9%, respectivamente; a 60 h los mismos tratamientos y en el mismo orden, reportaron incrementos en DMO sobre T0 de 8.1, 9.3, 7.6, 7.9 y 5.3%, respectivamente; y por último a 72 h los mismos tratamientos a los que se añadieron P0+C+U, P0 F0, consignaron para DMO incrementos sobre T0 de 8.3, 9.8, 7.9, 8.6, 6.2, 4.0, 4.2 y 4.0%, respectivamente. Para todos los periodos de tiempo antes indicados, los tratamientos restantes tuvieron valores de DMO iguales a T0 y en ningún caso T0 fue superior a cualesquiera de los tratmientos evaluados, excepto los tres casos señalados originalmente a 24 h (ver Cuadro 5 A).

Cuadro 17. ANOVA de la digestibilidad de la materia orgánica.

F.V.	GL	%DMO/T		%DMO	
		CM	P>F	CM	P>F
Tratamiento	16	0.012	0.0001	233.76	0.0001
Tiempo	4	8.252	0.0001	9973.18	0.0001
Rep(Bloque)	7	0.003	0.0001	1221.67	0.0001
Trat x Tiempo	64	0.001	0.0001	15.30	0.1359
Error	588	0.00019		26.64	
R ²		0.996		0.88	
C.V. (%)		2.85		4.36	

En DMO/t a 24 h a excepción de F24, F24+C y P24 que registraron valores similares a T0, los 13 tratamientos restantes registraron valores superiores a T0 (P<0.05); a 40 h todos los tratamientos con F0 o P0 sin y con C, U o C+U, así como F24+U y P24+U, superaron a T0 en DMO/t (P<0.05); a 48 y 60 h todos los que recibieron los preparados enzimáticos a 0 h y únicamente F24+U (con aplicación de F a 24 h), fueron superiores a T0 (P<0.05); finalmente a 72 h, sólo P0+U fue superior a T0 en DMO/t (P<0.05). Sin embargo, los tratamientos que registraron los valores más altos de DMO/t a 24 h fueron F24+U, F0+U, F0+C, F0+C+U, P0+U y P0+C+U, superando a los demás tratamientos e incluyendo a T0; mostrando además, superioridad de los tratamientos que contenían aditivos químicos (U, C y C+U) sobre T0 y sobre F y P sin aditivos químicos (P<0.05), y F0 y P0 a su vez, superaron a T0 (P<0.05). Esta tendencia fue más evidente en DMO, donde F0+U, F0+C, F0+C+U y P0+U superaron a T0 y al resto de los tratamientos (P<0.05).

Cuadro 18. Digestibilidad de la materia orgánica (DMO) y fraccional (DMO/t).

Trat.	TM (h)	%DMO/t	%DMO	Trat.	TM (h)	%DMO/t	%DMO
T0 (1)	24	0.84 ^b	67.7 ^a	U+F0 (10)	24	0.93 ^a	70.5
	40	0.51 ^b	77.8 ^b		40	0.56 ^a	83.3 ^a
	48	0.41 ^b	81.6 ^b		48	0.44 ^a	87.9 ^a
	60	0.31 ^b	84.5 ^b		60	0.34 ^a	91.4 ^a
	72	0.25	86.3 ^b		72	0.26	93.4 ^a
F24 (2)	24	0.85	69.4	C+F0 (11)	24	0.90 ^a	70.2
	40	0.51	79.6		40	0.54 ^a	83.8 ^a
	48	0.41	83.5		48	0.43 ^a	88.7 ^a
	60	0.32	86.6		60	0.33 ^a	92.4 ^a
	72	0.25	88.5		72	0.25	94.8 ^a
U+F24 (3)	24	0.89 ^a	69.3	U+C+F0 (12)	24	0.92 ^a	69.6
	40	0.54 ^a	80.1		40	0.55 ^a	82.8 ^a
	48	0.43 ^a	83.9		48	0.43 ^a	87.5 ^a
	60	0.33 ^a	86.8		60	0.33 ^a	91.0 ^a
	72	0.26	88.6		72	0.26	93.1 ^a
C+F24 (4)	24	0.84	67.7	U+P0 (13)	24	0.93 ^a	68.0
	40	0.51	77.5		40	0.58 ^a	82.0 ^a
	48	0.40	81.2		48	0.45 ^a	87.2 ^a
	60	0.31	84.1		60	0.35 ^a	91.2 ^a
	72	0.24	85.8		72	0.27 ^a	93.7 ^a
U+C+F24 (5)	24	0.87 ^a	69.9	C+P0 (14)	24	0.88 ^a	65.3
	40	0.52	79.5		40	0.55 ^a	79.6
	48	0.41	83.0		48	0.43 ^a	84.8 ^a
	60	0.32	85.7		60	0.33 ^a	89.0 ^a
	72	0.25	87.3		72	0.26	91.7 ^a
P24 (6)	24	0.85	69.5	U+C+P0 (15)	24	0.90 ^a	64.1 ^b
	40	0.51	79.9		40	0.56 ^a	78.2
	48	0.41	83.8		48	0.44 ^a	83.3
	60	0.31	86.8		60	0.34 ^a	87.3
	72	0.25	88.6		72	0.26	89.7 ^a
U+P24 (7)	24	0.87 ^a	65.9	F0 (16)	24	0.86 ^a	63.1 ^b
	40	0.53 ^a	76.1		40	0.55 ^a	77.2
	48	0.42	79.7		48	0.43 ^a	82.4
	60	0.32	82.5		60	0.33 ^a	86.3
	72	0.26	84.1		72	0.25	88.8
C+P24 (8)	24	0.87 ^a	67.0	P0 (17)	24	0.88 ^a	64.0 ^b
	40	0.51	77.5		40	0.56 ^a	78.2
	48	0.40	81.0		48	0.43 ^a	83.4
	60	0.30	83.6		60	0.33 ^a	87.4
	72	0.24	85.1		72	0.26	89.9 ^a
U+C+P24 (9)	24	0.89 ^a	67.8	Trats. con letras distintas difieren de T0, (Tukey = 0.05) a 24, 48, 60 y 72 h.			
	40	0.51	78.3				
	48	0.41	81.9				
	60	0.31	84.6				
	72	0.25	86.1				
Tukey=.05		0.02	2.99	Tukey=.05		0.02	2.99

Tratamientos sin literales no difieren de T0 para cada tiempo de medición.

Los resultados anteriores sugieren la existencia de un posible sinergismo entre los preparados enzimáticos y los aditivos químicos sobre los propios preparados enzimáticos. Asimismo, todos los tratamientos con aplicación de los preparados enzimáticos a 0 h superaron a T0 y a los que recibieron el tratamiento enzimático a 24 h ($P < 0.05$; ver Cuadro 6 A).

7.1.5. Patrones de fermentación

7.1.5.1. Producción de ácidos grasos volátiles

La producción de ácido acético (AA), ácido propiónico (AP) y ácido butírico fue afectada por el tratamiento (T), el tiempo de medición (TM: 24, 36 y 48 h) y por la interacción TxTM ($P < 0.0001$; Cuadro 19).

Cuadro 19. ANOVA para ácidos grasos volátiles.

F.V.	GL	%AA		%AP		%AB	
		CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F
Tratamiento	16	29.81	0.0001	37.35	0.0001	1.32	0.0001
Tiempo	2	32.44	0.0001	9.48	0.0001	13.57	0.0001
Trat x Tiempo	32	11.32	0.0001	10.19	0.0001	0.96	0.0001
Error	153	81.94		40.4		47.97	
R ²			0.92		0.96		0.96
C.V. (%)			1.31		1.77		3.67

En la producción de AA los mayores rendimientos se obtuvieron en los tratamientos con Fibrozyme a 24 h combinado con C, U o C+U y P24 sin químicos, incluyendo a T0, el resto de los tratamientos tuvieron rendimientos inferiores a T0; sin embargo, P0 con C, U y C+U junto con P0 y F0 sin aditivos químicos reportaron el más bajo rendimiento de AA ($P < 0.05$; Cuadro 20). No obstante en la interacción TxTM, F24+C, F24+C+U y P24 a 24 h, consignaron valores superiores de AA (58.5%, 59.0% y 58.7%, respectivamente) en comparación con T0 (57.7%) y también respecto a la mayor parte de los tratamientos ($P < 0.05$). Sin embargo, en producción de AP se presentó un comportamiento opuesto a

AA, donde los rendimientos mayores fueron consignados por los tratamientos P0 con C, U y C+U así como F0 y P0 sin aditivos químicos, los valores intermedios se registraron con P24 con C, U y C+U, y P0 con C, U y C+U, inferiores a los primeros pero superiores a T0 ($P < 0.05$); los más bajos rendimientos los produjeron los tratamientos F24 con C, U y C+U y P24 sin aditivos químicos iguales a T0 e inferiores al resto de los tratamientos ($P < 0.05$). En la interacción TxTM, para esta misma variable, los tratamientos P24 con C, U y C+U, F0 y P0 con y sin aditivos químicos superaron a T0 tanto a 24 h como a 48 h ($P < 0.05$), y a 36 h, F24 sin y con aditivos químicos, así como F0, P0, F0+U y P0 fueron superiores a T0 ($P < 0.05$). Finalmente, en producción de AB, los tratamientos no mostraron diferencias con T0. Sin embargo en la interacción TxTM el tratamiento F24+C a 48 h fue superior a T0 (16.7% vs. 15.7%) ($P < 0.05$).

Cuadro 20. Comparación de medias para ácidos grasos volátiles a 24 h.

Tratamientos	%AA	%AP	%AB
T0	57.60 a	26.55 g	15.85 a
F24	57.36 a	27.00 g	15.64 ab
F24+U	57.70 a	26.84 g	15.46 abc
F24+C	57.53 a	26.61 g	15.86 a
F24+C+U	57.84 a	26.81 g	15.35 abc
P24	57.61 a	26.95 g	15.44 abc
P24+U	55.52 bc	29.03 f	15.45 abc
P24+C	55.97 b	29.33 ef	14.69 c
P24+C+U	55.20 bcd	29.79 de	15.00 bc
F0+U	55.09 bcd	29.93 cde	14.97 bc
F0+C	55.54 bc	29.56 ef	14.90 bc
F0+C+U	55.64 b	29.33 ef	15.03 bc
P0+U	54.38 de	30.55 bc	15.08 abc
P0+C	54.54 cde	30.51 bcd	14.96 bc
P0+C+U	53.84 def	30.88 ab	15.29 abc
F0	53.42 ef	31.22 ab	15.36 abc
P0	53.39 f	31.30 a	15.31 abc
Tukey= 0.05	1.05	4.98	0.8

Tratamientos con letras diferentes, difieren estadísticamente.

7.1.5.2. Parámetros de la fermentación ruminal

La relación ácido acético: ácido propiónico (AA:AP), producción de ácidos grasos volátiles totales (AGVt) y patrón de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) fueron afectados por los tratamientos (T), el tiempo de medición (TM: 24, 36 y 48 h) y por la interacción TxTM (P<0.0001; Cuadro 21).

Cuadro 21. ANOVA de los parámetros de fermentación ruminal a 24 h.

F.V.	GL	AA:AP		AGVt		N-NH ₃	
		CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F
Tratamiento	16	0.38	0.0001	208.72	0.0001	21.24	0.0001
Tiempo	2	0.16	0.0001	12353.37	0.0001	86.67	0.0001
Trat x Tiempo	32	0.11	0.0001	74.41	0.0001	3.85	0.0001
Error	153	0.0031		5.3		0.36	
R ²		0.97		0.92		0.97	
C.V. (%)		2.84		5.23		4.71	

En la relación AA:AP, F24 con C, U y C+U. así como F0 y P0 con y sin aditivos químicos reportaron la proporción más baja (P<0.05) que el resto de los tratamientos, incluyendo a T0, pero en la producción de AGVt, estos mismos tratamientos incluyendo P24 fueron inferiores a T0 (P<0.05), el resto de los tratamientos no difirieron de T0. No obstante, para el patrón de nitrógeno amoniacal (N-NH₃), los tratamientos que contenían urea (excepto F0+C+U y P0+C+U) superaron a los demás tratamientos, incluyendo a T0 (P<0.05; Cuadro 22).

De hecho N-NH₃ a 24 h mostró una alta correlación con DV (r=0.81), con VG a 24 h (r=0.73), con VG a 48 h (r=0.76), con DMO a 24 h (r=0.82) y con DMO a 48 h (r=0.86) (P<0.0001 en todos los casos). Además, N-NH₃ a 36 h y 48 h también correlacionó con EM (r=0.62; P<0.0025 y r=0.65; P<0.0014) (Cuadros 7 A y 8 A); mientras que con propionato y butirato correlacionó fuertemente a 36 y 48 h y a 24 h correlacionó negativamente pero no fue significativa y con acetato a 24 y 48 h correlacionó alto y negativamente con N-NH₃ a 36 h, el resto no correlacionó (Cuadro 23).

Cuadro 22. Comparación de medias para los parámetros de fermentación ruminal a 24 h.

Tratamientos	AA:AP	AGVt	N-NH ₃
T0	2.18 a	48.59 ab	12.35 def
F24	2.14 a	48.54 ab	11.83 efg
F24+U	2.16 a	49.11 ab	14.87 a
F24+C	2.17 a	49.74 ab	12.36 de
F24+C+U	2.17 a	51.66 a	14.18 ab
P24	2.15 a	47.75 c	12.69 cde
P24+U	1.92 b	43.70 cd	14.57 a
P24+C	1.91 b	40.93 cde	11.84 efg
P24+C+U	1.86 bc	41.06 cde	13.36 bc
F0+U	1.84 bc	42.13 cd	14.60 a
F0+C	1.88 b	41.75 cde	11.61 fgh
F0+C+U	1.90 b	41.30 cde	12.91 cd
P0+U	1.78 cde	40.77 cde	14.55 a
P0+C	1.80 cd	38.64 e	11.58 fgh
P0+C+U	1.75 de	39.91 de	12.73 cd
F0	1.72 e	40.67 cde	10.75 h
P0	1.71 e	42.04 cde	11.06 gh
Tukey= 0.05	0.08	3.31	0.87

Medias de tratamientos con letras diferentes difieren estadísticamente.

Cuadro 23. Coeficientes de correlación entre N-NH₃ y porcentajes de ácidos acético, propiónico y butírico a tres tiempos.

Variables	% AA			% AP			% AB		
	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h
N-NH ₃ 24 h	-0.05 0.793	-0.04 0.822	-0.12 0.510	0.41 0.062	-0.03 0.904	-0.22 0.348	-0.24 0.288	0.18 0.433	-0.17 0.470
N-NH ₃ 36 h	-0.82 0.0001	0.21 0.246	-0.87 0.0001	0.51 0.017	0.86 0.0001	0.93 0.0001	0.89 0.0001	0.73 0.0002	0.93 0.0001
N-NH ₃ 48 h	0.07 0.708	0.26 0.339	0.08 0.700	0.58 0.006	0.88 0.0001	0.94 0.0001	0.88 0.0001	0.78 0.0001	0.94 0.0001

Como se observó en el presente trabajo, la relación AA:AP fue inferior en los tratamientos a los que se aplicaron las enzimas a 0 h, lo cual se explica por lo indicado anteriormente en el sentido de que el AP se incrementó en dichos tratamientos en forma inversamente proporcional a la del AA para los tratamientos citados, de modo que fue aquí donde se presentó una reducción en la relación AA:AP.

7.1.5.3. Indicadores de la velocidad de fermentación ruminal

La producción de bióxido de carbono (CO₂), gas metano (CH₄) y la relación CO₂:CH₄, fueron afectados por el tipo de tratamiento, el tiempo de medición (TM: 24, 36 y 48 h) y por la interacción TxTM (P<0.0001; Cuadro 24).

Cuadro 24. Análisis de varianza para producción de gases primarios.

F.V.	GL	CO ₂		CH ₄		CO ₂ :CH ₄	
		CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F
Tratamiento	16	93.87	0.0001	37.95	0.0001	0.06	0.0001
Tiempo	2	4226.62	0.0001	1102.27	0.0001	0.11	0.0001
Trat x Tiempo	32	30.66	0.0001	11.82	0.0001	0.02	0.0001
Error	153	2.45		0.41		0.0033	
R ²		0.882		0.98		0.79	
C.V. (%)		6.12		5.11		2.78	

La producción de CO₂ y CH₄ mostraron un comportamiento similar a la producción de AA, la relación AA:AP y producción de AGVt, donde F24 sin y con aditivos químicos, P24 y P24+U junto con T0 resultaron superiores al resto de los tratamientos (P<0.05), y además, siguieron un comportamiento muy similar a la variable AM (Cuadro 25). En la relación CO₂:CH₄, T0, F24, F24+U, F24+C y P24, tuvieron un comportamiento similar, pero superaron al resto de los tratamientos (P<0.05).

Cuadro 25. Comparación de medias para producción de gases primarios a 24 h.

Tratamientos	CO ₂	CH ₄	CO ₂ :CH ₄
T0	28.81 ab	14.72 a	1.97 f
F24	28.62 ab	14.58 a	1.98 ef
F24+U	28.93 ab	14.82 a	1.97 f
F24+C	29.63 ab	15.10 a	1.97 f
F24+C+U	30.64 a	15.00 a	2.07 cd
P24	28.09 ab	14.39 a	1.97 f
P24+U	25.42 b	12.42 b	2.06 de
P24+C	23.46 cd	11.48 c	2.05 def
P24+C+U	23.64 cd	11.33 cd	2.08 cd
F0+U	24.24 c	11.59 bc	2.09 bcd
F0+C	24.01 cd	11.60 bc	2.07 cd
F0+C+U	23.82 cd	11.57 bc	2.06 de
P0+U	23.41 cd	11.05 cd	2.12 abcd
P0+C	22.13 d	10.46 d	2.12 abcd
P0+C+U	22.96 d	10.70 cd	2.15 abc
F0	23.39 cd	10.79 cd	2.17 ab
P0	24.13 cd	11.06 cd	2.18 a
Tukey= 0.05	2.25	0.92	0.08

Medias de tratamientos con letras diferentes, difieren estadísticamente.

7.1.6. Energía metabolizable y energía neta de lactancia

Tanto la energía metabolizable (EM) como la energía neta de lactancia (ENL) a 24 y a 48 h fueron afectadas por los tratamientos evaluados ($P < 0.0001$; Cuadro 26).

Cuadro 26. Análisis de varianza para energía metabolizable y energía neta de lactancia.

F. DE V.	GL	EM 24h		EM 48h		ENL 24h		ENL 48h	
		CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F
Tratamiento	16	1.00	0.0001	1.24	0.0001	11.29	0.0001	20.36	0.0001
Rep(Bloque)	7	8.97	0.0001	4.77	0.0001	46.94	0.0001	37.33	0.0001
Error	112	20.83		34.14		16.36		38.19	
R ²		0.79		0.61		0.78		0.6	
C.V. (%)		4.25		4.37		6.62		7.17	

La energía metabolizable (EM) a 24 h no existieron diferencias entre tratamientos y T0, pero a 48 h F0+C reportó un valor de EM superior ($P<0.05$) al resto de los tratamientos incluyendo a T0, siendo estos últimos iguales entre sí. En producción de energía neta de lactancia (ENL) a 24 h no existieron diferencias entre tratamientos y T0, mientras que a 48 h, de nuevo el tratamiento F24+C reportó un promedio de ENL mayor al consignado por T0 y el resto de los tratamientos ($P<0.05$), y estos últimos a su vez, mostraron un comportamiento igual a T0. Se pudo observar un comportamiento similar entre EM y ENL a 48 h presentándose entre ambas una correlación alta y positiva ($r=0.99$; $P<0.0001$; Cuadro 27).

Los resultados aquí encontrados para EM y ENL, tanto a 24 h como a 48 h, indican que no existe evidencia que muestre ventaja alguna con la aplicación de los preparados enzimáticos a 24 h (antes de la incubación *in vitro*), ya que en las variables en que los primeros tratamientos fueron superiores a aquéllos que recibieron el tratamiento enzimático a 0 h (producción de CO_2 , CH_4 , $\text{CO}_2:\text{CH}_4$, AA, AGVt y relación AA:AP), no obstante, mostraron un comportamiento igual a T0; en cambio, en las variables VG, VA, DMO a 48, 60 y 72 h, MSD, DV, FDNr y EM los tratamientos que recibieron la aplicación de Fibrozyme o Promote 0 h sin y con aditivos químicos (C, U o C+U), siempre resultaron superiores tanto a T0 como también a los que recibieron tratamiento enzimático a 24 h.

Cuadro 27. Comparación de medias para energía metabolizable y neta de lactancia.

Tratamientos	EM 24 h MJ/kg, MS	EM 48 h MJ/kg, MS	ENL 24 h MJ/kg, MS	ENL 48 h MJ/kg, MS
T0	10.19 abc	12.31 bcd	5.82 ab	7.82 bc
F24	10.43 ab	12.58 abcd	6.05 a	8.13 abc
F24+U	10.39 ab	12.62 abcd	5.90 a	8.04 abc
F24+C	10.17 abc	12.24 cd	5.84 ab	7.79 bc
F24+C+U	10.48 ab	12.50 abcd	6.04 a	7.97 abc
P24	10.40 ab	12.64 abcd	6.06 a	8.19 abc
P24+U	9.88 abc	12.00 d	5.49 ab	7.44 c
P24+C	10.08 abc	12.22 cd	5.76 ab	7.78 bc
P24+C+U	10.18 abc	12.35 bcd	5.81 ab	7.88 bc
F0+U	10.57 a	13.24 ab	6.07 a	8.69 ab
F0+C	10.55 ab	13.37 a	6.15 a	8.98 a
F0+C+U	10.45 ab	13.19 abc	6.00 a	8.70 ab
P0+U	10.19 abc	13.13 abc	5.72 ab	8.55 ab
P0+C	9.80 c	12.79 abcd	5.51 ab	8.35 abc
P0+C+U	9.61 c	12.54 abcd	5.29 b	8.01 abc
F0	9.49 c	12.43 abcd	5.25 b	7.97 abc
P0	9.60 c	12.58 abcd	5.31 b	8.10 abc
Tukey=0.05	0.763	0.977	0.676	1.034

Medias de tratamientos con letras diferentes difieren estadísticamente

7.1.7 Análisis de Correlación

7.1.7.1. Correlaciones entre principales variables a 24 h

En las variables evaluadas a 24 h, se encontraron correlaciones significativas entre MSD, MSR, FDNr, AM, Vmax y MM (Cuadro 28). Aquellos tratamientos con porcentajes mayores de MSD y con mejor digestibilidad verdadera (DV%), presentaron también los mayores porcentajes de FDNr, mostrando que en estos hubo mejor aprovechamiento de los contenidos celulares. La correlación negativa entre FDNr y Vmax, muestra que probablemente la producción de gas está más influenciada por la degradación de la fracción FDN, más aún si se observa que V correlaciona de forma negativa con la variable DV. Además, la cantidad de AM a la fibra parece influir positivamente en la degradación de la FDN, lo cual se aprecia al notar que estas dos variables correlacionan inversamente.

Por otra parte, el crecimiento de la MM mejoró la degradación de la materia seca (MSD), FDN y la DV, pero correlacionó negativamente con Vmax.

Cuadro 28. Análisis de correlaciones para principales variables calculadas a 24 h.

VARIABLES	MSR %	MSD %	FDNr %	DV %	AM mg	Vmax mL	S mL/h	MM mg
%MSR	1	-1 0.0001	-0.77 0.0001	-0.97 0.0001	0.93 0.0001	0.93 0.0001	-0.35 0.0545	-0.96 0.0001
%MSD		1	0.77 0.0001	0.97 0.0001	-0.93 0.0001	-0.93 0.0001	0.35 0.0545	0.96 0.0001
%FDNr			1	0.61 0.0004	-0.94 0.0001	-0.70 0.0001	0.28 0.141	0.66 0.0001
%DV				1	-0.83 0.0001	-0.91 0.0001	0.35 0.0551	0.97 0.0001
AM (mg)					1	0.87 0.0001	-0.33 0.0732	-0.83 0.0001
Vmax (mL)						1	-0.56 0.0012	-0.87 0.0001
S (mL/h)							1	0.32 0.0798
MM (mg)								1

7.1.7.2. Correlaciones entre principales variables de datos de incubación a 96 h

Al igual que para 24 h, a 96 h la producción de biomasa microbiana (MM) correlacionó de forma alta y positiva con la materia seca degradada y también con la digestibilidad verdadera (MSD y DIV), así mismo, esta variable también mostró relación positiva con los porcentajes de digestibilidad de la materia orgánica (DMO 24 h y DMO 48 h) y con los volúmenes de gas (Vmax 24 h y Vmax 48 h); aunque a diferencia de las correlaciones a 24 h, no se encontró relación entre la degradación de la fracción FDNr y la cantidad de microorganismos producidos (MM; Cuadros 7A, 8A y 9A), pero sí se observó una relación alta y negativa ente FDNr y adherencia microbiana (AM), lo cual sugiere que a mayor cantidad de microorganismos adheridos a la fibra mejor será el aprovechamiento de ésta.

Tanto los valores de MSD, DV, DMO 24 h y DMO 48 h como los de energía metabolizable y energía neta de lactancia (EM y ENL) correlacionaron de forma alta y positiva con la producción de gas (V_{max} 24 h y V_{max} 48 h). No obstante, se debe destacar que la energía neta de lactancia (ENL) mostró una alta relación con DV, lo cual, debido a la naturaleza de los modelos de los cuales fueron calculados, muestra el grado de concordancia entre las variables relacionados con la degradación de la materia seca y FDN (a partir de las cuales se calculó DV) y los datos de producción de gas (a partir de los cuales se calculó la ENL).

El porcentaje de MSD correlacionó alta y positivamente con AP a 24 y 48 h, dado que la producción de AP está más relacionada con la degradación de los compuestos más digestibles. Esto podría explicar por qué aquellos tratamientos con mayor proporción de MS desaparecida tendieron a ser más altos en FDNr, ya que es probable que estos tratamientos hayan sido mejor aprovechados en sus contenidos celulares que aquéllos con menor proporción de FDNr, pero con porcentajes mayores de materia seca residual (MSR). El AA, por otra parte, mostró un comportamiento contrario al señalado anteriormente con MSD y MSR, debido a que el AP y AA tuvieron comportamientos inversos.

Este mismo patrón de comportamiento se observó entre las correlaciones de AA y AP con las variables FDNr, DV. Aunque a mayor cantidad de AA a 24 y 48 h, también se observa mejor adherencia microbiana, la cual, favorece la degradación de la FDN, el hecho de que el AA correlacione de forma negativa a 24 y 48 h con FDNr y DV, al tiempo que estas dos variables correlacionen de forma positiva con AP, muestra que se pueden diferenciar aquellos tratamientos en los que se aprovechó mejor la energía contenida en la FDN, de aquéllos en los que se aprovechó mejor la energía de los contenidos celulares: 1) es probable que en algunos tratamientos las enzimas y los aditivos químicos tuvieran mejor actividad rompiendo los enlaces de la pared celular liberando los contenidos celulares, caso en el que MSR fue menor, la DV se incrementó, pero la FDNr fue alta; lo que a su vez, promovió mayor producción de ácido propiónico; 2) en algunos otros tratamientos, las enzimas y aditivos químicos no rompieron totalmente los enlaces de la pared celular, lo cual probablemente incrementó la actividad de los microorganismos ruminales sobre la fracción FDN, pero no sobre los contenidos celulares, quizás por su baja disponibilidad;

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aunado a esto, se observó mayor producción de ácido acético, relacionado la degradación de las partes fibrosas de los sustratos.

7.1.8. Síntesis de los resultados

En el Cuadro 29 se puede observar con mayor claridad el efecto del pretratamiento sobre el comportamiento de las principales variables estudiadas en el presente trabajo. En general, los tratamientos a los que se les aplicó la enzima al momento de iniciar la incubación *in vitro* fueron mayor número de veces superiores al resto de los tratamientos en comparación con los tratamientos a los que se les aplicó la enzima 24 h antes.

Aunque tanto en los tratamientos con enzimas aplicadas 24 h como en aquéllos con P aplicado a 0 h se observaron mejores comportamientos con la adición de urea, es interesante señalar que el mejor tratamiento fue F24+C, seguido por todos aquellos tratamientos con P0, es decir, P0+U, P0+C, P0+C+U y P0.

En la mayoría de los casos, los tratamientos con enzima aplicada 24 h antes y que mostraron superioridad estadística, tendieron a ser similares a T0; al contrario de esto, generalmente aquellos tratamientos con enzima aplicada a 0 h tendieron a superar a T0.

La acción de Fibrozyme tiende a mejorar con el pretratamiento químico, especialmente con urea cuando la enzima es aplicada 24 h antes y con cal cuando es aplicada al momento. Tanto el testigo como el tratamiento P24+C+U, fueron aquéllos que consignaron menor número de superioridades estadísticas. Cabe señalar que aunque los tratamientos químicos U y C *per se*, en ciertos casos mejoraron el comportamiento de las enzimas; la combinación de estos dos químicos no favoreció la actividad de los preparados enzimáticos F y P aplicados a 0 h y P aplicado 24 h antes.

Cuadro 29. Resumen de diferencias significativas entre tratamientos para las principales variables de decisión.

Variables	Tratamientos																
	T0	Pretratamiento 24 h								Sin pretratamiento 0 h							
	s/a	Fibrozyme 24				Promote 24				Fibrozyme 0				Promote 0			
		S/Q [‡]	U	C	U+C	S/Q [‡]	U	C	U+C	U	C	U+C	S/Q [‡]	U	C	U+C	S/Q [‡]
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	16	13	14	15	17
VG										**	*			*	*		
TG	*	*	*	*	*	**		*	*	*	**	*		*	*		
VA						*				**	*			*			
%MSD 24h							**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
%DV 24h							**	**	*	*	**	**	*	**	**	**	*
%MSD 96h							*	*	*	*	*	*	*	**	*	**	*
%DV 96h										*	**	**	**	**	**	**	**
%DMO 48h										**	**	**					
%AA	**	**	**	**	**	**											
%AB	**	*	*	**	*	*	*										
%AP													*			*	**
AGVt	*	*	*	*	**												
A:P													**	*		*	**
CO ₂	*	*	*	*	**	*											
CH ₄	**	**	**	**	**	**											
CO ₂ :CH ₄													*	*	*	*	**
EM 24h	*	*	*	*	*	*	*	*	*	**	*	*		*	*		
EM 48h		*	*		*	*				*	**	*	*	*	*	*	*
ENL 24h	*	**	**	*	**	**	*	*	*	**	**	*		**	*	*	
ENL 48h		*	*		*	*				*	**	*	*	*	*	*	*
MM 24h							*		*	*	**		*	*	**		**
MM 96h										*	*		*	*	**	*	*
L 24h			*	*				*					*	**	*	**	*
L 48h		*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	**	*	*	*
	11	14	15	13	16	14	10	10	9	17	26	17	16	24	20	18	19

** Representa un nivel de significancia superior al resto de los tratamientos; * Representa un nivel de significancia de orden intermedio entre tratamientos estadísticamente superiores con los inferiores; ‡ S/Q: Enzima *per se*; s/a: sin aditivos químicos.

7.2. Resultados etapa *in situ*

7.2.1. Digestibilidad *in situ* (DIS) y fibra detergente neutro residual (FDNr)

El análisis de varianza utilizado con el diseño completamente al azar en arreglo factorial incompleto y tratamientos confundidos dentro de enzimas (parcelas mayores: modelo 1), consignó efectos significativos para la mayoría de las fuentes de variación sobre la DIS, excepto tiempo x enzima y tiempo x tratamiento dentro de Fibrozyme (Cuadro 30).

Cuadro 30. Análisis de varianza para digestibilidad *in situ*.

F de V	Digestibilidad <i>in situ</i>				
	GL	SC	CM	F cal	P>F
Modelo	12	15111.43	1259.30	215.86	0.0001
Error	147	857.58	5.83		
Tiempo	3	12279.96	4093.32	701.64	0.0001
Enzima	2	1595.90	797.95	152.07	0.0001
Tiempo x Enzima	6	57.32	9.55	1.82	0.1006
Tratamiento	9	2831.48	314.61	53.93	0.0001
Trat(Enzima)	9	2831.48	314.61	59.96	0.0001
Trat(Enzima F)	4	1080.32	270.08	51.47	0.0001
Trat(Enzima P)	3	155.26	51.75	9.86	0.0001
Tiempo*Trat(Enzima)	30	12507.88	416.93	79.46	0.0001
Tiempo*Trat(Enzima F)	12	65.41	5.45	1.04	0.4184
Tiempo*Trat(Enzima P)	9	105.19	11.69	2.23	0.0246
C.V.	4.5				
R ²	0.95				

En FDNr bajo el mismo modelo (modelo 1), de nuevo tiempo x enzima y tiempo x tratamiento dentro de Fibrozyme, así como factor enzima no mostraron significancia, el resto de las fuentes de variación sí afectaron el contenido de FDNr durante la incubación *in situ* (Cuadro 31).

Cuadro 31. Análisis de varianza de la FDNr.

F.V.	FDN residual				
	GL	SC	CM	F cal	P>F
Modelo	12	3907.03	325.58	38.68	0.0001
Error	147	1668.98	11.35		
Tiempo	3	3632.62	1210.87	106.65	0.0001
Enzima	2	57.58	28.79	2.81	0.0641
Tiempo X Enzima	6	78.75	13.13	1.28	0.2709
Tratamiento	9	274.42	30.49	2.69	0.0064
Trat(Enzima)	9	274.42	30.49	2.98	0.0031
Trat(Enzima F)	4	127.71	31.93	3.12	0.0177
Trat(Enzima P)	3	89.12	29.71	2.9	0.0378
Tiempo*Trat(Enzima)	30	4072.45	135.75	13.25	0.0001
Tiempo*Trat(Enzima F)	12	112.09	9.34	0.91	0.5373
Tiempo*Trat(Enzima P)	9	248.98	27.66	2.7	0.0067
C.V.	4.16				
R ²	0.70				

El tipo de aditivo químico tuvo un efecto significativo sobre la digestibilidad *in situ* (DIS), sin embargo ésta no fue afectada por la interacción tiempo x aditivo químico. La fibra detergente neutro residual (FDNr) fue afectada tanto por el aditivo químico como por la interacción tiempo x aditivo químico (Cuadro 32).

Cuadro 32. Análisis de varianza para aditivo químico y tiempo x aditivo químico.

F.V.	Digestibilidad <i>in situ</i>				
	GL	SC	CM	F cal	P>F
Tiempo	3	12279.96	4093.32	307.58	0.0001
Aditivo químico	4	1746.48	436.62	32.81	0.0001
Tiempo*A. químico	12	79.47	6.62	0.5	0.9133
Error	60	798.60	13.31		
C.V.	6.76				
R ²	0.88				
F.V.	FDN residual				
	GL	SC	CM	F cal	P>F
Tiempo	3	3632.62	1210.87	120.89	0.0001
Aditivo químico	4	218.93	54.73	5.46	0.0004
Tiempo*A. químico	12	322.17	26.85	2.68	0.0028
Error	60	601.2	10.02		
C.V.	3.91				
R ²	0.75				

El porcentaje promedio de DIS fue diferente para los cuatro tiempos evaluados ($P < 0.05$) y se incrementó linealmente a medida que el tiempo aumentó (Cuadro 33), indicando que la tasa de degradación de los forrajes en el rumen es proporcional al tiempo de incubación del alimento (en este caso rastrojo de maíz). No obstante, se observó que a 48 h de incubación, considerado este tiempo como digestibilidad verdadera, fue moderadamente alta, si se compara con otros forrajes que a ese mismo tiempo exhiben valores de digestibilidad inferiores al 50%. Lo anterior sugiere que existió una mejora en la degradación del rastrojo de maíz a 48 h, por la acción de los preparados enzimáticos y los aditivos químicos evaluados en el presente estudio.

Cuadro 33. Efecto del tiempo sobre DIS y FDNr.

Tiempo	DIS	FDNr
24 h	41.15 d	85.12 a
48 h	52.38 c	84.31 a
72 h	56.75 b	81.22 b
96 h	65.48 a	73.07 c
Tukey= 0.05	1.4	1.96

Letras distintas entre líneas difieren estadísticamente

Los valores de FDNr mostraron una tendencia inversa a DIS; en este caso no hubo diferencias significativas entre los tiempos 24 y 48 h, los cuales arrojaron los valores más elevados de FDNr, seguidos de los tiempos 72 y 96 h que exhibieron valores de FDNr menores. No obstante, existió una correlación alta y negativa ($r = -0.78$; $P < 0.0001$) entre FDNr y DIS, indicando que a medida que el contenido porcentual de fibra detergente neutro residual disminuyó la digestibilidad *in situ* aumentó proporcionalmente para cada tiempo evaluado. Este comportamiento se observó consistentemente dentro y entre los tratamientos evaluados en la etapa experimental *in situ* (Cuadro 34). De hecho considerando DIS como variable independiente (X) y FDNr como variable dependiente (Y) se encontró entre variables una relación inversa $y = 106.9 - 0.48x_i$. Además la correlación Tiempo y DIS fue de ($r = 0.987$) y una relación de dependencia lineal y positiva de DIS respecto al Tiempo ($y = 34.6 + 0.322x_i$); en tanto que la correlación Tiempo y FDNr fue negativa ($r = -0.92$) y una relación ($y = 90.71 - 0.164x_i$) también negativa.

Cuadro 34. Correlación entre DIS y FDNr dentro y entre tratamientos.

FDNr	DIS									
	R	R+M	C+F	U+F	C+U+F	C+P	U+P	C+U+P	F	P
R	-0.78 0.0004									
R+M	-0.71 0.0019	-0.78 0.0003								
C+F	-0.79 0.0003	-0.84 0.0001	-0.79 0.0002							
U+F	-0.79 0.0003	-0.81 0.0002	-0.77 0.0005	-0.83 0.0001						
C+U+F	-0.64 0.0074	-0.61 0.0114	-0.60 0.0145	-0.63 0.0096	-0.69 0.0033					
C+P	-0.79 0.0003	-0.77 0.0005	-0.78 0.0004	-0.85 0.0001	-0.80 0.0002	-0.82 0.0001				
U+P	-0.77 0.0005	-0.73 0.0015	-0.71 0.0020	-0.67 0.0041	-0.75 0.0008	-0.69 0.0028	-0.65 0.0062			
C+U+P	-0.81 0.0002	-0.81 0.0001	-0.78 0.0003	-0.82 0.0001	-0.84 0.0001	-0.76 0.0007	-0.67 0.0042	-0.78 0.0004		
F	-0.77 0.0005	-0.76 0.0007	-0.73 0.0013	-0.77 0.0006	-0.79 0.0002	-0.72 0.0016	-0.66 0.0056	-0.73 0.0014	-0.82 0.0001	
P	-0.79 0.0003	-0.86 0.0001	-0.85 0.0001	-0.87 0.0001	-0.86 0.0001	-0.84 0.0001	-0.71 0.0021	-0.82 0.0001	-0.85 0.0001	-0.89 0.0001

En el Cuadro 35 se observa que existieron diferencias entre preparados enzimáticos sobre la DIS, donde Promote fue superior a Fibrozyme (P=0.0001). La comparación de medias incluyó el promedio del conjunto de tratamientos que contenían Promote y de los tratamientos con Fibrozyme, en ambos casos con y sin aditivos químicos, además se incluyeron ambos testigos (T0 y T00). Los resultados indicaron que los tratamientos que incluyeron Promote (P, P+U, P+C y P+U+C) superaron en DIS a los que incluyeron Fibrozyme (F, F+U, F+C y F+U+C). Además, ambos grupos de tratamientos superaron (P<0.05) a T0 (rastrojo+melaza) y este a su vez superó (P<0.05) a T00 (rastrojo sin melaza). Sin embargo, en FDNr no existieron diferencias entre tratamientos y T0, pero sí superaron a T00 (P<0.05).

Cuadro 35. Comparación entre preparados enzimáticos y testigos.

Enzima	DIS	FDNr
Promote*	56.14 a	80.35 a
Fibrozyme**	54.85 b	80.98 a
T0	53.27 c	81.06 a
T00	42.20 d	82.92 b
Tukey= 0.05	0.80	1.18

* P, P+U, P+C y P+U+C; **F, F+U, F+C y F+U+C

La interacción tiempo x enzima no afectó significativamente la DIS ni la FDNr, de modo que los tratamientos evaluados tuvieron un comportamiento lineal sobre los tipos de preparados enzimáticos estudiados en el presente trabajo (ver Cuadros 30 y 31).

7.2.1.1. Efecto de tratamientos

La prueba de medias indicó que los tratamientos P+U+C, P+C y F+U+C registraron los valores más altos en DIS, incluso superaron a T0 (Cuadro 35) y en el caso de FDNr, P+C+U registró el valor más bajo de FDNr, seguido por P+U+C y F+U+C, respectivamente, aunque no difirieron de T0. No obstante, la correlación entre DIS y FDNr fue ($r = -0.78$), indicando con ello que los tratamientos que consignaron los valores más altos de DIS también tendieron a expresar los valores más bajos de FDNr, de modo que aunque tales tratamientos no fueron diferentes a T0 (rastroy+melaza), existe evidencia de que sí tuvieron un efecto mayor sobre la degradación de la pared celular del rastroy de maíz durante la incubación *in situ*. El resto de los tratamientos fueron todos iguales a T0, excepto T00 (rastroy sin melaza) quien mostró el más alto valor de FDNr y consecuentemente el más bajo en DIS (Cuadro 36).

Cuadro 36. Prueba de medias de tratamientos sobre DIS y FDNr

	DIS, %		FDNr, %	
Fibrozyme				
Urea	54.63	bcd	80.47	ab
Cal	55.87	abc	82.16	ab
Urea+Cal	56.01	ab	79.17	ab
S/Q	52.89	d	82.13	ab
Promote				
Urea	53.97	cd	80.49	ab
Cal	56.90	ab	80.39	ab
Urea+Cal	58.15	a	78.60	b
S/Q	55.53	abcd	81.93	ab
Testigos				
R+Melaza (T0)	53.27	cd	81.06	ab
Rastrojo (T00)	42.20	e	82.92	a
Tukey= 0.05	2.74		3.83	

Letras distintas entre líneas indican diferencias estadísticas entre tratamientos.

El análisis de tratamientos por tiempos de incubación *in situ* mediante la prueba de medias mostró que a 24 h ninguno de los tratamientos resultó superior a T0. Sin embargo, F+C+U superó a T0 en 4 unidades porcentuales, que representa un incremento del 9.7% sobre T0, aunque dicha diferencia no fue significativa (Cuadro 37). A 48 h F+C, P+C y P+U+C consignaron valores de DIS superiores a T0 (Tukey, $p < 0.05$), el resto de los tratamientos reportaron valores de DIS iguales a T0, excepto T00, el cual registró el valor más bajo de DIS para los cuatro tiempos de digestión *in situ*.

Los tratamientos de F sin químico y P+U fueron los que mostraron los comportamientos más bajos junto con T0 y T00, siendo este último (rastrosjo sin melaza) inferior al resto de los tratamientos. Considerando por lo tanto, la DIS a 48 h como verdadera, se puede establecer que los mejores tratamientos fueron: F+C, P+C y P+U+C y se puede añadir (F+U+C), este último atendiendo la prueba de medias del modelo general para efecto de tratamientos.

Cuadro 37. Efecto de tratamiento x tiempo sobre digestibilidad *in situ*.

	Digestibilidad <i>in situ</i> (%)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Fibrozyme				
Urea	41.5 ab	52.9 bc	58.2 ab	66.0 ab
Cal	42.7 ab	54.8 ab	57.7 ab	68.2 ab
Urea+Cal	45.4 a	53.2 bc	58.0 ab	67.4 ab
S/Q	40.2 b	50.7 c	54.4 b	66.4 ab
Promote				
Urea	41.6 ab	53.7 bc	56.0 ab	64.5 ab
Cal	42.5 ab	57.9 a	61.0 ab	66.2 ab
Urea+Cal	43.5 ab	56.0 ab	62.2 a	70.9 a
S/Q	44.8 ab	54.2 abc	57.5 ab	65.7 b
Testigos				
R+Melaza (T0)	41.4 ab	50.2 c	57.1 ab	64.4 b
Rastrojo (T0)	28.0 c	40.2 d	45.6 c	55.1 c
Tukey= 0.05	4.77	4.07	7.2	5.55

Letras distintas entre líneas difieren estadísticamente.

Las mayores diferencias de superioridad en DIS de los tratamientos sobre T0 (rastrajo+melaza), se presentaron en P+C a 48 h (7.7); P+U+C a 96, 48 y 72 h (6.5, 5.8, y 5.1, respectivamente); F+C a 48 h (4.7); P a 48 h (4.0); F+U+C a 24 h (4.0); F+C a 96 h (3.8); P a 24 h (3.4); P+U a 48 h (3.6) y F+U+C a 96 h (3.0). Dichos valores representan un incremento de DIS sobre T0 de: 15.3, 10.0, 11.6, 8.9, 9.3, 8.0, 9.7, 6, 8.2, 7.1 y 4.7%, respectivamente. En conjunto los tratamientos anteriores superaron en promedio a T0 con 9% en DIS. En el caso de T00, fue inferior a todos los tratamientos (P<0.05).

Aunque existieron pocas diferencias significativas en el porcentaje de DIS, de los tratamientos evaluados sobre T0, sin embargo de los 32 tratamientos derivados de la combinación tratamiento x tiempo, 29 registraron valores de DIS superiores a T0 y sólo tres fueron inferiores a T0 (F a 24 y 72 h, y P+U a 72 h, respectivamente). En general, los tratamientos que contenían U+C con Promote ó con Fibrozyme, resultaron superiores en DIS al resto de los tratamientos, seguidos de los que incluían C con ambos preparados enzimáticos, que aunque no difirieron estadísticamente de T0, no obstante, bajo la prueba

de medias de Tukey (Cuadro 38), sí se observó la superioridad de U+C y C con los preparados enzimáticos sobre T0, cuando se analizaron los tratamientos mediante contrastes no ortogonales (Prueba de Scheffé). Es interesante notar, de acuerdo con el Cuadro 36, que no se encontraron diferencias entre los tratamientos que incluyeron U+C con aquéllos que sólo incluyeron C, y que además, los tratamientos que incluyeron U, ó enzimas solas (sin aditivos químicos: ENZ S/Q) y T0 mostraron un comportamiento igual en DIS. De nuevo se encontró que T00 fue inferior al resto de los tratamientos ($P < 0.05$).

Cuadro 38. Efecto de aditivo químico en modelo 2.

Aditivo químico	DIS	FDNr
U+C	57.1 a	78.9 a
Cal	56.4 a	81.3 bc
Urea	54.3 b	80.5 ab
Enz S/Q	54.2 b	82.0 bc
T0	53.3 b	81.1 bc
T00	42.2 c	82.9 c
Tukey= 0.05	2.52	2.19

Letras distintas entre líneas difieren estadísticamente.

En el caso de la FDNr el efecto de los tratamientos dentro de cada tiempo de incubación *in situ*, como se indicó previamente en la prueba de media general, no existieron efectos significativos de los tratamientos en la reducción de FDNr sobre T0. De los 32 tratamientos derivados de las combinaciones entre preparados enzimáticos y los aditivos químicos, 18 de ellos muestran valores de FDNr inferiores a T0, mientras que los 14 restantes expresan valores igual o mayores a T0. Esto indica que aunque la DIS sí fue afectada por algunos tratamientos, como anteriormente se vio, y a pesar de que hubo una correlación inversa importante entre la DIS y la FDNr, sin embargo los valores de FDNr no se redujeron significativamente con respecto al testigo de rastrojo+melaza (Cuadro 39).

Cuadro 39. Efecto de tratamiento x tiempo sobre fibra detergente neutro residual.

	FDN residual (%)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Fibrozyme				
Urea	85.8 a	84.3 a	80.2 a	71.6 ab
Cal	86.3 a	84.3 a	83.4 a	74.6 ab
Urea+Cal	83.4 a	85.7 a	79.4 a	68.1 ab
S/Q	85.2 a	85.1 a	83.5 a	74.7 ab
Promote				
Urea	86.3 a	81.1 a	82.7 a	71.9 ab
Cal	84.5 a	83.3 a	79.9 a	73.8 ab
Urea+Cal	84.8 a	83.6 a	79.5 a	66.5 b
S/Q	84.8 a	83.5 a	81.2 a	78.3 a
Testigos				
R+Melaza	84.9 a	85.6 a	79.1 a	74.6 ab
Rastrojo	85.2 a	86.5 a	83.2 a	76.8 ab
Tukey = 0.05	3.77	6.12	8.5	10.70

Letras distintas entre líneas difieren estadísticamente.

Sin embargo, aunque no se presentaron diferencias entre tratamientos y los respectivos testigos, sí se aprecian tendencias numéricas que es importante señalar. Por ejemplo, a 48 h salvo el tratamiento F+U+C que resultó ligeramente superior en valor a T0 (85.7% vs 85.6%), el resto de los tratamientos tuvieron valores de FDNr inferiores a T0 de hecho todos fueron inferiores en FDNr a T0, el cual mostró el valor más alto de FDNr a 48 h (86.5%) y de hecho es el valor mayor en todo el conjunto de tratamientos. Además, en este mismo tiempo el tratamiento de P+U consignó -4.5 unidades porcentuales absolutas de FDNr que T0 (81.1% vs 85.6%, respectivamente), que representa una reducción verdadera de 5.6% respecto a T0. Debe tenerse presente que en DIS a 48 h todos los tratamientos registraron valores mayores a T0; esto probablemente explique la correlación inversa entre DIS y FDNr ($r=-0.66$, $P<0.0001$). Además, los tratamientos con U+C registraron los valores más altos de DIS. En el mismo sentido P+U+C registró 8.12% menos contenido de FDNr que T0 a 96 h (66.5% vs 74.6%), en este mismo tiempo F+U+C registró 6.4% menos FDNr que T0 (68.1% vs 74.6%). También a 96 h F+U y P+U mostraron reducciones en porcentaje de FDNr en comparación con T0 (3.0% y 2.7%, respectivamente).

7.2.1.2. Contrastes no ortogonales

Se aplicaron para validar los resultados obtenidos a partir del modelo completo y para discriminar algunas tendencias entre los diferentes factores y sus respectivos niveles estudiados en la etapa *in situ*. Fueron aplicados en forma independiente para DIS y para FDNr en n-1 contrastes no ortogonales (prueba de Scheffe; Steel y Torrie, 1988).

En DIS el promedio de todos los tratamientos superó al promedio de ambos testigos (T0 y T00); el mismo comportamiento ocurrió entre los tratamientos con respecto a T0; también los promedios de los tratamientos que contenían Fibrozyme o Promote exhibieron una DIS superior a T0. Promote superó a Fibrozyme, así mismo los tratamientos que incluyen aditivos químicos superaron al promedio de los que no contienen dichos aditivos (incluye a T0 y T00 así como a F y P) (Cuadro 40). Además, los tratamientos con C ó U+C ó sin aditivos químicos, en conjunto presentaron valores superiores a los que sólo contenían U, pero dichos tratamientos fueron inferiores a los que contenían C, y a su vez, los que contenían U+C fueron superiores a los que contenían C. La suma de los $\sum C_i \bar{y}_i$ para diferentes contrastes permite discriminar los tratamientos que mejores resultados consiguieron en DIS. En realidad se adicionan los diferenciales de los productos de los coeficientes (C_i) por los promedios de los tratamientos que se comparan en cada uno de los contrastes seleccionados. La suma absoluta de C4 y C9 es 48.3% y corresponde a P+U+C; C4+C8 = 37.3%, corresponde a P+C; C3+C9 = 38%, corresponde a F+U+C y C3+C8 = 27.0% corresponde a F+C. Dichos tratamientos fueron superiores a T00 con 17.8% el resto de los tratamientos con preparados enzimáticos sin aditivos ó éstos con urea resultaron inferiores a T00. Debe notarse que estos fueron los mismos resultados obtenidos mediante Tukey aplicada a los tratamientos del modelo1 ó la prueba de medias para Tratamiento x Tiempo también derivada del modelo 1.

Cuadro 40. Análisis de varianza mediante contrastes no ortogonales para DIS.

F.V.	GL	SC	CM	F cal	P>F
Tratamiento	9	2831.48	314.61	59.96	0.0001
Tratamiento*Tiempo	30	12507.88	416.93	79.46	0.0001
C.V.		4.25			
R ²		0.96			

Contrastes	Ci	GL	SC	CM	F CAL	P>F	$\Sigma ci \bar{y}_i$
Testigo vs. Tratamientos	C1	1	1542.54	1542.54	293.97	0.0001	-62.10
Testigo 2 vs. Tratamientos	C2	1	70.62	70.62	13.46	0.0004	-17.82
Testigo 2 vs. Enzima F	C3	1	32.06	32.06	6.11	0.0148	-12.66
Testigo 2 vs. Enzima P	C4	1	105.72	105.72	20.15	0.0001	-22.98
Enzima F vs. Enzima P	C5	1	53.36	53.36	10.17	0.0018	-10.32
Sin químico vs. Químico	C6	1	941.01	941.01	179.33	0.0001	-59.42
U vs. C, C+U y S/Q	C7	1	60.73	60.73	11.57	0.0009	-19.08
C vs. U, C+U y S/Q	C8	1	33.98	33.98	6.48	0.0122	14.29
U+C vs. C y U	C9	1	106.99	106.99	20.39	0.0001	25.34

En el caso de FDNr sólo fueron significativos los contrastes promedio de tratamientos contra promedios de dichos testigos (T0 y T00) ya que T00 consistentemente consignó el más alto valor de FDNr y el valor más bajo de DIS. Asimismo, los tratamientos sin aditivos químicos fueron inferiores a los que sí incluyeron aditivos químicos por la razón antes indicada, y U+C ya sea con Fibrozyme o Promote superaron a aquéllos que contenían cal ó urea con ambos preparados enzimáticos. Los tratamientos que contenían Promote o Fibrozyme no difirieron de T0, tampoco hubo diferencias entre Promote y Fibrozyme, ni U ni C difirieron del resto de los tratamientos. Sin embargo, los tratamientos que incluyeron U+C sí superaron en promedio a los que sólo contenían C ó U. Este resultado sugiere la existencia de un moderado sinergismo entre urea y cal sobre la degradación de la pared celular del rastrojo de maíz, por encima de la actividad independiente de la cal o la urea. Lo anterior, probablemente explique por qué consistentemente P+U+C fue el tratamiento que mostró los mejores resultados tanto en porcentaje de DIS como de FDNr, seguido por F+U+C y F+U, respectivamente, con los cuales generalmente no difiere significativamente. Dichos tratamientos como ya se indicó superaron al testigo de rastrojo+melaza (T0) (Cuadro 41).

Cuadro 41. Análisis de varianza mediante contrastes no ortogonales para FDNr.

FDN residual						
F.V.	GL	SC	CM	F cal	P>F	
Modelo	39	4346.83	111.46	10.88	0.0001	
Error	120	1229.15	10.24			
Tratamiento	9	274.42	30.49	2.98	0.0031	
Tratamiento*Tiempo	30	4072.45	135.75	13.25	0.0001	
C.V.	3.95					
R ²	0.78					

Contrastes	GL	SC	CM	F cal	P>F	Σci \bar{y}_i
Testigo vs. Tratamientos	1	44.98	44.98	4.39	0.0382	10.60
Testigo 2 vs. Trat.	1	2.25	2.25	0.22	0.6405	3.18
Testigo 2 vs. Enzima F	1	0.09	0.09	0.01	0.9257	0.67
Testigo 2 vs. Enzima P	1	6.47	6.47	0.63	0.4282	5.68
Enzima F vs. Enzima P	1	12.60	12.60	1.23	0.2695	5.02
Sin químico vs. Químico	1	124.27	124.27	12.13	0.0007	21.59
U vs. C, C+U y S/Q	1	1.49	1.49	0.15	0.7035	-3.00
C vs., U, C+U y S/Q	1	15.64	15.64	1.53	0.219	9.68
U+C vs. C y U	1	135.49	135.49	13.23	0.0004	-28.52

7.3. Resultados etapa *in vivo*

7.3.1. Comportamiento animal

El tratamiento afectó la ganancia diaria de peso ($P=0.0018$), la conversión alimenticia ($P=0.004$) y el peso ganado ($P=0.0001$), pero no afectó el consumo de alimento (Cuadro 42 a y b). La interacción Sexo*Tratamiento fue significativa sólo para peso total ganado ($P=0.05$), mientras que el efecto del sexo fue significativo para las cuatro variables indicadas ($P<0.0001$).

Cuadro 42. a) Análisis de varianza para ganancia diaria de peso (GP), consumo de alimento (CoA), conversión alimenticia (CA), peso ganado (PG).

F.V.	GL	GP kg/día		CoA kg/día		CA kg		PG kg	
		CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F
Sexo	1	0.0197	0.0001	0.106	0.0001	13.17	0.0001	38.63	0.0001
Rep(Sexo)	4	0.0005	0.2767	0.007	0.2187	0.28	0.7598	1.07	0.2307
Trat	6	0.0018	0.0025	0.010	0.0757	2.67	0.0038	3.98	0.0009
Sexo*Trat	6	0.0009	0.0754	0.004	0.6027	1.25	0.0952	1.82	0.0459
Error	24	0.0004		0.005		0.61		0.71	
C.V.		13.94		7.83		12.12		11.70	
R ²		0.80		0.66		0.72		0.82	

b) Análisis de varianza para peso final (PF).

F.V.	GL	PF Cov* kg				P>F
		SC	CM	FC		
Sexo	1	78.36	78.36	52.33	0.0001	
Rep(Sexo)	4	44.89	11.22	7.49	0.0005	
Trat	6	41.75	6.96	4.65	0.0031	
Sexo*Trat	6	34.41	5.73	3.83	0.0086	
Peso Inicial	1	134.28	134.28	89.67	0.0001	
Error	23	34.44	1.50			
C.V.		4.30				
R ²		0.91				

*Ajustado por el peso inicial como covariable.

Los tratamientos que contenían F, P y P+C+U mostraron una ganancia de peso diaria (GP) y peso ganado total (PG) similar, pero fueron superiores al resto de los tratamientos incluyendo al testigo (T0; $P < 0.05$). Por otra parte, F, P+C, F+C+U y P+C+U superaron al resto de los tratamientos ($P < 0.05$) en conversión alimenticia (CA), el resto de los tratamientos fueron similares a T0. En peso final (PF) los tratamientos F, P, P+C y P+C+U tuvieron un comportamiento similar pero superaron al resto de los tratamientos, incluyendo a T0 ($P < 0.05$). Finalmente, en CoA no hubo diferencias entre tratamientos ni entre éstos con T0, sin embargo T0 consignó uno de los valores más bajos en consumo diario de alimento (0.817 kg) junto con el tratamiento F+C+U (0.815 kg). No obstante, T0 registró la más baja CA (7.81 kg de MS/kg de peso vivo), mientras que F+C+U mostró uno de los valores más altos en CA (6.14 kg de MS/kg de peso vivo) (Cuadro 43).

Cuadro 43. Prueba de medias para GP, CoA, CA, PG y PF.

Tratamiento	GP	CoA	CA	PG	PF
	Kg/día			kg	
T0	0.108 b	0.817 a	7.81 a	5.75 b	26.30 b
F	0.165 a	0.904 a	5.83 b	8.18 a	29.60 a
P	0.145 a	0.921 a	6.55 ab	7.93 a	28.96 a
F+C	0.133 ab	0.843 a	6.52 ab	6.96 ab	28.13 ab
P+C	0.143 ab	0.860 a	6.11 b	7.00 ab	28.67 a
F+C+U	0.140 ab	0.815 a	6.14 b	6.87 ab	28.28 ab
P+C+U	0.152 a	0.880 a	5.97 b	7.63 a	29.21 a
Tukey = 0.05	0.036	0.126	1.44	1.56	2.27

Medias con literales distintas por columna difieren entre tratamientos.

7.3.2. Patrón de fermentación ruminal

La producción de acetato (AA), propionato (AP), butirato (AB) y la producción de AGVt fueron afectados por el Sexo (bloque), Tratamiento y Sexo*Tratamiento. Sin embargo, el pH, proporción acetato:propionato (A:P) y nitrógeno amoniacal (N-NH₃) del líquido ruminal a 6 h, no fueron afectados por el sexo, tratamiento y sexo x tratamiento (Cuadro 44 a y b).

Cuadro 44. a) Análisis de varianza para AA, AP, AB y AGVt.

F.V.	AA			AP		AB		AGVt	
	GL	CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F
Sexo	1	117.43	0.0001	2.85	0.0525	23.67	0.0001	302.47	0.0001
Rep(Sexo)	4	3.62	0.4348	0.74	0.3871	1.20	0.3601	10.39	0.3294
Trat	6	69.80	0.0001	8.05	0.0001	2.78	0.0405	156.29	0.0001
Sexo*Trat	6	101.91	0.0001	13.20	0.0001	6.34	0.0006	260.02	0.0001
Error	24	3.68		0.69		1.05		8.53	
C.V.		5.79		9.51		19.29		6.20	
R ²		0.93		0.89		0.77		0.93	

b) pH, proporción A:P y nitrógeno amoniacal (N-NH₃, mg/dL).

F.V.	pH			A:P		N-NH ₃	
	GL	CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F
Sexo	1	0.017	0.62	0.30	0.15	2.9	0.64
Rep(Sexo)	4	0.109	0.22	0.13	0.46	10.2	0.78
Trat	6	0.049	0.65	0.21	0.22	9.0	0.66
Sexo*Trat	6	0.051	0.62	0.28	0.10	5.7	0.85
Error	24	0.070		0.14		13.1	
C.V.		3.65		9.56		34.2	
R ²		0.39		0.53		0.20	

El pH, proporción acetato:propionato (A:P), concentración de ácido butírico (AB) y nitrógeno amoniacal (N-NH₃) fue similar entre tratamientos y el testigo (T0). En producción de ácido acético (AA) a excepción del tratamiento P+C que tuvo un comportamiento similar a T0, el resto de los tratamientos registraron valores superiores a T0 (P<0.05), pero los mayores valores los consignaron los tratamientos con Fibrozyme solo (F), Promote solo (P) y Fibrozyme+Cal (F+C), y fueron estos mismos tratamientos, los que reportaron los valores más altos de producción de ácido propiónico (AP) y ácidos grasos volátiles totales (AGVt), superando a T0 en todos los casos (P<0.05) (Cuadro 45).

Cuadro 45. Prueba de medias para pH, AA, AP, AB, AGVt y relación A:P.

TRAT.	pH	AA	AP	AB	AGVt	A:P	N-NH ₃
				mMol/L			(mM/dL)
T0	7.22 a	28.20 d	7.51 d	4.53 a	40.24 c	3.85 a	11.7 a
F	7.29 a	37.94 a	10.73 a	5.68 a	54.35 a	3.55 a	9.2 a
P	7.07 a	35.87 a	9.58 ab	6.33 a	51.77 a	3.86 a	11.0 a
F+C	7.15 a	35.32 ab	9.09 bc	5.96 a	50.37 ab	3.89 a	9.7 a
P+C	7.28 a	30.38 cd	7.99 cd	4.95 a	43.32 c	3.87 a	10.3 a
F+C+U	7.31 a	31.90 bc	8.33 bcd	4.80 a	45.03 bc	3.84 a	9.6 a
P+C+U	7.28 a	32.13 bc	7.73 cd	4.89 a	44.75 c	4.19 a	12.5 a
Tukey= 0.05	0.49	3.56	1.53	1.9	5.42	0.68	6.6

Medias con literales distintas por columna difieren entre tratamientos.

7.3.5. Contenido de fibra en heces y digestibilidad por cenizas insolubles

El porcentaje de fibra detergente ácido (FDA) fue afectado por el sexo de los ovinos (P<0.0001) y por la interacción sexo x tratamiento (P=0.003), pero no por el efecto de los tratamientos evaluados. El contenido de lignina sólo fue afectado por sexo (P = 0.029); el resto de las variables incluyendo los tratamientos no mostraron significancia. Sin embargo, tanto el contenido de fibra detergente neutro (FDN) como la digestibilidad por cenizas insolubles (DCI) fueron afectados por los tratamientos (P=0.004 y P<0.0001, respectivamente). En general los coeficientes de variación fueron bajos en todos los casos, denotando un bajo grado de error aleatorio y un nivel aceptable de confiabilidad en la evaluación de las variables antes mencionadas (Cuadro 46).

Cuadro 46. Análisis de varianza para el porcentaje de FDA, lignina, FDN y DCI en heces.

F.V.	GL	%FDA		%LIG		%FDN		%DCI	
		CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F	CM	P>F
Sexo	1	130.7	<.0001	102.71	0.029	7.02	0.106	4	0.384
Rep(Sexo)	4	11.52	0.13	24.46	0.305	1.9	0.558	5.63	0.377
Tratamiento	6	11.63	0.105	16.8	0.524	10.66	0.004	235.13	<.0001
Sexo*Trat	6	26.14	0.003	35.44	0.13	4.6	0.131	2.66	0.786
Error	24	5.81		19.07		2.48		5.09	
R ²		0.74		0.53		0.64		0.92	
C.V.		4.74		13.81		2.44		3.35	

No hubo diferencias entre tratamiento ni de éstos con el T0 respecto a los porcentajes de FDN, FDA y LIG. No obstante en el porcentaje de DCI los tratamientos F+C+U y P+C+U reportaron lo mayores valores de DCI seguidos por el tratamiento de F+C, los cuales superaron al T0 quien mostró el comportamiento más bajo junto con F (P<0.05). F+C superó al T0 en 5 unidades absolutas, lo que representó un incremento real del 8% en DCI sobre el T0; F+C+U y P+C+U superaron al T0 en 12.9 y 12.8 unidades absolutas, lo que representó un incremento real en DCI del 20.5 y 20.3%, respectivamente (Cuadro 47).

Es posible que las diferencias en porcentaje de DCI entre tratamientos esté relacionada con la composición de las dietas experimentales (datos no reportados), pues los valores promedio para el porcentaje de cenizas insolubles en ácido (CIA), en las dietas experimentales de los diferentes tratamientos, muestran una correlación inversa con el porcentaje de digestibilidad por cenizas insolubles. Así el testigo (T0), Fibrozyme (F) y Promote (P) sin aditivos químicos compartieron misma dieta base con un contenido de 3.18% de cenizas insolubles en ácido (CIA) y reportaron el más bajo porcentaje de DCI. Además F+C y P+C también compartieron la misma dieta base, cuyo contenido de CIA fue de 2.85% y su digestibilidad mostró un comportamiento intermedio; mientras que F+C+U y P+C+U con una misma dieta base tuvo un contenido de CIA de 2.44% y ambos tratamientos consignaron los valores más altos de DCI. Lo anterior se sustenta en los propios modelos utilizados para realizar las estimación final de la digestibilidad, a partir de los contenidos de cenizas insolubles en ácido tanto de las heces como de las dietas experimentales, a los cuales si hizo referencia en la sección de materiales y métodos para

la etapa *in vivo*. Si se atiende a lo indicado por el modelo 2, cuando el porcentaje de C.I. en heces es similar entre tratamientos, entonces las diferencias sólo pudieran ser explicadas por las variaciones en el porcentaje de C.I. en ingrediente, tal como se indicó anteriormente. Pero también pudo ser producto de la acción combinada de los preparados enzimáticos con la cal y la urea, ya que F+C+U, P+C+U y F+C, reportaron los valores más altos de porcentaje de DCI y también porcentaje de AA.

Cuadro 47. Prueba de medias de tratamientos para FDA, lignina, FDN y DCI.

Tratamiento	%FDA	%LIG	%FDN	%DCI
T	50.46 a	34.14 a	65.28 a	62.93 cd
F	51.77 a	31.80 a	66.29 a	59.92 d
P	52.18 a	30.77 a	64.80 ab	63.34 cd
F+C	49.23 a	30.68 a	64.14 ab	67.90 b
P+C	48.84 a	28.95 a	62.00 b	65.49 bc
F+C+U	52.24 a	32.40 a	64.11 ab	75.79 a
P+C+U	51.34 a	32.64 a	64.96 a	75.67 a
Tukey 0.05=	4.47	8.1	2.92	4.18

Letras diferentes por columnas indican diferencias estadísticas entre tratamientos.

7.3.7. Relaciones entre indicadores de la etapa *in vivo*

DCI correlacionó negativamente con producción de ácido propiónico ($r=-0.338$, $P=0.0287$), y también negativamente con el porcentaje de la misma variable ($r=-0.305$, $P=0.0493$), con la relación A:P ($r =0.311$, $P=0.0453$) y con la producción de ácido acético ($r=0.296$, $P=0.0572$). El porcentaje de fibra detergente neutro en heces correlacionó con la relación ácido acético:ácido propiónico ($r=-0.328$, $P=0.0342$), con contenido de ácido propiónico ($r=0.351$, $P=0.0226$), mientras que el porcentaje de FDA correlacionó con porcentaje de lignina ($r=0.542$; $P=0.0002$) y con ganancia de peso final ($r=0.287$; $P=0.0656$). En general las correlaciones son bajas pero significativas, excepto en el caso del contenido de FDA con el porcentaje de LIG, que mostraron el valor de correlación más alto (Cuadro 8 A).

8. DISCUSIÓN

8.1. Etapa *in vitro*

8.1.1. Producción de gas y perfil del modelo no lineal de Vmax, S y FL

Existió sinergismo positivo entre los preparados enzimáticos y los aditivos químicos en la producción de gas (VG, TF y VA), ya que aunque todos los tratamientos a 0 h de aplicaciones enzimáticas fueron superiores a los de 24 h ($P < 0.05$), los mejores fueron F0+U, F0+C, F0+C+U y P0+U, para VG, y F0+U, F0+C y F0+C+U para VA; incluso fueron superiores a F0 y P0 ($P < 0.05$), aunque todos ellos superaron a T0. Hasta las 24 h, los tratamientos tratados con Promote aplicado a 0 h y F0, fueron los que mostraron menor FL. Sin embargo, de forma consistente tanto a 24 como a 96 h, el tratamiento con P0+U fue aquél con menor FL, mientras que a 96 h, T0 mostró la mayor FL. En cierta investigación donde se estudió el efecto de aplicación del preparado enzimático comercial Fibrozyme sobre heno de alfalfa y orchardgrass (pasto ovillo: *Dactylis glomerata*), se obtuvo un efecto cuadrático al incrementar el pH de 5.6, 6.2 y 6.8, sobre la FL y el valor más bajo se encontró a pH 6.2 (Márquez *et al.*, 2009); mientras que otros investigadores también han reportado sinergismo entre aplicación de preparados enzimáticos exógenos sobre paja de arroz, paja de trigo y bagazo de caña sobre incrementos en la producción de gas y degradación de componentes fibrosos y mejoramiento de la digestibilidad de dichos sustratos (Eun *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004; Gómez-Vázquez *et al.*, 2003). Lo anterior sugiere que en el presente trabajo, la acción combinada de preparados enzimáticos (F y P) con aditivos químicos como urea (U) e hidróxido de calcio (Cal=C) contribuyeron a mejorar la degradación de componentes fibrosos del rastrojo de maíz, en especial la fracción de la fibra detergente neutro (FDN). Almaraz *et al.* (2010) encontraron incrementos lineales para producción de gas a 48 h de fermentación para niveles de 0, 3 y 6 g/kg de MS de un preparado enzimático comercial (Fibrozyme); además, se redujo la FL a 4 h. Otros autores han encontrado que ocurren incrementos lineales en la producción de gases y AGV totales con respecto a la dosis, al utilizar preparados con endoglucanasas y xilanasas en diferentes proporciones (Tricarico y Dawson, 2005; Colombatto *et al.*, 2007), lo cual coincide con lo encontrado en el presente trabajo. Lo anterior guarda relación con

la capacidad que tienen ciertos preparados enzimáticos producidos exógenamente para promover la degradación de compuestos fibrosos de mayor resistencia, mejorando con ello el aprovechamiento del forraje. Se han reportado incrementos de la digestibilidad aparente total de la FDN, FDA y celulosa (Souza *et al.*, 2006c), mientras que otros han consignado incrementos importantes en la digestibilidad de la materia seca y de la materia orgánica debido a la acción de las enzimas fibrolíticas exógenas (Eun y Beauchemin, 2007b; Eun *et al.*, 2007b). Otros autores han reportado sinergismo entre Fibrozyme con amoníaco, mejorando el consumo de alimento por el animal, como una consecuencia del incremento en la digestibilidad de la materia seca en los tratamientos que contenían la enzima y el amoníaco, en comparación con un tratamiento control (Gómez-Vazquez *et al.*, 2003). En el presente trabajo se encontró que los tratamientos que contenían urea mostraron el más alto perfil de N-NH₃ frente al resto de los tratamientos, incluyendo al testigo, que en esa variable mostró uno de los comportamientos más bajos (P<0.05). Incluso superaron a los tratamientos que contenían los preparados enzimáticos (F24, F0 y P0; P<0.05), a excepción de P24, que fue estadísticamente igual a los tratamientos con urea, lo que sustenta la existencia de sinergismo positivo de los preparados enzimáticos y la urea en la degradación de los componentes fibrosos del rastrojo de maíz en el presente estudio. Además, a 24 h el N-NH₃ mostró una alta correlación con VG a 24 h, VG a 48 h, DMO a 24 h, DMO a 48 h y DV (r=0.73, r=0.76, r=0.82, r=0.86 y r=0.81, respectivamente; P<0.0001); a 36 h y 48 h también correlacionó con EM (r=0.62; P<0.0025 y r=0.65; P<0.0014); mientras que con propionato y butirato correlacionó fuertemente a 36 y 48 h (Cuadros 6A y 7A). Esto indica que la suplementación con urea tiene efectos benéficos en la cinética ruminal, sobre todo favoreciendo el crecimiento en la población de las del tipo fibrolítico que puede traer como consecuencia una mejora en los patrones de AGV, especialmente el de la producción de AP, que es una buena fuente de energía para los rumiantes. Wang *et al.* (2004) aplicaron 1.5 mg/g de MS sobre paja de trigo sin tratar (control) o tratada previamente con álcali (NaOH; tratamiento) y se incrementó la producción de gas (P<0.001); además, la aplicación de 0, 0.15 y 1.5 mg/g de MS de la misma paja (no tratada y tratada con NaOH) y la misma mezcla enzimática *in situ*, incrementó la desaparición de la MS de los tratamientos sobre el control (P<0.001). En el experimento *in vivo*, la paja de trigo tratada 4 meses antes con NH₃ y luego con la mezcla enzimática al suministrar la alimentación, incrementó la digestibilidad de MS y de la MO. Concluyeron que el tratamiento previo de la paja de trigo con álcalis mejoró la eficacia de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

las enzimas exógenas (*in vitro*, *in situ* e *in vivo*) presumiblemente por romper los enlaces esterificados, incrementando su volumen y facilitando con ello la penetración de las enzimas a la fracción de celulosa cristalina. En este sentido Soto y Martínez (2001) demostraron que la suplementación con urea y melaza en dietas basadas en pajas puede incrementar la tasa de ganancia de peso en bovinos, debido a la mayor concentración de amoníaco ruminal que favorece el crecimiento y desarrollo de bacterias que degradan fibra. Se han reportado incrementos lineales *in vitro* de N-NH₃ a niveles crecientes de aplicación enzimática (Fibrozyme) sobre una dieta 70:30 de concentrado-forraje (Almaraz *et al.*, 2010). Sin embargo, Giraldo *et al.* (2008) estudiaron un preparado enzimático con actividades endoglucanasa y xilanasas sobre una dieta 70:30 (heno de pasto:concentrado) y no se afectaron los niveles de N-NH₃ y AGVt de los tratamientos sobre el control, pero sí se redujo la proporción AA:AP del tratamiento sobre el control (P<0.05).

Por su parte Eun *et al.* (2006) lograron incrementar la degradación *in vitro* de la cáscara de arroz mediante el efecto combinado de enzimas EX (endoglucanasas y xilanasas) con amoníaco. Se incrementó la producción de gas y la degradación de la materia seca a 18 y 24 h, respectivamente. Esto pudiera ser una evidencia de que la amonificación remueve compuestos fenólicos, rompiendo complejos lignina-carbohidratos y por lo tanto, incrementado la accesibilidad de la enzima a su sustrato. Además, concluyen que combinando enzimas exógenas con tratamiento de amonio se incrementa la degradación ruminal de la paja de arroz y se espera una mejora potencial del aprovechamiento de ésta por los rumiantes. Así mismo, Petersen *et al.* (1981) han encontrado que el tratamiento con álcalis antes del ensilado puede incrementar la digestibilidad de residuos de cosechas. Al tratar paja de Blue grass Kentucky con diferentes álcalis [Ca(OH)₂, NaOH y la combinación de éstos] y melazas, encontraron que el uso de ambos álcalis *per se* y combinados incrementaba la digestibilidad *in vitro* de la MS. Además la degradación y contenido de FDN y FDA fue afectada positivamente por la adición de álcalis y melazas en combinación con álcalis. Los menores contenidos de FDN se observaron en los ensilados con Ca(OH)₂ y melazas (61 vs. 71%). La LDA fue similar en todos los tratamientos; trabajos previos indican que esta no es afectada por el uso de álcalis. Sin embargo, se ha demostrado que el tratamiento con álcalis puede destruir los enlaces éster (ácido urónico) que unen la lignina con la hemicelulosa, y aunque esto no disminuye el contenido de lignina, sí cambia la susceptibilidad de la pared celular.

En general, tanto las enzimas P y F *per se* (sin tratamiento químico) aplicadas a 0 h, como los químicos adicionados con Promote aplicado sin pretratamiento, tuvieron FL más cortas al ser calculadas a partir de los datos de incubación *in vitro* hasta 24 h, sin embargo, es con los datos a 96 h en donde se aprecia, que el tratamiento P0+U es aquél con menor FL. Esto es importante pues tiempos más cortos de retardo, indican una colonización microbial en fases tempranas, lo cual, a su vez, acelera el inicio de la fermentación (Almaraz *et al.* 2010).

8.1.2. Degradación y digestibilidad de la materia seca y cinética microbiana

Es interesante notar que en este trabajo existió una alta correlación entre la MSD y la DV, lo cual se explica si se considera que a medida que la fracción desaparecida aumenta, entonces la fracción retenida contiene proporcionalmente una mayor cantidad de compuestos estructurales de mayor resistencia y viceversa. Es por ello que los tratamientos que mayor cantidad de estos compuestos tenían, fueron los que mostraron también una mayor cantidad de FDNr, pero con mayor materia seca desaparecida y mayor digestibilidad *in vitro*, después de que las muestras residuales derivadas de la incubación *in vitro* fueron sometidas al lavado con detergente neutro. Evidentemente el caso contrario se presentó generalmente en los tratamientos T0, F24, F24+U, F24+C, F24+C+U y P24, que originalmente consignaron una menor cantidad de MSD, y por supuesto, al someterlos al lavado con el detergente neutro, proporcionalmente se obtuvo un residuo menor porque se liberó material que originalmente no se había removido. Por lo tanto, fueron estos también los tratamientos que consignaron los valores más bajos de DV y MSD ($P < 0.05$). No obstante los tratamientos con valores mayores de DV a 24 h fueron F0+C, F0+C+U, P0+U y P0+C+U (52.6, 55.3, 55.6 y 55.8% de DV, respectivamente), contra T0 (testigo) que consignó un valor de 38.5%, de modo que se obtuvieron 38.7, 43.6, 44.4 y 45.0% de incremento de DV sobre T0, de los cuales, los tres últimos valores son los mayores y corresponden con lo que contenían U y dos de ellos contenían C. Esto concuerda con otros autores en que el tratamiento de las pajas con aditivos químicos previo a la aplicación de enzimas fibrolíticas exógenas incrementa el acceso de éstas al complejo lignocelulósico probablemente degradando compuestos fenólicos (Tricarico y Dawson, 2005; Eun *et al.*, 2006; Colombatto *et al.*, 2007).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Lewis *et al.* (1996) señalan que la tasa de desaparición de la FDN fue más rápida para los pastos tratados con enzimas que en los no tratados. Sin embargo, ellos encontraron que la tasa de desaparición de la MS no difirió significativamente entre sustratos bajo condiciones *in situ*. Este resultado es contrario al obtenido en el presente estudio, donde se encontró un efecto significativo de los tratamientos que recibieron los preparados enzimáticos (F y P) a 0 h, así como P24+U, P24+C y P24+C+U sobre la MSD y la DV, superando a T0 que fue el que mostró el comportamiento más bajo ($P < 0.05$). Sin embargo, los mismos autores sostienen que cuando el forraje de pasto no fue tratado con enzimas, no existieron diferencias en las tasas de desaparición de la MS y de la FDN entre los tratamientos evaluados, lo cual indicó una menor degradación de la fibra del forraje. Resultados similares fueron reportados previamente por Stokes (1987) quien trató un ensilado de pasto-leguminosa, y por Feng *et al.* (1996) quienes aplicaron enzimas directamente a pasto seco antes de la alimentación. Sin embargo Colombatto *et al.* (2003a) encontraron que en ensilado de maíz el preparado enzimático comercial (Promote) a 48 h incrementó la degradación de la FDN, pero no a 6, 18 y 96 h, muy similar a lo aquí reportado.

Además, Colombatto *et al.* (2003b) también reportaron incrementos en adherencia microbiana a sólidos y de la masa microbiana asociada a líquidos de dos preparados enzimáticos de *Trichoderma longibrachiatum* y *Aspergillus niger* sobre el control; este resultado coincide con lo encontrado en el presente trabajo para masa microbiana (MM), pero es contrario a adherencia microbiana (AM). El resultado aquí encontrado para adherencia microbiana (AM) mostró un efecto inverso a MSD, DV, y FDNr. En este caso, todo parece indicar que una mayor disponibilidad de nutrientes estuvo presente en aquellos tratamientos (especialmente T0, F24 sin y con C y U, y F24) donde los microorganismos continuaron prosperando y por lo tanto, fue aquí donde se obtuvieron los valores más altos de AM, mientras que en aquéllos donde el mayor porcentaje de nutrientes había desaparecido (F24 con aditivos químicos; F0 y P0 sin y con aditivos químicos), quizá porque había ocurrido inicialmente una mayor DV, en tal caso, dichos tratamientos mostraron comparativamente un valor menor de AM ($P < 0.05$). Esto está soportado por otras investigaciones que señalan que los tratamientos con preparaciones enzimáticas comerciales solas o adicionadas con tratamientos químicos mejoran la degradación de los componentes de la fibra, especialmente la FDN y la materia seca

desaparecida, liberando potencialmente una mayor cantidad de carbohidratos a partir de compuestos de alta resistencia en los forrajes fibrosos (Soto y Martínez, 2001; Petersen *et al.*, 1981; Tricarico y Dawson, 2005; Eun *et al.*, 2006; Colombatto *et al.*, 2007).

Es importante señalar que como en el caso de las variables de producción de gas, también en las presentes variables (MSD, FDNr y DV) generalmente los tratamientos que mejor resultado consiguieron fueron los que recibieron la aplicación de los preparados enzimáticos a 0 h, a excepción de los tratamientos que recibieron Promote adicionado con C, U y C+U, cuya aplicación se llevó a cabo a 24 h. No obstante, aún en este caso, los mejores tratamientos fueron F0 y P0 sin y con C, U o C+U, donde además, se puede observar un sinergismo entre ambos preparados enzimáticos y los aditivos químicos estudiados para el caso de la DV. Adicionalmente, al igual que en VG y VA, no existieron diferencias importantes entre los aditivos químicos (urea e hidróxido de calcio: U y C). Estos resultados concuerdan con lo encontrado por otros investigadores quienes han reportado un incremento en la digestibilidad de la MS y en la degradación de la FDNr en alimentos tratados con preparados enzimáticos e incubados *in situ* en bolsas de Nylon (Lewis *et al.* 1996). Estos mismos autores aplicaron una dosis de 1.65 mL/kg de MS de heno de pasto y cebada, a 0 y 24 h antes de la alimentación de los animales canulados. Reportaron que la enzima infundida ruminalmente produjo un incremento en la desaparición de la MS entre 8 y 32 h, así como de la FDN, disminuyendo proporcionalmente la FDNr, pero también se incrementó la MSD y la FDNr a 96 h. Además encontraron que las preparaciones enzimáticas aplicadas en pretratamiento al sustrato, se degradan más rápidamente cuando entran en contacto con las enzimas propias del animal, que cuando éstas son infundidas directamente al ambiente ruminal vía cánula. Lo cual coincide con los resultados que se presentan en este trabajo, donde el pretratamiento (24 h antes de la incubación *in vitro*) tuvo un efecto menor sobre las variables de producción de gas y los indicadores de degradación y digestibilidad de la MS que cuando dichos preparados enzimáticos se aplicaron al inóculo al momento de iniciar la incubación *in vitro*.

No obstante, otros investigadores han encontrado que el pretratamiento con enzimas, ha tenido efectos benéficos en la fermentación ruminal (Hristov *et al.*, 1998). Estos mismos autores, mostraron que el pretratamiento con enzimas puede incrementar la degradación

de la FDN en diferentes alimentos. De nuevo esto no concuerda con lo encontrado en el presente trabajo, ya que consistentemente, el pretratamiento a 24 h mostró resultados inferiores a los consignados por los tratamientos que recibieron la aplicación de los preparados enzimáticos a 0 h antes de iniciar la incubación *in vitro*, para la mayoría de la variables estudiadas, excepto para producción de ácido acético, donde sí parece existir sinergismo pero sólo con Fibrozyme y los aditivos químicos. No obstante, estos resultados coinciden con los reportados por Giraldo *et al.* (2008) quienes no encontraron efectos benéficos del pretratamiento del alimento antes de suministrarlo a los animales experimentales.

Por otra parte, aunque se hubiera esperado que los tratamientos suplementados con urea promovieran los mayores porcentajes de masa microbiana/g MS degradada a 24 h, en realidad fue el tratamiento P0 (sin aditivos químicos) el que consignó la mayor producción de masa microbiana. Para esta variable, los tratamientos P24+U y P24+C+U mostraron producciones altas y similares a las de sus homólogos pero sin pretratamiento. Además a este tiempo, a excepción de P0+C, todos los sustratos con enzima aplicada a 0 h tuvieron valores superiores a los del testigo (T0). Sin embargo, son los tratamientos con P0 los que favorecen la mayor biomasa microbiana a 96 h y que el tratamiento P0+U fue superior estadísticamente al resto de los tratamientos ($P < 0.05$).

Estos resultados parecen indicar que el Promote aplicado a 0 h parece favorecer el crecimiento de microorganismos en el interior del rumen, pero la urea actúa sinérgicamente con la actividad ruminal mejorando el porcentaje de masa microbiana, pues se sabe que la adición de NNP a las dietas de los animales incrementa el crecimiento de bacterias amonificadoras (Petersen *et al.*, 1981, Soto y Martínez, 2001; Tricarico y Dawson, 2005; Eun *et al.*, 2006; Colombatto *et al.*, 2007).

8.1.3. Digestibilidad de la materia orgánica (DMO)

Los aditivos químicos incrementan la velocidad de degradación del rastrojo de maíz, en mayor proporción que los preparados enzimáticos, lo cual se traduce en un aumento de la digestibilidad de la materia orgánica de dicho forraje por hora, tal y como lo señalan otros

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

autores (Getachew *et al.*, 1998). También se han reportado incrementos en la digestibilidad de la materia orgánica con la aplicación de diferentes niveles de endoglucanasas y xilanasas (Tricarico y Dawson, 2005; Colombatto *et al.*, 2007). Contrariamente, en heno de alfalfa en condiciones *in situ* de borregos infundidos mediante cánula ruminal con Fibrozyme donde no se incrementó la digestibilidad de la MO del tratamiento sobre el control, tampoco se incrementaron las digestibilidades de la MS, FDN y FDA, sin embargo, si se incrementó el consumo de MS, MO y FDN ($P < 0.01$, 0.01 y 0.07, respectivamente; Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002).

Asimismo (Williams, 2000) señala que la sincronización entre la energía y el nitrógeno suplementados en el rumen es una estrategia adecuada para mejorar la eficiencia de la fermentación ruminal. No obstante, para aplicar este principio en formulación de alimentos, se necesitan datos sobre las tasas de degradación de las proteínas y de fermentación de los carbohidratos. En tal caso las técnicas de producción acumulativa de gas pueden ser usadas para generar esta información. De modo que la cinética de producción de gas depende de las proporciones de partículas solubles, insolubles pero degradables, y no degradables del alimento (Getachew *et al.*, 1998).

Eun y Beauchemin (2007b) evaluaron las actividades de productos enzimáticos que contenían endoglucanasas y xilanasas. Se encontró correlación entre la actividad de la endoglucanasas y la degradabilidad de la materia orgánica ($r = 0.71$; $P < 0.01$). Sin embargo algunos autores no observaron efecto sobre la degradación de la materia orgánica de enzimas fibrolíticas producidas por hongos o provenientes de bacterias (Ferreira *et al.*, 2006; Bergamaschine *et al.*, 2006). Los resultados aquí encontrados concuerdan con los primeros autores ya que a 40, 48, y 72 h, los tratamientos que superaron al testigo en DMO, recibieron los preparados enzimáticos (F o P) a 0 h, aunque en el presente trabajo, lo hicieron en combinación con U, C o U+C (F0+C, F0+U, F0+C+U, P0+U y P0+C, respectivamente) (ver Cuadro 5 A); y en digestibilidad de la materia orgánica fraccional (DMO/t), Fibrozyme con y sin aditivos químicos pero aplicados a 0 h y Promote adicionado con Cal+Urea aplicado a 24 h superaron a T0 a 24, 40, 48, 60 y 72 h (ver Cuadro 6 A).

8.1.4. Patrones de fermentación ruminal

En el presente estudio no hubo efectos de los tratamientos enzimáticos y químicos sobre el testigo (T0) para AA, AB, AGVt y AA:AP; sin embargo Giraldo *et al.* (2008) encontraron efectos positivos a la suplementación de la enzima directamente en el rumen del animal, lo cual corrobora lo encontrado en este estudio. Aunque en el caso de ellos no se afectó la digestibilidad, los AGV, ni el contenido de N-NH₃, el uso de la enzima si demostró incrementar el número de bacterias celulolíticas 4 h después de la alimentación, lo cual puede indicar, que el uso de la enzima sin pretratamiento puede incrementar la actividad fibrolítica a consecuencia de este aumento bacteriano. No obstante, en nuestro caso, la producción de ácido propiónico (AP) sí fue mejorada en todos los tratamientos con aplicación enzimática a 0 h, así como en F24+U, F24+C y F24+C+U. Este resultado coincide con lo reportado por Almaraz *et al.* (2010), quienes estudiaron diferentes niveles de Fibrozyme (0, 3 y 6 g/kg de MS) sobre una dieta con 70:30 (concentrado:forraje), y observaron un incremento cuadrático en la producción de propionato, donde el mayor valor se obtuvo con 3 g de enzima/kg de MS a 48 h. En este estudio, en producción de AP los rendimientos mayores fueron consignados por los tratamientos P0 con C, U y C+U así como F0 y P0 sin aditivos químicos, los valores intermedios se registraron con P24 con C, U y C+U, y P0 con C, U y C+U, inferiores a los primeros pero superiores a T0 (P<0.05). En la interacción TxTM, para esta misma variable, los tratamientos P24 con C, U y C+U, F0 y P0 con y sin aditivos químicos superaron a T0 tanto a 24 h como a 48 h (P<0.05), y a 36 h, F24 sin y con aditivos químicos, así como F0, P0, F0+U y P0 fueron superiores a T0 (P<0.05); estos resultados son similares a los reportados por los autores anteriores.

Por otra parte, aunque en nuestro caso, los preparados enzimáticos (Fibrozyme y Promote) *per se* no incrementaron la producción de N-NH₃, sin embargo, los tratamientos que contenían urea (F24+U, F24+C+U, P24+U, P24+C+U, F0+U, P0+U y P0+C+U) superaron al testigo (T0) en producción de N-NH₃, concordando con lo reportado por Giraldo *et al.* (2008) y Pinos-Rodríguez *et al.* (2002), quienes tampoco encontraron efectos de la suplementación enzimática sobre producción de N-NH₃. En nuestro estudio tampoco las enzimas solas mejoraron la producción de N-NH₃, sino únicamente cuando fueron combinadas con urea. Pinos-Rodríguez al infundir *in situ* ruminalmente Fibrozyme en borregos tampoco encontró efecto de la suplementación de la enzima sobre AA, AP y

AB (mol/100 mol) sobre el control, pero sí lo hubo en AGV (mmol/L) a 3 h ($P<0.02$), a 6 h ($P<0.01$) y a 12 h ($P<0.09$). Por su parte, Giraldo *et al.* (2007b) reportaron incrementos de AGV ($P=0.004$) con dos tipos de celulasas y la respectiva combinación de ellas sobre el control sin enzimas en una dieta alta en forrajes (70:30; forraje:concentrado), concordando en parte, con el resultado antes indicado. Además, en este caso la producción total de AGV tendió a disminuir en forma paralela a la disminución del ácido acético. No obstante, se encontró que el ácido propiónico sí incrementó su valor con el efecto combinado de los preparados enzimáticos utilizados y los aditivos químicos, al grado que esta variable estuvo altamente correlacionada con digestibilidad verdadera (DV), con materia seca desaparecida (MSD), fibra detergente neutro residual (FDNr), digestibilidad de la materia orgánica (DMO) a 48, 60 y 72h, con DMO ajustada por tiempo (DMO/T ó fraccional) y con energía metabolizable (EM).

Algunos autores sostienen que un incremento de ácido propiónico a expensas del acético y el butírico, trae aparejado una reducción significativa de los mismos y una consiguiente menor producción de gas, a la vez que se reduce notablemente la producción de gas (Posada y Noguera, 2005; Bruni y Chilibroste, 2001; Theodorou *et al.*, 1998). En el presente trabajo la producción de propionato correlacionó inversamente con el acetato, lo cual corrobora lo antes citado, de modo que estos resultados permiten suponer que una mayor producción de propionato permitirá disponer potencialmente de una mayor cantidad de energía, pues Bruck *et al.* (1984) sostienen que por cada 100 kcal en la forma de celulosa, ésta a su vez corresponderá a 52 kcal aproximadamente en la forma de propionato, 18 de acetato y 5 de butirato. En este caso la mayor degradación de carbohidratos complejos de difícil degradación ocurrió entre 34 y 48 h aunque obviamente con una menor tasa fraccional de gas que durante las primeras 24 h, no obstante es aquí donde mayormente se produjo propionato, ya que el acetato y el butirato se liberan en la primeras horas y sobre todo en alimentos de alto contenido energético, que no es el caso del rastrojo de maíz, lo cual probablemente provocó la correlación inversa antes citada (Cuadro 11 A).

Como era de esperarse, en este periodo de tiempo se obtuvo una baja relación AA:AP, sustentada por lo antes dicho. Lo cual explica de nuevo, por qué el AP correlacionó positivamente con DV, MSD y FDNr, en tanto que el AA lo hizo proporcionalmente en forma inversa, concordando con los autores antes citados.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Pinos-Rodríguez (1999) encontró que disminuyó el porcentaje de AA y la proporción de AA:AP, pero aumentó proporcionalmente el AP y el AB a 3 h con ballico y el butirato a 12 h con alfalfa mediante la aplicación de un preprado enzimático comercial. Estos resultados coinciden con lo encontrado en el presente trabajo.

Por otra parte Tricarico y Dawson (2005) encontraron que la adición de xilanasas redujo la proporción de acetato:propionato, los efectos de la suplementación de dichas enzimas en la producción de AGV *in vitro* variaron dependiendo de los sustratos utilizados, y que la suplementación con endoglucanasa redujo consistentemente la proporción acetato:propionato en todos los sustratos probados. Estos resultados sugieren que la actividad de la xilanasas puede ser más importante en dietas que contienen alfalfa y la actividad de la endoglucanasa puede ser más importante en dietas que contienen heno de pasto o maíz, tal y como se utilizó en el presente estudio y donde se obtuvieron resultados similares a los reportados por estos autores.

Esto sugiere que la suplementación con urea puede tener efectos benéficos en la cinética ruminal, sobre todo promoviendo el crecimiento en la población de bacterias ruminales del tipo fibrolítico, que puede traer como consecuencia una mejora en los patrones de AGV especialmente el de la producción de AP, que es una buena fuente de energía para los rumiantes. En este sentido Soto y Martínez (2001) demostraron que la suplementación con urea y melaza en dietas basadas en pajas puede incrementar la tasa de ganancia de peso en bovinos, debido a la mayor concentración de amoníaco ruminal que favorece el crecimiento y desarrollo de bacterias que degradan fibra. No obstante, en este estudio N-NH₃ a 36 y 48 h, mostró una alta correlación y positiva con AP y AB a 24, 36 y 48 h, respectivamente, sin embargo con AA a 36 h correlacionó alta y negativamente y sólo mostró una alta correlación con AA a 24 h y N-NH₃ a 48 h. Lo anterior explica por qué AP a 36 h mostró altas correlaciones negativas con la relación AA:AP a 24 y 36 h y sólo tuvo alta correlación positiva con AA:AP a 48 h. Esto está de acuerdo con lo reportado por Giraldo *et al.* (2008), quienes señalan que la suplementación con la enzima disminuyó la tasa AA:AP, y que los cambios en los patrones de fermentación podrían ser un reflejo de los cambios en la población de bacterias.

8.1.5. Indicadores de la velocidad en fermentación ruminal

Como anteriormente se explicó, tanto el comportamiento de la producción de AA como la producción de CO₂ fueron opuestos al comportamiento de la producción de AP, incluyendo las propias correlaciones entre CO₂ con respecto a AA y AP, sobre todo por que el AA y el AP tienden a producirse en forma opuesta a partir de la fermentación de los diferentes sustratos. Cuando un forraje fibroso es tratado con aditivos enzimáticos o químicos, los enlaces de mayor resistencia entre los diferentes componentes de la fibra pueden ser removidos, facilitando el acceso de la actividad enzimática, ya sea de los productos exógenos o bien, de la proveniente del ambiente ruminal, lo que trae como consecuencia una mayor velocidad de degradación y una mayor disponibilidad de azúcares solubles que originalmente estaban atrapados en la red fibrosa de la pared celular, pero también de aquellos carbohidratos complejos de más fácil degradación. Probablemente esto fue lo que sucedió en el presente trabajo y que ocasionó una relación opuesta, posiblemente promovida por la actividad combinada de los preparados enzimáticos y los aditivos químicos utilizados en el presente estudio. Es importante destacar que en el presente trabajo los tratamientos que reportaron los valores mayores de producción de CO₂ y CH₄, así como la proporción CO₂:CH₄, fueron los que recibieron el tratamiento enzimático (P o F solos o combinados con C y U) a 24 h, aunque no difirieron de T0. Sin embargo, los mismos tratamientos siguieron una tendencia opuesta para MSD, DV, FDNr y FDN desaparecida, donde los mejores tratamientos fueron los de aplicación enzimática a 0 h. Giraldo et al. (2007a) reporta un incremento en la producción de metano y de AGV (P=0.009 y P =0.004, respectivamente) de la aplicación enzimática sobre control en dieta alta en fibra, pero no se afectó la proporción CH₄:AGV. En el presente estudio tampoco se afectó la proporción CO₂:CH₄, respecto a T0.

Esto se confirma con lo reportado por otros autores, quienes señalan que un aumento en la producción de AA y AB contribuye fuertemente a incrementar la producción de CO₂, CH₄ y AM, esta última como consecuencia de un incremento en la proporción de ATP generado por la fermentación. Señalan que la relación de sustrato verdaderamente degradado a volumen de gas producido puede reflejar variaciones en la producción de biomasa microbiana (AM), y este coeficiente ha sido definido como factor de partición. Este factor disminuye con el tiempo de incubación, de tal forma que la producción de gas o de AGV y de biomasa microbiana por unidad de sustrato realmente degradado no es

una constante y una relación inversa puede existir entre ellos. La explicación reside en la variación de la producción de biomasa microbiana por unidad de ATP generada (Y_{ATP}) (Posada y Noguera, 2005).

El factor de partición puede variar dependiendo de las proporciones molares de AGV (relación acetato a propionato) y Y_{ATP} . La producción de masa microbiana por unidad de ATP puede variar desde 10 hasta 32 mg. A una cantidad de similar Y_{ATP} , una producción proporcionalmente más alta de propionato conducirá a un mayor factor de partición en comparación con una alta producción de acetato (3.0 vs. 2.8 y 3.6 vs. 3.3 a un Y_{ATP} de 10 y 20, respectivamente) (Bruni y Chilbroste, 2001). Así, cambios en el patrón de fermentación que incrementen la proporción de ácido butírico y acético y disminuya la proporción de propiónico, pueden resultar en un incremento en el volumen de gas. Contrariamente, cambios en la estequiometría de las reacciones que aumenten la proporción de propiónico a expensas del butírico y acético, resultarían en menos producción de gas a partir de la fermentación. Por lo que la proporción molar de AGV debe ser tomada en cuenta cuando se realizan comparaciones entre perfiles de producción de gas provenientes de diferentes sustratos (Theodorou *et al.*, 1998).

Es importante notar que aunque AA correlaciona con CO_2 , sin embargo no tuvo correlación con CH_4 . No obstante aún con CO_2 muestra resultados opuestos y sólo correlaciona cuando AA fue evaluado a 24 y 36 h. Así, AA a 24 h correlaciona alta y positivamente con CO_2 a 24 y 36 h, pero alta y negativamente con CO_2 a 48 h, mientras que con AA a 36 h lo hace en forma opuesta para los mismos tiempos con CO_2 . La razón de la explicación es que CO_2 también correlaciona con propionato (AP) pero las correlaciones a 24 y 36 h muestran valores opuestos a los exhibidos con AA; además en este caso, AP a 48 h sí correlaciona con CO_2 en los tres tiempos (Cuadro 12 A).

Finalmente la relación $CO_2:CH_4$ mostró un comportamiento opuesto al mostrado por AA y un comportamiento parecido al de AP debido a lo antes descrito, y eso está de acuerdo con los resultados encontrados por otros investigadores, en el sentido de que una mayor proporción de ácido propiónico durante la degradación de los forrajes fibrosos, cuando éstos son tratados con aditivos enzimáticos, o con la combinación de aditivos enzimáticos y químicos se traduce en una reducción de AA (Posada y Noguera, 2005; Bruni y

Chilibroste, 2001; Theodorou *et al.*, 1998), lo cual en este trabajo ocurrió principalmente después de las 36 h, como anteriormente se explicó.

Giraldo *et al.* (2007b) sugirieron que el tratamiento con productos comerciales de *Trichoderma* puede incrementar en el interior del rumen la población de bacterias que utilizan principalmente hemicelulosa y otros productos secundarios de la digestión de la celulosa, lo cual ocurre generalmente después de las 24 h.

8.1.6. Energía metabolizable y energía neta de lactancia

Tanto para EM y ENL a 48 h se encontró en el presente trabajo que T0 al igual que C+F24, U+P24 C+P24 y U+C+P24 fueron los que mostraron el comportamiento más bajo ($P<0.05$), mientras que el resto de los tratamientos expresaron la más alta producción de EM y de ENL, no existiendo diferencias entre ellos. Al igual que en la mayoría de las variables se mostró la superioridad de los tratamientos, cuya aplicación de los preparados enzimáticos se realizó a 0 h, en comparación con los que fueron tratados a 24 h.

Es importante destacar que las dos variables citadas correlacionaron alta y positivamente con MM, y con volumen de gas (Cuadro 7 A); Sin embargo, no correlacionaron con AP y AA. Otros investigadores corroboran este tipo de inconsistencias en los resultados que han obtenido, por ejemplo Tang *et al.* (2008), quienes utilizaron mediciones de gas producido durante la fermentación *in vitro* para investigar las características e interacciones en pajas de arroz y trigo ó rastrojo de maíz, mezclados con alfalfa y trébol a diferentes proporciones. Ellos registraron el gas acumulado a 2, 4, 8, 12, 14, 16, 24 y 48 h y encontraron efectos de interacción inconsistentes entre la desaparición de la materia seca, de la materia orgánica y producción de gas acumulado entre las diferentes mezclas de cereal y heno de pasto, lo cual guarda estrecha relación con lo reportado al respecto en el presente trabajo, donde se presentaron algunas inconsistencias entre variables de producción de energía con producción de algunos ácidos grasos como en AA y el AP, lo cual fue discutido en el apartado de correlaciones. Sin embargo, estos autores destacan una producción importante de gas aún a 48 h, lo cual también sostienen Liu *et al.* (2002), quienes al asociar paja de arroz tratado con NaOH, urea ó $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, ó sin tratar, con

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

heno de pasto lograron incrementar el rango de producción de gas ($P < 0.05$) a 48 h en 55, 52 y 37%, respectivamente con los aditivos antes indicados, así como de 0.64 a 1.51, 1.27 y 1.13 mL/h, respectivamente.

Los mismos autores encontraron que hubo aspectos asociativos positivos ($P < 0.05$) en paja de arroz y paja tratada en al menos todos los niveles de inclusión de heno y hojas de mora adicionados con la paja tratada con los productos químicos antes indicados, desde 12 h hasta 96 h, lo cual sugiere que los tratamientos químicos prolongan su efecto por tiempos mayores a 24 h, y que en forrajes fibrosos, los estudios de correlación entre variables de producción de gas, AGV, perfil de N-NH₃ y las respectivas digestibilidades verdaderas de la MS, MO, así como los niveles de EM y ENL, los modelos de producción deberían proyectarse a tiempos mayores de medición, para llegar a resultados más consistentes y reproducibles (Liu *et al.* 2002; Tang *et al.* 2008). En el presente trabajo resultados semejantes a los reportados anteriormente fueron consignados, ya que se pudo apreciar que la acción combinada de F0+C y P0+U fueron los dos tratamientos que en esta variable y en la mayoría de las variables estudiadas, mostraron los mejores comportamientos por encima de T0, del resto de los tratamientos e incluso por encima de los preparados enzimáticos solos a 0 h.

8.1.7. Análisis de correlación

De forma consistente, se encontraron correlaciones positivas entre la producción de gas y el MSD, DMO (a 24 y 48 h), DV. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Blümmel *et al.* (1997), quienes al evaluar 54 forrajes, encontraron correlaciones de 0.96 y 0.95 entre la producción de gas *in vitro* y la degradabilidad de la materia seca.

Además se observaron correlaciones altas y negativas entre MDR y FDNr. El porcentaje de ácido acético producido se relacionó alta y positivamente con la degradación de FDN, mientras que la proporción de ácido propiónico se asoció a un mejor porcentaje de MSD, DV y DMO, pero también a mayores residuos de FDN (FDNr; Cuadros 7, 8 y 9 A).

El que consistentemente la aplicación de Promote a 0 h hubiese mostrado relación con el incremento en la cantidad de biomasa microbiana, producción de ácido propiónico y en muchos casos la digestibilidad de la materia orgánica, muestra que el Promote *per se* aplicado sin pretratamiento, puede incrementar el crecimiento de la biomasa microbiana, no obstante, la suplementación con urea parece incrementar esta respuesta. Pues se ha observado que la suplementación de N no amoniacal produce un crecimiento de las bacterias amilolíticas y celulolíticas y que además la sustitución parcial del N amoniacal por N no amoniacal puede estimular el crecimiento de las bacterias ruminales *in vivo* e *in vitro* (Carro *et al.*, 1999). Además, la adición de NNP a las dietas de los animales incrementa el crecimiento de bacterias amonificadoras (Petersen *et al.*, 1981, Soto y Martínez, 2001; Tricarico y Dawson, 2005; Eun *et al.*, 2006; Colombatto *et al.*, 2007) y en el presente estudio (etapa *in vitro*) se usó la urea combinada con los preparados enzimáticos (P y F).

Así pues, los tratamientos con P0 además tuvieron valores bajos en su FL, dado que este preparado enzimático presenta mayormente actividad de celulasas, es posible que sea un sinergismo entre la enzima y la urea con la actividad del rumen lo que favorezca la actividad de estas celulasas; es decir, probablemente sea el incremento en la masa bacteriana la que promueva mayor degradación de la parte externa de la pared celular, permitiendo el acceso de las celulasas a sus componentes y favoreciendo así la liberación de los contenidos celulares. Sobre todo, si se facilita el acceso tanto de las enzimas nativas del rumen como de las enzimas fibrolíticas exógenas, mediante el tratamiento previo de pajas y rastrojos con álcalis, amonificación o aplicación de urea, pues parece que éstos, inician la ruptura de enlaces éteres o ésteres de alta resistencia, provocando que la fibra se expanda y permitiendo con ello el ingreso de las enzimas, especialmente a la fracción de celulosa cristalina, dando como consecuencia la degradación y fraccionamiento del complejo lignocelulósico en carbohidratos más simples y potencialmente más aprovechables por los rumiantes (Tricarico y Dawson, 2005; Eun *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004). En el presente estudio se utilizaron hidróxido de calcio y urea, como álcali y como fuente de NNP, respectivamente combinados con F y P.

Trichoderma viride, tiene principal actividad de xilanasas, que atacan los enlaces que existen entre los heteropolímeros de hemicelulosa y xilosas, manosas y pectinas, entre

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

otros. En el presente estudio, mostró los mejores promedios al ser añadido sin pretratamiento con cal, pero no fue así al ser añadido *per se*, armonizando con lo encontrado por Eun *et al.* (2006) y Wang *et al.* (2004).

Se sabe que tratar estos residuos con álcalis, tiene como objetivo romper los enlaces alcali lábiles de la pared celular de la planta, solubilizando la hemicelulosa al fraccionar los enlaces entre lignina, celulosa y hemicelulosa, además de provocar modificaciones físicas en la estructura de la pared celular, lo cual permite un mejor acceso de los microorganismos del rumen a los carbohidratos estructurales, aumentando con ello la digestibilidad mediante los siguientes mecanismos: 1) Se liberan los grupos fenólicos de la lignina; 2) Se hidrolizan los enlaces de hidrógeno entre la lignina y la hemicelulosa, lo cual, permite la entrada de enzimas microbianas al interior de la células y 3) como consecuencia del tratamiento alcalino se solubiliza parcialmente el sílice, pero no se observan cambios en la estructura cristalina de la celulosa (Rupiérrez- Hernández *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2004; Tricarico y Dawson, 2005 y Ewn *et al.*, 2006). Especialmente se ha observado que el tratamiento con álcalis disminuye las fracciones FDN y FDN.

En el presente trabajo es posible que se haya presentado un efecto sinérgico entre la acción enzimática del preparado que actúa en la parte externa de la pared celular, mientras que el preparado químico pudiese haber favorecido por una parte, el acceso de la enzima a su sustrato y por otra, la degradación de la parte interna de la pared celular liberando el contenido celular.

De esta forma podemos decir que en el caso de Fibrozyme se observó un aparente efecto sinérgico entre la enzima y el preparado químico, mientras que en el caso del Promote se observaron efectos sinérgicos con la actividad ruminal.

8.2. Etapa *in situ*

8.2.1. Efecto del tiempo de incubación sobre DIS y FDNr

La digestibilidad *in situ* (DIS) se incrementó linealmente con el tiempo ($P < 0.0001$) de incubación (24, 48, 72 y 96 h, respectivamente) mientras que la fibra detergente neutro residual (FDNr) se redujo cuadráticamente ($P < 0.001$) aunque la tendencia lineal fue también significativa ($P < 0.01$) y la correlación entre DIS y FDNr fue ($r = -0.78$; $P < 0.0001$). Resultados similares aunque bajo condiciones *in vitro* reportan Dosualdo *et al.* (2006) al aplicar dos preparados enzimáticos a tiempos diferentes entre 0 y 56 días; encontraron una reducción lineal en los contenidos de FDN y FDA de 0.302 y 0.063 unidades/día, respectivamente. Asimismo, Pinos-Rodríguez (1999) reporta incrementos ($P < 0.05$) en la desaparición de la MS de alfalfa y ballico con la inclusión de dosis crecientes de enzima con líquido ruminal a 48 y 72 h; igualmente se registró un aumento en la desaparición de la FDN en ambas especies de 6 a 72 h, así como la desaparición de la fibra detergente ácido (FDA) de ballico de 3 a 12 h y la de alfalfa a 3, 12, 24, 48 y 72 h ($P < 0.05$). La desaparición neta de la FDN de la alfalfa aumentó entre 48 y 72 h ($P < 0.05$), pero la de la FDA del ballico disminuyó a las 12 h ($P < 0.05$). En ambos reportes se observan decrementos lineales en las fracciones fibrosas (FDN y FDA) con el tiempo de exposición de los sustratos a los tratamientos enzimáticos, similar a lo reportado en el presente estudio. Sin embargo, Maki *et al.* (1998) no encontraron ningún efecto sobre la desaparición de la MS y el pH *in situ* para la interacción de tiempo de medición x niveles de enzima en cebada rolada y entera. Además, Pinos-Rodríguez *et al.* (2002) tarabajando *in situ* con Fibrozyme infundido ruminalmente en borregos alimentados con heno de alfalfa y heno de ryegrass no encontró efectos del tratamiento sobre el control en digestibilidad de la MS, MO, PC, FDN, FDA y hemicelulosa, pero sí se incrementaron el porcentaje de desaparición de la MS a 3, 6 y 24 h ($P < 0.01$); de la FDN a 3, 12, y 24 h ($P < 0.01$) y 6 y 72 h ($P < 0.03$); de la FDA a 3, 6, 12 y 24 h ($P < 0.01$) y de la hemicelulosa en todos los tiempos (3, 6, 12, 24, 48 y 72 h; $P < 0.01$). En nuestro caso no hubo efecto de los preparados enzimáticos *per se* sobre DIS, semejante a los reportado por estos autores, aunque sí lo hicieron los tratamientos combinados de enzimas con los aditivos químicos; por otra parte,

en nuestro caso no se afectó la desaparición de la FDN, contrario a lo reportado por los autores antes citados.

8.2.2. Efecto de los preparados enzimáticos sobre DIS y FDNr

En el presente estudio los tratamientos que incluyeron los preparados enzimáticos sin aditivos químicos así como los que incluyeron urea (F, P, F+U y P+U, respectivamente) mostraron valores de DIS similares al testigo que incluyó rastrojo de maíz más melaza (T0), aunque sí superaron al testigo de rastrojo sin melaza (T00) ($P < 0.05$); pero F+C+U, P+C y P+C+U reportaron un promedio general para DIS, superior a T0 y T00 (56.0, 56.9 y 58.2 vs. 53.3 y 42.2 %, respectivamente). Además, a 48 h F+C, P+C y P+C+U superaron a T0 en 4.65, 7.68 y 5,82 unidades de DIS, las cuales representan incrementos de 9.26, 15.3 y 11.6% sobre T0. Balci *et al.* (2007) evaluaron la digestibilidad *in vitro* de la paja de trigo sin y con tratamiento enzimático con un preparado comercial (Promote; Cargill, Inc.). Se incrementó la digestibilidad de la MS, de la FDN y de la MO del tratamiento contra el control ($P < 0.05$). En nuestro caso los preparados enzimáticos sin aditivos químicos no superaron al control (T0), pero sí lo hicieron combinados con cal (C) o con cal+urea (C+U), sugiriendo que el tratamiento de los sustratos fibrosos con álcalis o álcalis más un aditivo nitrogenado (U), pueden facilitar y promover una acción más eficaz de las enzimas fibrolíticas exógenas sobre los componentes altamente resistentes de la fibra en beneficio de los rumiantes (Rodgers y Zhan, 2009; Wang *et al.*, 2004, Eun *et al.*, 2006; Dawson y Tricarico, 2005; Morgavi *et al.* (2000a). Estos autores encontraron mejoras tanto en la degradación de la MS como de la FDN. En nuestro estudio la FDN no fue cambiada por los tratamientos enzimáticos, ni por la combinación de éstos con los aditivos químicos (cal y urea). Pinos-Rodríguez (2002) encontró que no hubo incrementos en la digestibilidad de la MS, MO, FDN, FDA y hemicelulosa de un preparado comercial con actividad xilanasas (Fibrozyme) sobre el control. Coincide con nuestros resultados tanto para FDN como en digestibilidad de la MS (DIS) del rastrojo de maíz, ya que tanto Fibrozyme y Promote sin aditivos químicos reportaron valores iguales al testigo.

Fue notable la superioridad de Promote sobre Fibrozyme en DIS para los cuatro tiempos de incubación (24, 48, 72 y 96 h). Fibrozyme sin aditivos químicos mostró los valores más bajos del conjunto de tratamientos evaluados siendo igual a T0 (rastrojo+melaza), lo cual

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sugiere que las xilanasas presentes en Fibrozyme probablemente fueron degradadas por las proteasas producidas en el ambiente ruminal. Contrario a lo anterior, algunos autores han reportado sinergismo entre algunas enzimas celulasas exógenas y la actividad enzimática ruminal, cuando el pH es mayor a 6.2, mientras que otras actúan mejor a un pH menor a 6 (Morgavi *et al.*, 2000a). Aunque estos autores trabajaron probando celulasas, otros autores han encontrado que las xilanasas son mucho más sensibles a un pH elevado (entre 6 y 7), ya que el pH óptimo de actividad de las xilanasas está por debajo de 6.0. Kung *et al.* (2002a) probaron en vacas lecheras dos xilanasas, tipo B y tipo C, ambas a un mismo nivel de actividad enzimática y en combinación con una celulasa tipo D, sobre una dieta con 30% de ensilaje de maíz, 15% de alfalfa y 55% de concentrado; encontraron que la actividad de la xilanasa tipo C fue mucho más alta a un pH de 6.5 y su actividad se redujo sustancialmente cuando el pH decreció en el ambiente ruminal. En contraste, la xilanasa tipo B mostró la más alta actividad a un pH de 5 y dicha actividad fue dos veces mayor a la de la propia xilanasa B cuando ésta se probó a un pH de 5.5 a 6.

Lo anterior destaca la alta sensibilidad de las enzimas fibrolíticas exógenas, en especial las xilanasas a los cambios de pH ruminal sobre todo cuando éste se eleva, ya que lo anterior condiciona el tipo de bacterias que se desarrollan, y éstas a su vez condicionan el tipo de actividad enzimática, aumentando la actividad fibrolítica y la actividad proteolítica. Cuando el pH es alto o cercano al neutro (entre 6 y 7), como ocurrió en el presente trabajo, se espera una alta población de bacterias fibrolíticas y paralelamente una alta población de bacterias proteolíticas, siendo estas últimas, las que destruyen con mayor rapidez a las enzimas, especialmente del tipo de las xilanasas, lo que posiblemente sucedió con Fibrozyme en este trabajo. Por ejemplo, Márquez *et al.* (2009) aplicaron Fibrozyme sobre heno de alfalfa y heno de orchardgrass *in vitro* y encontraron que el mejor comportamiento en degradación de FDN del heno de alfalfa a 24, 48 y 72 h ocurrió a un pH de 6.2, donde también se observó la más baja FL, a pH 5.6 se redujo la fracción no degradable de FDN de la pared celular el heno de alfalfa y la tasa de degradación se incrementó. Concluyen que estos resultados confirman que el pH es un importante factor modulador en la respuesta enzimática. Morgavi *et al.* (2000b) señalan que los preparados enzimáticos comerciales encuentran un desempeño mejor en la degradación de las fibras de los forrajes a rangos de pH por debajo del pH óptimo ruminal requerido para una mayor degradación de las fibras. Sin embargo, se ha observado menos afinidad de las

enzimas proteolíticas del rumen por las celulasas, lo cual probablemente favoreció a Promote cuyo valor de DIS estuvo entre los cinco mejores tratamientos: P+U+C, P+C, F+U+C, F+C y P. Adicionalmente, en el presente trabajo los valores de pH estimados durante el desarrollo de la etapa *in situ* fueron 6.7, 6.8, 6.9 y 6.9, respectivamente con un promedio de 6.8, muy por encima de los valores citados por los autores anteriores, lo cual probablemente explique el bajo comportamiento de la actividad de Fibrozyme cuya actividad principal es del tipo de las xilanasas (Morgavi *et al.*, 2000b; Kung *et al.*, 2002a; Ranilla *et al.*, 2008). Por otra parte, Colombatto *et al.* (2004) en una serie de experimentos evaluaron el impacto de adicionar enzimas sobre la degradación ruminal de ensilaje de maíz *in vitro*. Evaluaron dos productos comerciales Depol 40 (D) y Liquicell 2500 (L) y se determinó en un primer experimento un rango de pH óptimo de 4.0-6.8. Los resultados indicaron que la actividad de la xilanasas de ambos productos tuvo un pH óptimo de 5.6. Ambos productos mantuvieron una actividad de alrededor del 70% después de 48 h. Estos resultados parecen confirmar que la reducción de la actividad de la xilanasas del Fibrozyme en el presente estudio fue afectada por un pH elevado, y concuerdan con lo aquí encontrado, en el sentido de que el tiempo óptimo de mayor actividad de los tratamientos evaluados coincidió con 48 h, principalmente en los tratamientos que contenían U+C ó C ya sea con Promote ó Fibrozyme. De hecho de las 11 combinaciones (tratamiento x tiempo de incubación *in situ*) con los valores más altos de DIS (ver Cuadro 36) dos ocurrieron a 24 h, cinco a 48 h, uno a 72 h y tres a 96 h. En la etapa *in vitro* del presente trabajo, se encontró también que el tiempo óptimo en el que los tratamientos evaluados digirieron la materia orgánica ocurrió a 48 h y se prolongó la actividad de los tratamientos (que contenían Promote ó Fibrozyme) hasta 72 y 96 h, sugiriendo con ello que la actividad enzimática puede prolongarse más allá de las 48 h y que probablemente un tiempo óptimo quizá se encuentre todavía entre 48 y 72 h.

8.2.3. Sinergismo entre actividad enzimática ruminal y enzimas exógenas

Respecto al sinergismo que pudiera existir entre las enzimas exógenas aquí estudiadas y la actividad enzimática ruminal no se observó en este trabajo, para la etapa *in situ*, lo cual difiere con otros autores quienes han encontrado que las enzimas exógenas interactúan con las enzimas ruminales para degradar el forraje más rápidamente (Colombatto *et al.*,

2003a). Morgavi *et al.* (2000a) trabajaron con 11 preparaciones enzimáticas y sus combinaciones originadas del cultivo de *Trichoderma longibrachiatum* con diferentes proporciones de xilanasas y celulasas, las cuales fueron combinadas con líquido ruminal extraído de ganado alimentado con dietas que variaron desde altas en fibra a altas en concentrado. Los sustratos evaluados para medir la capacidad degradativa de las enzimas exógenas y sus respectivas combinaciones entre ellas y con líquido ruminal variable, fueron celulosa soluble, xilanos y ensilaje de maíz. Se encontró sinergismo entre las enzimas exógenas y las enzimas ruminales en la degradación de los tres sustratos. Fue más evidente dicho sinergismo en un rango de pH de 5.0-6.0. Éstos autores concluyeron que los efectos sinérgicos entre enzimas ruminales y enzimas exógenas incrementan el potencial hidrolítico dentro del ambiente ruminal y es probablemente, un importante mecanismo por el cual los aditivos enzimáticos mejoran la digestibilidad en los rumiantes (Wang *et al.*, 2004; Morgavi *et al.* (2000a). Asimismo, Yang *et al.* (2002;) quienes trabajaron en dietas para vacas lecheras encontraron que se incrementó en 8% la degradación de la FDN a pH 5.5, pero a pH 6.0 dicho incremento fue de 15%. No obstante, es importante aclarar que los autores antes citados trabajaron en condiciones *in vitro*, y en la primera etapa del presente trabajo los preparados enzimáticos (Fibrozyme y Promote) mostraron superioridad sobre el testigo a 24 h en fibra detergente neutro residual (FDNr), degradación de la materia seca desaparecida (MSD), y en digestibilidad *in vitro* (DV) después de la incubación, cuando éstos fueron aplicados a 0 h, es decir, al momento de iniciar el periodo de incubación. Ambos preparados enzimáticos solos (sin aditivos químicos) estuvieron entre los mejores tratamientos de los 16 tratamientos que se evaluaron *in vitro* además del testigo. De modo que tales resultados están de acuerdo con lo reportados por tales autores, sin embargo, en la presente investigación se trabajó en condiciones *in situ* y solamente las muestras que fueron llevadas al rumen de animales fistulados recibieron el tratamiento correspondiente excepto en el caso de los testigos T0 y T00. Es probable que la cantidad de enzima adherida a la muestras haya sido rápidamente degradada a nivel ruminal y el sinergismo esperado entre enzimas exógenas y ruminales no se pudo manifestar en FDNr claramente en el presente estudio, aunque sí se manifestó en DIS, especialmente con Promote.

Algunos investigadores evaluaron la aplicación de endo y exoglucanasas, xilanasas y proteasas, variando su actividad enzimática sobre heno de alfalfa y ensilado de maíz. En

el caso del ensilaje de maíz ninguno de los preparados enzimáticos incrementó la producción de gas ni la degradación de la materia seca, aunque sí incrementaron la degradación de la FDN total (Eun y Beauchemin, 2007b). Este resultado es contrario al aquí encontrado, donde sí hubo efecto sobre la digestibilidad *in situ* del rastrojo del maíz aunque no se observaron mejoras en la degradación de la FDN, pero aclarando que nuestro caso se determinó la FDN residual y no total. Además, los autores citados trabajaron con alimentos tratados sin la aplicación de algún adherente (como es el caso de la melaza), lo cual probablemente hace diferente la respuesta por ellos encontrada y la que se obtuvo en el presente trabajo. En nuestro caso, el testigo de rastrojo sin la solución melaza:agua registró en promedio una digestibilidad 14% inferior al promedio de los tratamientos con Promote, mientras que a 48 h el tratamiento de P+C (Promote+Cal) registró una superioridad de 7.7% en digestibilidad sobre el testigo de rastrojo+melaza. Esto hace diferente la perspectiva del presente trabajo donde se evaluó un testigo conteniendo solución melaza:agua y un segundo testigo donde no se aplicó solución vehículo (melaza:agua) como adherente para los tratamientos combinados de preparados enzimáticos y aditivos químicos. En este mismo sentido, los resultados encontrados para DIS guardan estrecha relación con los reportados para la etapa *in vitro*, ya que en ambos casos se observaron efectos importantes de la aplicación de tratamientos enzimáticos y aditivos químicos sobre la digestibilidad de la materia seca. También guardan relación con los valores de digestibilidad de la materia orgánica total y relativa registrados a 48, 60 y 72 h donde algunos tratamientos mejoraron estas variables al igual que ocurrió en la presente etapa con la DIS, encontrando coincidencia con otros autores que registraron una estrecha correlación entre la actividad de las endoglucanasas y xilanasas de algunos productos enzimáticos y la degradabilidad de la materia orgánica ($r=0.71$; $P<0.01$) (Eun et al., 2007b).

8.2.4. Actividad de los aditivos químicos

En el presente trabajo se encontró consistentemente un efecto marcado de la combinación Urea+Cal, ya sea con Promote o Fibrozyme, a incrementar la digestibilidad *in situ* de la materia seca del rastrojo de maíz, donde a pesar de que Fibrozyme estuvo entre los tratamientos más bajos sin embargo un posible efecto negativo de este no

parece haber estado presente en los tratamientos F+C y F+U+C, lo cual pudiera sugerir un posible efecto combinatorio positivo causado principalmente por los aditivos químicos ya que, en los cuatro tratamientos antes citados no existieron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, pero estos sí fueron superiores al testigo de rastrojo+melaza. Más aún, tampoco se observó superioridad de Promote sobre Fibrozyme en estos 4 tratamientos, indicando que o bien los aditivos químicos tienen un efecto independiente de los preparados enzimáticos, o en todo caso, tanto la actividad de Promote como la de Fibrozyme fueron incrementadas en una asociación sinérgica con la actividad de cal o urea+cal, puesto que en nuestro caso la actividad de urea con los respectivos preparados enzimáticos registró valores muy bajos de DIS, no mostrando diferencias con respecto a T0 (rastrojo+melaza).

Estos resultados pueden encontrar sustento en lo que han encontrado otros investigadores. En un estudio de laboratorio la paja de maíz fue tratada previamente con hidróxido de sodio y posteriormente sometida a una digestión enzimática *in vitro* a una dosis de 15 FPU/g (FPU= unidades de papel de filtro, ver lista de abreviaturas) de materia seca de rastrojo de maíz, a una temperatura de 35 °C. El tiempo de tratamiento fue de 24 h. Se encontró que el 95% de los glucanos y los xilanos fueron hidrolizados enzimáticamente en las muestras de maíz pretratado. Los investigadores concluyeron que el hidróxido de sodio mejora la hidrólisis enzimática de la pared celular de la paja de maíz (Rodgers y Zhan, 2009). Aunque en el presente trabajo se utilizó hidróxido de calcio, parece haber cierta coincidencia con los resultados anteriores y con los publicados por Wang *et al.* (2004) y Eun *et al.* (2006), cuando en el presente estudio, hubo un incremento en la digestibilidad *in situ* de la materia seca de rastrojo de maíz, sobre todo a 48 h, sugiriendo un incremento en el acceso de las enzimas ruminales al contenido celular y mejorando su aprovechamiento, aunque como ya se ha indicado anteriormente, no hubo un efecto sustantivo de los tratamientos sobre la degradación de la fibra detergente neutro residual (FDNr).

Otros investigadores evaluaron la aplicación de 0.4 g de urea por litro a una saliva artificial en combinación con alta y baja concentración de proteína degradable en el rumen, y evaluaron su efecto sobre el crecimiento microbiano, la digestibilidad y la fermentación en un cultivo de doble flujo continuo. Encontraron que la infusión de urea incrementó la digestibilidad ($P<0.05$), asimismo incrementó la producción de ácidos grasos volátiles

(Griswold *et al.*, 2003). Dicho resultado es contrario al registrado en el presente trabajo donde la urea en combinación con Fibrozyme o Promote no consignó mejoras en la digestibilidad *in situ* de la materia seca, aunque cabe señalar que cuando esta fue combinada con cal y los mismos preparados enzimáticos sí registró valores de digestibilidad *in situ* superiores a los testigos evaluados, sugiriendo un posible efecto sinérgico ya sea entre ambos aditivos químicos (C y U) ó de ambos con F y P.

8.3. Etapa *in vivo*

8.3.1. Discusión general

Los valores más bajos de ganancia de peso (GP), conversión alimenticia (CA), peso ganado (PG) y peso Final (PF) los reportó el testigo (T0). En consumo diario de alimento (en base seca) también mostró uno de los valores más bajos junto con el tratamiento F+C+U. Los resultados muestran que aquellos tratamientos con mejor ganancia de peso fueron Fibrozyme, Promote y Promote+Urea+Cal. En un experimento una dieta base+paja de trigo, sin y con suplementación (control y tratamiento) de un preparado comercial (Promote, con actividad principal de celulasa), fue suministrada a dos lotes de 8 novillos cada uno, con pesos promedio de 362 ± 17 y 363 ± 16 kg, para control y tratamiento, respectivamente. Se obtuvo un incremento en la ganancia de peso total del tratamiento sobre el control (89 vs 69 kg); se incrementó también la ganancia diaria de peso (1270 g vs. 986 g); mejoró la conversión alimenticia (CA) del concentrado en el grupo tratado con la enzima sobre el control (7.3 kg de MS/kg de peso obtenido vs. 9.4 kg de MS/kg de peso vivo); mejoró la CA del forraje (paja de trigo: 1.7 vs. 2.0 kg de MS/kg de peso vivo); también se incrementó la CA total del tratamiento sobre el control (8.9 vs. 11.4 kg de MS/kg de peso vivo) (Balci *et al.*, 2007). En el presente estudio, Promote sin aditivos químicos mejoró la GP promedio por día en borregos sobre el testigo T0 (0.145 vs. 0.108 kg/día); mejoró también el PG total (7.9 vs. 5.8 kg), así como el peso promedio final (PF: 29.0 vs. 26.3 kg). No obstante, el consumo de alimento (CoA) y la conversión alimenticia (CA) no fue mejorada por la adición de Promote, a pesar de que registró el CoA más alto

de todos los tratamientos, incluyendo a T0, sugiriendo una mejoría en el consumo, el cual correlacionó alta y significativamente con la ganancia de peso diaria, con respecto al tratamiento testigo (Cuadro 13 A).

Además, CoA correlacionó negativamente con CA y positivamente con PG, PF, AA, AB y AGVt; mientras que GP diaria correlacionó negativa y significativamente con CA y positiva y significativamente con AA, AP, AB y AGVt a 6 h, lo cual sugiere que los tratamientos mejoraron la disponibilidad de energía retenida en los componentes fibrosos del rastrojo de maíz, el cual representó el 56.3% del total de la dieta, así como probablemente de los ingredientes del concentrado, aunque en nuestro caso no se realizaron estudios independientes de forraje y concentrado. Además, es probable que la actividad enzimática y su eficacia en degradar la fibra se haya incrementado por la actividad de los aditivos químicos utilizados en el presente estudio. Otros autores reportaron efectos positivos al aplicar Fibrozyme (alto en xilanasas: *Aspergillus niger* y *Trichoderma longibrachiatum*) sobre forraje de caña de azúcar tratado con urea y suministrado a novillos de engorda. Encontraron un incremento en el consumo de MS sobre el grupo control como consecuencia de una mayor digestibilidad de la MS (Gómez-Vázquez *et al.*, 2003); también se han reportado incrementos en la degradación de los componentes fibrosos en paja de arroz tratada con amoníaco (NH₃) y a la que enseguida se aplicó un preparado enzimático que contenía endoglucanasas y xilanasas (Eun *et al.*, 2006). Wang *et al.* (2004) en el tercero de tres experimentos evaluaron la digestibilidad del tracto total en 32 vacas productoras de carne, utilizando paja de trigo tratada con 3% de NH₃ durante 4 meses, con aplicación (tratamiento) o no aplicación (control) al momento de alimentar a los animales de una mezcla de enzimática (xilanasas, β-glucanasa, carboximetilcelulasa y amilasa). La enzima sobre paja amoniada incrementó la digestibilidad de la MS, MO y N total sobre el control (P<0.05), pero no afectó el consumo de MS ni la digestibilidad de la FDA.

Krueger *et al.* (2008) evaluaron el comportamiento animal y digestibilidad aparente *in vivo* en novillos Angus x Brangus (peso promedio de 244 kg) alimentados con 40% de concentrado y 60% zacate bermuda henificado. Los tratamientos consistieron en pacas de zacate (20 kg) tratadas con NH₃ anhidro (30 g/kg de MS) durante 6 semanas; zacate tratado con una combinación de varios preparados de enzimas fibrolíticas (Biocellulase

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A20, Loders Croklaan, Channahon, IL) con actividades celulasa y xilanasas, cuya actividad enzimática mínima recomendada por el fabricante era de 1400 U/g. De ella se aplicaron 0 (control) o 16.5 g/ton de MS al corte (Ec) al empacar (Eb) y al alimentar diariamente a los animales (Ef). No encontraron efectos de los tratamientos sobre ganancia de peso por día, peso final y eficiencia en conversión alimenticia; resultados opuestos a los reportados en nuestro estudio, donde tanto las enzimas *per se* como algunas de las combinaciones de éstas con cal o cal+urea mejoraron significativamente los indicadores anteriores. Sin embargo, los mismos autores sí encontraron incrementos significativos en consumo voluntario de alimento tanto de la MS de dieta total como de la MS del heno de zacate bermuda con los tratamientos de NH₃, Ec y Ef, lo cual difiere de lo encontrado en el presente trabajo, donde ninguno de los tratamientos evaluados (enzimas sin químicos o con químicos) mostraron incrementos sobre el testigo. Encontraron incrementos en la digestibilidad aparente *in vivo* tanto de la MS total como de la FDN para todos los tratamientos, coincidiendo con el presente estudio donde tratamientos químicos con cal y cal+urea mejoraron la DCI pero difieren en que en nuestro caso Fibrozyme y Promote *per se* no mejoraron la DCI sobre el testigo. Además también diferimos en que en nuestro caso la degradación de la FDN no fue afectada por los tratamientos evaluados en comparación con el testigo.

En este estudio, tanto Fibrozyme como Promote+Cal+Urea, no sólo mejoraron la ganancia diaria de peso, sino también incrementaron el peso ganado en promedio por kilogramo de alimento (CA), lo cual sugiere un mayor aprovechamiento de la energía liberada por la acción enzimática y de los aditivos químicos sobre los componentes estructurales de la pared celular. Estos resultados parecen indicar que la combinación de Promote con aditivos químicos, actúa sinérgicamente con la actividad ruminal mejorando el porcentaje de masa microbiana, pues se sabe que la adición de NNP a las dietas de los animales incrementa el crecimiento de bacterias, lo que probablemente incrementa la degradación de los componentes fibrosos de los forrajes; esto a su vez se potencia con el uso de álcalis donde se ha observado que mejoran la eficacia de las enzimas fibrolíticas exógenas para degradar el complejo lignina-celulosa, mejorando eventualmente su aprovechamiento por los rumiantes (Rodgers y Zhan, 2009; Eun et al., 2006, Dawson y Tricarico, 2005, Wang et al., 2004; Morgavi et al., 2000a). Por ejemplo, Soto y Martínez (2001) demostraron que la suplementación con urea y melaza en dietas basadas en pajas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

puede incrementar la tasa de ganancia de peso en bovinos, debido a la mayor concentración de amoníaco ruminal que favorece el crecimiento y desarrollo de bacterias que degradan fibra. Además, lo encontrado en la fase *in vivo*, concuerda con lo encontrado en la fase *in vitro* del presente trabajo, pues los tratamientos P+U y P+C+U fueron aquéllos que favorecieron la mayor masa microbiana a 96 h.

El resto de los tratamientos mostraron bajos valores de conversión alimenticia pero la ganancia de peso consignada por ellos no fue significativamente diferente a la observada en los animales alimentados con la dieta control. Sin embargo, estos resultados muestran que la suplementación con Promote y Fibrozyme en combinación con aditivos químicos, favorece mayor liberación de energía en dietas altas en fibra como el rastrojo de maíz. Asimismo, esto representaría un ahorro importante en la cantidad de alimento necesario para sostener la ganancia de peso en borregos. Lo anterior se hizo más evidente cuando se realizó una estimación proyectada sobre la cantidad de consumo necesario para obtener 10 kg de peso vivo. Se encontró que T0 requirió una cantidad comparativamente mayor de alimento, indicando con ello, que la conversión alimenticia fue significativamente más baja (78 kg/ 10 kg de peso vivo) que la de los tratamientos evaluados (con valor promedio de 62 kg de alimento por kg de peso vivo incrementado). El tratamiento con F mostró la más alta conversión con sólo 58 kg de alimento por cada 10 kg de peso vivo, seguido por P+C+U (60 kg), F+C+U (61 kg) y P+C (62 kg). Esta proyección, explica por qué T0, a pesar de mostrar uno de los consumos promedio de alimento más bajos (0.817 kg/día) no reportó tampoco una elevada CA, ya que consignó también el comportamiento más bajo en GP (0.108 kg/día), como se indicó en los resultados estadísticos obtenidos (Figura 3 A ver Apéndice). Dicha tendencia se aprecia mejor considerando el incremento proporcional a partir del T2 (F) como punto cero (Figura 4 A), donde T0 requeriría 35% más alimento para ganar 10 kg de peso vivo en comparación con F; además, P y F+C requerirían 17 y 16% más alimento que F, respectivamente, luego P+C y F+C+U requerirían adicionalmente 5 y 6%, y finalmente, P+C+U requeriría 2% de alimento adicional sobre F. Estos resultados sugieren que existe una ventaja al tratar el rastrojo de maíz antes de mezclarlo con otros ingredientes proteicos y energéticos en comparación con el testigo, quien tuvo la misma dieta base pero donde el rastrojo de maíz no recibió tratamiento enzimático ni químico.

La respuesta en cuanto a GP y CA observada en el resto de los tratamientos, parece estar en concordancia con el sinergismo reportado previamente entre Fibrozyme y el amoniaco, los cuales mejoran el consumo de alimento en novillos, como una consecuencia del incremento en la digestibilidad de la materia seca en los tratamientos que contenían la enzima y el amoniaco, en comparación con el tratamiento control (Gómez-Vazquez *et al.*, 2003).

En concordancia con lo anterior, los tratamientos que incluían C+U tuvieron los valores más altos estadísticamente de digestibilidad aparente, calculada a partir del análisis del marcador interno en heces de cenizas insolubles (DCI; Figura 5 A). Estos resultados concuerdan además con los encontrados en este mismo trabajo en la fase *in situ*, en donde, dentro de cada enzima, el uso de C+U con Fibrozyme o Promote mejoró la digestibilidad de los tratamientos, en comparación con aquéllos que incluían la enzima *per se* (ver Cuadros 37, 38 y 40). Al respecto, Ly *et al.* (2008) reportaron una alta interrelación entre los valores de digestibilidad *in vivo* (utilizando las cenizas insolubles) y la *in situ* ($r^2=0.9$; $P<0.001$), al comparar tallos de leucaena (*Leucaena leucocephala*), marpacífico (*Hibiscus rosa-sinensis*) y gandul (*Cajanus cajan*) en ganado porcino (utilizando 40 cerdos para evaluar cada una de estas digestibilidades), con una alimentación base de maíz y soya reemplazada en un 20% por alguno de tales forrajes. No obstante, lo aquí encontrado no concuerda con otros trabajos en los que cierta suplementación urea+melaza mejora sólo una de las dos digestibilidades (en este caso la *in situ*; Ayala *et al.*, 1994). Lo cual muestra que los resultados de alguna de estas digestibilidades no siempre son concluyentes al momento de evaluar un tratamiento alternativo.

Por ejemplo, aún cuando en el presente estudio se observaron diferencias en la CA y en la DCI, el consumo fue estadísticamente igual entre tratamientos, aunque superiores a T0. Otros trabajos han reportado resultados en los que ciertas dosis de enzima mejoran la ganancia diaria de peso pero sin modificar la ingesta de los animales (Adesogan, 2005). Además, algunos trabajos muestran que incluso habiendo diferencias en digestibilidad de la MS entre tratamientos, puede no haber diferencias entre los consumos de MO, MS, FDN y PC (Chay-Canul *et al.*, 2009). También puede ocurrir el comportamiento inverso, que usando un preparado enzimático como Fibrozyme en heno de alfalfa y luego administrada por cánula directamente al rumen de seis borregos se incrementaron el

consumo de MS, MO y FDN pero no la FDA; en tanto que el porcentaje de digestibilidad para MS, MO, PC, FDN, FDA y hemicelulosa no se incrementó sobre el control. Sin embargo, el porcentaje de desaparición *in situ* en el mismo estudio reportó incrementos significativos sobre el control para MS, FDN y hemicelulosa a diferentes tiempos (3, 6, 12, 24, 48 y 72 h); a su vez, en el mismo estudio, no se reportaron incrementos significativos sobre el control para pH, N-NH₃, AA, AP y AB a 3, 6 y 12 h, mientras que sí existió superioridad significativa para los tres tiempos en la producción de AGVt (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002). En este estudio, en el experimento de la etapa *in vivo* no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, ni de éstos con el testigo (T0) para CoA, pH, producción de AB, proporción A:P, degradación de la FDN, FDA y lignina (LIG), pero sí hubo efectos de tratamientos enzimáticos F o P *per se* o en algunas de las combinaciones con aditivos químicos (C o C+U). De modo que estos resultados coinciden con lo reportado por los investigadores anteriores en pH, AB, en el sentido de que no se encontraron efectos de tratamientos sobre el control, ni tampoco en producción de N-NH₃, degradación de FDN, FDA y LIG (ellos evaluaron degradación de hemicelulosa); pero ellos sí reportaron incrementos de los AGVt del tratamiento sobre el control y lo mismo ocurrió en nuestro caso. No obstante, a diferencia de lo reportado por ellos, aquí sí se encontraron efectos sobre producción de AA y AP y en las variables de comportamiento animal, de los tratamientos sobre T0 (Cuadro 48).

Cuadro 48. Parámetros e indicadores *in vivo* donde los tratamientos superaron a T0.

Variables de comportamiento				Patrón de AGV y DCI			
GP (kg/d)	CA (kg de MS/kg pv)	PG (kg)	PF (kg)	AA (mMol/L)	AP (mMol/L)	AGVt (mMol/L)	DCI (%)
F	F	F	F	F	F	F	F+C
P	P+C	P	P	P	P	P	F+C+U
P+C+U	F+C+U P+C+U	P+C+U	P+C P+C+U	F+C F+C+U P+C+U	F+C	F+C	P+C+U

Prueba de comparación de medias de Tukey (P<0.05); GP: ganancia de peso/día; CA: conversión alimenticia; PG: peso ganado; PF: peso final; AA: ácido acético; AP: ácido propiónico; AGVt: ácidos grasos volátiles totales y DCI: digestibilidad por cenizas insolubles.

En el presente estudio, los valores de CA casi concuerdan en su totalidad con los de DCI, pues los tratamientos con U+C fueron los mejores, seguidos de P+C. Sólo en el tratamiento con Fibrozyme *per se* se observa una tendencia opuesta, pues éste tratamiento también estuvo entre los tratamientos con mejores resultados en CA, pero su porcentaje de DCI se encuentra entre los más bajos e incluso es similar al del testigo ($P>0.05$). Una posible explicación podría ser la velocidad de la tasa de pasaje del alimento por el rumen, pues se sabe que alimentos con mayor digestibilidad tienen una velocidad de paso por el rumen más rápida, pero esto no siempre es favorable, pues una tasa de pasaje demasiado rápida también podría limitar la disponibilidad de nutrientes fermentables en el rumen necesarios para el crecimiento y posterior aporte de proteína microbiana al duodeno. Chay-Canul *et al.* (2009) observaron lo anterior al medir la tasa de pasaje de tres diferentes tamaños de partícula (molidos en cribas de 3, 13 y 25 mm) en una dieta a base de grano de frijol terciopelo (*Mucuna pruriens*) y la retención en el rumen variaba de 20 a 35 h. Sin embargo, debe notarse que F, fue el tratamiento con el mayor incremento de GP, sugiriendo que una segunda explicación se relaciona probablemente con un mejor aprovechamiento de los nutrientes digestibles tanto del forraje (quizás por degradación de pared celular y liberación de contenido celular), lo cual se nota por un incremento en este mismo tratamiento del AP, AP y AGVt, como del concentrado.

Es notable la variabilidad existente en los resultados encontrados entre diversos investigadores en la aplicación de una gran variedad de preparados enzimáticos exógenos, y los reportados en el presente estudio, sobre indicadores de la degradación y digestibilidad de los diferentes componentes de la pared celular de los forrajes fibrosos, tanto en pajas de cereales como de henos de gramíneas y de leguminosas, utilizados en la alimentación de rumiantes. Sin embargo, existe investigación que ha demostrado que la suplementación de las dietas de vacas lecheras o ganado productor de carne con enzimas degradadoras de fibras, tiene un potencial significativo en la mejora de la utilización del alimento y el comportamiento animal. Los aditivos enzimáticos contienen básicamente xilanasas y celulasas, son extractos concentrados, producto de fermentaciones de bacterias u hongos, que tienen actividades enzimáticas específicas. Las mejoras en el comportamiento animal debido al empleo de aditivos enzimáticos, pueden atribuirse principalmente a una mejora en la digestión de la fibra, resultando en un incremento de energía digestible. La respuesta animal es mayor cuando involucra la

digestion de la fibra y cuando la energía es el componente limitante en la dieta. Por lo tanto, al revisar a través de una variedad de productos enzimáticos y condiciones experimentales, las respuestas al suministrar enzimas fibrolíticas exógenas en dietas para rumiantes, han sido variables (Beauchemin *et al.*, 2003).

Las mejoras en el comportamiento animal relacionadas a la suplementación con enzimas, concuerdan con otros trabajos, por ejemplo, al probar una combinación de Fibrozyme+urea en ganado de engorda (*Bos taurus* x *Bos indicus*; 270 kg) suplementado a dietas con zacate estrella o caña de azúcar, Gómez *et al.* (2003) y González *et al.* (2003), encontraron una tendencia lineal en la ganancia de peso conforme se incrementaba la dosis de enzima en caña de azúcar.

Al analizar de forma conjunta las variables ganancia diaria de peso y conversión alimenticia, se pudiera concluir que Fibrozyme *per se* (con actividad principal de enzimas xilanasas) resultó mejor que Promote *per se* (con actividad principal de enzimas celulasas). Algunos productos enzimáticos han demostrado sobrevivir en el interior del rumen y al pasaje hacia el duodeno, sin embargo, parece ser mayor la estabilidad de las xilanasas que la de endoglucanasas (Morgavi *et al.*, 2000b). De acuerdo a esto, Colombatto *et al.* (2003b) al aplicar dosis (0.5, 2.55 y 5.1 $\mu\text{L g}^{-1}$ de MS) de un producto enzimático (Liquicell 2500; derivado de fermentaciones de *Trichoderma reesei*) con actividad de xilanasas y celulasas, sobre celulosa (CEL, Avicel PH-101, Fluka Chemicals), xilano (XYL, X-0627, Sigma Chemicals) y una combinación celulosa y xilano (CEXYL, relación 1:1), encontraron que el aumento de la actividad de las xilanasas ocurría entre 0 y 6 h pero el de las endoglucanasas sólo ocurría a 0 h, mostrando que en incubaciones *in vitro* con fluido ruminal, las endoglucanasas exógenas parecen ser menos estables que las xilanasas. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado sinergismo entre enzimas exógenas de *Trichoderma longibrachiatum* y las enzimas producidas por los microorganismos del rumen (Hristov *et al.*, 2000; Morgavi *et al.*, 2000a). Giraldo *et al.* (2009) utilizaron Fibrozyme en la alimentación de borregos Merino, al analizar la actividad de diversas enzimas presentes en el líquido ruminal entre 4 y 8 h después de la alimentación, encontraron que las proporciones molares de propionato fueron mayores, indicando cambios en las poblaciones bacterianas del rumen, mientras que hubieron incrementos en las actividades de endoglucanasas y xilanasas endógenas, además tales

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

autores señalan que los cambios en los patrones de fermentación pueden producir cambios en las poblaciones de bacterias a largo plazo.

Aunque la acción de las xilanasas y endoglucanasas exógenas en el interior del rumen no es del todo comprendida, se han encontrado acciones sinérgicas entre las actividades de enzimas de complejos derivados de *Trichoderma logibrachiatum* y enzimas ruminales, para liberar azúcares del xilano y celulosa del ensilado de maíz (Morgavi *et al.*, 2000a). Asimismo, una causa importante para el incremento de la fermentabilidad del rastrojo de maíz, es que la adición de complejos exógenos ha probado aumentar el número de bacterias fibrolíticas del fluido ruminal (Wang *et al.*, 2001), observándose tendencias cuadráticas en su conteo con respecto a niveles de un producto enzimático de *Trichoderma logibrachiatum* (Nsereko *et al.*, 2002). Además, es posible que las enzimas no hidrolicen directamente la fibra del alimento sino que en lugar de ello incrementen la actividad enzimática endógena del rumen, la cual es sostenida por pequeñas liberaciones de enzima debido al alimento (Rode *et al.*, 1999).

Se esperaría, por lo tanto, que el mayor tiempo de viabilidad dentro del rumen de la enzima Fibrozyme en comparación con Promote, mejorara su actividad sinérgica con enzimas endógenas y su capacidad para incrementar la población de bacterias fibrolíticas. Así en este trabajo aún cuando el tratamiento que incluía Fibrozyme *per se* tuvo valores bajos de DCI, fue uno de los tratamientos con mayor porcentaje de FDN residual mostrando que de alguna forma hubo mejor aprovechamiento de los contenidos celulares y mayor proporción de hemicelulosa, celulosa y lignina en el residuo analizado en las heces. En contraste, el tratamiento P+C consignó valores intermedios de DCI y el porcentaje más bajo de FDN, mostrando que pudo haberse utilizado mayor cantidad de partes fibrosas del alimento, pero menor liberación de los contenidos celulares y por lo tanto menor aprovechamiento de los mismos. Todo lo anterior, pudo impactar los resultados en CA y CoA en los que se hubiera esperado que aquellos tratamientos con menor DCI fueran aquéllos que consignaran mayores CA.

En el presente estudio Fibrozyme sin aditivos químicos registró los mejores valores en GP, PG, CA, PF, producción de AA, AP, AB y AGVt y a excepción de CA, también Promote *per se* estuvo entre los más altos, sin embargo en DCI fueron F+C+U y P+C+U y

F+C los que mostraron el mejor desempeño, superando a T0, pero F y P estuvieron entre los más bajos junto con el testigo (T0). No obstante, P+C+U, sí estuvo siempre junto con F *per se*, entre los mejores tratamientos para las variables de comportamiento antes indicadas y también en AA, pero no fue superior a T0 para AP y AB, en tanto que F sí lo fue; a su vez, P+C+U registró el valor más alto en DCI, mientras que F (sin químicos) registró el más bajo, incluso por debajo de T0. Además, F+C, tuvo un bajo desempeño en comportamiento animal pero muy alto en producción de ácidos grasos volátiles.

En una investigación realizada se probaron tres niveles de un preparado enzimático comercial Fibrozyme: 0 (control), 3 g/kg de MS y 6 g/kg de MS de una dieta concentrado:forraje (70:30%) sobre borregos en crecimiento. No se encontraron efectos del tratamiento enzimático sobre el control para peso final (PF), ganancia de peso total (PG), ganancia de peso por día (GP), consumo de MS (CoA) y conversión alimenticia (CA) (Almaraz et al., 2010). Difiere notablemente de lo reportado en nuestro estudio, donde los preparados enzimáticos (F y P) *per se*, así como algunas combinaciones de ellos con C o C+U (P+C, P+C+U y F+C+U mejoraron el comportamiento en borregos (GP, CA, PG y PF) sobre el testigo ($P < 0.05$).

En otro estudio se evaluó la influencia del Fibrozyme sobre la digestión de la fibra en un primer experimento (E1), luego se evaluó su correlación con el consumo y crecimiento (E2). Se utilizaron novillos alimentados con una dieta para crecimiento, la cual contenía 78% de concentrado y el resto a base de forraje. En E1 se trataron novillos vía cánula rumen/duodenal. Se incrementó ($P < 0.05$) la digestión ruminal de la FDN en un 23% con la adición de la enzima (Fibrozyme), también mejoró en 5% la digestión ruminal del nitrógeno (N). En E2 aumentó el peso final en 3%, el promedio de ganancia diaria de peso en 6% y el consumo de materia seca en 4.5%. Concluyeron que un aumento en consumo es el reflejo del incremento en la digestión de la FDN, y que en dietas altas en energía la adición de enzimas puede estimular la digestión de la fibra y por consecuencia mejorar el consumo de MS y el crecimiento animal (Zinn y Salinas, 1998). En este estudio, no existió mejora de los tratamientos sobre la degradación de la FDN *in situ* ni *in vivo* sobre rastrojo de maíz molido (1 mm) tratado con Fibrozyme (1.5 g/kg de MS) y con Promote (0.02 g/kg de MS) ni de las combinaciones de éstos con cal, urea o cal+urea (C, U y C+U) para la condición *in situ*; tampoco de F o P *per se* y sus combinaciones con C o U+C para la

condición *in vivo*. Pero sí están de acuerdo con los autores anteriores en el incremento de PF y GP donde F, P, P+C+U, y P+C superaron a T0 ($P<0.05$). Además, algunas combinaciones de Fibrozyme y Promote con cal y cal+urea incrementaron la digestibilidad *in situ* a 48 h; a su vez las combinaciones F+C, F+C+U y P+C+U reportaron los valores más altos ($P<0.05$) en digestibilidad estimada mediante cenizas insolubles (DCI) en la etapa *in vivo* del presente estudio, ambos resultados coinciden con lo encontrados en el estudio antes citado. Beauchemin *et al.* (1995) evaluaron dosis crecientes de inclusión de enzimas fibrolíticas exógenas sobre una dieta a base de alfalfa; se incrementó la ganancia de peso por día (GP) en novillos, al nivel intermedio de dosificación, existiendo una tendencia cuadrática respecto a los niveles enzimáticos. Dichos resultados están de acuerdo con lo encontrado en el presente estudio, pues tanto Fibrozyme como Promote sin aditivos químicos reportaron incrementos en GP en borregos (Black Belly x Dorper) sobre el control ($P<0.05$). Así mismo, en un experimento *in situ* con vacas fistuladas y canuladas ruminalmente a las que alternativamente se alimentó con una dieta alta en fibra (82% forraje y 18% concentrado) siendo la composición del forraje 67% rastrojo de maíz y 33% de heno de alfalfa y otra dieta baja en fibra (73.3% forraje: 26.7% concentrado), el forraje se componía por 27.3% de rastrojo de maíz, 27.3% heno de alfalfa y 45.4% harina de nopal deshidratado. Se evaluaron cuatro niveles de enzima (Fibrozyme, Alltech, Inc., Nicholasville, KY, USA): 0 (control), 1, 2 y 3 g/kg de MS adicionado al rastrojo molido 24 h y 0 h antes de iniciar la incubación *in situ* que duró 24 h. Se incrementó la digestibilidad *in situ* de la materia seca (DISMS; $P<0.05$) sobre el control para los tres niveles de enzima, pero con tendencia cuadrática siendo el pico máximo a 1 g de enzima; en fibra detergente neutro desaparecida (FDND) sólo el nivel de 1 g de enzima superó al control ($P<0.05$) y no hubo efectos sobre fibra detergente ácido desaparecida. Correlacionaron alta y significativamente DIVMS y FDND ($r=0.82$; $P<0.01$). El mejor tratamiento fue 1 g de enzima a 24 h para DISMS (Tirado *et al.*, 2004). En el mismo estudio se evaluaron los patrones de AGV y N-NH₃ a 0, 3, 6, 9, 12 y 24 h, con las mismas dosis de enzima Fibrozyme (0 (control), 1, 2 y 3 g/kg de MS) los valores más altos sobre control se obtuvieron con 1 y 2 g de enzima y a 3, 6 y 9 h para AA, AP, AB y AGVt ($P<0.05$), y el punto máximo de N-NH₃ se obtuvo a 3 h sobre control y con 1 y 2 g de enzima ($P<0.05$). En la etapa *in vivo* del presente estudio, también mejoró la digestibilidad de la MS mediante el indicador de cenizas insolubles (DCI) con los preparados enzimáticos combinados con cal y urea, pero no lo hicieron por sí solos. Además, los resultados

presentes coinciden con los anteriores en los incrementos de AA, AP y AGVt de los tratamientos (incluso para F y P *per se*) sobre el testigo, pero difieren para degradación de FDN y patrón de N-NH₃, ya que en nuestro caso no hubo mejora en los tratamientos evaluados sobre el testigo en tales variables.

Cabe señalar que la acción de la enzima, no se restringe a su actividad directa sobre el sustrato contenido en la dieta experimental, sino que también actúa en sinergismo modificando ciertas condiciones del rumen y con ello favoreciendo modificaciones en las poblaciones bacterianas, la actividad de enzimas endógenas y modificando la unión de microorganismos con los sustratos (Adesogan, 2005). Por ejemplo, Yang *et al.* (2003), al utilizar Promote, encontraron que la suplementación de la enzima no afectó el total de AGV pero sí incrementó la concentración de acetato y disminuyó la de propionato, además, la inclusión de enzimas exógenas no tuvo efecto sobre la digestión cuando el pH fue menor a 5.6, mostrando que las enzimas actúan sinérgicamente con los microorganismos del rumen más que por hidrólisis directa. Tales interacciones parecen causar múltiples variantes en las respuestas *in vivo* observadas al suplementar aditivos enzimáticos, por ejemplo, Yescas *et al.* (2004) al utilizar Fibrozyme (0 y 1 g de enzima/kg de MS) en rastrojo de maíz y avena, encontraron que la adición de este preparado incrementaba la concentración de acetato y butirato, pero no la de propionato, Pinos-Rodriguez *et al.* (2002) también observaron aumento en la concentración de AGVt al probar un complejo fibrolítico. No obstante, Yang *et al.* (2002) reportaron que la suplementación con enzimas fibrolíticas exógenas no modificó la concentración de AGVt, incrementó las proporciones molares de acetato y redujo las de propionato. Explicar tales variaciones resulta complicado por los diversos factores que intervienen (Beauchemin *et al.*, 2003): En primer lugar, los alimentos son muy complejos estructuralmente, pues contienen una gran variedad de polisacáridos, proteínas, lípidos, lignina y ácidos fenólicos en íntima asociación; en segundo lugar, los productos enzimáticos son mezclas de enzimas con diversas actividades, las cuales difieren entre sus condiciones óptimas y por último, el fluido ruminal es un ecosistema microbiano extremadamente complejo, pues contiene cientos de especies de microorganismos con sus propia secreción de enzimas (Colombatto *et al.*, 2003b). Recientemente, se ha utilizado la caracterización bioquímica con el fin de comprender algunos de los mecanismos por los cuales tales complejos de enzimas pueden mejorar la digestibilidad de la MS, FDN, FDA y patrones de fermentación

de algunos alimentos, no obstante, tales ensayos no representan la complejidad de la pared celular de la planta, el espectro de acción de las enzimas, ni las condiciones del rumen (Beauchemin *et al.*, 2003), por lo que no pueden predecir su potencial en experimentos *in vitro* (con líquido ruminal), *in situ* o *in vivo*. Kung *et al.* (2000b), al comparar dos diferentes productos comerciales con actividades similares de celulasas y xilanasas en dietas para vacas productoras de leche, encontró que sólo una de ellas podía incrementar la producción de leche. También la dieta en que las enzimas fibrolíticas son aplicadas puede explicar algunas de las variantes en experimentos *in vivo*; por ejemplo, Gómez *et al.* (2003) encontraron que la mezcla de Fibrozyme+urea sólo afectaba el consumo voluntario y la ganancia de peso de bovinos alimentados con caña de azúcar, pero no había efectos de la suplementación cuando en lugar de ésta se utilizaba zacate estrella.

Aunque las estimaciones obtenidas *in vitro* e *in situ*, pueden predecir hasta con cierta certeza los resultados que se obtendrían con alimentos experimentales *in vivo* (Sims *et al.*, 2008), es aún necesario llevar a cabo trabajos *in vivo*. Algunas variantes como las cantidades y tipos de proteínas o grasas contenidas en la dieta, pueden producir variaciones en las estimaciones *in vitro*, pues aún cuando existe una fuerte relación entre la DMO de los alimentos y la tasa de producción de gas, valores altos de PC y grasa pueden disminuir la cantidad de gas, por lo que no siempre los alimentos con menor producción de gas son aquéllos con menor valor de DMO (Kilic y Garipoglu, 2009). Además, una alta concentración de propionato se asocia con una producción de gas más baja, debido a un carbón extra incluido dentro del propionato que de otra forma se transformaría en CO₂ (Vargas-Villamil *et al.*, 2005). Al respecto, González *et al.* (2003) al probar Promote en cabras de leche, no encontraron relación entre los resultados *in vitro* e *in vivo*. Tales variaciones se pueden atribuir a condiciones experimentales en la cual la energía no es un nutriente limitante, así como a las actividades y características de las enzimas suplementadas, baja o sobre suplementación de actividad enzimática y al inadecuado método de suministro del producto enzimático, disponibilidad de los productos y número limitado de animales en las pruebas. Aunque se han logrado grandes avances en la tecnología de las enzimas para ruminantes, se requiere considerable investigación para reducir la variabilidad en las respuestas (Beauchemin *et al.*, 2003).

9. CONCLUSIONES

Etapa *in vitro*:

La tasa fraccional de gas ajustada y volumen de gas a 24 h se incrementó en comparación con el testigo (T0) en cinco de los 16 tratamientos evaluados. En el resto de las variables relacionadas con producción de gas los tratamientos fueron iguales a T0.

La concentración de ácido propiónico se incrementó sobre T0 en aquéllos tratamientos donde los preparados enzimáticos se aplicaron a 0 h, incluyendo a los que recibieron Promote a 24 h, solo o combinado con cal ó urea, pero no con cal+urea. En el resto de las variables relacionadas con patrones de fermentación (AA, AB, AGVt y AA:AP) los tratamientos mostraron un comportamiento similar a T0.

Los indicadores de la degradación de la fibra de rastrojo de maíz (FDNr, MSD, DV), se incrementaron por encima de T0 en todos los tratamientos con aplicación enzimática a 0 h. También sucedió lo mismo con Promote solo, ó con cal ó con urea, aplicado a 24 h.

La evaluación de la cinética ruminal mostró un incremento en producción de masa microbiana de los tratamientos sobre T0 con aplicación de enzimas a 0 h, pero no para adherencia microbiana.

La tasas de energía metabolizable y energía neta de lactancia, evaluadas a 48 h de incubación *in vitro*, se incrementaron sobre T0 en los tratamientos con aplicación enzimática a 0 h, pero no a 24 h.

La digestibilidad fraccional de la materia orgánica (DMO/t) se incrementó sobre T0 para la mayoría de los tratamientos y en todos los tiempos evaluados (24, 40, 48, 60 y 72 h); donde T0 reportó los valores más bajos. Los resultados se obtuvieron principalmente en aquéllos tratamientos que contenían Fibrozyme aplicado a 0 h. También en la digestibilidad de la materia orgánica (DMO), a excepción de la medición a 24 h, donde los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tratamientos no difirieron de T0, el resto de los tiempos de medición (40-72 h) mostró un comportamiento semejante a DMO/t.

Etapa *in situ*:

La digestibilidad de la materia seca fue mejorada sobre T0 a 48 h por la acción combinada de Promote, ó Fribrozyme+cal, ó Promote+cal+urea y a 72 h por Promote+cal+urea. La tasa de degradación de FDN no se incrementó sobre T0 en los tratamientos y tiempos evaluados.

Etapa *in vivo*:

Las variables de comportamiento animal y patrones de fermentación reportaron incrementos sobre T0 para la mayoría de los tratamientos estudiados así como también sobre la digestibilidad medida sobre la fracción de cenizas insolubles en ácido. Los tratamientos que mostraron los comportamientos más altos fueron Fibrozyme, Promote, Promote+cal+urea y Fibrozyme+cal. La degradación de las fracciones de fibras neutra y ácida, así como el contenido de lignina, evaluadas en heces, no reportaron diferencias respecto a T0.

Conclusiones generales:

En general, los tratamientos que recibieron la aplicación de los preparados enzimáticos fibrolíticos exógenos a 0 h, reportaron incrementos sobre T0 en todas las variables en las que hubo significancia, pero con la aplicación de dichos preparados enzimáticos 24 h antes de la incubación *in vitro* no hubo diferencias con T0.

Los tratamientos que mejores resultados consignaron en las tres etapas experimentales fueron Fibrozyme+cal, Promote+cal y Promote+cal+urea seguidos por Fibrozyme y Promote+cal a 0 h.

Resulta benéfico aplicar preparados enzimáticos y algunas combinaciones de estos con ciertos aditivos químicos para mejorar la degradación y aprovechamiento de dietas altas en forrajes fibrosos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Adesogan, A. T. 2005. Improving forage quality and animal performance with fibrolytic enzymes. Florida Ruminant Nutrition Symposium: 91-109.
- Akin, D. E., y Chensson, 1990. Lignification as the major factor limiting forage feeding value especially in warm conditions. *In: Proc. XVI Int. Grassland Congr., Nice, France, 4-11 October 1989, Association Francaise pour la Production Fourragere, Versailles, France, Vol. III. p. 1753-1760.*
- Albretch, K. A., Wedin, y D. R. Buxton. 1987. Cell-wall composition and digestibility of alfalfa stems and leaves. *Crop Sci. 27:735-741.*
- Almaraz, I., S. S. González, J. M. Pinos-Rodríguez, L. A. Miranda. 2010. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in sacco* and *in vitro* degradation of diets and on growth performance of lambs. *Italian J. Anim. Sci. 9:e2: 6-10.*
- Ayala, J. O., G. Mendoza M., R. Bárcena G. y S. González M. 1994. Efecto de la adición de *Saccharomyces cerevisiae* y melaza-urea sobre la digestibilidad *in vivo* e *in situ* en dietas para ovinos basadas en paja de cártamo. *Vet. Méx. 25(3): 220-226.*
- Balci, F., S. Dikmen, H. Gencoglu, A. Orman, I. I. Turkmen y H. Biricik. 2007. The effect of fibrolytic exogenous enzyme on fattening performance of steers. *Bulg. J. Vet. Med., 10 (2): 113-118.*
- Bauchop, T. 1981. The anaerobic fungi in rumen fibre digestion. *Agriculture and Environment 6:339-348.*
- Beauchemin, K. A., L. M. Rode, y V. J. Sewalt. 1995. Fibrolytic enzymes supplementation on energy, amino acid digestibility and performance of pigs fed hulled barley based diets. *Can. J. Anim. Sci. 78:625-631.*

- Beauchemin, K., S. D. M. Jones, L. M. Rode, and V. J. H. Sewalt. 1997. Effects of fibrolytic enzymes in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 77:645–653.
- Beauchemin, K. A., D. Colombatto, D. P. Morgavi, y W. Z. Yang. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81(2):E37-E47.
- Bergamaschine, A. F., M. Passipieri, F. W. Veriano, O. Isepon y C. L. Almeida C. L. 2006. Calidad y valor nutritivo del capim-marandu (*B. brizantha* cv.) con aditivos o forrajes enmohecidos. *R. Bras. Zootec.* 35(4):1454-1462.
- Blümmel, M., H. Steingas y K. Becker. 1997. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British J. Nut.* 77: 911-921.
- Braden, A. C. y C. W. Smith. 2004. Phenology measurements and fiber associations of near-long staple upland cotton. *Crop Sci.* 44: 2032-2037.
- Bruni, M. A. y P. Chilibroste. 2001. Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal.* Vol 9 (1): 43-51.
- Bruck, D. T., D. W. Smith y M. T. Madigan. 1987. *Microbiología*. Primera edición. Prentice Hall Hispanoamericana, S. A. pp 492-514.
- Bryant, D. R. 1973. Nutritional requeriments of the predominant rumen cellulolytic bacteria. *Fed. Proc.* 32:1809-1813.
- Buxton, D. R. 1989. *In vitro* digestion kinetics of temperate perennial forage legume and grass stems. *Crop Sci.* 29:213-219.
- Buxton, D. R. y J. R. Russell. 1988. Lignin constituents and cell wall digestibility of grass and legume stems. *Crop Sci.* 28:553-558.

- Buxton, D. R., J. R. Russell, y W. F. Wedin. 1987. Structural neutral sugars in legume and grass stems in relation to digestibility. *Crop Sci.* 27:1279-1285.
- Carro, M.D., S. López, C. Valdés y M.J. Ranilla. 1999. Effect of nitrogen supplementation on the *in vitro* rumen fermentation of nitrogen deficient forages. *Arch. Zootec.* 48: 295-306.
- Casler, M. D. 2005. Agricultural fitness of smooth bromegrass populations selected for divergent fiber concentration. *Crop Sci.* 45:36-43.
- Castañeda, E. A. y V. J. Monroy. 1984. Métodos de procesamiento de subproductos agrícolas para elevar su valor nutricional. *In: González, S. y M. Cuca (eds.). Utilización de subproductos agroindustriales en la alimentación de rumiantes.* Colegio de Posgraduados, Montecillo. Edo. de México. pp: 25-60.
- Chávez, S. A., E. V. de Chávez y M. L. Máynez. 1984. Contenido y fluctuación de nutrientes de especies nativas consumidos por el ganado en la región central de Chihuahua, contenido y fluctuación de nutrientes en las especies forrajeras consumidas en los agostaderos de Chihuahua. *Col. Pastizales, RELC-INIP- SARH (Ed. A. Chávez), Chihuahua, México. Vol. XV(1): 24, 32.*
- Chay-Canul, A., A. J. Ayala-Burgos, J. C. Kú-Vera, y J.G. Magaña-Monforte. 2009. Efecto del tamaño de partícula sobre consumo, digestibilidad y balance del nitrógeno en ovinos pelibuey alimentados con dietas basadas en frijol terciopelo (*Macuna pruriens*) y grano de maíz. *Tropical and Subtropical Agroecosystems.* 10: 383-392.
- Cherney, J. H., J. D. Axtel, M. M. Hassen y K. S. Anliker. 1988. Forage quality characterization of a chemically induced brown-midrib mutant in pearl millet. *Crop Sci.* 28: 783-787.
- Chesson, A. 1993. Mechanistic models of forage cell wall degradation. *In: Jung, H. G., D. R. Buxton, R. D. Hatfield and J. Ralph (eds.). Forage Cell Wall Structure and Digestibility, ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI. pp: 347-376.*

- Chesson, A. 1988. Lignin polysaccharide complexes of the plant cell wall and their effect on microbial degradation in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 21: 219-228.
- Church, D, C. y W. G. Pond. 1996. *Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales*. UTHEA Noriega (Eds.). México, pp: 89-99.
- Colombatto, D., D. P. Morgavi., A. F. Furtado. Y K. A. Beauchemin. 2003a. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: Relationship between biochemical characteristics and *in vitro* ruminal degradation. *J. Anim. Sci.* 81(10): 2628-2638.
- Colombatto, D., F. L. Mould, M. K. Bhat y D. P. Morgavi. 2003b. Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentation of pure cellulose xylan by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 81:1040-1050.
- Colombatto, D., F. Mould., M. Bhat., R. Philipps y E. Owen. 2004. *In vitro* evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage: I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 111(1-4): 111-129.
- Colombatto, D., F. L. Mould, M. K. Bhat y E. Owen. 2007. Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and incubation pH on the *in vitro* ruminal fermentation of alfalfa stems. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 137:150-162.
- Corah, L. R. 1990. Ammoniation of low quality forages. *Agri-Practice* 11:35-38.
- Coughlan, M. P. 1992. Enzymic hydrolysis of cellulose: An overview. *Bioresource Technol.* 39: 107-115.
- Dawson, K. A. 1993. Probiotics and enzymes in ruminant nutrition. *In: Wenk, C. and M. Boessinger (eds.). Enzymes in Animal Nutrition: Proceedings of the 1st Symposium.* Institut Fur Nutrien Wissenschaften, Zurich. p: 89.

- Dawson, K. A., y J. M. Tricarico. 1999. The use of exogenous fibrolytic enzyme to enhance microbial activities in the rumen and the performance of ruminant animals. *In*: Lyons, T. P. and K. A. Jacques (eds.) *Biotechnology in Feed Industry: Proceedings of the Fifteenth Annual Symposium*, Nottingham University Press, Loughborough, Leics. UK. pp: 303-312.
- Dean, J. F. y K. E. Eriksson. 1992. Biotechnological modification of lignin structure and composition in forest trees. *Holzforschung* 46:135-147.
- Dehoroty, B. A. 1993. Microbial ecology of cell wall fermentation. *In*: Jung, G. D., R. Buston, R. D. Hatfield and J. Ralph. (eds.) *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. ASSA-CSSA-SSSA, Madison, WI. pp: 425-453.
- Delgado, N. J., M. D. Casler, C. R. Grau y H. G. Jung. 2002. Reactions of smooth bromegrass clones with divergent lignin or etherified ferulic acid concentration to three fungal pathogens. *Crop Sci.* 42:1824-1831.
- Dosualdo, R. K., Gomes P. O., Campos V. S., Prates O. A., Bastos P. L. y C. F. Martins. 2006. Valor nutritivo del ensilado de maíz (*Zea mays* L.) producido con inoculantes enzimo-bacterianos. *R. Bras. Zootec.* 35(2):389-395.
- Dirven, J. G. y B. Deinum. 1977. The effect of temperature on the digestibility of grasses: An analysis. *Forage Res.* 3:1-17.
- Eraso, F. y R. D. Hartley. 1990. Monomeric and dimeric fenolic constituents of plant cell walls-Possible factors influencing wall biodegradability. *J. Sci. Food Agric.* 51:163-170.
- Erwin, E. S., G. J. Marco y E. Emery. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44: 1768-1771.
- Eun, J. S. y K. A. Beauchemin. 2007a. Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using *in vitro* fermentation characteristics. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 132(3/4): 298-315.

- Eun, J. S. y K. A. Beauchemin. 2007b. Enhancing *in vitro* degradation of alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. *J. Dairy Sci.* 90(6): 2389-2851.
- Eun, J. S., K. A. Beauchemin y H. Schulze. 2007a. Use of an *in vitro* fermentation bioassay to evaluate improvements in degradation of alfalfa hay due to exogenous feed enzymes. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 135(3):315-328.
- Eun, J. S., K. A. Beauchemin y H. Schulze. 2007b. Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance *in vitro* fermentation of alfalfa hay and corn silage. *J. Dairy Sci.* 90(3): 1440-1451.
- Eun, J. S., J. S. Beauchemin, S. H. Hong, S.-H. y M. W. Bauer. 2006. Exogenous enzymes added to untreated or ammoniated rice straw: Effects on *in vitro* fermentation characteristics and degradability. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 131(1):87-102.
- Fahey, G. C., L. D. Bourquin, E. C. Titgemeyer y D. G. Atwell. 1993. Postharvest treatment of fibrous feedstuffs to improve their nutritive value. *In: Jung, G. D., R. Buston, R. D. Hatfield y J. Ralph. (eds.) Forage Cell Wall Structure and Digestibility.* ASSA-CSSA-SSSA, Madison, WI. pp: 715-766.
- FAOSTAT. 2004. FAO online agricultural database collections. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org/default.htm>.
- Feng, P., C. W. Hunt, G. T. Pritchard y W. E. Julien. 1996. Effect of enzyme preparations on *in situ* and *in vitro* degradation and *in vivo* digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. *J. Anim. Sci.* 74: 1349-1357.
- Ferreira, C. F., L. G. Nussio, H. C. Maluf, F. P. Campos, R. M. Coelho, L. J. Mari y T. P. Almeida. 2006. Perfil microbiológico, parámetros físicos y estabilidad aerobia de ensilados de Tifton 85 (*Cynodon* sp.) con distintas concentraciones de materia seca y aplicación de aditivos. *R. Bras. Zootec.* 35(2):358-371.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Freedden, A. H. y R. E. McQueen. 1993. Effects of enzyme additives on quality of alfalfa/grass silage and dairy cow performance. *Can. J. Anim. Sci.* 73:581-591.
- Fritz, J. O., K. J. Moore, y E. H. Jaster. 1990. Digestion kinetics and cell wall composition of brown midrib sorghum x sudangrass morphological components. *Crop Sci.* 30:213-219.
- Getachew G., M. Blümmel, H. P. Makkar y K. Becker. 1998. *In vitro* measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: A review. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 72: 261-281.
- Giraldo, L. A., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, S. Ramos, A. R. Mantecón y M. D. Carro. 2009. Influence of direct-fed exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fibrolytic activity sheep. *Option Méditerranéennes*, A. 85. 297-302.
- Giraldo, L. A., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, S. Ramos y M. D. Carro. 2008. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay based diet. *J. Anim. Sci.* Published on line march, 2008. Available in: <http://jas.fas.org>.
- Giraldo, L. A., M. J. Ranilla, M. L. Tejido y M. D. Carro. 2007a. Influence of exogenous fibrolytic enzyme and fumarate on methane production, microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters. *British J. Nut.* 98:753-761.
- Giraldo, L. A., M. J. Ranilla, M. L. Tejido y M. D. Carro. 2007b. Effects of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in Rusitec fermenters *J. Anim. Sci.* 85:1962-1970.
- Goering, H. K. y Van Soest. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agricultural Handbook No. 379.* ARS-USDA, Washington, D.C. 20 p.

- Goikoetxea, E. 2005. Caracterización molecular de una familia de genes de celobiohidrolasas en el hongo *Pleurotus ostreatus*. Tesis para apelar al grado de Doctor. Depto. Producción Agraria, Un. Navarra.
- Gómez-Vázquez, A., J. Pérez, G. D. Mendoza, E. Aranda y A. Hernández. 2003. Fibrolytic exogenous enzymes improve performance in steers fed sugar cane and stargrass. *Livestock Prod. Sci.* 82(2/3): 249-255.
- Gómez, A., J. Perez, G. D. Mendoza, E. Aranda, A. Hernandez, J. A. Ramos y R. Rojo. 2003. Exogenous fibrolytic enzymes and sugar cane improve performance in steers fed stargrass. *J. Anim. Sci.* V. 80, Suppl. 1/*J. Dairy Sci.* V. 85, Suppl. 1: 355.
- González, E., G. Caja, E. Albanell, C. Flores, A. Castro, R. Casals, X. Such, A. Bach, y C. Torre. 2003. Effects of fibrolytic enzyme supplementation for dairy goats in mid lactation. *J. Anim. Sci.* V. 80, Suppl. 1/*J. Dairy Sci.* V. 85, Suppl. 1: 355.
- Grabber, H. 2005. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Sci.* 45: 820-831.
- Griswold, K. E., G. A. Apgar., J. Bouton. y J. L. Firkins. 2003. Effects of urea infusion and ruminal degradable protein concentration on microbial growth, digestibility, and fermentation in continuous culture *J. Anim. Sci.* 81(1):329-337.
- Gutierrez, A. J. L. 1991. Nutrición de Rumiantes en Pastoreo. Departamento Editorial de la Universidad Autónoma de Chihuahua. México. pp: 33-63.
- Gwayumba, W. y D. A. Christensen. 1996. The effect of fibrolytic enzymes on protein and carbohydrate degradation fractions in forages. *Can. J. Anim. Sci.* 78:541.
- Hartley, R. D. y C. W. Ford. 1989. Phenolic constituents of plant cell walls and wall biodegradability. *In:* Lewis, N. G. and M. G. Paice (eds.) *Plant Cell Wall Polymers: Biogenesis and Biodegradation.* Am. Chem. Soc., Washington, D.C. pp: 137-145.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Hatfield, R. D. 1993a. Cell wall polysaccharide interactions and degradability. *In*: Jung, H. G., D. R. Buxton, R. D. Hatfield, and J. Ralph (eds.) Forage Cell Wall Structure and Digestibility. ASA-CSSA-SSSA, Madison, Wisconsin. pp: 285-313.
- Hatfield, R. D. 1993b. Characterization of a pectic fraction from smooth bromegrass cell walls using an endopolygalacturonase. *J. Agric. Food Chem.* 41:380-387.
- Hatfield R. D, J. Ralph y J. H. Grabber. 1999. Cell wall structural foundations: molecular basis for improving forage digestibilities. *Crop Sci.* 39: 27-34.
- Hatfield R. y R. S. Fukushima. 2005. Can lignin be accurately measured?. *Crop Sci.* 45:832-839.
- He, X., M. B. Hall, M. Gallo-Meagher y R. L. Smith. 2003. Improvement of forage quality by down regulation of maize O-methyltransferase. *Crop Sci.* 43: 2240-2251.
- Hernández, H. J., R. Sanginez, C. García, G. Mendoza y R. Ricalde. 1992. Efecto de suplementos energéticos y nitrogenados con distinta degradabilidad ruminal en la digestibilidad *in vivo* de raciones de rastrojo de maíz para borregos. *Agrociencia Serie Ciencia Animal* 2 (3): 253-264.
- Hernández-López T. 2002. Monografía del Municipio de Calvillo, Aguascalientes, México. 336 p.
- Hristov, A. N., T. A. McAllister y K. J. Cheng. 1998. Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharide-degrading enzymes on rumen fermentation and nutrient digestibility. *J. Anim. Sci.* 76:3146-3156.
- Hristov, A.N., McAllister, T.A. y K.J. Cheng. 2000. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: Effects on nutrient digestion on cattle fed a barley grain diet. *J. Anim. Sci.* 78: 477-487.

- Hobson, P. N., A. Chesson, y C. W. Forsbery. 1988. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. *In*: P. N. Hoson (ed.) The Rumen Microbial Ecosystem. London: Elsevier Applied Sci. pp: 251-284.
- Howes, D. 1998. Using biotechnology to improve forage and cereal utilization by lactating cows. *In*: Fibrozyme: La Primera Enzima Encapsulada para Rumiantes. Alltech. Inc. pp: 11-19.
- Hungate, R. E. 1966. The Rumen and its Microbes. Academic Press, New York. 533 p.
- Idareta, O. 2004. Estudio de caracteres productivos de híbridos de *Pleurotus ostreatus* en condiciones semiindustriales para su selección dentro de un programa de mejora genética. Tesis. Universidad Pública de Navarra.
- Iiyama, K. y T. B. T. Lam. 1990. Lignin in wheat internodes. Part. I. The reactivities of lignin units during alkaline nitrobenzene oxidation. *J. Sci. Food Agric.* 51:481-491.
- INEGI, 1994. Censo Agropecuario (Anuario), México.
- Jouany, J. P., F. Mathieu, J. Senaud, J. Bohatier, G. Bertin, M. Mercier. 1998. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on the digestion of the cell wall of a mixed diet in defaunated and refaunated sheep rumen. *Nutr. Develop.* 38:1-16.
- Jung, H.G, T. A. Morrison y D. R. Buxton. 1998. Degradability of cell-wall polysaccharides in maize internodes during stalk development. *Crop Sci.* 38 (4): 1047-1051.
- Jung, H.G. y F. M. Engels. 2002. Alfalfa stem tissues: cell wall deposition, composition, and degradability. *Crop Sci.* 42:524-534.
- Jung, H. G., y Deetz. 1993. Cell wall lignification and degradability . *In*: Jung, G. D., R. Buston, R. D. Hatfield and J. Ralph. (eds.) Forage Cell Wall Structure and Digestibility. ASSA-CSSA-SSSA, Madison, WI. pp: 315.346.

- Jung, H. G. y M. D. Casler. 1991. Relationship of lignin and esterified phenolics to fermentation of smooth bromegrass fiber. *Anim. Feed Sci. Technol.* 32:63-68.
- Jung, H. G. y M. P. Russell. 1991. Light source in nutrient regime effects on fiber composition and digestibility of forages. *Crop Sci.* 31:1065-1070.
- Jung, H. G. y J. Ralph. 1990. Phenolic carbohydrate complexes in plant cell walls and their effect on lignocellulose utilization. *In: D. E. Akin, D. E., L. G. Ljungdahl, J. R. Wilson and P. J. Harris (eds.) Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminants.* Elsevier Sci. Publ. Co., New York. pp: 173-182.
- Keulen, J. V. y B. A. Young. 1977. Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *J. Anim. Sci.* 44: 282-287.
- Kilic, U. y A.V. Garipoglu. 2009. *In situ* rumen degradability, *in vitro* digestibility and *in vitro* gas production of full fat canola seeds. *Asian J. Anim. and Vet. Advances* 4(4): 200-208.
- Krueger, N. A., A. T. Adesogan, C. R. Staples, W. K. Krueger, S. C. Kim, R. C. Littell y L. E. Sollenberger. 2008. Effect of method of applying fibrolytic enzymes or ammonia to Bermudagrass hay on feed intake, digestion, and growth of beef steers. *J. Anim. Sci.* 86:882-889.
- Kung, L. Jr., M. A. Cohen, y L. M. Rode. 2002a. The effect of fibrolytic enzymes sprayed onto forages and fed in a total mixed ratio to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:2396–2402.
- Kung, L. Jr., R. J. Treacher, G. A. Nauman, A. M. Smagala, K. M. Endres y M. A. Cohen. 2000b. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:115-122.
- La Grange, D. C., I. S. Pretorius, M. Claeysens y W. H. Van Zyl. 2001. Degradation of xylan to D-xilose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* coexpressing the

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Aspergillus niger β -xylosidase (xlnD) and the *Trichoderma reesei* xylanase II (xyn2) genes. Applied and Environmental Microbiology 67 (12): 5512-5519.

Leng, R. A. 1991. Application of biotechnology to nutrition of animals in developing countries. FAO 1(1): 146 p.

Lewis, G. E., C. W. Hunt, W. K. Sánchez, R. Treacher, G. T. Pritchard y P. Feng. 1996. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. J. Anim. Sci. 74:30-20.

Liebhart, W. C., R. W. Andrews, M. N. Culik, R. R. Hardwood, R. R. Janke, J. K. Radke S.L. y Rieger-Schwartz. 1990. Crop production during conversion from conventional to low-input methods. Agron. J. 81: 150.

Liu, J. X., A. Susenbeth y K.-H. Südekum. 2002. *In vitro* gas production measurements to evaluate interactions between untreated and chemically treated rice straws, grass hay, and mulberry leaves. J. Anim. Sci. 80:517-524.

López, T. R., E. R. García, B. M. Mellano y O. J. Acosta. 2002. Crecimiento y características de la canal de bovinos Charolais y Beefmaster alimentados con dos fuentes de proteína y dos niveles de grasa sobrepasante. Tec. Pecu. Méx. 40(3):291-298.

Ly, L., J. D. Allen, Pok Samkol y M. Castro. 2008. Evaluación de la digestibilidad de forraje arbóreo tropical en cerdos mediante el uso de la técnica de bolsa móvil. Revista Computarizada de Producción Porcina. 15(3): 271-276.

Macarron, L. R. 1992. Purificación y caracterización de endoglucanasa III de *Trichoderma reesei* QM9414. Universidad Complutense de Madrid, España. Dpto. Bioquímica y Biología Molecular. Tesis doctoral. 106 p.

Makkar, H. 2001. Recent advances in *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources.

http://www.fao.org/DOCREP/ARTICLE/AGRIPPA/570_EN_toc.htm

- Maki, S. P., K. A. Johnson y C. Hunt. 1998. The effect of fibrolytic enzymes on the digestibility of dry rolled and tempered barley. *J. Anim. Sci.* 76(suppl. 1): 320.
- Márquez, A., G. D. Mendoza M., J. M. Pinos-Rodríguez, H. Zavaleta, S. González, S. Buntinx, O. Loera, M. Meneses. 2009. Effect of fibrolytic enzymes degradation of NDF extracts of alfalfa and orchardgrass. *Ital. J. Anim. Sci.* 8:221-230.
- McAllister, T. A., S. J. Oosting, J. D. Popp, Z. Mir, L. J. Yanke, A. N. Hristov R. J. Treacher y K. J. Cheng. 1999. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 79:353-360.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clin. Chem. Acta* 17: 297-304.
- Medina, R. M. A., G. Tirado E., I. Mejía H., I. Camarillo S. y C. R. Cruz V. 2006. Digestibilidad *in situ* de dietas con harina de nopal deshidratado conteniendo un preparado de enzimas fibrolíticas exógenas. *Pesq. Agropec. Bras.* 41(7): 1173-1177.
- Méchin, V., O. Argillier, Y. Hébert, E. Guingo, L. Moreau, A. Charcosset y Y. Barrière. 2001. Genetic analysis and QTL mapping of cell wall digestibility and lignification in silage maize. *Crop Sci.* 41: 690-697.
- Menke, K. H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz, y W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 92, 217 -222.
- Menke, K. E. y H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Development* 27:7-55.

- Miranda, R. L. A., G. Mendoza, J. R. Bárcena, S. González, R. Ferrara, M. E. Ortega y M. A. Cobos. 1996. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae* cultures and level on parameters of ruminal fermentation. *Anim. Feed Sci. And Technol.* 63: 289-296.
- Miranda, R. L. A. 1998. Obtención y caracterización de un cultivo mixto de bacterias ruminales con capacidad para degradar rastrojo de maíz. Tesis. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Edo. México. P. 8-10.
- Morgavi, D. P., K. A. Beauchemin, V. L. Nsereko., L. M. Rode., A. D. Iwaasa., W. Z. Yang., T. A. McAllister y Y. Wang. 2000a. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Dairy Sci.* 83:1310–1321.
- Morgavi, D. P., Newbold, C. J., Beever, D. E. and R. J. Wallace. 2000b. Stability and stabilization of potential feed additive enzymes in rumen fluid. *Enz. Microb. Technol.* 26:171–177.
- Morrison, T. A., H. G. Jung, D. R. Buxton y R. D Hatfield. 1998. Cell-wall composition of maize internodes of varying maturity. *Crop Sci.* 38 (2): 455-460.
- Mozammel, H. M. y Mostafa. 1992. Enzyme biotechnology in developing countries: Production and application of thermostable xylanase in jute fiber updegradation. En: M.R. Ladisch y A. Bose (eds.). *Harnessing Biotechnology for the 21st Century*. American Chemical Society, Washington, D.C. pp. 569-573.
- Murrieta, D., G. Mata y L.G. Iglesias. 2002. Cambios en la producción de lacasa por el hongo *Pleurotus pulmonarios* (FR.) QUÉL. cultivado en pulpa de café en confrontación con *Trichoderma viride* Pers., un moho contaminante. *Foresta Veracruzana* 4(1): 47-52.
- National Research Council. 1989. *Alternative Agriculture*. National Academy Press, Washington, D.C.
- Nsereko, V.L., Beauchemin, K.A., Morgavi, D.P., Rode, L.M., Furtado, A.F., McAllister, T.A., Iwaasa, A.D., Yang, W.Z. and Y. Wang. 2002. Effect of a fibrolytic enzyme

preparation from *Trichoderma logibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. *Can. J. Microbiol.* 48:14-20.

Nishitani, K., y Y. Masuda. 1979. Growth and cell wall changes in adzuki bean epicotyls. I. Change in cell wall polysaccharides during intact growth. *Plant Physiol.* 20: 63-74.

Nobel, P. S. 1988. Principles underline the prediction of the temperature in plants with special referents to dessert succulents. *In: S. P. Long and F. I. Woodward (eds.) Plants and Temperature Soc. Exp. Biol. Cambridge, U.K.* pp: 1-23.

Orskov, F.R, and Mcdonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 92: 499-503.

Pastor, J. 2004. Mapeo del gen Mn4-161 mediante el uso de marcadores RFLP, en *Pleurotus ostreatus* var. Florida. Tesis. Universidad Pública de Navarra.

Perdok, H. B., R. A. Leng, S. H. Bird, G. Habib y M. Van Hourted. 1988. Improving livestock production from straw based diets. *In: Thompson, E. F. and F. S. Thompson (eds.) Increasing Small Ruminant Productivity in Semi-Arid Areas, Syria: ICARDA.* pp: 81-91.

Petersen, M. K., V. M. Thomas y R.E. Roffler. 1981. Reconstituted Kentucky bluegrass straw. I. Ensiled with molasses and sodium or calcium hidroxides. *J. Anim. Sci.* 52:398-405.

Pinos-Rodríguez, J. M. 1999. Caracterización de enzimas fibrolíticas exógenas en la fermentación ruminal y digestibilidad de alfalfa y ballico. Tesis de Doctor en Ciencias, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Texcoco, Mex. 97 p.

Pinos-Rodríguez, J. M., S. S. González, G. D. Mendoza, R. Bárcena, M. A. Cobos, A. Hernández y M. E. Ortega. 2002. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal

- fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 80(11): 3016-3021.
- Ponce, T. y A. O. Pérez. 2002. Celulasas y xilanasas en la industria. *Avance y Perspectiva* 21: 273-277.
- Posada, S. L y Noguera, R. R. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development* 17 (4).
- Ralph, J., y R. F. Helm. 1993. Lignin-hydroxycinnamic acid-polysaccharide complexes: synthetic models for regiochemical characterization. *In: Jung, G. D., R. Buston, R. D. Hatfield and J. Ralph. (eds.) Forage Cell Wall Structure and Digestibility. ASSA-CSSA-SSSA, Madison, WI. pp: 201-246.*
- Ranilla, M. J., M. L. Tejido, L. A. Giraldo, J. M. Tricárico, y M. D. Carro. 2008. Effects of an exogenous fibrolytic enzyme preparation on *in vitro* ruminal fermentation of three forages and their isolated cell walls. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 145:109-121.
- Redondo, P. 2004. Mapeo de los genes *dyp* y *Mn-162* y del fragmento que contiene los genes ligados porfobilinógeno deaminasa y fosfatidilserina decarboxilasa del basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* var. Florida. Tesis. Universidad Pública de Navarra.
- Reeves, J. B. III. 1987. Lignin and fiber compositional changes in forages over a growing-season and their effects on *in vitro* digestibility. *J. Dairy Sci.* 70: 1583-1594.
- Reyes, M. L., H. O. Rubio, L. F. Peña, G. Tirado, E. Esparza, A. López, E. Ballín y A. Rivera. 1997. Evaluación socioeconómica y técnica de los sistemas ganaderos de carne de bovino en cuatro estados del centro de México. En: IV Simposio Estatal La Investigación y Desarrollo Tecnológico en Aguascalientes (resúmenes). CONACyT, Aguascalientes, Ags. 145 p.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Riquelme, V. E. 1984. Suplementación y efectos asociativos en dietas basadas en subproductos agrícolas. En: González, S. y M. Cuca (eds.). Utilización de Subproductos Agroindustriales en la Alimentación de Rumiantes. Centro de Ganadería, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Edo. de México. pp. 1-24.
- Rode, L. M., W. Z. Yang, y K.A. Beauchemin. 1999. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 82:2121-2126.
- Rodgers, M., Z. Hu y X. Zhan. 2009. Enhancing enzymatic hydrolysis of maize stover by Bayer process. *Energy and Fuels* 23:2284-2289.
- Rupíérrez-Hernández, F., J. Madrid S., M. A. Pulgar G. y J. M. Cid D. 1994. Valor nutritivo de la paja de cebada tratada con álcalis en la especie caprina. *Arch. Zootec.* 43: 259-271.
- Satter, L. D. y L. L. Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein productions *in vitro*. *British J. Nutr.* 32: 194-208.
- Schofield, P., R. E. Pitt y A.N. Pell. 1994. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *J. Anim. Sci.* 72: 2980-2991.
- Sims, L. E., N. A. Pyatt, P. H. Doane y S. S. J. Block. 2008. Comparision of *in vitro*, *in situ*, and *in vivo* methodologies to assess nutrient digestibility in ruminants. *J. Anim. Sci.* 86 (E-Suppl. 2/J): 82, 83.
- Soto-Camargo, R. y R. D. Martínez R. 2001. Utilización de bloques de melaza y urea en la engorda intensiva de becerros criollos. *Arch. Latioam. Prod. Anim.* 9(2): 99-103.
- Souza, M. A., V. P. Figueiredo, B. T. Teresinha, P. I. Nunes, C. R. Carrillo y M. C. Setti. 2006a. Tasa de paso y parámetros ruminales en bovinos suplementados con enzimas fibrolíticas. *R. Bras. Zootec.* 35(3): 1186-1193.

- Souza, M. A., V. P. Figueiredo, B. T. Teresinha, P. I. Nunes y J. L. Moletta. 2006b. Consumo y digestibilidad aparente total en bovinos suplementados con enzimas fibrolíticas. *R. Bras. Zootec.* 35(5): 2118-2124.
- Souza, M. A., V. P. Figueiredo, B. T. Teresinha, P. I. Nunes y G. J. Soares. 2006c. Eficiencia de síntesis microbiana y actividad enzimática en bovinos sometidos a suplementación con enzimas fibrolíticas. *R. Bras. Zootec.* 35(3): 1194-1200.
- Statistical Analysis System Institute, Inc. 2002. SAS user's guide: Statistics, Version 2a edition. Cary, NC.
- Steel, G. D .R. y J. H. Torrie. 1988. Bioestadística: Principios y Procedimientos. Segunda Edición (Primera en Español). McGraw-Hill Interamericana de México, S. A. de C. V. 622 p.
- Stendal, C, M. D. Casler y G. Jung. 2006. Marker-assisted selection for neutral detergent fiber in smooth bromegrass. *Crop Sci.* 46:303-311.
- Stokes, M. R. 1987. The effect a commercial enzymes mixture on rumen degradation of grass-legume silage. *Nutr. Rep. Int.* 36:919.
- Sundstol, F. 1991. Large scale utilization of straw for ruminant production systems. *In:* Ho, Y. W., H. K. Wong, N. Abdulah and Z. A. Tajuddin (eds.) Recent Advances on the Nutrition of Herbivores. Malaysian. Soc. Prod. Kuala Lumpur.
- Tang, S. X., Tayo, G. O., Tan, Z. L., Sun, Z. H., Shen, L. X., Zhou, C. S., Xiao, W. J., Ren, G. P., Han, X. F., Shen, S. B., 2008. Effects of yeast culture and fibrolytic enzymes supplementation on in vitro. *J. Anim. Sci.* 86:1164-1172.
- Theodorou, M. K., R. S. Lowman, Z. S. Davies, D. Cuddeford y E. Owen. 1998. Principles of techniques that rely on gas measurement in ruminant nutrition. In British Society of Animal Science. Occasional Publication N°. 22.

- Thorvaldsson, G. 1992. The effects of temperature on digestibility of timothy (*Phleum pretense* L.) tested in growth chambers. Grass Forage Sci. 47:306-308.
- Tilley, J. M. A. y R. A. Terry. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. J. Brit. Gras. Soc. 18: 104-111.
- Tirado, E. G., R. Larios, A. González, J. Ruiz, E. Rodríguez. 1999. Rendimiento de proteína cruda en cuatro especies de pasto durante dos épocas del año. VI Simposio Estatal de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Memoria. Aguascalientes, México. p. 28.
- Tirado, E. G., I. Mejía H., C. R. Cruz V., G. D. Mendoza M., I. Tovar L. y J. Fajardo P. 2004. Effects of exogenous enzymes on fiber degradation of corn stalks. J. Anim. Sci. Vol. 79, Suppl.1 /J. Dairy Sci. Vol. 84, Suppl. 1 /54th Annu. Rec. Meat Conf., Vol. II (Abstract 1165).
- Treacher, R. T., A. McAllister, J. D. Propp, Z. Mir, P. Mir y K. J. Cheng. 1996. Effect of exogenous cellulases and xylanases on feed utilization and growth performance of feedlot steers. Can. J. Anim. Sci. 78:542.
- Tricarico, J. M., K. A. Dawson y K. E. Newman. 1998. Effects of an exogenous microbial enzyme (Fibrozyme) on ruminal digestion of fescue hay. J. Anim. Sci. 76 (Suppl. 1): 289.
- Tricarico, J. M. y K. A. Dawson. 2005. Influence of supplemental endoglucanase or xylanase on volatile fatty acid production from ruminant feed by ruminal *in vitro* cultures. Arch. Anim. Nutr. 59(5): 325-334.
- Valdéz, O. A. y G. Núñez. 1984. El uso de esquilmos agrícolas para la alimentación animal en la zona centro de México. En: González, S. y M. Cuca (eds.). Utilización de Subproductos Agroindustriales en la Alimentación de Rumiantes. Centro de Ganadería, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Edo. de México. pp. 89-98.

- Van Soest, P. J. 1964. Symposium on nutrition and forage and pastures: New chemical procedures for evaluation of forages. J. Anim. Sci. 26: 838-845.
- Van Soest, P. J. 1982. Nutritional Ecology of the Ruminant. O and Brooks, Inc., Corvallis, OR. 374 p.
- Van Soest, P.J. y J.B. Robertson. 1985. Analysis of forrage and fibrous foods. Cornell University. Ithaca, N. Y. USA. 164 p.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson y B. A. Lewis. 1991 Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74: 3583-3592.
- Van Soest, P. J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant (second edition). Cornell University Press, Ithaca. p. 119.
- Vargas-Villamil, L., E. Ávila-Vales, F. Vargas-Villamil y S. Medina-Peralta. 2005. Evaluación de la relación entre experimentos *in vitro* e *in situ* mediante un modelo dinámico mecanístico. Tec. Pec. Méx 43(3):387-398.
- Vilches, P. L. 2002. Determinación de la actividad de endoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Haraz. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. Depto. Acad. de Microbiología y Parasitología. Tesis. 77 p.
- Villanueva, C. Z. 1998. Caracterización nutritiva de los ingredientes alimenticios utilizada en la ganadería tamaulipeca. *In*: IX Congreso Nacional de Investigación y Desarrollo Tecnológico Agropecuario. SEP-SEIT-DGETA, Mérida, Yucatán, México. p. 212.
- Wang, Y., McAllister, T. A., Rode, L. M., Beauchemin, K. A., Morgavi, D. P., Nsereko, V. L., Iwaasa, A. D. and W. Z. Yang. 2001. Effects of an exogenous enzyme preparation on microbial protein synthesis, enzyme activity and attachment to feed in the rumen simulation technique (Rusitec.). Brit. J. Nutr. 85: 325-332.

- Wang, Y., B. M. Spralting, D. R. Zobell, R. D. Wiedmeier y T. A. McAllister. (2004). Effect of alkali pretreatment of wheat straw on the efficacy of exogenous fibrolytic enzymes. *J. Anim. Sci.* 82(1): 198-208.
- Weding, C. L., E. H. Jaster y K. J. Moore. 1989. Disappearance of hemicellulosic monosaccharides and alkali-soluble phenolic compounds of normal and brown midrib sorghum x sudangrass silages fed to heifers and sheep. *J. Dairy Sci.* 72:104-111.
- White, B. A., R. I. Mackie y K. C. Doerner. 1993. Enzymatic hydrolysis of forage cell walls. *In: Jung, G. D., R. Bustin, R. D. Hatfield and J. Ralph. (eds.) Forage cell wall structure and digestibility. ASSA-CSSA-SSSA, Madison, WI. pp: 455-484.*
- Williams, B. A. 2000. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. *In: Givens D. I., Owen E., Omed H. M. y Axford R. F. E. (editors). Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. Wallingford (UK). CAB International. 475 p.*
- Wilson, J. R. y D. J. Minson. 1980. Prospects for improving the digestibility and intake of tropical grasses. *Trop. Grassl.* 14:253-257.
- Wilson, J. R., B. Deinum y F. M. Engels. 1991. Temperature effects on anatomy and digestibility of leaf and stem of tropical and temperate forage species. *Neth. J. Agric. Sci.* 39:31-48.
- Windham, W. R., F. E. Barton y D. S. Himmelsbach. 1983. High pressure liquid chromatographic analysis of component sugars in neutral detergent fiber for representative warm-and cool-season grasses. *J. Agric. Food Chem.* 31:471-475.
- Wolin, M. J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *Journal of. Dairy Science.* 43: 1452-1459.
- Yang, W. Z., K. A. Beauchemin y D. D. Vedres. 2003. Effects of ruminal pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and ruminal fermentation during continuous culture. *J. Anim. Sci. Vol. 80, Suppl. 1/J. Dairy Sci. Vol. 85, Suppl. 1: 356.*

Yang, W.Z., K. A. Beauchemin y D. D. Vedres. 2002. Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and fermentation in continuous culture. *Anim. Feed Sci. And Technol.* 102(1-4): 137-151.

Yescas, Y. R., R. Bárcena G., G. D. Mendoza M., S. S. González M., M. Cobos P. y M. E. Ortega C. 2004. Digestibilidad *in situ* de dietas con rastrojo de maíz o paja de avena con enzimas fibrolíticas. *Agrociencia* 38(1): 23-31.

Yu P., McKinnon J. J. y D. A. Christensen. 2005. Improving the nutritional value of oat hulls for ruminant animals with pretreatment of multienzyme cocktail: *In vitro* studies. *J. Anim. Sci.* 83:1133-1141.

Zinn, R. A. y J. Salinas. 1998. Influence of Fibrozyme on digestive function and growth performance of feedlot fed a 78% concentrate growing diet. In: *Fibrozyme: La Primera Enzima Encapsulada para Rumiantes*. Alltech, Inc. pp: 8-10.

11. APÉNDICE

Cuadro 1 A. Soluciones base de la técnica de gas *in vitro*

Carbonato de sodio	Solución mineral I	Solución mineral II	Solución de resazurina.	Solución reductora
8 g de Na ₂ CO ₃ Aforar a 100 mL con agua destilada	6.0 g de K ₂ HPO ₄ y aforar a 1000 mL con agua destilada	6.0 g de KH ₂ PO ₄ . 6.0 g de (NH ₄) ₂ SO ₄ . 12.0 g de NaCl. 2.45 g de MgSO ₄ . 1.0 g de CaCl ₂ ·H ₂ O. Aforar a 1000 mL con agua destilada.	1 g en 100 mL forados con H ₂ O	50 mL de agua destilada 2 mL de NaOH 1 N 0.5 g de Na ₂ S 0.5 g de cisteína 1 gota de solución de resazurina 1%



Se utilizó un manómetro de presión adaptado con aguja hipodérmica y válvula de paso de control manual. Se registró el valor de presión de cada uno de los 72 frascos en la escala de kg/cm².



Tiempos de medición de producción de gas (horas) durante la incubación *in vitro*.



Figura 2 A. procedimiento para la toma lecturas de producción de gas y cronograma de medición.

Cuadro 2 A. Ejemplo ilustrativo de programación SAS para la estimación de Vmax, S y FL

```

Data A;
Input Sust Rep T Vol;
Cards
Sust      Rep      T      Vol
1         1         0      0,000
1         1         1      23,781
1         1         2      50,536
1         1         4      69,359
1         1         6      89,338
1         1         8      107,003
1         1        10      121,032
1         1        14      140,681
1         1        18      157,024
1         1        24      169,896
1         1        30      177,975
1         1        36      177,975
1         1        42      185,063
1         1        48      189,175
1         1        54      195,270
1         1        66      202,358
1         1        78      209,445
1         1        90      214,880
1         1       102      220,314
1         1       114      222,773
1         1       126      225,894
1         1       138      227,362
**         **         ***         ****
**         **         ***         ****
**         **         ***         ****
4,000     4,000     90,000     212,465
4,000     4,000    102,000     213,933
4,000     4,000    114,000     216,411
4,000     4,000    126,000     218,553
4,000     4,000    138,000     221,031
proc sort; by Sust Rep;
proc nlin best=3 data=A; by Sut Rep;
parms v=20 to 320 by 50 s=-0.05 to 0.05 by .01 L=-.1 to 2.5 by 0.3;
model Vol=v/(1+exp(2-4*s*(T-L)));

```

Cortesía: Dr. Luis A. Miranda R. (Laboratorio de Microbiología Ruminal, Depto de Zootecnia, UACH, Mex.)

Cuadro 3 A. Distribución de tratamientos por vaca y tiempo de incubación *in situ*.

TRATAMIENTO	24 h				TRATAMIENTO	48 h			
	VACA1		VACA2			VACA1		VACA2	
T1	1	2	3	4	T1	5	6	7	8
T2	17	18	19	20	T2	21	22	23	24
10	33	34	35	36	10	37	38	39	40
11	49	50	51	52	11	53	54	55	56
12	65	66	67	68	12	69	70	71	72
13	81	82	83	84	13	85	86	87	88
14	97	98	99	100	14	101	102	103	104
15	113	114	115	116	15	117	118	119	120
16	129	130	131	132	16	133	134	135	136
17	145	146	147	148	17	149	150	151	152

TRATAMIENTO	72 h				TRATAMIENTO	96 h			
	VACA1		VACA2			VACA1		VACA2	
T1	9	10	11	12	T1	13	14	15	16
T2	25	26	27	28	T2	29	30	31	32
10	41	42	43	44	10	45	46	47	48
11	57	58	59	60	11	61	62	63	64
12	73	74	75	76	12	77	78	79	80
13	89	90	91	92	13	93	94	95	96
14	105	106	107	108	14	109	110	111	112
15	121	122	123	124	15	125	126	127	128
16	137	138	139	140	16	141	142	143	144
17	153	154	155	156	17	157	158	159	160

Nota: se consideraron dos subrepeticiones por tratamiento en cada vaca fistulada y para cada tiempo de incubación *in situ*.

Cuadro 4 A. Composición de las dietas experimentales para la etapa *in vivo*.

	Enzimas y aditivos químicos (g/kg MS)						
	Control	Fibrozyme			Promote		
	To (0 g)	F (1.5 g)	C (15 g)	C+U (7.5 g c/u)	P (0.2 g)	Cal (15 g)	C+U (7.5 g c/u)
Ingredientes, % MS							
R. de Maíz	56.3	56.3	56.25	56.3	56.3	56.25	56.3
Melaza	6.5	6.5	5.4	7.4	6.5	5.4	7.54
Sorgo	17.6	17.6	17.5	18.6	17.6	17.5	18.6
H. de soya	13.0	12.85	13.2	10.2	13	13.2	10.85
Aminosoy	6.6	6.6	6.0	5.85	6.6	6.13	5.84
Enzima		0.15	0.15	0.15	0.02	0.02	0.02
Aditivo químico			1.5	0.75		1.5	0.75
				0.75			0.75
Agua (L)	14.3	14.3	13.5	18.5	14.3	13.5	18.8
Composición química							
Materia seca, %*	90.5	90.7	91	90.5	90.5	90.8	89.8
Proteína cruda,% MS	13.5	13.4	13.2	14.1	13.5	13.3	14.3
EM Mcal/kg MS	2.3	2.3	2.25	2.25	2.3	2.26	2.27
FDN, % MS	44.6	44.6	44.5	44.3	44.6	44.5	44.4
FDA, % MS	26.4	26.4	26.4	26.2	26.4	26.4	26.2
Ash, % MS	6.40	6.37	6.22	6.27	6.38	6.23	6.33

*Estimada a partir de la dieta total con tres replicas/dieta, restando el agua añadida.

Nota1. Se mezclaron juntos los tratamientos con enzimas (sin químicos) y el testigo. Además las cantidades se ajustaron por semana a un consumo del 4% de peso vivo de cada borrego.

Nota 2. La proporción de agua en la melaza se mantuvo en 1:2.2 melaza:agua (v/v para testigo y sin químicos); 1:2.5 melaza:agua (v/v para tratamientos con cal y cal+urea).

Cuadro 5 A. Comparación de medias para digestibilidad de la materia orgánica.

Trat	24 h	Trat	40 h	Trat	48 h
F0+U	70.5 a	F0+C	83.8 a	F0+C	88.7 a
F0+C	70.2 a	F0+U	83.3 a	F0+U	87.9 a
F24+C+U	69.9 ab	F0+C+U	82.8 ab	F0+C+U	87.5 ab
F0+C+U	69.6 ab	P0+U	82.0 abc	P0+U	87.2 ab
P24	69.5 ab	F24+U	80.1 bcd	P0+C	84.8 bc
F24	69.4 ab	P24	79.9 bcd	F24+U	83.9 cd
F24+U	69.3 ab	P0+C	79.6 cd	P24	83.8 cd
P0+U	68.0 abc	F24	70.6 cd	F24	83.5 cd
P24+C+U	67.8 abc	F24+C+U	79.5 cd	P0	83.4 cd
T0	67.7 abc	P24+C+U	78.3 de	P0+C+U	83.3 cd
F24+C	67.7 abc	P0	78.2 de	F24+C+U	82.8 cd
P24+C	67.0 bcd	P0+C+U	78.2 de	F0	82.4 cde
P24+U	65.9 cde	T0	77.8 de	P24+C+U	81.9 cde
P0+C	65.3 cde	F24+C	77.5 de	T0	81.6 de
P0+C+U	64.1 de	P24+C	77.5 de	F24+C	81.2 de
P0	64.0 e	F0	77.2 de	P24+C	81.0 de
F0	63.1 e	P24+U	76.1 e	P24+U	79.7 e
Trat	60 h	Trat	72 h		
F0+C	92.4 a	F0+C	94.8 a		
F0+U	91.4 ab	F0+U	93.4 ab		
P0+U	91.2 ab	P0+U	93.7 ab		
F0+C+U	91.0 ab	F0+C+U	93.1 ab		
P0+C	89.0 bc	P0+C	91.7 bc		
P0	87.4 cd	P0	89.9 cd		
P0+C+U	87.3 cd	F0	89.8 cd		
F24+U	86.8 cde	P0+C+U	89.7 cd		
P24	86.8 cde	F24+U	88.6 de		
F24	86.6 cdef	P24	88.6 de		
F0	86.3 cdef	F24	88.5 de		
F24+C+U	85.7 def	F24+C+U	87.3 def		
P24+C+U	84.6 defg	T0	86.3 efg		
T0	84.1 defg	F24+C+U	86.1 efg		
F24+C	83.6 efg	F24+C	85.8 efg		
P24+C	83.6 fg	P24+C	85.1 g		
P24+U	82.5 g	P24+U	84.1 g		

Literales diferentes entre hileras difieren estadísticamente (Tukey=0.05)

Cuadro 6 A. Comparación de medias para digestibilidad fraccional de la MO (DMO/t).

Trat	24 h	Trat	40 h	Trat	48 h
F0+U	0.93 a	P0+U	0.58 a	P0+U	0.45 a
P0+U	0.93 a	F0+U	0.56 b	F0+U	0.44 ab
F0+C+U	0.92 a	P0+C+U	0.56 b	P0+C+U	0.44 ab
F0+C	0.90 b	P0	0.56 b	F24+U	0.43 bc
P0+C+U	0.90 b	F0+C+U	0.55 bc	F0+C	0.43 bc
P24+U	0.89 bc	P0+C	0.55 bc	F0+C+U	0.43 bc
P24+C+U	0.89 bc	F0	0.55 bc	P0+C+U	0.43 bc
P0+C	0.88 cd	F24+U	0.54 bc	F0	0.43 bc
P0	0.88 cd	F0+C	0.54 cd	P0	0.43 bc
F24+C+U	0.87 de	P24+U	0.53 de	P24+U	0.42 cd
P24+U	0.87 de	F24+C+U	0.52 ef	F24	0.41 d
P24+C	0.87 de	F24	0.51 f	F24+C	0.41 d
F0	0.86 ef	F24+C	0.51 f	P24	0.41 d
P24	0.85 fg	P24	0.51 f	P24+C+U	0.41 d
F24	0.85 fg	P24+C	0.51 f	T0	0.41 d
F24+C	0.84 g	P24+C+U	0.51 f	F24+C	0.40 e
T0	0.84 g	T0	0.51 f	P24+C	0.40 e
Trat	60 h	Trat	72 h		
P0+U	0.35 a	P0+U	0.27 a		
F0+U	0.34 ab	F24+U	0.26 ab		
P0+C+U	0.34 ab	P24+U	0.26 ab		
F24+U	0.33 bc	F0+U	0.26 ab		
F0+C	0.33 bc	F0+C+U	0.26 ab		
F0+C+U	0.33 bc	P0+C	0.26 ab		
P0+C	0.33 bc	P0+C+U	0.26 ab		
F0	0.33 bc	P0	0.26 ab		
P0	0.33 bc	F24	0.25 bc		
F24	0.32 cd	F24+C+U	0.25 bc		
F24+C+U	0.32 cd	P24	0.25 bc		
F24+U	0.32 cd	P24+C+U	0.25 bc		
F24+C	0.31 de	F0+C	0.25 bc		
P24	0.31 de	F0	0.25 bc		
P24+C+U	0.31 de	T0	0.25 bc		
T0	0.31 de	F24+C	0.24 c		
P24+C	0.30 e	P24+C	0.24 c		

Literales diferentes entre hileras difieren estadísticamente (Tukey=0.05)

Cuadro 7 A. Principales correlaciones derivadas de datos de incubaciones *in vitro* con dos repeticiones en tiempo, a 96 h.

	MSR	MSD	FDNr	DV	AM	EM 48h	ENL48	DMO %		VG mL/g		AA %			AP %		
	%	%	%	%	mg	MJ	MJ	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h
MSR %	1	-1.00	-0.32	-0.97	0.80	-0.37	-0.35	-0.57	-0.67	-0.72	-0.84	0.78	-0.49	0.89	-0.80	0.14	-0.88
		0.0001	0.0733	0.0001	0.0001	0.0354	0.0498	0.0006	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.004	0.0001	0.0001	0.4358	0.0001
MSD %		1	0.32	0.97	-0.80	0.37	0.35	0.57	0.67	0.72	0.84	-0.78	0.49	-0.89	0.80	-0.14	0.88
			0.0733	0.0001	0.0001	0.0354	0.0498	0.0006	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.004	0.0001	0.0001	0.4358	0.0001
FDN %			1	0.09	-0.82	0.11	0.08	0.08	0.08	0.40	0.12	-0.55	0.29	-0.46	0.58	-0.29	0.45
				0.6208	0.0001	0.5486	0.646	0.6649	0.6645	0.025	0.5279	0.001	0.1055	0.0088	0.0005	0.1016	0.0096
DV %				1	-0.63	0.37	0.35	0.58	0.68	0.66	0.86	-0.68	0.44	-0.82	0.69	-0.07	0.80
					0.0001	0.0372	0.0503	0.0005	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0108	0.0001	0.0001	0.7122	0.0001
AM mg					1	-0.28	-0.25	-0.38	-0.44	-0.68	-0.57	0.83	-0.48	0.83	-0.87	0.29	-0.83
						0.1232	0.1597	0.0296	0.0114	0.0001	0.0007	0.0001	0.005	0.0001	0.0001	0.1035	0.0001
EM 48 MJ						1	0.99	0.81	0.80	0.69	0.51	-0.26	0.30	-0.21	0.19	-0.06	0.17
							0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0028	0.1536	0.0912	0.257	0.2978	0.7566	0.3457
ENL 48 MJ							1.00	0.78	0.77	0.69	0.51	-0.25	0.30	-0.20	0.19	-0.08	0.17
								0.0001	0.0001	0.0001	0.0029	0.1602	0.0961	0.2698	0.3008	0.6753	0.3513
DMO% 24 h								1	0.99	0.70	0.58	-0.30	0.30	-0.36	0.28	-0.04	0.34
									0.0001	0.0001	0.0005	0.0937	0.1004	0.0446	0.125	0.834	0.058
DMO% 48 h									1	0.73	0.70	-0.40	0.33	-0.47	0.37	-0.02	0.45
										0.0001	0.0001	0.0233	0.0664	0.007	0.0372	0.9047	0.0104
VG mL 24 h										1	0.59	-0.60	0.66	-0.63	0.64	-0.36	0.65
											0.0004	0.0003	0.0001	0.0001	0.0001	0.0457	0.0001
VG mL 48 h											1	-0.71	0.27	-0.78	0.66	0.11	0.75
												0.0001	0.1284	0.0001	0.0001	0.5417	0.0001
AA% 24 h												1	-0.36	0.91	-0.97	0.09	-0.91
													0.0434	0.0001	0.0001	0.6076	0.0001
AA% 36 h													1	-0.41	0.42	-0.73	0.46
														0.0192	0.016	0.0001	0.0088
AA% 48 h														1	-0.93	0.06	-0.99
															0.0001	0.7274	0.0001
AP% 24 h															1	-0.20	0.94
																0.2624	0.0001
AP% 36 h																1	-0.13
																	0.4785

Cuadro 8 A. Principales correlaciones derivadas de datos de incubaciones *in vitro* con dos repeticiones en tiempo, a 96 h.

	AC. BUTÍRICO (AB) %			AGVt mmol/L			N-NH ₃ g/dL			CO ₂ (moles)			NH ₄ (moles)			MM mg
	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h	
MSR %	0.06	0.59	0.14	0.66	-0.13	0.84	-0.02	-0.84	0.12	0.65	-0.47	-0.28	-0.29	0.11	0.09	-0.74
	0.7533	0.0004	0.461	0.0001	0.4781	0.0001	0.8926	0.0001	0.5054	0.0001	0.0069	0.1174	0.1082	0.557	0.618	0.0001
MSD %	-0.06	-0.59	-0.14	-0.66	0.13	-0.84	0.02	0.84	-0.12	-0.65	0.47	0.28	0.29	-0.11	-0.09	0.74
	0.7533	0.0004	0.461	0.0001	0.4781	0.0001	0.8926	0.0001	0.5054	0.0001	0.0069	0.1174	0.1082	0.557	0.618	0.0001
FDNr %	-0.11	-0.15	-0.07	-0.55	-0.47	-0.38	0.01	0.28	0.10	-0.16	0.32	0.14	-0.06	0.09	0.09	0.22
	0.5353	0.4284	0.6854	0.0012	0.0068	0.0333	0.9725	0.119	0.5942	0.3938	0.077	0.4564	0.7466	0.611	0.616	0.2252
DV %	-0.02	-0.58	-0.11	-0.54	0.27	-0.78	0.02	0.81	-0.16	-0.64	0.41	0.27	0.32	-0.14	-0.12	0.73
	0.9126	0.0005	0.5644	0.0013	0.1421	0.0001	0.9009	0.0001	0.3868	0.0001	0.0205	0.1394	0.0712	0.4393	0.498	0.0001
AM mg	0.14	0.43	0.17	0.78	0.25	0.78	-0.02	-0.69	0.00	0.48	-0.49	-0.24	-0.12	-0.01	-0.02	-0.58
	0.4541	0.0147	0.3466	0.0001	0.1694	0.0001	0.901	0.0001	0.986	0.0051	0.0044	0.1803	0.4998	0.9662	0.927	0.0005
EM MJ	0.30	-0.39	0.18	-0.18	-0.08	-0.15	-0.12	0.18	0.02	-0.22	0.23	0.12	0.04	0.04	0.06	0.70
48 h	0.0929	0.028	0.3329	0.3356	0.6485	0.427	0.5175	0.3177	0.9061	0.2313	0.1957	0.4992	0.8103	0.8348	0.745	0.0001
ENL MJ	0.29	-0.36	0.16	-0.19	-0.11	0.01	-0.17	-0.04	0.41	0.22	0.17	-0.19	0.29	0.09	0.31	0.68
48 h	0.1074	0.041	0.3949	0.2975	0.5626	0.9547	0.3443	0.8452	0.0205	0.2353	0.339	0.291	0.1123	0.6408	0.087	0.0001
DMO %	0.12	-0.39	0.04	-0.22	0.08	-0.32	0.04	0.34	-0.03	-0.37	0.27	0.15	0.15	-0.02	0.00	0.84
24 h	0.5293	0.0255	0.8217	0.2232	0.6825	0.0698	0.8199	0.0584	0.8874	0.0366	0.1297	0.427	0.4266	0.9008	0.99	0.0001
DMO %	0.14	-0.46	0.03	-0.31	0.16	-0.44	0.02	0.45	-0.03	-0.43	0.33	0.16	0.17	-0.02	0.00	0.88
48 h	0.4365	0.0084	0.8798	0.082	0.3949	0.0122	0.9005	0.0099	0.8824	0.013	0.0643	0.3859	0.365	0.9008	0.995	0.0001
VG mL	-0.14	-0.63	-0.28	-0.57	-0.23	-0.59	0.05	0.47	0.07	-0.34	0.48	0.14	0.04	0.10	0.12	0.76
24 h	0.4542	0.0001	0.1214	0.0007	0.2084	0.0004	0.7879	0.007	0.7007	0.0539	0.0058	0.4454	0.8417	0.5918	0.516	0.0001
VG mL	0.24	-0.51	0.05	-0.59	0.37	-0.72	-0.12	0.76	-0.02	-0.52	0.46	0.15	0.17	-0.01	0.01	0.77
48 h	0.1935	0.0031	0.7759	0.0004	0.0375	0.0001	0.4991	0.0001	0.9124	0.0023	0.0077	0.3971	0.3414	0.9763	0.947	0.0001
AA %	-0.15	0.43	0.18	0.82	-0.05	0.84	-0.05	-0.82	0.07	0.57	-0.48	-0.27	-0.21	0.05	0.04	-0.52
24 h	0.4149	0.013	0.3171	0.0001	0.7813	0.0001	0.7932	0.0001	0.6932	0.0006	0.0059	0.1369	0.2471	0.7708	0.81	0.0026
AA %	-0.26	-0.76	-0.38	-0.46	-0.30	-0.48	-0.04	0.21	0.26	-0.13	0.54	-0.15	-0.17	0.28	0.29	0.40
36 h	0.1525	0.0001	0.0319	0.0083	0.0967	0.005	0.8218	0.2461	0.1473	0.4857	0.0016	0.4203	0.3384	0.1236	0.11	0.024
AA %	0.03	0.54	0.16	0.78	-0.15	0.90	-0.12	-0.87	0.08	0.60	-0.47	-0.26	-0.24	0.07	0.06	-0.56
48 h	0.8834	0.0014	0.3966	0.0001	0.3986	0.0001	0.5098	0.0001	0.6607	0.0003	0.0071	0.1534	0.189	0.6835	0.726	0.0008
AP %	-0.08	-0.42	-0.31	-0.85	-0.07	-0.89	0.12	0.80	-0.07	-0.54	0.48	0.28	0.20	-0.04	-0.03	0.49
24 h	0.6539	0.0161	0.0824	0.0001	0.6853	0.0001	0.5134	0.0001	0.7202	0.0013	0.0057	0.1234	0.2847	0.8242	0.865	0.0042
AP %	0.47	0.12	0.45	0.26	0.55	0.25	0.05	0.06	-0.20	-0.14	-0.22	0.15	0.21	-0.22	-0.22	-0.04
36 h	0.0068	0.5231	0.0103	0.1539	0.0011	0.1764	0.7652	0.7341	0.2816	0.4423	0.2212	0.4114	0.2437	0.2313	0.234	0.8393
AP %	-0.11	-0.54	-0.30	-0.81	0.10	-0.93	0.13	0.86	-0.08	-0.60	0.48	0.26	0.24	-0.07	-0.06	0.55
48 h	0.5508	0.0014	0.0931	0.0001	0.569	0.0001	0.4836	0.0001	0.6752	0.0003	0.006	0.1546	0.1877	0.6925	0.734	0.0012

Cuadro 9 A. Correlaciones derivadas de datos de incubaciones *in vitro* con dos repeticiones en tiempo, a 96 h.

	AB %			AGVt mmol/L			N-NH ₃ g/dL			CO ₂ (moles)			CH ₄ (moles)			MM
	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h	mg
AB	1	-0.07	0.55	0.12	0.54	0.16	-0.31	0.11	-0.03	-0.15	0.01	-0.03	0.07	-0.06	-0.06	0.11
% 24h		0.7125	0.0012	0.5005	0.0014	0.3842	0.0884	0.5403	0.8656	0.4168	0.9508	0.8688	0.6861	0.7587	0.7537	0.5355
AB		1	0.13	0.42	-0.09	0.47	0.01	-0.37	-0.20	0.32	-0.57	0.07	0.05	-0.20	-0.21	-0.55
% 36 h			0.4799	0.0158	0.6297	0.0063	0.9644	0.0387	0.2834	0.0741	0.0007	0.6943	0.7718	0.2769	0.2383	0.0013
AB			1	0.36	0.29	0.43	-0.08	-0.14	-0.01	0.17	-0.16	-0.05	-0.06	0.00	0.00	-0.02
% 48h				0.0452	0.1044	0.0151	0.6748	0.4451	0.9769	0.3465	0.379	0.7653	0.7476	0.9887	0.9955	0.8981
AGVt				1	0.10	0.82	0.01	-0.66	0.02	0.45	-0.42	-0.24	-0.14	0.01	0.00	-0.51
mM 24h					0.6045	0.0001	0.9666	0.0001	0.9131	0.0104	0.0171	0.1943	0.4552	0.9489	0.9878	0.0028
AGVt					1	-0.10	-0.06	0.32	-0.18	-0.29	-0.11	0.05	0.27	-0.22	-0.23	0.06
mM 36h						0.5917	0.7265	0.0725	0.3191	0.1015	0.5371	0.7991	0.1423	0.2178	0.2152	0.7522
AGVt						1	-0.08	-0.83	0.01	0.57	-0.49	-0.18	-0.19	0.02	0.02	-0.08
mM 48h							0.6718	0.0001	0.9566	0.0007	0.0041	0.3159	0.3016	0.8929	0.9319	0.675
N-NH₃							1	0.01	-0.05	0.04	-0.06	0.07	0.03	-0.04	-0.04	-0.20
g/dL 24h								0.9628	0.7714	0.8315	0.7458	0.6956	0.8527	0.8279	0.829	0.2729
N-NH₃								1	-0.37	-0.82	0.19	0.50	0.54	-0.39	-0.38	-0.05
g/dL 36h									0.0357	0.0001	0.2955	0.004	0.0014	0.0256	0.0296	0.7941
N-NH₃									1	0.65	0.77	-0.93	-0.96	0.98	0.98	0.72
g/dL 48h										0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
CO₂ 24h										1	0.08	-0.69	-0.82	0.69	0.68	0.40
%											0.6511	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0243
CO₂ 36h											1	-0.62	-0.62	0.77	0.77	0.34
%												0.0002	0.0002	0.0001	0.0001	0.0555
CO₂ 48h												1	0.91	-0.91	-0.90	-0.36
%													0.0001	0.0001	0.0001	0.0435
CH₄ 24h													1	-0.98	-0.97	0.46
%														0.0001	0.0001	0.008
CH₄ 36h														1	1.00	-0.07
%															0.0001	0.7001
CH₄ 48h															1	0.53
%																0.002

Cuadro 10 A. Correlaciones entre indicadores de degradación, patrones de fermentación y variables de comportamiento animal derivados de la etapa *in vivo*.

	%FDA	%LIG	%FDN	%DCI
PINI kg	0.104 0.512	0.072 0.651	-0.003 0.986	0.085 0.593
GP kg	0.163 0.301	0.209 0.184	-0.097 0.542	0.008 0.959
CoA kg	0.18 0.255	0.153 0.334	-0.002 0.992	-0.14 0.376
CA kg	-0.202 0.199	-0.155 0.328	0.141 0.373	-0.137 0.388
PG kg	0.287 0.066	0.214 0.173	-0.113 0.478	-0.036 0.819
PF kg	0.174 0.271	0.18 0.254	-0.074 0.642	0.076 0.630
AA mmol/L	0.176 0.265	0.092 0.560	0.122 0.443	-0.203 0.197
AP mmol/L	0.185 0.240	0.002 0.992	0.26 0.096	-0.338 0.029
AB mmol/L	0.226 0.150	0.118 0.458	0.071 0.653	-0.183 0.246
A:P	-0.055 0.730	0.105 0.506	-0.328 0.034	0.311 0.045
pH	0.136 0.391	0.145 0.360	0.099 0.534	0.175 0.267
AGVt mmol/L	0.196 0.213	0.082 0.606	0.149 0.346	-0.239 0.127
AA %	-0.152 0.337	0.027 0.866	-0.207 0.188	0.296 0.057
AP %	0.025 0.876	-0.153 0.334	0.351 0.023	-0.305 0.049
AB %	0.158 0.317	0.092 0.563	-0.041 0.797	-0.099 0.533
FDA %	1	0.542 0.0002	0.156 0.323	0.001 0.996
LIG %	0.542 0.0002	1	0.055 0.732	-0.012 0.941
FDN %	0.156 0.323	0.055 0.732	1	-0.184 0.243
DCI %	0.001 0.996	-0.012 0.941	-0.184 0.243	1

PINI= peso inicial

Cuadro 11 A. Correlaciones entre ácido acético (AA) y ácido propiónico (AP).

	%AP 24h	%AP 36	%AP 48h
%AA 24h	-0.97 0.0001	0.09 0.608	-0.91 0.0001
%AA 36h	0.42 0.016	-0.73 0.0001	0.46 0.0088
%AA 48h	-0.93 0.0001	0.06 0.727	-0.99 0.0001

Cuadro 12 A. Correlaciones entre AA, AP, EM, CO₂ y CH₄.

	EM kJ/kg MS	AA (24 h)	AA % (36 h)	AA (48 h)	AP (24 h)	AP % (36 h)	AP (48 h)
CO ₂ 24 h	0.20	0.71	-0.70	0.08	0.22	0.52	0.62
	0.3785	0.0003	0.0005	0.7322	0.343	0.0151	0.0028
CO ₂ 36 h	0.70	0.92	-0.87	0.08	0.72	0.94	0.95
	0.0004	0.0001	0.0001	0.74	0.0001	0.0001	0.0001
CO ₂ 48 h	-0.55	-0.99	0.99	0.17	-0.40	-0.78	-0.88
	0.0096	0.0001	0.0001	0.4711	0.071	0.0001	0.0001
CH ₄ 24 h	0.08	0.26	-0.32	-0.11	-0.07	0.13	0.22
	0.7162	0.2595	0.1614	0.6387	0.755	0.561	0.347
CH ₄ 36 h	0.41	0.20	-0.12	0.48	0.47	0.38	0.28
	0.0635	0.393	0.595	0.0289	0.032	0.0926	0.2122
CH ₄ 48 h	0	-0.47	0.49	0.33	-0.11	-0.35	-0.42
	0.4174	0.0335	0.0238	0.1441	0.625	0.124	0.0597

Cuadro 13 A. Correlaciones entre variables evaluadas en la etapa *in vivo*.

	GP	CoA	CA	PG	PF	AA	AP	AB	A:P	pH	AGVt
PINI	0.10	0.29	-0.02	0.16	0.72	0.06	-0.04	0.12	0.15	0.40	0.05
	0.548	0.060	0.923	0.322	0.0001	0.723	0.796	0.454	0.351	0.009	0.755
GP	1	0.69	-0.87	0.92	0.75	0.51	0.34	0.49	0.07	0.13	0.49
		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.026	0.001	0.670	0.424	0.001
CoA		1	-0.31	0.67	0.66	0.46	0.24	0.47	0.26	0.25	0.44
			0.050	0.0001	0.0001	0.002	0.128	0.002	0.090	0.116	0.004
CA			1	-0.80	-0.62	-0.41	-0.33	-0.41	0.06	-0.07	-0.41
				0.0001	0.0001	0.008	0.036	0.007	0.692	0.646	0.007
PG				1	0.73	0.56	0.39	0.54	0.07	0.06	0.55
					0.0001	0.0001	0.0101	0.0002	0.656	0.696	0.0002
PF					1	0.40	0.22	0.43	0.14	0.37	0.39
						0.009	0.157	0.005	0.384	0.016	0.012
AA						1	0.89	0.79	-0.30	-0.13	0.99
							0.0001	0.0001	0.057	0.398	0.0001
AP							1	0.73	-0.68	-0.23	0.93
								0.0001	0.0001	0.146	0.0001
AB								1	-0.31	-0.16	0.85
									0.045	0.316	0.0001
A:P									1	0.27	-0.40
										0.086	0.009
pH										1	-0.17
											0.29

PINI= peso inicial

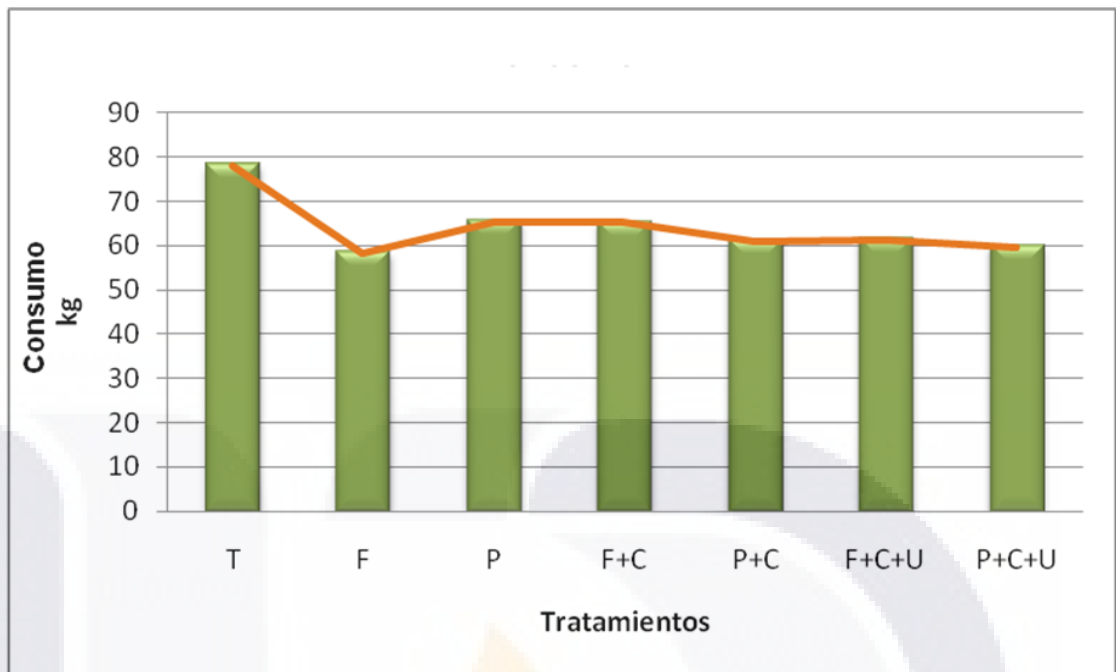


Figura 3 A. Alimento necesario para obtener 10 kg de peso vivo.

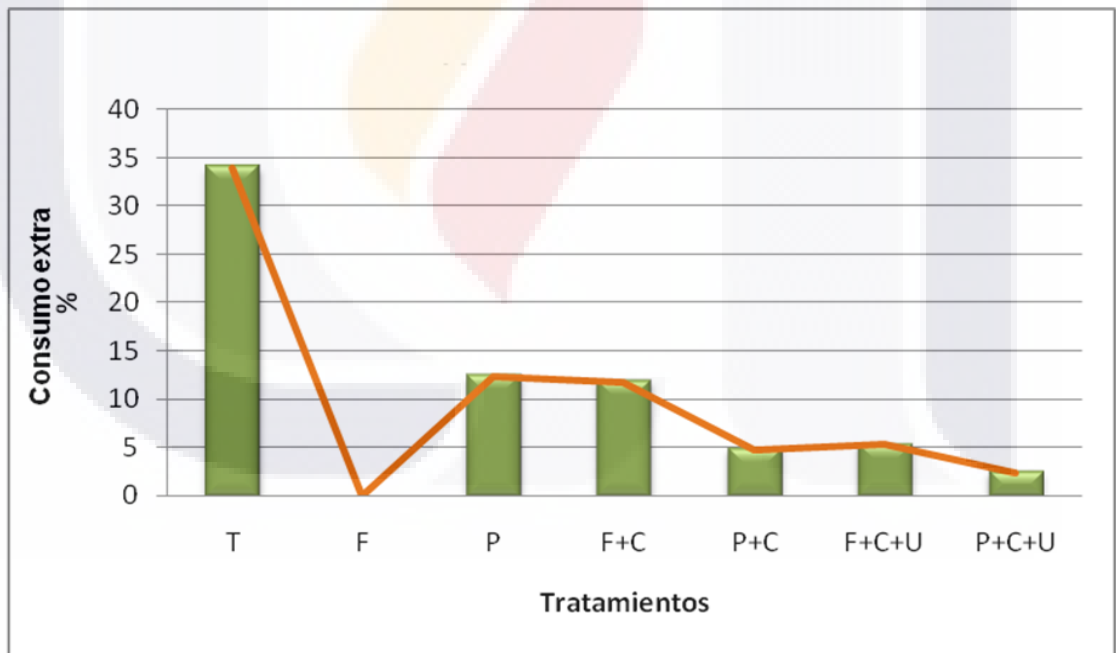


Figura 4 A. Alimento adicional por cada 10 kg de peso vivo a partir del tratamiento que registró un consumo menor (F) tomado como punto cero (F=0).

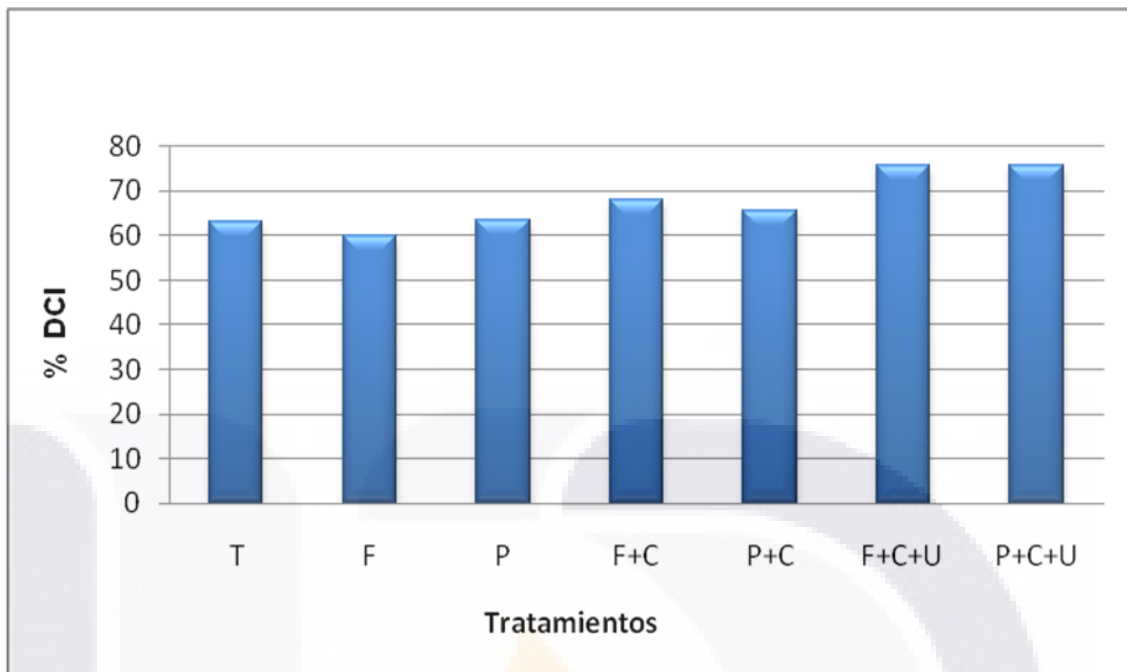


Figura 5 A. Digestibilidad aparente de la materia seca calculada a partir del marcador interno por cenizas insolubles.