



Departament de Ciència Animal i dels Aliments
Universitat Autònoma de Barcelona

**Utilización de enzimas fibrolíticas en cabras lecheras. Evaluación
de su actividad y características fermentativas *in vitro***

*Use of fibrolytic enzymes in dairy goats. In vitro evaluation of
activity and fermentative characteristics*

TESIS DOCTORAL

ELIEL GONZÁLEZ GARCÍA

Barcelona 2004

Departament de Ciència Animal i dels Aliments
Universitat Autònoma de Barcelona

**Utilización de enzimas fibrolíticas en cabras lecheras. Evaluación
de su actividad y características fermentativas *in vitro***

***Use of fibrolytic enzymes in dairy goats. In vitro evaluation of
activity and fermentative characteristics***

Tesis Doctoral presentada por Eliel González García, bajo la dirección de los Doctores Elena Albanell Trullas y Gerardo Caja López, del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona, para optar por el grado de Doctor.

Bellaterra, Barcelona, 21 de Abril de 2004

Vº Bº

Dra. Elena Albanell Trullas

Dr. Gerardo Caja López

DEDICATORIA

A mis padres, cuya capacidad de sacrificio, fuerza de voluntad y sencillez, han constituido motor impulsor en nuestras vidas.

"El asunto es el problema; la forma, la solución."

Christian F. Hebbel (1813-1863);

AGRADECIMIENTOS

El presente documento es el fruto final de un largo trabajo; un largo trabajo producto no del azar, sino de una actividad conciente que comenzó en La Habana en 1991 cuando egresé del ISCAH y decidí meterme en el sacrificado y también privilegiado mundo de la investigación, y que ha pasado por innumerables experiencias en mi país, por ese año inolvidable en Holanda y que finalmente ha tenido la dicha de llegar a su momento cumbre en este punto geográfico; esta tesis más que un resultado científico contiene para mi un valor emocional, pues es el resultado de un esfuerzo sostenido en el sano ánimo de estar en mejores condiciones de aportar.

Resulta entonces literalmente imposible plasmar en un par de cuartillas mi profundo agradecimiento acumulado a lo largo de tanto tiempo y a tantas personas de un extremo a otro del Atlántico; no obstante, porque es deber y porque pienso que lo disfruto, me permito la siguiente síntesis de agradecimientos a todos los que con buena voluntad y disposición han contribuido, en al menos un instante, porque el recorrido hasta aquí haya sido lo más agradable o menos escabroso posible. Mis especiales agradecimientos van entonces:

A la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) por otorgarme la beca de investigación que me dio acceso a este país,

Al Dr. Gerardo Caja, por la aceptación rotunda desde un inicio y por el apoyo sin vacilación en los momentos más cruciales y, sobre todo, por toda la experiencia y enseñanzas transmitidas,

Al Dr. Giraldo Martín, director de la EEPF 'Indio Hatuey', Matanzas, por su imprescindible apoyo y ayuda claves en la decisión y trámites para hacer posible mi viaje desde Cuba y estancia doctoral en España,

A la Dra. Elena Albanell, por la sintonía, ritmo y buen engranaje alcanzados en la etapa final y decisiva del trabajo; por la independencia permitida; por la ayuda aportada,

Al Dr. Ramón Casals, por su esfuerzo en la presentación del proyecto al CICYT que “nos salvó el tema de enzimas”; por su solidaridad y apoyo brindados,

A mis compañeros becarios con quienes, en un objetivo común y una diversidad totalmente lógica, compartí momentos muy alegres y de todo tipo desde el inicio y hasta este final, y que sin dudas nos hicieron crecer como personas. Les estaré siempre agradecido a los que empezamos en el numeroso grupo del 2000, que constituimos compañía (Aina, Gerardo, Ernesto, Toni, Marta Busquet, Marta Hdez, Cristóbal, Ahmed, Moez, Juan, Aixa, etc.) y que en mayor o menor medida, pero todos con su role, me dieron el lujo de disfrutar de su amistad; a los que nos encontramos cuando llegamos (Paul, Silvia, etc.) y nos ayudaron

transmitiéndonos sus vivencias y experiencias; y a los que posteriormente se han incorporado y nos han aportado frescura y riqueza de convivencia (Luciano, Amine, Vanesa, Coni, Elisa, Montse, Ana, Marta Blanch, etc.). Para todos queda garantizado mi recuerdo; las cosas buenas vividas en común (que han sido muchas) las llevaré siempre conmigo, y ojalá quedaran muchas más por compartir, mucha suerte a todos!

A Irene Llach, mi especial agradecimiento por su calidad y sanidad humana, y por su apoyo e inmensa ayuda incondicionales durante la última y decisiva etapa,

Un agradecimiento imprescindible es para Pili; no tengo palabras para ser justo en la dimensión de lo que has contribuido, sencillamente, sin tu inmensa colaboración durante estos años el cumplimiento de este reto hubiera sido una utopía; tu comportamiento como madre lo llevaré siempre conmigo, gracias por siempre!.

Quiero agradecer también a los compañeros de la granja y el laboratorio de análisis químico por todas las experiencias y enseñanzas prácticas aportadas durante el desarrollo de las experiencias que conforman esta tesis y que me hicieron también crecer,

Obvios agradecimientos a mi familia, la 'de la cuna' que no fallará y fuente espiritual de donde bebo; también a la familia paterna extensiva que encontré en la tierra de mi abuelo, por acogerme como lo han hecho,

A los amigos y compañeros de trabajo en Cuba que siempre han confiado en mi; a Maikelis y Gustavo por las divertidas acogidas en Cerdanyola,

A los profesores del Dpto de Ciencia Animal i dels Aliments por su tolerancia y buen trato durante estos años de convivencia,

Als Joan, Félix, Ramón y Marga de SERVEICOLOR por su efectiva y grata colaboración en la preparación de la portada de este material,

A todos, sinceramente un millón de gracias por ayudarme a llegar hasta aquí y sólo espero en un futuro ser digno de lo que han depositado en mí.....

Publicaciones y comunicaciones a las que ha dado origen el presente trabajo de tesis:

- González, E.** 2002. Efectos de la suplementación con enzimas fibrolíticas en cabras lecheras. Treball de Recerca. pp 77.
- González, E.,** Caja, G., Albanell, E., Flores, C., Casals, R., Such, X., Castro, A. Bach, A. and Torres, C. 2002. Effects of fibrolytic enzyme supplementation for dairy goats in mid lactation. J. Dairy Sci. 85-J. Anim. Sci. 80 (Suppl. 1): 355 (Abstr.).
- González, E.,** Albanell, E., Caja, G., Casals, R. 2003. Efectos de pH, temperatura y dosis de inclusión sobre la actividad celulolítica de productos comerciales con enzimas fibrolíticos. Memorias. ITEA, Vol. Extra, 24: 747-749 Zaragoza, mayo, 2003.
- Caja, G., **González, E.,** Flores, C., Carro, M.D., Albanell, E. 2003. Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos. XIX Curso de Especialización “Avances en nutrición y alimentación animal”. Capítulo XIX, p. 183-213. Federación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA), 23-24 octubre 2003, Madrid, España
- Caja, G., **González, E.,** Flores, C., Carro, M.D., Albanell, E. 2003. Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos (I). Producción Animal. Noviembre 2003. Nº. 193. p. 2-8
- Caja, G., **González, E.,** Flores, C., Carro, M.D., Albanell, E. 2003. Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos (II). Producción Animal. Diciembre 2003. Nº. 194. p. 2-24
- González, E.,** G. Caja, E. Albanell, C. Flores, A. Castro, R. Casals, X. Such, and A. Bach. 2004. Adding a Fibrolytic Enzyme Complex to the Concentrate of Lactation Diets. 2. Milking Performances and Digestibility in Dairy Goats. J. Dairy Sci. (Enviado)
- González, E.,** Albanell, E., Caja, G., Casals, R. 2004. Ranges of optimal cellulase activity of commercial fibrolytic enzyme preparations used in ruminant diets. J. Dairy Sci. 87-J. Anim. Sci. 82 (Suppl. 1): (Aceptado) (Abstr.).
- González, E.,** Albanell, E., Caja, G., Casals, R. 2004. Ranges of optimal cellulase activity of commercial fibrolytic enzyme preparations used in ruminant diets. Anim. Feed Sci. Tech. (Enviado).
- González, E.,** Albanell, E., Caja, G., Casals, R. 2004. Forage:concentrate ratio and nature of inoculum affect *in vitro* fermentation of ruminant diets supplemented or not with fibrolytic enzyme. J. Anim. Sci. (Enviado).

Lista de Abreviaturas

μ 12 ó 24: Ritmo fraccional de degradación o fractional degradation rate

μ : overall mean

A: Asymptote or predicted potential gas production

ADF: Acid detergent fiber

ADFD: Acid detergent fibre degradation

AE: Actividad enzimática

AR: Azúcares reductores

b: Rate of fermentation constant (h^{-1})

BCS: Body condition score

BW: Body weight

c: Rate of fermentation constant ($\text{h}^{-1/2}$)

CC: Condición corporal

CEL: Cellupract[®] AL 100

CMC: Carboximetilcelulosa

CON: Control (no enzyme)

CP: Crude protein

d: Día o Day

C: Dairy cow

DF: dilution factor

G: Dairy goat

DM: dry matter

DMD: Dry matter degradation

DMI: Dry matter intake

DMS: Digestibilidad de la material seca

ECM: Energy Corrected Milk

EF: Eficiencia de utilización de alimentos

F:C: Forage:concentrate ratio

FAD: Fibra ácido detergente

FCM: Fat corrected milk

FND: Fibra neutral detergente

g: Grams o gramos

GEF: Gravedad específica funcional

GP: Gas production

h: Hora o Hour
HF: High forage diet
HMF: High moderate forage diet
INRA: Institut National de la Recherche Agronomiques
Kg: Kilograms o kilogramos
L and l: Liter o litro
L: Lag phase or lag time
LF: Low forage diet
LMF: Low moderate forage diet
M: μmol of glucose released
Mcal: Megacalories o megacalorías
mg: milligram
min: Minutes o minutos
ml: mililiter o mililitros
MSI: Materia seca ingerida
NDF: Neutral detergent fibre
NDFD: Neutral detergent fibre degradation
NE_L: Net energy for lactation
NIRS: Near-Infrared Spectroscopy
OM: Organic matter
P: Probability
PNA: Polisacáridos no amiláceos
PRO: PromoteTM
PV: Peso vivo
RT: Total tract retention time
S1GCE: Servei de Granges i Camps Experimentals, UAB, Spain
SEM: Standard Error of the mean
t: incubation time
TMR: Total mixed ration
TR: Turnover rate
VFA: Volatile fatty acid
vs.: Versus

RESUMEN

En una serie de experiencias *in vivo* e *in vitro*, se evaluaron los efectos de la suplementación con enzimas fibrolíticas a la ración de cabras lecheras. En la experiencia de lactación (Exp.1) se estudió, mediante un diseño 'crossover' con 24 cabras Murciano-Granadinas a mediados de lactación y distribuidas en dos tratamientos (Control: sin suplementación, CON, n = 12; y Promote™: suplementadas con enzimas fibrolíticas a 0.47 mL/kg de MS en el concentrado, PRO, n = 12), el comportamiento de los principales indicadores de consumo de alimento (MSI), producción (PL) y composición de la leche (CL), y los cambios en peso vivo (PV) y condición corporal (CC) de los animales. Finalizada la 'Exp.1' (semana 26 de lactación), se seleccionaron y alojaron en jaulas de metabolismo 8 cabras (4 por tratamiento) para medir (semana 27 a 30) la digestibilidad de las raciones en el tracto total, comprobándose a continuación, mediante un ensayo *in vitro*, los efectos de la suplementación sobre la producción de gas (GP), la degradabilidad de la materia seca (DMS) y de la fibra neutro detergente (DFND) de las raciones suministradas *in vivo* (Exp. 2). El potencial de GP, la degradabilidad de los componentes de la pared celular (FND y FAD) y las características fermentativas de un rango de relaciones F:C, con diferentes contenidos en FND y FAD, fueron también estudiados (Exp. 3) con dos fuentes de inóculo (vacas, C; y cabras, G) y diferentes dosis de PRO (0, 1 y 2 mL/kg MS sustrato) mediante la técnica propuesta por Theodorou et al. (1994). La 'Exp. 4' se desarrolló con el objetivo de comprobar, mediante la técnica de los azúcares reductores, el efecto de la variación de un rango de factores abióticos (pH: 4.0, 5.5, 6.5; temperatura: 30, 40, 50 y 70°C; y dosis de adición: 0, 1 y 2 µL/g MS sustrato; y sus interacciones) sobre la actividad celulolítica (AE) de dos productos comerciales (PRO y Cellupract AL-100, CEL). Para el procesamiento y análisis de los datos se utilizaron los procedimientos GLM y PROC MIXED de SAS (v. 8.1).

La MSI, la PL y CL, no se afectaron por la suplementación enzimática, aunque la caseína, el PV y la CC tendieron a disminuir y a aumentar con PRO, respectivamente. La suplementación enzimática aumentó la DMS (CON, 68.9%; PRO, 71.9%), tendió a aumentar la digestibilidad de la materia orgánica (DMO) (CON, 70.4%; PRO, 72.9%), y no afectó la DFND, la DFAD ni la digestibilidad de la PB; el primer ensayo *in vitro*, no pudo confirmar las tendencias obtenidas en las condiciones *in vivo*. La cinética de GP fue afectada por la relación F:C y estuvo positivamente determinada por el nivel de concentrado en la ración y por la naturaleza del inóculo (G > C). La suplementación con enzimas tendió a afectar o afectó positivamente los perfiles de GP real y potencial (A) en las raciones más forrajeras con un incremento promedio acompañado de las constantes de ritmo (a y b) y la disminución promedio del tiempo lag (L). Las degradabilidades de FND y FAD disminuyeron con el aumento de la proporción de concentrado en los sustratos fermentados con inóculo de vaca, mientras que con inóculo de cabras no se afectaron, o incluso se vieron estimuladas. La producción de AGV totales en inóculo de cabras aumentó con el nivel de concentrado en la ración y con la suplementación enzimática, y estuvo relacionada con un incremento del propionato y disminución de la relación acetato:propionato. Se comprobó que la AE de PRO y CEL se comportó ($P < 0.05$) de manera similar cuando las condiciones de pH, temperatura y dosis de aplicación varían. Las máximas AE se obtuvieron para pH 4.0, temperatura 50 °C y la mayor dosis de aplicación (3 µL/g de MS). Se observaron además interacciones significativas entre los factores experimentales estudiados. Las condiciones óptimas obtenidas en la 'Exp. 4' para la expresión de la actividad celulolítica de los productos, así como la carencia de efectos positivos sobre la degradación de los componentes de la pared celular *in vivo* o *in vitro*, o sobre el consumo y comportamiento productivo de las cabras, argumentan el planteamiento de que la efectividad de estos preparados enzimáticos en la nutrición de rumiantes está predeterminada por un conjunto de factores complejos relacionados entre sí que requieren continuar siendo estudiados.

SUMMARY

A sequence of *in vivo* and *in vitro* experiences was carried out in order to evaluate the effects of supplementing dairy goat diets with fibrolytic enzymes. In the lactation experience (Exp.1) the performance of the main figures of feed intake (DMI), milk production (PL) and milk composition (CL), and the change of body weight (BW) and body condition score (BCS) were studied by a 'crossover' experiment design with 24 Murciano-Granadinas dairy goats in mid lactation, randomly allocated in two treatments (Control: unsupplemented, CON, n = 12; and Promote™: supplemented with fibrolytic enzymes at 0.47 mL/kg DM of concentrate, PRO, n = 12). At the end of the lactation trial (wk 26), eight goats (four per treatment) were selected and allocated in metabolic crates in order to measure the total tract digestibility from wk 27 to 30 of lactation; *in vivo* digestibility was tried to support with an *in vitro* assay, determining the effects on gas production profile (GP) and dry matter (DMD) or neutral detergent fiber (NDFD) degradabilities of the same diets offered *in vivo* (Exp. 2). The GP potential, the cell wall components degradability (NDF and ADF) and the fermentative characteristics of an array of diets with four F:C ratios and different NDF and ADF contents, were also studied (Exp.3), with two sources of inoculum (dairy cows, C; and dairy goats, G) and different doses of PRO enzyme preparation (0, 1 and 2 mL/kg of substrate DM) using the cumulative GP technique proposed by Theodorou et al. (1994). The 'Exp. 4' was developed with the aim to check the effect of factor variations (pH: 4.0, 5.5, 6.5; temperature: 30, 40, 50 and 70 °C; and enzyme addition dose: 0, 1 and 2 µL/g of substrate DM; and their interactions), on the cellulase activities (EA) of two liquid commercial products (PRO and Cellupract AL-100, CEL) by mean of the copper reducing sugars (RS) technique. For data analysis and processing, the GLM and PROC MIXED procedures of SAS (v. 8.1) were used.

The DMI, milk yield, 4% fat corrected milk yield, and milk composition were not affected (Exp. 1) by enzyme supplementation, although milk casein content tended to decrease in the enzyme treatment. Body weight change and body condition score change tended to be higher with the enzyme treatment. Digestibilities of DM (CON, 68.9%; PRO, 71.9%) and organic matter (CON, 70.4%; PRO, 72.9%) were higher or tended to be higher, respectively, with enzyme supplementation, while digestibility of N, NDF and acid detergent fiber were not significantly affected with the enzyme addition. Total tract digestibility results could not be supported by the *in vitro* trial on which similar values were observed for DM and NDF degradability and gas production in both diets. The GP kinetics were affected ($P < 0.05$) by F:C ratio and was positive determined by the concentrate level in the diet and by source of inoculum ($G > D$; $P < 0.001$). Enzyme supplementation tended to affect ($P < 0.10$) or positively affected GP profiles determined and predicted (A) in forage diets with the average concomitant increase and decrease of constant rates (a and b) and lag time (L), respectively. The *in vitro* NDFD and ADFD were depressed ($P < 0.05$) by the increase of concentrate level in the TMR substrates fermented with dairy cows inoculum, meanwhile, with dairy goat inoculum, under this conditions, this figures were not affected but even enhanced. Total VFA in G inoculum increased with concentrate level and enzyme supplementation, being related to the increase of propionate and the depression of acetate propionate ratio. The PRO and CEL activity was proved (Exp. 4) to be affected ($P < 0.05$) in similar way with variation of pH, temperature and addition doses. Maximum EA were found for pH 4.0, 50°C and the greatest enzyme dose (3 µL/g of substrate DM). Significant interactions were detected among the studied factors. Optimum conditions for product EA expression, found in 'Exp. 4', as well as the lack of positive effects on *in vivo* or *in vitro* cell wall degradation, DMI and dairy goat productive performance, argue the statements what assure that effectiveness of using fibrolytic enzyme preparations in ruminant nutrition is determined by a whole of related and complex factors, which needs to continue being studied.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: Introducción

1

CAPÍTULO 2: Revisión bibliográfica

3

2.1. La estructura vegetal

4

2.1.1. Los carbohidratos. Clasificación general y estructuras

5

2.1.1.1. Celulosa

8

2.1.1.2. Hemicelulosa

9

2.1.1.3. Pectinas

10

2.1.1.4. Los compuestos fenólicos

10

2.1.1.5. Almidones

11

2.2. El ecosistema ruminal como fuente de enzimas

12

2.2.1. La actividad microbiana y enzimática del rumen

14

2.2.2. La fermentación de los carbohidratos

17

2.3. Estrategias para potenciar la degradación de la pared celular vegetal

18

2.3.1. Uso de enzimas en alimentación animal

20

2.3.1.1. Fuentes de enzimas

21

2.3.1.2. Uso en monogástricos

22

2.3.1.3. Uso en rumiantes. Comportamiento productivo y digestión

25

2.3.1.3.a. *Modo de acción*

27

2.3.1.3.b. *Bovino lechero*

29

2.3.1.3.c. *Bovino de cebo*

37

2.3.1.3.d. *Ovinos y caprinos*

41

2.4. Actividad enzimática de los productos industriales

43

2.4.1. Factores que afectan la efectividad de los productos enzimáticos

46

2.4.2. Actividad celulasa

50

2.4.3. Actividad xilanasas

51

2.5. La técnica de producción de gas *in vitro* para estimar la fermentabilidad de alimentos para rumiantes

51

2.5.1. Efectos de la adición de enzimas fibrolíticas sobre la producción de gas *in vitro* de raciones para rumiantes

53

2.6. Las cabras y su comportamiento alimenticio

55

2.6.1. Aparato digestivo

55

2.6.2. Comportamiento en pastoreo

56

CAPÍTULO 1

Introducción

CAPÍTULO 1: Introducción

El incremento de la contribución de los bienes provenientes del sector ganadero a la cadena de producción de alimentos ha constituido en las últimas décadas, y constituye actualmente, una de las necesidades más urgentes a resolver a escala global.

En este sentido, el aumento de los niveles de producción del ganado rumiante representa una de las principales alternativas a tener en cuenta, si se considera su capacidad para generar productos de alto valor biológico a partir de fuentes de alimento poco o no utilizables por otras especies animales que conforman la base alimentaria y proteica de muchas regiones, culturas y países (Devendra, 2001; FAO, 2003) y la materia prima para la generación de centenares de productos con diversos niveles de sofisticación en las regiones y países más desarrollados (Haenlein, 2001).

En este contexto, y a partir de las propias ventajas de determinadas zonas geográficas, las explotaciones de los sectores ovino y caprino lecheros constituyen relevantes rubros para más de una docena de países, entre los que se incluyen algunas naciones desarrolladas del área mediterránea como Francia, Italia, España y Grecia, que demuestran que estas ganaderías no necesariamente son sinónimo de economías emergentes, y por otra parte también para una mayor cantidad de países de Asia, África y América Latina, donde la explotación de estos rumiantes resulta relevante en términos de tradición religiosa o étnica, y más allá, como base alimentaria.

Desde el punto de vista de la anatomofisiología de los rumiantes, es conocido que estas especies presentan un ecosistema microbiano muy diverso adaptado para la digestión de fuentes de alimentos fibrosos; se considera también que la pared celular de las plantas presenta estructuras complejas no entendidas completamente, y que las propiedades químicas de algunos compuestos de la pared celular vegetal y la matriz tridimensional entrelazada de los polisacáridos, la lignina y los compuestos fenólicos, limitan la digestión de la pared celular por parte de los microorganismos ruminales.

Se han identificado además, tres principales estrategias adaptativas en el ecosistema ruminal para la degradación de la pared celular, las cuales incluyen: la producción de un complejo multienzimático, requerido para la ruptura de numerosos enlaces dentro de la pared celular de las plantas; la adhesión y colonización microbiana a las partículas de los alimentos; y las interacciones sinérgicas entre las especies microbianas.

A pesar de la existencia de estos mecanismos, la digestión de la fibra, que constituye además uno de los principales componentes de las fuentes de alimento más abundantes

para el ganado en muchas partes del mundo, especialmente en los trópicos, se mantiene incompleta; es por ello que durante las últimas décadas se han venido desarrollando un gran número de investigaciones para intentar superar estas limitaciones en la magnitud de la degradación de los compuestos fibrosos en los rumiantes.

Dentro de las razones que explican la digestión incompleta de la fibra a nivel del tracto digestivo de los rumiantes se incluyen, la combinación de barreras bioquímicas y físicas presentes en los sustratos ingeridos y los límites en el tiempo de retención en el rumen de las sustancias ingeridas (Wang y McAllister, 2002). Además, los alimentos consumidos por los rumiantes no sólo comprenden los nutrientes requeridos por el animal, sino también algunos compuestos naturales secundarios tales como los polifenoles y las saponinas (McAllister et al., 1993; Wang et al, 2001a, b) y otros compuestos de la pared celular tales como los ácidos fenólicos y las sílices (Bae et al., 1997) que usualmente tienen un efecto negativo sobre la actividad celulolítica. Sin embargo, el mayor obstáculo para una degradación eficiente de la pared celular en el rumen, lo constituyen los cruces entrelazados entre la celulosa, la hemicelulosa, la lignina y otros compuestos que limitan el acceso de las enzimas a los sustratos.

Las enzimas fibrolíticas exógenas han sido ampliamente usadas para mejorar el valor nutritivo de los alimentos para monogástricos; en el ganado rumiante hace más de 40 años (Burroughs et al., 1960; Rovics y Elly, 1962; Rust et al., 1965) se hicieron los primeros intentos sobre el estudio de su efectividad en la suplementación del rebaño, pero no es hasta la última década (Beauchemin et al., 1995, 1999, 2000; Beauchemin y Rode, 1996; Kung et al., 2000; Kung 2001; Yang et al., 2000) que se comienza a investigar con más intensidad en estas tecnologías, fundamentalmente en investigaciones desarrolladas con ganado vacuno de leche y de carne.

Es así que la suplementación con enzimas fibrolíticas exógenas, a pesar de la incertidumbre e inconsistencia de los resultados obtenidos hasta hoy, se presenta actualmente como una de las alternativas tecnológicas capaces de contribuir a estimular los complejos mecanismos de degradación de la pared celular vegetal de los pastos, forrajes, ensilados, pajas de cereales, cereales y otras fuentes de alimentos de uso frecuente en la nutrición de los rumiantes.

CAPÍTULO 2
Revisión Bibliográfica

CAPÍTULO 2: Revisión bibliográfica

La salud humana, la seguridad ambiental y el bienestar animal, son algunos de los temas que más se abordan actualmente en las agendas de los medios informativos y círculos políticos de muchas de las esferas de la actividad humana a nivel internacional, como consecuencia de una creciente preocupación de la población y los consumidores, y como reflejo del incremento acelerado en los procesos de globalización de la cadena alimentaria y de la industria de los alimentos.

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

Los rumiantes “modernos” que han evolucionado en aspectos relacionados con su genética y adaptación ambiental, hacia sistemas de producción más intensivos, han modificado algunos aspectos de su comportamiento en relación a sus ancestros, y un ejemplo de ello lo constituyen las diferencias en sus necesidades y requerimientos nutricionales. En este sentido, existen algunas razones que explican la inclusión en la práctica ganadera de muchos de los aditivos que en la actualidad se están utilizando con relativa frecuencia y normalidad en la alimentación de los rumiantes, entre las que se encuentran (West, 2000):

- La mayor actividad metabólica por animal, que requiere de la suplementación con nutrientes para alcanzar el adecuado balance.
- Los aditivos ayudan a mantener un deseable ambiente ruminal en las raciones con más concentrado y menos forraje. Los altos consumos de alimento y potenciales de producción de leche condicionan la síntesis de compuestos orgánicos por parte de los microorganismos del rumen, cuya actividad poblacional estará muy en dependencia con lo que se le suministre al animal en la ración.

- Ante el considerable empleo de subproductos de bajo o variable valor nutricional, resulta beneficiosa la suplementación estratégica con algunos elementos o nutrientes deficitarios
- Los aditivos son frecuentemente necesarios en momentos fisiológicos y productivos de mayores necesidades nutricionales (gestación, inicios de lactación, animales de alto potencial genético, etc.)
- Algunos aditivos pueden aumentar la inmunidad de los animales y su resistencia por tanto a determinadas enfermedades
- Los aditivos mejoran por lo general las funciones microbianas ruminales y pueden incrementar la digestión de la fibra en este compartimiento, así como la biosíntesis proteica.

2.1. La estructura vegetal

Generalmente se señala a los factores físicos como los que más directamente influyen sobre el volumen inicial ocupado por la ingestión de un alimento y el ritmo mediante el cual ese volumen es disminuido por la digestión y la velocidad de paso de la digesta. La proporción de pared celular fibrosa es uno de los principales factores que determinan este proceso, toda vez que sus estructuras son menos solubles y ocupan más espacio que el contenido celular (Akin, 1989). La pared celular de las plantas consiste principalmente en celulosa (40-45%), hemicelulosa (30-35%) y lignina (20-23%) (Ladisch et al. 1983). Los forrajes contienen una gran proporción de su materia orgánica (MO) (35–80%) en forma de pared celular, lo cual proporciona la integridad estructural de la planta. Los carbohidratos estructurales, principalmente la hemicelulosa, la celulosa y las pectinas, son degradadas por los microorganismos en el rumen, lo cual capacita a los rumiantes para utilizar fuentes de energía que no pueden ser utilizadas eficientemente por los monogástricos.

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

Reid et al. (1988) encontraron un efecto significativo del tipo de fotosíntesis de la especie (C-3 ó C-4) o tipo de forraje (gramínea o leguminosa) en las pendientes e intercepto para las regresiones de la materia seca ingerida (MSI) con relación a la fibra neutro detergente (FND), tanto para ganado vacuno como para ovino, indicando que el efecto de llenado puede variar con los diferentes forrajes. Esto pudiera ser explicado por la distribución de los polisacáridos estructurales. Minson (1990) observó que para grupos de forrajes con similar digestibilidad de la materia seca (DMS), el contenido de fibra sería mayor en leguminosas que en gramíneas, en pastos templados respecto a los tropicales y en las hojas respecto a los tallos.

Wilson y Kennedy (1996) sugirieron que la menor digestibilidad de las gramíneas tropicales con relación a las de clima templado y las leguminosas, refleja la presencia en ellos de una estructura física más rígida y entrelazada. Estos autores también plantean que la mayor digestibilidad de las leguminosas con relación a las gramíneas puede estar relacionada con el tamaño de las hojas.

Las partículas de gramíneas son más largas y con una gravedad específica funcional (GEF) baja, mientras que las partículas de leguminosas al ser masticadas son cortas y de consistencia más “gomosa” con alta GEF y por ello tienden a escapar rápidamente del rumen. De esta manera, el consumo potencial es dependiente no sólo del contenido en fibra de la ración, sino también de la estructura original de la planta y de la vía en la cual se degrada durante la digestión.

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

2.1.1. Los carbohidratos. Clasificación general y estructuras

La reducción de la proporción de forraje en la ración y, por tanto, del contenido en fibra como resultado del empleo de altas proporciones de grano, está estrechamente relacionada

con cambios en las concentraciones de grasa de la leche y con desórdenes metabólicos tales como acidosis, abomaso desplazado, abscesos en el hígado, y un declive general de algunos de los parámetros de la salud (Harris, 2001). El conocimiento de la importancia de una eficiente utilización de estos componentes estructurales de las raciones para rumiantes, constituye entonces uno de los principales factores a tener en cuenta en la implementación de adecuados sistemas de alimentación en cualquier explotación ganadera.

Los hidratos de carbono desempeñan cuatro papeles importantes en los organismos vivientes: 1) como fuente de energía, mediante su combustión, 2) en el aporte de átomos de carbono para la síntesis de otros componentes celulares, 3) constituyen la forma principal de almacenamiento de energía química y 4) son elementos estructurales de las células y los tejidos (Lenhinger, 1985).

En general, de acuerdo con la clasificación de McDonald et al. (2002), los carbohidratos son compuestos químicos neutrales que contienen elementos de carbono, hidrógeno y oxígeno y tienen la fórmula empírica $(CH_2O)_n$, donde 'n' es tres o más. Sin embargo, algunos compuestos con propiedades de carbohidratos también contienen fósforo, nitrógeno o azufre. El grupo de los carbohidratos contiene polihidroxialdehido, cetonas, alcoholes y ácidos, sus derivados simples, y cualquier compuesto que pueda ser hidrolizado a éstos.

El término 'azúcar' se refiere generalmente a aquellos carbohidratos que contienen menos de 10 residuos de monosacáridos, mientras que el nombre 'oligosacáridos' (del griego *oligos*, pocos) es usado con frecuencia para incluir todos los carbohidratos que no son monosacáridos.

Los azúcares más simples son los monosacáridos, que se dividen en los subgrupos: triosas ($C_3H_6O_3$), tetrosas ($C_4H_8O_4$), pentosas ($C_5H_{10}O_5$), hexosas ($C_6H_{12}O_6$) y heptosas ($C_7H_{14}O_7$), dependiendo del número de átomos de carbono presentes en la molécula. Los monosacáridos pueden unirse, con la eliminación de una molécula de agua en cada enlace, para producir di-, tri-, tetra- o polisacáridos, que contienen dos, tres, cuatro o más unidades de monosacáridos, respectivamente.

Los polisacáridos en cambio, también llamados glicanos, son polímeros de unidades de monosacáridos, que se clasifican en dos grupos, los homoglicanos y los heteroglicanos, y contienen uno o varios tipos de unidades de monosacáridos, respectivamente, en sus cadenas. El peso molecular de los polisacáridos varía de 8000, en algunos fructanos vegetales, hasta 100 millones en los componentes amilopécticos de los almidones. La hidrólisis de estos polímeros a sus azúcares constituyentes puede efectuarse por la acción de enzimas específicos o ácidos.

La definición de carbohidratos complejos la constituyen un grupo de compuestos resultantes de la combinación de moléculas de carbohidratos con no-carbohidratos, e incluyen a los glicolípidos y las glicoproteínas.

La figura 2.1 ilustra las estructuras químicas de dos de los componentes de la pared celular vegetal (celulosa y arabinoxilano).

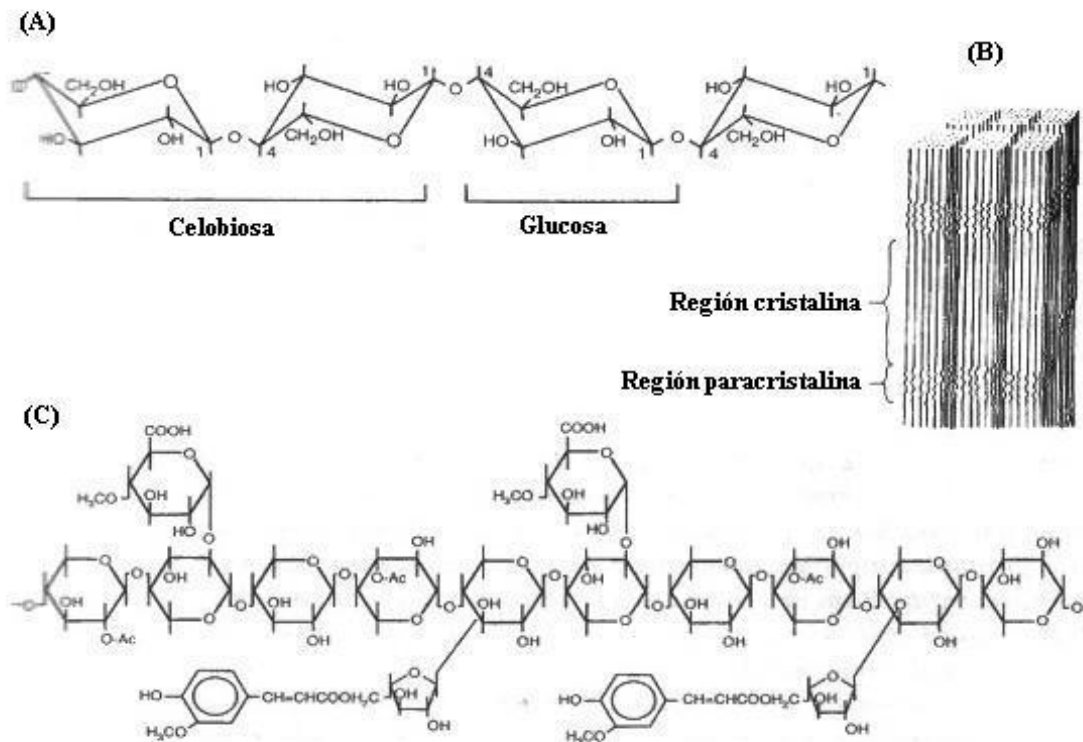


Figura 2.1. Estructura de la celulosa y el arabinoxilano. A) Glucosa y celobiosa. B) Microfibrillas de celulosa, mostrando la región cristalina y paracristalina (amorfa). C) Un típico arabino-4-*O*-metilglucuronoxilano de cereal. (Adaptado de Bhat y Hazlewood, 2001).

Los polisacáridos estructurales se sintetizan en el interior de las células, pero son impelidos hacia el exterior, para formar una pared o cubierta que rodea a la célula. En las plantas, la celulosa y la hemicelulosa son los principales polisacáridos estructurales y representan aproximadamente el 70% de la biomasa vegetal (Ladisich et al., 1983). Además del esencial papel que juegan estos elementos en el mantenimiento de la integridad estructural de las plantas, la celulosa y la hemicelulosa sirven como fuente principal de nutrientes para los herbívoros y como sustratos renovables para la producción de alimento, papel y pulpa, así como textiles (Ryu y Mandels, 1980; Gilbert y Hazlewood, 1993; Béguin y Aubert, 1994).

La membrana celular de los vegetales se inicia como una membrana pectínica, que gradualmente va siendo sustituida por depósitos de celulosa, hemicelulosa y lignina. El contenido en pectina desciende notablemente según envejece la planta y se produce de forma simultánea un incremento en el contenido de lignina y celulosa. Se conoce que la celulosa y la hemicelulosa pueden ser convertidas a azúcares solubles por enzimas de origen principalmente microbiano, denominadas por lo general como celulasas y hemicelulasas (Mandels, 1985; Viikari et al., 1993).

La mayoría de los carbohidratos consumidos por los rumiantes son polímeros de la glucosa que aparecen en forma de celulosa o almidón, por su parte la fracción fibrosa de éstos contiene fundamentalmente celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales son los encargados de conformar la estructura de la planta, de ahí el término “carbohidratos estructurales” o “carbohidratos de la pared celular”; sin embargo, algunas dietas pueden contener cantidades importantes de hemicelulosa y de pectina. Por consiguiente, para que tenga lugar su fermentación, la mayoría de los carbohidratos deben experimentar una hidrólisis en el rumen (Chesson y Forsberg, 1997). Los microorganismos, incluidos las bacterias, los hongos y los protozoos, producen principalmente tres tipos de celulasas para la hidrólisis de la celulosa, denominados endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa, que actúan tanto como entidades separadas o en la forma de un complejo agregado (Bhat y Bhat 1997).

2.1.1.1. Celulosa

La celulosa es el principal carbohidrato sintetizado por las plantas. Es un polímero de glucosa lineal unido por enlaces β -1,4 glucosídicos (Béguin y Aubert, 1994) teniendo una estructura simple primaria y otra compleja terciaria.

En todas las plantas superiores, la celulosa aparece en forma de microfibrillas (Lam et al., 1990) en las paredes primarias y secundarias (Figura 2.1), lo cual es el resultado de la formación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas, que se orientan en dominios cristalinos paralelos altamente ordenados y “salpicados” por regiones amorfas más desordenadas (Béguin y Aubert, 1994). El grado de cristalinidad de las microfibrillas de la celulosa es dependiente de la fuente, la edad, y el pretratamiento del material vegetal del que provenga (Lam et al., 1990; Béguin y Aubert, 1994).

En la pared secundaria, la celulosa forma varias láminas en las cuales las microfibrillas se organizan en paralelo, presentando una orientación diferente cada lámina (Béguin y Aubert, 1994), lo cual es conocido como concepto helicoidal. Este arreglo helicoidal puede tener implicaciones importantes con relación a los procesos de degradación de las enzimas

microbianas. Las microfibrillas son generalmente “empotradas” en una matriz de hemicelulosa y lignina.

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

2.1.1.2. Hemicelulosa

Se definen como polisacáridos de la pared celular solubles en álcali y estrechamente asociados a la celulosa. El nombre hemicelulosa ha sido generalizado e implica erróneamente que el material es destinado para la conversión a celulosa (Van Soest, 1982). Estructuralmente están compuestas principalmente por unidades de D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-xilosa y L-arabinosa unidas en diferentes combinaciones y por varios enlaces glicosídicos.

Es el segundo polisacárido estructural más abundante de las plantas, está presente en asociación con la celulosa en las paredes de la mayoría de las especies vegetales, y puede ser extraída por álcalis. Basado en los principales residuos de azúcares presentes en el esqueleto del polímero, las hemicelulosas pueden ser denominadas xilanos, glucomananos, galactanos o arabinanos (Bhat y Hazlewood, 2001). Se considera generalmente que los dos tipos principales de hemicelulosas son los xilanos y los glucomanos.

Las hemicelulosas contienen dos tipos diferentes de polisacáridos: polisacáridos de cadena corta (o celulosanas), que forman parte de la propia estructura de la celulosa y están orientadas en la estructura micelar, y polisacáridos amorfos incrustados, que se asocian íntimamente con la lignina de la membrana celular.

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

ser comprimido entre grupos íntimamente asociados en los que podría ocupar espacios en lugar de celulosa. Aparentemente, el xilano aparece enredado en la fibra de celulosa aunque no es un componente de la región micelar cristalina.

2.1.1.3. Pectinas

Las sustancias pécticas son un grupo de polisacáridos estrechamente asociados, solubles en agua caliente y que aparecen como constituyentes de las paredes primarias de las células y las regiones intercelulares de las plantas superiores. Son particularmente abundantes en tejidos blandos como la piel de los frutos cítricos y la pulpa de remolacha (McDonald et al., 2002).

Los carbohidratos en este grupo incluyen los poligalacturonanos (ramnogalacturonanos) y los polisacáridos neutrales tales como los arabinanos, galactanos y arabinogalactanos (Chesson, 1994). Se ha demostrado que las pectinas pueden contener enlaces de ésteres con ácidos fenólicos, tales como el ácido ferúlico. Están presentes en la pared celular de todas las plantas y se localizan específicamente en el centro de la lamela (Aman, 1993), constituyendo el cemento de la pared celular de las plantas (Van Soest, 1994).

Los contenidos en pectinas son particularmente importantes en las plantas dicotiledóneas. En la alfalfa (*Medicago sativa* L.), la pectina constituye una proporción significativa del total de los polisacáridos estructurales de la pared celular, estando en el rango entre 100 y 200 g/kg en tallos y de 250 a 300 g/kg en hojas (Hatfield, 1992). Este análisis es importante si tenemos en cuenta que los polisacáridos pécticos son considerados altamente degradables (Hatfield y Weimer, 1995). En las gramíneas, en cambio, las sustancias pécticas constituyen una menor proporción en la pared celular primaria (Hatfield, 1989; Aman, 1993).

2.1.1.4. Los compuestos fenólicos

La lignina, que no es un carbohidrato pero que está estrechamente asociada a los compuestos de este grupo, confiere resistencia química y biológica a la pared celular y fortaleza mecánica a la planta. El término 'lignina' no se refiere a un compuesto simple, bien definido, sino que es un término colectivo que engloba a una serie de compuestos estrechamente relacionados.

Se considera un polímero que se origina de tres derivados de fenilpropano: alcohol coumaril, alcohol coniferil y alcohol sinapil. La molécula de lignina se conforma de muchas unidades fenilpropanoides asociadas en una estructura compleja entrelazada.

La lignina representa el principal compuesto fenólico de la pared celular (Lapierre, 1993). Es un polímero con estructura no definida (Ralph et al., 1996), y existe una gran

heterogeneidad entre las ligninas de diferentes especies, órganos, tejidos y posiblemente de tipo de células (Lam et al., 1990). Las ligninas han sido clasificadas en ligninas nuclear o central y lignina no nuclear (Lapierre, 1993). Este compuesto es de particular interés en nutrición animal debido a su alta resistencia a la degradación química.

La lignina nuclear representa el principal polímero de lignina (Van Soest, 1994), y consiste en un polímero fenilpropanoide altamente condensado (Lapierre, 1993). Para estimar las concentraciones de lignina, se consideran los métodos Klason y las determinaciones de la lignina ácido detergente (LAD) (en ácido sulfúrico al 72%) (Lapierre, 1993).

En cambio, la lignina no nuclear o central consiste en fenoles de bajo peso molecular (p.ej. *p*-coumárico, ácido ferúlico, y sus dímeros) que pueden ser extraídos mediante una hidrólisis ligera (Jung y Deetz, 1993; Van Soest, 1994). Los ácidos fenólicos esterificados son estimados por extracción alcalina a bajas temperaturas, y los ácidos fenólicos eterificados mediante hidrólisis alcalina a altas temperaturas o acidólisis. Estos ácidos fenólicos pueden estar ligados a la lignina nuclear, a los polisacáridos, o a ambos en la pared celular de las plantas (Lapierre, 1993).

Los compuestos fenólicos de la pared celular han sido considerados como el principal factor limitante de la disponibilidad del material de la pared y contenido celular para los animales (Jung y Ralph, 1990; Van Soest, 1994). Se ha demostrado que la lignina ejerce una acción negativa en la digestibilidad de los principales compuestos presentes en las células vegetales, protegiéndolos de la hidrólisis enzimática de los procesos digestivos (Jung y Allen, 1995).

2.1.1.5. Almidones

Los almidones representan el principal reservorio de polisacáridos en las plantas (Van Soest, 1994), y se encuentran en concentraciones altamente significativas en cereales tales como el maíz (*Zea mays* L.), el trigo (*Triticum aestivum* L.), la cebada (*Hordeum vulgare* L.), la avena (*Avena sativa* L.), el arroz (*Oryza sativa* L.), el triticale (*Triticum x Secate*), el sorgo (*Sorghum bicolor*), el centeno (*Secate cereale*), y tubérculos tales como la patata (*Solanum tuberosum* L.).

Aunque generalmente se le refiere como un polisacárido simple, los almidones son de hecho un compuesto de dos polímeros de glucosa estructuralmente diferentes: la amilosa y la amilopectina (Chesson y Forsberg, 1997). La amilosa es el compuesto más simple de los dos, y consiste en una cadena lineal de residuos de azúcares con enlaces β 1-4, pudiendo contener hasta 6000 residuos de glucosa en su cadena (Bhat, 1998). En soluciones, la amilosa asume

una estructura de hélice con aproximadamente seis residuos de glucosa (Chesson y Forsberg, 1997). En cambio, la amilopectina es una molécula considerablemente más grande, y está compuesta por un polímero altamente ramificado con cadenas cortas de amilosa de 10 a 60 residuos conectados mediante enlaces β 1-6 (Bhat, 1998).

En las plantas, la amilosa y la amilopectina son empaquetadas en forma de discretos gránulos de tamaño variable (Chesson y Forsberg, 1997). La proporción entre estos dos polímeros varía con los cereales (Van Soest, 1994), resultando constante sin embargo para una misma fuente (Bhat, 1998).

2.2. El ecosistema ruminal como fuente de enzimas

Generalmente se acepta que desde el punto de vista evolutivo, los rumiantes deben ser considerados como las especies animales de mayor desarrollo en el sistema digestivo, de todas las existentes (Tamminga y Williams, 1998). Las adaptaciones anatómicas dieron como resultado la compartimentación del tracto digestivo y las fermentaciones pre-gástricas desarrolladas condujeron a una relación simbiótica del animal hospedero y el ecosistema microbiano. Sólo seis de las 150 especies de rumiantes se domesticaron, no obstante alcanzar una población 10 veces mayor a la de las especies salvajes (Van Soest, 1994).

La domesticación fue seguida por los procesos de selección para los propósitos de producción de leche, carne y lana, con la producción de piel y la tracción animal en desarrollo paralelo (Tamminga y Williams, 1998). Dicho proceso de selección ha incrementado sustancialmente los niveles de producción por animal lo cual ha derivado en una mayor necesidad de conocimientos apropiados referidos a la cantidad y calidad de los requerimientos en nutrientes.

El rumen es una adaptación pre-péptica altamente especializada del tracto digestivo que facilita el almacenamiento y procesamiento microbiano de una gran cantidad de material vegetal (Hungate, 1988). El ecosistema ruminal comprende una muy diversa población de bacterias anaeróbicas estrictas, hongos y protozoos (Forsberg y Cheng, 1992) definidos por la intensa presión selectiva del ambiente ruminal. Estos microorganismos en simbiosis se adaptan a sobrevivir en condiciones de anaerobiosis, altos ritmos de dilución, altas densidades de células y la predación protozoaria, y han desarrollado la capacidad para la utilización eficiente de los complejos polímeros vegetales (p.ej. celulosa y hemicelulosa).

Como compartimiento esencial en los rumiantes, este órgano tiene dos funciones básicas:
i) producir energía a partir de fuentes de carbohidratos que de otra manera no estarían

disponibles para el animal, y, ii) fijar nitrógeno no proteico de forma que pueda ser utilizado por el animal, como es el caso de la proteína microbiana.

Estas funciones son llevadas a cabo por la microflora y microfauna, mediante una acción conjugada de todos los microorganismos que conviven en el ecosistema ruminal y los respectivos mecanismos de degradación (Figura 2.2).

La microflora produce un volumen vasto de enzimas encargadas de intervenir activamente en el proceso de degradación del material alimenticio, cuya complejidad de este sistema no puede ser subestimada (Yokohama y Jonson, 1993). Los organismos funcionan de manera sinérgica y competitiva y, debido a su gran diversidad, pueden adaptarse a una amplia variedad de alimentos convirtiéndolos en sustratos energéticos y en proteínas utilizables por el animal hospedero (Preston y Leng, 1987). Muchos de estos alimentos son completamente inutilizables por los animales monogástricos (Ensminger et al., 1990). De esta manera los rumiantes representan un medio idóneo para transformar fuentes de alimentos de distintas formas de presentación en productos de alta calidad y demanda por el ser humano (carne, leche y fibra).

Para la optimización de los sistemas de alimentación de rumiantes, se requiere del desarrollo de diferentes estrategias nutricionales básicas con los siguientes objetivos (Preston y Leng, 1987):

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

La degradación y utilización del material vegetal ingerido por los rumiantes es regulado por factores inherentes a las plantas, los animales y la población microbiana ruminal (Forsberg y Cheng, 1992). El acceso de las enzimas digestivas a los nutrientes de las plantas es gobernado en gran medida por las características de éstas en cuanto a su estructura, composición, y las técnicas de procesamiento empleadas. La masticación, salivación y rumia efectuadas por el animal comienzan a acondicionar la liberación de nutrientes e incrementan su disponibilidad para las enzimas digestivas microbianas. La degradación y metabolismo de los componentes del alimento (celulosa, hemicelulosa, almidón, proteína) llevada a cabo por los microorganismos ruminales, suministra el carbono, energía, aminoácidos (proteína microbiana) y vitaminas requeridas por el rumiante huésped (Owens y Goetsch, 1993).

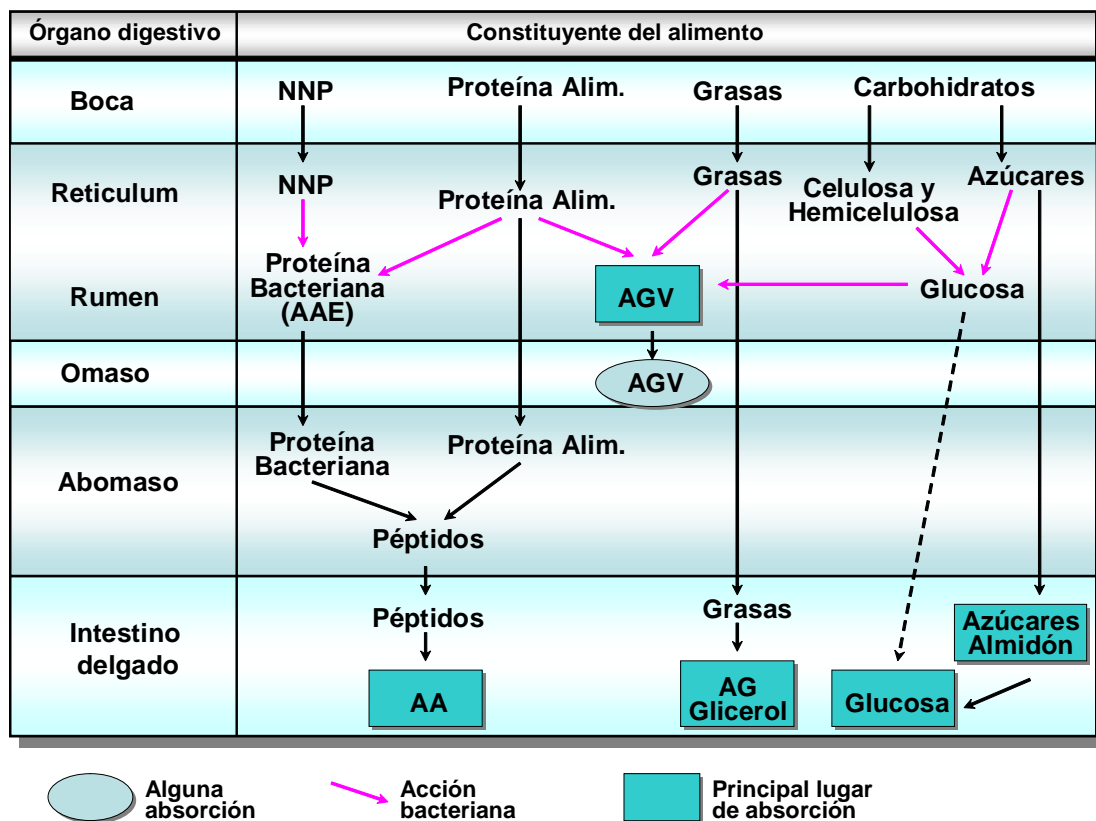


Figura 2.2. Síntesis de los mecanismos de digestión en los órganos digestivos de los rumiantes.

A pesar de su complejidad, la baja porosidad y la variable capacidad de cristalización, los compuestos fibrosos de las plantas son en efecto digeridos por la actividad simultánea de todo el conjunto de enzimas microbianas presentes en el rumen (Chesson y Forsberg, 1997).

2.2.1. La actividad microbiana y enzimática del rumen

La actividad enzimática confirmada que existe en el rumen es muy diversa, e incluye las enzimas que degradan los polímeros de las paredes celulares en las plantas (celulasas, xylanasas, β -glucanasas, pectinasas, etc.), las amilasas, las proteasas, las fitasas y las encargadas de degradar las toxinas presentes en un grupo de especies vegetales (p.ej. taninasas).

La variedad de enzimas presentes en el rumen viene dada no sólo por la diversidad de su comunidad microbiana sino también por la multiplicidad de enzimas fibrolíticas producidas por microorganismos individuales (Doerner y White, 1990; Yanke et al., 1995).

La digestión eficiente de sustratos complejos en el rumen requiere de la acción combinada de muchas enzimas (Bhat y Hazlewood, 2001). Han sido propuestos dos modelos para células individuales con el objetivo de describir la organización del sistema de enzimas fibrolíticas siguiendo la síntesis y secreción de la célula. En el primer modelo, las enzimas actúan individual y sinérgicamente para efectuar la hidrólisis de la celulosa. Este modelo fue originado a partir de investigaciones en hongos aeróbicos representantes de algunos géneros que incluían *Trichoderma* y *Phanerochaete* y ha sido revisado por Wood (1992) y Béguin y Aubert (1994). En el segundo modelo, las enzimas individuales se acoplan en un complejo multienzimático (p.ej. celulosomas). El complejo multienzimático celulosomal de la bacteria termofílica *Clostridium thermocellum* es el ejemplo más extensivamente estudiado de este modelo (Bayer et al., 1998). Por otra parte, un alto número de celulasas contenidas en complejos de alta masa molecular, han sido identificados en un número de bacterias ruminales tales como *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus* y *Fibrobacter succinogenes*, así como en los hongos *Neocallimastix frontalis* y *Piromyces* sp. (Forsberg et al., 1993; Ali et al., 1995; Fanutti et al., 1995).

En el rumen, las especies de bacterias amilolíticas y dextrinolíticas más comunes que habitan son, *Bacteroides amylophilus*, *Streptococcus bovis*, *Succinimonas amylolytica* y *Succinivibrio dextrinosolvens*, mientras que *Bacteroides ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Selenomonas ruminantium* son las bacterias sacarolíticas más representativas y *Bacteroides succinogenes*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens* las celulólicas.

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

Las principales bacterias celulólicas, *R. albus*, *R. flavefaciens* y *F. succinogenes*, pueden representar del 0.3–4% del total de la población bacteriana (Krause et al., 1999; Weimer et al., 1999). Los hongos, por otra parte, representan aproximadamente el 8% de la biomasa microbiana (Orpin, 1983), y sólo una porción de éstos producen celulasas y hemicelulasas altamente activas (Trinci et al., 1994). Un número limitado del género protozoario cuenta también con un importante papel en la digestión de la pared celular de las plantas, pudiendo

digerir del 5–21% de los materiales celulolíticos en dependencia de la ración (Dijkstra y Tamminga, 1995).

El factor primario limitante de la digestión de la celulosa parece ser la disponibilidad de sitios específicos para desarrollar este proceso en el material vegetal más que una baja actividad celulolítica (Dehority y Tirabasso, 1998). Sin embargo, Weimer et al. (1999) indicaron que las diferencias en las poblaciones celulolíticas en vacas individuales fueron mayores que aquellas atribuibles a la ración, sugiriendo entonces que cada animal mantiene un ensamblaje único de especies celulolíticas. Esto pudiera ser el resultado de diferentes eficiencias en la masticación de las paredes celulares de las plantas si se considera que el grueso de la digestión microbiana ocurre en la pared celular secundaria (Word et al., 1988).

Los conocimientos sobre los mecanismos de digestión en el rumen, en particular aquellos relacionados con la degradación de los polisacáridos de la pared celular de las plantas, requieren el estudio del ecosistema microbiano (Michalet-Doreau et al., 2001). La fracción microbiana ruminal está conformada básicamente por bacterias y protozoos, y por la población adherida a la fracción sólida, la cual parece ser determinante en la digestión del forraje a nivel ruminal, en términos de masa (Craig et al., 1987), y en términos de actividad enzimática (Williams et al., 1989; Martin y Michalet-Doreau, 1995).

La contribución bacteriana al flujo de nutrientes al duodeno ha sido calculada principalmente a partir de muestras de bacterias ruminales flotantes libremente, o más recientemente a partir de la población adherida a la fracción sólida (Doreau et al., 1991; Ferlay et al., 1992) o a partir de una mezcla de bacterias asociadas a la fracción líquida y sólida (Cecava et al., 1990).

Se han comprobado grandes diferencias en la composición química (Legay-Carmier y Bauchart, 1989) y las actividades enzimáticas (Martin y Michalet-Doreau, 1995) entre los protozoos y las bacterias y entre las bacterias asociadas a las fases líquidas o sólidas del rumen. Para comprobar si estas diferencias corresponden a variaciones en la estructura de la comunidad bacteriana, Michalet-Doreau et al. (2001) estudiaron con ovinos adultos la distribución de las actividades fibrolíticas microbianas en el ecosistema de la digesta ruminal en relación a la composición de la comunidad de bacterias celulolíticas involucradas en el proceso de degradación de los polisacáridos. Estos autores encontraron que las actividades específicas de las enzimas polisacaridasas fueron mayores en la población adherida a la fracción sólida que en el promedio de la población microbiana total, y dentro de la adherida resultó mayor la de la población firmemente adherida que la del resto de esta subclasificación. La sumatoria de los RNA de las tres especies de bacterias celulolíticas representadas (*F.*

succinogenes, *R. albus* y *R. flavefaciens*) significó el 9 % del total de RNA bacteriano. En todas las muestras analizadas en este estudio, el tamaño relativo de la población de *F. succinogenes* fue mayor que el de *R. albus* y *R. flavefaciens*. Los autores concluyen que las diferencias en la composición de la microflora entre las fases líquida y sólida sugieren que las bacterias no están distribuidas de manera uniforme en el contenido ruminal y que las especies celulolíticas están presentes en una proporción mayor en la fase sólida.

2.2.2. La fermentación de los carbohidratos en el rumen

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

La microflora del rumen no está capacitada para distinguir entre estos dos tipos de carbohidratos. Todos los alimentos que llegan al rumen son fermentados hasta convertirse en productos metabólicos comunes como son los ácidos grasos de cadena corta (volátiles), metano y calor (Preston y Leng, 1987). Estos ácidos grasos son absorbidos directamente desde el rumen y pueden ser usados tanto en los procesos catabólicos como anabólicos (p.ej. gluconeogénesis). El proceso de fermentación resulta en significativas pérdidas de energía en forma de metano, hidrógeno y calor. Así por ejemplo, cuando la glucosa alimenticia elude el rumen (`bypass`) y es absorbida en el intestino delgado, la eficiencia de utilización de la energía es capaz de incrementarse hasta un 30%.

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

Para la degradación de los PNA a sus azúcares constituyentes, lo cual es un prerrequisito para la fermentación, se requiere de la acción coordinada de muchas polisacaridasas. Por ejemplo, la degradación de los arabinoxilanos, un polisacárido estructural que se encuentra en las paredes celulares de los forrajes y en el endospermo de los cereales, requiere de un amplio

rango de enzimas trabajando secuencialmente. En esencia, las enzimas que destruyen las cadenas de arabinosa, grupo acetil, ácido ferúlico y ácido glucurónico actúan primero seguidas por las xilanasas que se encargan de fraccionar las principales cadenas de xilano. La descomposición de la celulosa también requiere de una serie de enzimas las cuales incluyen endo-1,4 β -D-glucanasas, 1,4- β -D-glucano celobiohidrolasas y β -glucosidasas.

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

2.3. Estrategias para potenciar la degradación de la pared celular vegetal

A partir de los estudios realizados sobre la estructura de la pared celular de las plantas, se ha hecho evidente que un buen número de elementos de carácter organizacional determinan la naturaleza de los procesos de biodegradación de dichas barreras físicas en el material vegetal. El más importante de estos factores lo constituye la distribución del tamaño de los espacios entre los polímeros individuales, que contribuyen a la estructura de la pared y que es bastante similar en todas las especies de cultivos usadas en los propósitos de alimentación. La medición directa ha demostrado que la mayoría de estos espacios o poros tienen un diámetro entre 2 y 4 nm (Chesson y Forsberg, 1997; Gardner et al., 1999). Estas dimensiones no son suficientes para permitir la difusión libre dentro de la pared por simples enzimas globulares con masas mayores que 20 kDa. La porosidad de la pared (Gardner et al., 1999) y su composición (Chesson et al., 1986) cambia muy poco durante el curso de su degradación, incluso cuando 70% de la materia seca ha sido descompuesta.

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

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

La superficie disponible está determinada por la preparación del alimento y los procesos de masticación y/o rumia, los cuales abren las células de la planta y las exponen a la colonización. La eliminación subsiguiente de los polisacáridos de la superficie, en los tipos de células más lignificadas, puede conducir al desarrollo de una superficie inerte en la cual algunos polisacáridos remanentes están protegidos del ataque por la presencia de compuestos fenólicos. Consecuentemente, el área superficial disponible alcanza un máximo para disminuir después en el tiempo, resultando en una disminución del ritmo de degradación. La cantidad de superficie que logra escapar del ataque microbiano por este mecanismo es el producto de las proporciones de lignina presentes y el grado de entrelazamiento a otros polímeros de la estructura, todo lo cual define la magnitud de la degradación en su conjunto (Forsberg et al., 1997).

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

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

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

cruzados entre polímeros dentro de la pared celular, puede ser una vía efectiva de alteración de las características de su degradación (Grabber et al., 1998).

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

Actuando en otra dirección, existen trabajos que han demostrado que la suplementación con enzimas en la ración de los animales puede incrementar la digestibilidad de los nutrientes y la respuesta en producción del ganado de especies tanto monogástricas como más recientemente en rumiantes (Beauchemin et al., 1995; Beauchemin y Rode, 1996; Yang et al., 1999). En el caso de los rumiantes, algunos de los resultados expuestos provocan la sorpresa y escepticismo de muchos investigadores y especialistas del ramo, al considerarse el amplio potencial de las enzimas fibrolíticas endógenas producidas por la microflora del rumen. Dentro de los argumentos para la explicación de los efectos positivos, aparece el relacionado con el posible beneficio como resultado de la adición de polisacaridasas extracelulares enriquecidas que darían como resultado un ataque inmediato del material vegetal a consumir, proporcionando con ello una disponibilidad adicional de carbohidratos que estimularía un crecimiento y actividad microbiana más rápidos, disminuyendo por tanto el tiempo (“lag time”) requerido para la colonización microbiana.

2.3.1. Uso de enzimas en alimentación animal

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

Sin las enzimas, los alimentos no podrían ser digeridos. Más de 3000 enzimas han sido descubiertas, y en su totalidad están compuestas por cadenas de aminoácidos como cualquier proteína. Como resultado de la actividad enzimática, los ritmos de progresión de las

reacciones químicas se ven ampliamente modificados independientemente del estado energético de que se trate. La forma tridimensional y la posición de los aminoácidos reactivos dentro de la molécula es lo que confiere las propiedades catalíticas a las enzimas (Sheppy, 2001).

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

2.3.1.1. Fuentes de enzima

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

Tal como se ha comentado, las enzimas son biocatalizadores naturales producidos por las células vivas para intervenir en reacciones bioquímicas específicas. En el contexto de los aditivos de alimentos, las enzimas son empleadas para catalizar las reacciones degradativas mediante las cuales los sustratos (p.ej. los alimentos) son digeridos a sus componentes químicos (p.ej. azúcares simples, aminoácidos, ácidos grasos). Estos componentes son utilizados para el crecimiento celular, tanto por los microorganismos ruminales (en el caso de rumiantes) como por el animal huésped.

La digestión completa de los alimentos complejos requiere literalmente de la intervención de cientos de enzimas. Los preparados enzimáticos para rumiantes son comercializados primeramente sobre la base de su capacidad para degradar la pared celular de las plantas y, como tal, son frecuentemente referidos como celulasas o xilanasas. Sin embargo, ninguno de estos productos comerciales constituye una preparación pura con la participación de una sola enzima aislada (Beauchemin y Rode, 1996). Así, estarán invariablemente presentes actividades enzimáticas secundarias, tales como amilasas, proteasas o pectinasas. La degradación de la celulosa y la hemicelulosa requiere de enzimas, y la diferencia en sus proporciones relativas y sus actividades individuales determinan la eficacia para la degradación de la pared celular de estos productos comerciales. Incluso dentro de una especie

microbiana aislada, los tipos y actividades enzimáticas pueden variar ampliamente, dependiendo de la cepa seleccionada, del sustrato de crecimiento y de las condiciones de cultivo empleadas (Considine y Coughlan, 1989; Gashe, 1992).

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

2.3.1.2. Uso en monogástricos

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

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

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

El uso de enzimas en raciones para pollos en Europa por ejemplo, es prácticamente universal en estos momentos. Las razones del por qué estas tecnologías son empleadas incluyen (Bedford, 2000):

- a) El incremento del valor nutritivo de las principales materias primas utilizadas (cebada, trigo, maíz, etc.) (Marquardt et al., 1994; Hughes y Zviedrans, 1999; Steinfeldt et al., 1998)
- b) La reducción de la variación en la calidad de los nutrientes de los ingredientes, siendo mayor la respuesta al uso de enzimas en las materias primas de peor calidad. Como resultado en este aspecto se obtiene una menor variación en el comportamiento de las aves lo que resulta a su vez en lotes o rebaños más uniformes y también mayor uniformidad en la producción entre lotes (Scott et al., 1995)
- c) La reducción de la humedad de la cama de los animales. Por ejemplo, la alimentación de las aves con cebada, avena, triticale, y en menor medida el trigo, con bastante frecuencia hace que los desechos y los excrementos sean más húmedos y viscosos (Bedford y Morgan, 1996)

El empleo de granos viscosos en la alimentación de monogástricos induce a un incremento en la viscosidad intestinal, lo cual afecta el ritmo de digestión. La estructura física del endospermo de la pared celular de estos granos puede impedir también el acceso de las enzimas digestivas a su contenido, lo cual es resuelto con la correcta aplicación de la enzima apropiada para disminuir este problema y permitir que la digestión transcurra de manera más rápida y completa (Bedford, 2000).

En el caso de los granos no viscosos, la aplicación de enzimas permite reducir las variaciones en calidad y sus consiguientes efectos sobre los ritmos y magnitudes del comportamiento en los lotes de producción (Pack et al., 1998).

Teniendo en cuenta estas consideraciones para los dos tipos de granos, la aplicación de enzimas provoca un aumento de los ritmos de digestibilidad, lo cual es de una importancia primordial puesto que se “adelanta” el sitio de digestión y absorción de almidones y proteínas hacia zonas donde existe una menor competitividad con la flora microbiana residente y por tanto una mayor disponibilidad directa para el animal (Figura 2.3). Esto es particularmente importante en el caso de aves con cierta edad donde la flora intestinal es más densa y en los casos en que no se usen antibióticos (Bedford, 2000)

Las características químicas de los carbohidratos viscosos, la estructura de la pared celular y los complejos indigestibles almidón/proteína son en extremo heterogéneos; de igual manera, las enzimas empleadas para contribuir a disminuir estos efectos son de amplios rangos en

cuanto a su preferencia por un sustrato determinado, en el sentido de que el peso molecular de éste puede variar en orden o magnitud como lo puede hacer su grado de complejidad y las características de los azúcares acompañantes a la cadena. Como resultado se puede inferir que los beneficios se pueden lograr mediante el uso de cualquier enzima de amplio rango o variedad, de fuentes de organismos divergentes, y que con frecuencia presentan mecanismos de acción diferentes (Bedford, 2000).

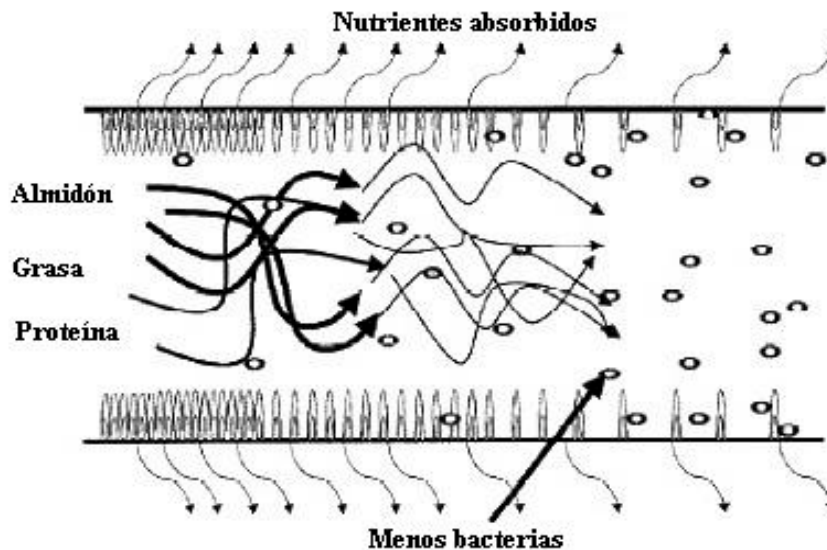


Figura 2.3. Relación entre el ritmo de digestión y densidad microbiana. Una ración rápidamente digerible soportará una menor población de microorganismos (Adaptado de Bedford, 2000).

Annison (1992), evaluando la efectividad de la adición de cuatro productos enzimáticos comerciales que contenían actividades xilanasas y β -glucanasas a una ración de pollos de engorde basada en trigo, obtuvieron incrementos significativos en los contenidos de energía metabolizable aparente de 14.26 a 15.79 MJ/kg de MS , que estuvo asociado con mejoras en los coeficientes de digestibilidad ileal de los almidones (de 0.88 en las aves control a 0.96 en las aves suplementadas) y en la digestibilidad aparente del pentosano (de 0.26 a 0.37), detectándose además un aumento en la actividad xilanasas del contenido ileal de las aves suplementadas. Este autor concluye que los factores antinutricionales presentes en la pared celular del trigo pueden ser reducidos a través de la suplementación con enzimas de este tipo.

Por otra parte, entre las enzimas de uso corriente en las especies monogástricas aparecen las fitasas. Se considera que el fitato, sustrato objetivo de este grupo de enzimas, es la forma de almacenaje de fosfato en las plantas, lo cual provoca considerables efectos antinutritivos

para la mayoría de los animales. La mayoría de las raciones para monogástricos contienen más fósforo que el que ellos pueden utilizar o necesitar, lo cual hace que se excrete una gran proporción de lo que se consume. Las presiones para reducir los niveles de contaminación por fósforo en algunas partes de Europa y de los Estados Unidos, ha creado una oportunidad de mercado para la introducción de las fitasas como enzimas exógenas (Bedford, 2000). La aplicación de estas enzimas permite a los animales acceder al fósforo ligado al fitato de las plantas, reduciendo la necesidad de fuentes de fósforo inorgánico y por tanto los riesgos de contaminación por este concepto.

2.3.1.3. Uso en rumiantes. Comportamiento productivo y digestión

El empleo de enzimas para mejorar la calidad de las raciones de rumiantes puede ser visto como un reto más lejano. Aunque las mismas técnicas analíticas empleadas en los estudios con especies monogástricas pueden ser aplicadas a los alimentos para rumiantes, el tracto digestivo de éstos resulta mucho más complejo.

El hecho de que se haya demostrado que las enzimas fibrolíticas se mantienen activas en el rumen, alienta la posibilidad de que éstas puedan jugar un papel importante en su contribución a la manipulación de la digestión ruminal.

A pesar de la gran variación observada en las respuestas ruminales a la suplementación con enzimas fibrolíticas (McAllister et al. 2001), un fenómeno comúnmente observado ha sido el incremento de la actividad celulolítica (Figuras 2.4.a y 2.4.b) en asociación con las enzimas (Wiedmeier et al. 1987; Feng et al. 1996; Newbold et al. 1992a,b; Yang et al. 1999; Wang et al. 2001a,b).

Una de las respuestas más consistentes que se han observado con la alimentación directa de microorganismos a los rumiantes ha sido el incremento del número total de bacterias cultivables y de bacterias celulolíticas (Nagaraja et al. 1997). Los modos de acción propuestos para los productos que en este sentido se emplean comercialmente, incluyen la presencia de componentes todavía no identificados lábiles y estables al calor (Nisbet y Martin 1993; Girard y Dawson 1995), productos del metabolismo microbiano, tales como vitaminas, en el medio de cultivo (Martin y Nisbet, 1992) y el “secuestro” de oxígeno por microorganismos vivos (Rose 1987). Sin embargo, los trabajos publicados hasta el momento sugieren que el modo de acción de los productos con enzimas fibrolíticas puede ser diferente al de los productos con microorganismos directos.

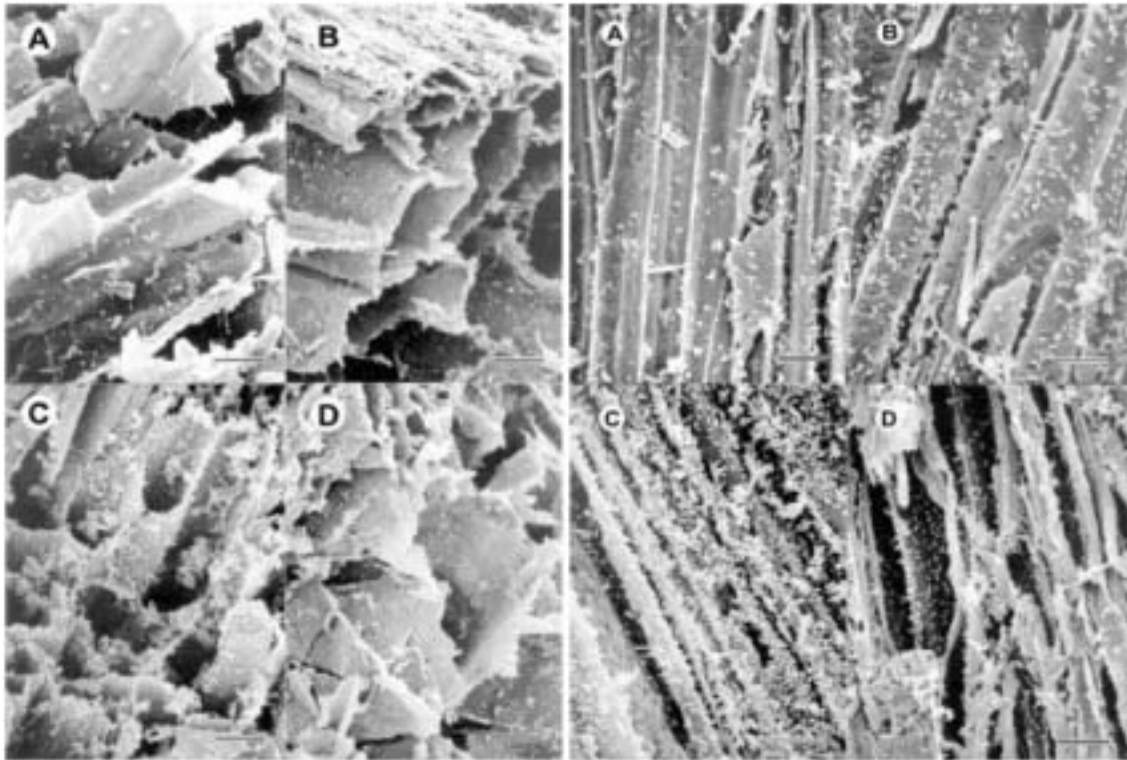


Figura 2.4.a. (Izq.). Efecto de las enzimas fibrolíticas (EF) en la colonización del heno de alfalfa por *Ruminococcus flavefaciens* durante 48 h de incubación in vitro. A) Sin EF; B) 28 µg/mL β -glucanasa; C) 280 µg/mL β -glucanasa; D) 280 µg/mL xilanasa. Barra = 10 µm (Adaptado de Wang et al. 2001b).

Figura 2.4.b. (Der.). Efecto de las enzimas fibrolíticas (EF) en la colonización de la paja de cebada por *Ruminococcus flavefaciens* durante 48 h de incubación in vitro. A) Sin EF; B) 28 µg/mL de β -glucanasa; C) 280 µg/mL β -glucanasa; D) 280 µg/mL de xilanasa. Barra = 20 µm (Adaptado de Wang et al. 2001b).

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

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

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

2.3.1.3.a. Modo de acción

Las enzimas exógenas podrían afectar la utilización de los alimentos en rumiantes tanto a través de sus efectos en el alimento, antes de ser consumidos, como a través de un estímulo de la digestión en el rumen y/o en el tracto digestivo post-ruminal (Figura 2.5; Mc Allister et al., 2001).

Los efectos antes del consumo (de “hidrólisis”) pudieran ser tan simples como la liberación de carbohidratos solubles, o tan complejos como la ruptura de barreras que limitan la digestión microbiana del alimento en el rumen. Dentro del rumen, las enzimas exógenas pueden actuar directamente en la digestión del alimento, o pueden estimular indirectamente la actividad digestiva a través de un efecto de sinergia con los microorganismos ruminales. Asimismo, las enzimas exógenas pudieran permanecer activas en el tracto digestivo posterior, contribuyendo a la digestión post-ruminal de la fibra, o en la mejora indirecta de la absorción de nutrientes mediante la disminución de la viscosidad de la digesta intestinal. Finalmente, según McAllister et al. (2001) las enzimas exógenas pueden a su vez complementar la actividad enzimática en las heces, contribuyendo con ello a la aceleración de su descomposición.

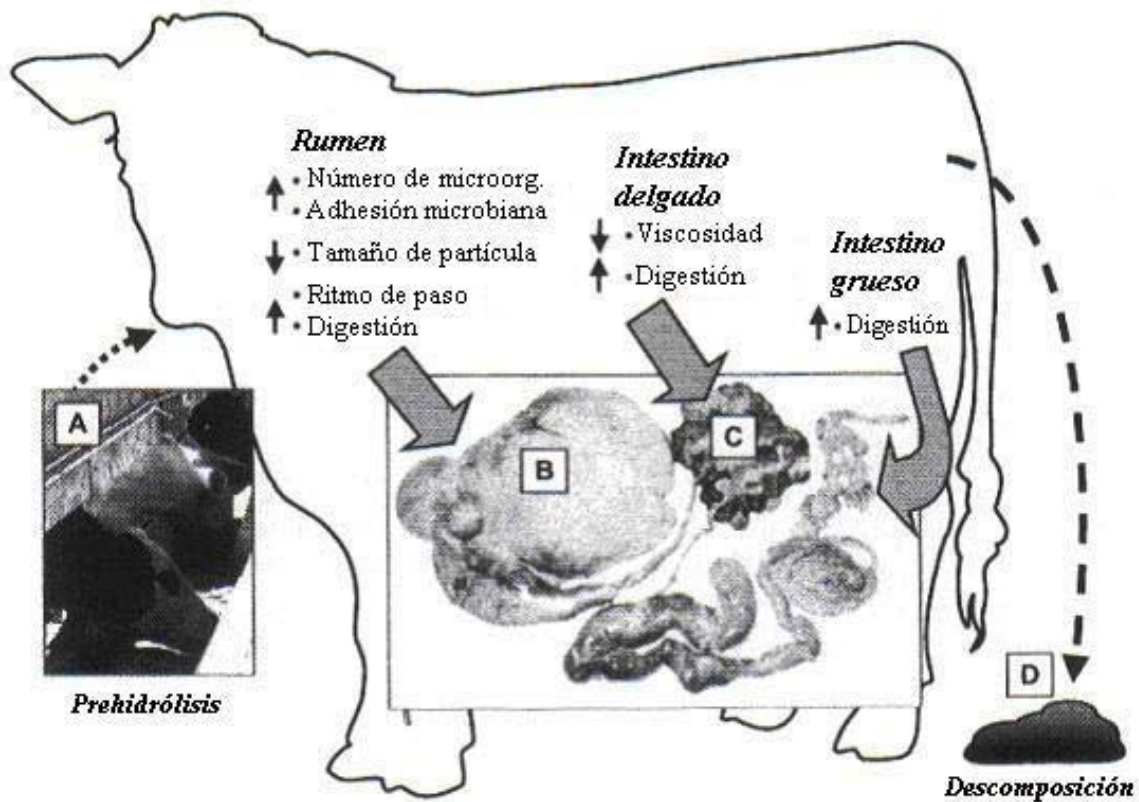


Figura 2.5. Posibles modos de acción de las enzimas exógenas en rumiantes. A) Antes del consumo, mediante la ‘digestión’ parcial del alimento o el debilitamiento de las barreras estructurales que impiden la digestión microbiana en el rumen. B) En el rumen, mediante la hidrólisis directa del alimento, o en sinergia con los microorganismos ruminales para estimular la digestión. C) En el intestino delgado, mediante la mejora de la absorción de nutrientes al reducir la viscosidad, o hidrolizando los sustratos que escapan de la digestión ruminal. D) En las heces, pudiendo incrementar el ritmo de descomposición (Adaptado de McAllister et al., 2001).

Si siguiendo este enfoque, el objetivo de la suplementación con enzimas en rumiantes sería mejorar la eficiencia de utilización de los alimentos y contribuir a la reducción de la producción de desechos en los sistemas de producción animal. No obstante, el modo de acción de las enzimas exógenas en el ganado rumiante, es un tema excesivamente complejo que sigue siendo de primordial importancia en las investigaciones que actualmente se continúan desarrollando.

2.3.1.3.b. Bovino lechero

Comportamiento productivo

Las primeras experiencias referidas a los efectos de la adición de enzimas exógenas sobre la producción de leche en vacas fueron desarrolladas a mediados de los años 90's (Chen et al., 1995; Lewis et al., 1995; Stokes y Zheng, 1995); más recientemente, los esfuerzos en esta temática han dado origen a un gran número de trabajos provenientes de diversos autores y en diferentes condiciones (Luchini et al., 1997; Nussio et al., 1997; Kung et al., 1998; Yang et al., 1998, 1999; Beauchemin et al., 1999). Una síntesis de los efectos de la suplementación con enzimas fibrolíticas en vacas lecheras, en las experiencias publicadas entre el año 1999 y 2000, aparece en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Efecto de la aplicación de enzimas en el alimento antes de la alimentación, sobre la producción de leche en experiencias publicadas entre 1999-2000 (adaptado de Kung, 2001).

Estudio	Incremento en producción de leche ¹ , kg/d
Beauchemin et al., 1999	+0.3, +1.5
Lewis et al., 1999	+1.2, +6.3 (P < 0.05), +1.6
Rode et al., 1999	+3.6 (P < 0.11)
Schingoethe et al., 1999	Expt 1. +1.2, +0.9, +2.7 Expt 2. +1.3 (P < 0.01)
Yang et al., 1999	+0.9, +1.9, +1.6
Beauchemin et al., 2000	-0.5, -0.5
Kung et al., 2000	Expt 1. +2.5 (P < 0.10), -0.8 Exp.2+0.7, +2.5(P<0.10)
Yang et al., 2000	0.1, +2.1 (P < 0.05)
Zheng et al., 2000	+2.0, +4.1, +1.5 (P < 0.07) ²
Promedio de los tratamientos	+1.60 kg/d

¹Cuando se listan más de un valor, significa que se han probado más de un tratamiento enzimático
El incremento en leche es relativo a la producción de leche de las vacas no suplementadas o control

²Todos los tratamientos comparados al control.

La aplicación de mezclas enzimáticas a sorgo forrajero no mejoró la producción de leche en vacas Holstein (Chen et al., 1995). La adición de una mezcla celulasa/xylanasa a raciones que contenían 45-50% de concentrado y ensilado de alfalfa, heno de alfalfa, o una mezcla de ensilado de alfalfa, de maíz y heno de alfalfa, tampoco demostró efectos sobre los niveles de producción de leche de vacas en lactación (Luchini et al., 1997; Nussio et al., 1997). En cambio, la aplicación de dos preparados enzimáticos similares en el ensilado de maíz en una ración con un 50% de concentrado, incrementó la producción de leche en 2.5 kg/d sin alterar su composición (Kung, 1996).

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

Aunque se ha demostrado que estos preparados enzimáticos pueden incrementar la producción de leche en vacas alimentadas con raciones mixtas compuestas por heno o ensilado de alfalfa (Lewis et al., 1995; Stokes y Zheng, 1995; Sánchez et al., 1996), las respuestas positivas en producción de leche han sido altamente dependientes de los niveles de enzima aplicados (Sánchez et al., 1996). Por ejemplo, las investigaciones en el Lethbridge Research Centre, Canadá, han demostrado que el aumento del nivel de enzima aplicado a pellets de alfalfa desde 1 g/kg hasta 2 g/kg, incrementó la producción de leche de 23.7 kg/d (control) hasta 24.6 kg/d y 25.6 kg/d, respectivamente (Yang et al., 1999).

Tabla 2.2. Consumo de materia seca, producción y composición de la leche en vacas alimentadas con raciones que contenían 45% de alfalfa tratada con niveles bajos o medios de enzimas fibrolíticas (adaptado de Beauchemin et al., 1995).

Item	Ración		
	Control	Nivel bajo	Nivel medio
MSI, kg/d	20.4	20.7	20.7
Producción de leche, kg/d	23.7 ^b	24.6 ^{ab}	25.6 ^a
Leche corregida 4%, kg/d	22.7 ^b	23.3 ^{ab}	24.6 ^a
Grasa, %	3.79	3.7	3.78
PB, %	3.4	3.4	3.4
Kg leche/kg MSI	1.2	1.22	1.29

^{a,b} Medias con diferentes letras dentro de una misma columna difieren a ($P < 0.05$).

En producción y composición de leche en vacas, Beauchemin et al. (1995) observaron tendencias lineales en la mejora de estos indicadores cuando se añadieron enzimas hasta, lo que los autores consideran, niveles medios de inclusión (Tabla 2.2).

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

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

Sánchez et al. (1996) presentaron datos menos convincentes sobre la relación dosis-respuesta en una experiencia en la que se suplementó al ganado vacuno lechero con tres niveles de mezcla enzimática añadida a una ración de heno de alfalfa. Estos autores comprobaron que el nivel intermedio de adición de enzima fue más efectivo que el mayor nivel empleado (Tabla 2.3).

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

Tabla 2.3. Comportamiento de vacas alimentadas con forraje tratado con diferentes niveles de enzimas fibrolíticas (adaptado de Sánchez et al., 1996)

Item	Enzima			
	Sin tratar	1.25 l/t	2.5 l/t	5 l/t
MSI, kg/d	24.3 ^a	26.2 ^b	26.1 ^b	26.6 ^b
Leche corregida, kg/d	41.1 ^a	42.1 ^a	48.1 ^b	41.9
Condición Corporal, 1-5	2.6 ^a	3.0 ^b	2.6 ^a	3.0 ^b

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

Se ha observado que las respuestas a la aplicación de preparados enzimáticos han sido más relevantes cuando las vacas se encuentran a inicios de lactación. Una ración compuesta por 24% ensilado de maíz, 15% heno de alfalfa y 61% de un concentrado basado en cebada, mejoró la producción de leche en 4 kg/d cuando se suplementó con un complejo de enzimas fibrolíticas (Beauchemin et al., 1998). La eficacia del producto enzimático en este estudio, fue dependiente del método de aplicación, si se tiene en cuenta que la aspersion a la ración total no afectó la producción de leche, mientras que la aplicación al concentrado sí lo hizo (4 kg/d).

Kung et al. (2000), en un experimento donde se roció una mezcla de henos de maíz y alfalfa con un complejo enzimático líquido (con actividades celulasa y xilanasas) justo antes de la oferta y de combinarse con el concentrado en una ración 50% forraje:50% concentrado para vacas lecheras, lograron aumentar la producción diaria de leche en el tratamiento con una actividad enzimática intermedia, en 2.5 kg/d con respecto al 'control' (39.5 vs. 37.0 kg/d); cuando la actividad enzimática de los productos añadidos resultó demasiado alta (8800 unidades de carboximetilcelulasa y 40000 unidades de xilanasas), la producción de leche disminuyó a 36.2 kg/d como promedio, así como se vieron afectados también las producciones de proteína y grasa de la leche. Esta tendencia cuadrática ha sido encontrada por otros autores (Beauchemin et al., 1995; Sánchez et al., 1996). No obstante, en el segundo año de este experimento, al sustituirse el complejo enzimático empleado en el tratamiento de mayor actividad enzimática por un nuevo preparado enzimático alternativo, las vacas que lo recibieron aumentaron su producción de leche de manera significativa con relación al 'control' y con una tendencia numérica al compararse con el tratamiento intermedio, sin afectarse las concentraciones de proteína o grasa.

Digestibilidad de nutrientes in vivo y/o in vitro

Los efectos de la aplicación de enzimas fibrolíticas sobre la digestibilidad de los nutrientes han sido abordados en una serie de estudios tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro* con vacas lecheras.

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

había sido deshidratado, la digestibilidad de la MS se vio incrementada en un 2.9% (Beauchemin y Rode, 1996).

La aplicación directa de enzimas en el ambiente ruminal ha tenido una menor repercusión desde el punto de vista productivo que la aplicación al alimento antes de ser suministrado a los animales. Treacher et al. (1996) compararon los efectos de rociar la enzima en el forraje con la infusión directa en el rumen a través de una cánula. Las digestibilidades de la MS y la fibra resultaron mayores cuando el preparado fue aplicado al alimento (Tabla 2.4). De hecho, la adición directa en el rumen pudo realmente disminuir la digestibilidad de la MS (Treacher, et al., 1996). Esto implica que al menos para ciertas mezclas enzimáticas, el uso del producto de manera directa sin haberse previamente estabilizado en el alimento, tiene altas posibilidades de provocar poco o ningún beneficio.

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

Tabla 2.4. Digestibilidad de raciones con 45% del alimento tratado con diferentes dosis de enzimas fibrolíticas (MS) (adaptado de Treacher et al.,1996).

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

^{a,b} Medias con letras diferentes en la misma fila difieren ($P < 0.05$).

¹ Proteína pasante.

Knowlton et al. (2002), estudiando los efectos sobre el consumo, la digestibilidad aparente y la excreción de nutrientes en vacas a inicios o final de la lactación que recibían 45 o 61% de forraje, respectivamente, encontraron que la suplementación enzimática del alimento mejoró la ganancia media diaria (GMD) de los animales con respecto a las que recibían la ración 'control', lo cual ocurrió en mayor medida en las vacas que se encontraban a inicios de la lactación; sin embargo, estos efectos no fueron explicados por un incremento en los índices de digestibilidad aparente, la excreción de N y P, o por la retención de estos nutrientes en el tejido corporal.

Por su parte, en la experiencia llevada a cabo por Bowman et al. (2002), se argumenta que los incrementos en el consumo de energía digestible debido a la suplementación enzimática en el concentrado al no usarse para aumentar la producción de leche o su composición, pueden haberse destinado a formar parte de las reservas corporales, lo cual es confirmado por el aumento numérico de los cambios en peso vivo de las vacas en este tratamiento. La falta de respuesta en los parámetros productivos también es atribuida al balance energético positivo en que se encontraban los animales durante el experimento.

El efecto del método de aplicación sobre los procesos digestivos y el comportamiento de vacas a inicios de la lactación ha sido también estudiado por Sutton et al. (2003). Estos autores ensayaron un producto con actividad endoglucanasa y xilanasas, que fue ofertado de tres formas distintas: 1) rociado 1 h antes de la oferta del alimento de la mañana (TMR-E), en una proporción de 2 kg/1000 kg de MS de la ración, 2) en la misma concentración aplicado sólo al concentrado el día antes del suministro a los animales (Conc-E), y 3) infundido directamente en el rumen durante 14 h/d (Rumen-E).

Los autores no encontraron efectos significativos sobre el consumo de alimentos o la producción de leche aunque para ambos indicadores el tratamiento TMR-E fue numéricamente mayor; las digestibilidades de la MS, MO, y los almidones no se afectó por la enzima, mientras que la digestibilidad de la FND resultó menor en TMR-E en el rumen pero mayor a nivel postruminal. En el tracto digestivo total la digestibilidad de la MS, la MO y los almidones resultó mejorada en TMR-E, lo cual no ocurrió con la FND del mismo tratamiento donde las diferencias no fueron significativas. Como consecuencia de la suplementación enzimática, los tiempos de retención del ensilado de paja de maíz utilizado en este estudio, se redujeron a nivel ruminal pero posteriormente se incrementaron en los siguientes compartimentos, lo que hizo que este parámetro no resultara significativo para todo el tracto digestivo.

Como hemos comentado, la digestibilidad postruminal de la FND se vio estimulada en el tratamiento TMR-E, siendo significativamente mayor que los valores obtenidos en Rumen-E. Esta tendencia al cambio del sitio de digestión de la fracción fibrosa al tracto posterior al rumen está en correspondencia con lo encontrado por Beauchemin et al. (1999) quienes argumentan que este efecto refleja la separación rápida de las enzimas de la ración mixta (TMR) en el rumen y su paso al intestino de manera todavía activa; no obstante, si esta explicación pudiera generalizarse, el mismo efecto hubiera sido encontrado en Rumen-E, por lo que no parece haber todavía un criterio unificado con relación a la variabilidad de estas observaciones.

La magnitud de la digestión ruminal es la resultante de efectos conflictivos sobre la capacidad digestiva y el tiempo de retención. Asumiendo que tanto k_1 como k_2 describen el movimiento de las partículas dentro del rumen (Gasa et al. 1991), los tres métodos de aplicación de las enzimas en la experiencia de Sutton et al. (2003) resultarían en una reducción del ritmo de degradación de las partículas largas a partículas cortas (k_2) con una estimulación del ritmo de pasaje de las partículas cortas a través del rumen (k_1). Sobre la base de esta interpretación se calculó que el tiempo medio de retención de las partículas en el rumen se redujo entre 7.1 y 10.4 h debido a los tratamientos enzimáticos. Los autores explican que esta tendencia a la reducción del tiempo de retención estuvo más asociada a una reducción variable en la viscosidad del líquido ruminal que pudo contribuir al incremento del ritmo de paso.

Las raciones basadas en granos de cebada pueden producir altas concentraciones de β -glucanos, los cuales, si son poco utilizados en el rumen pueden obstaculizar la digestión y contrarrestar la absorción de nutrientes en el intestino delgado mediante la alteración del pH, el ritmo de tránsito, la viscosidad de la digesta, la afectación de las enzimas digestivas, o por la interacción con la superficie intestinal. En novillas canuladas, Hristov et al. (2000) estudiaron los efectos digestivos provocados por la adición intraruminal de enzimas fibrolíticas con actividad β -glucanasa a una ración basada en 85.5% grano y 14% de ensilado, ambos de cebada. El uso de las enzimas hizo disminuir el pH ruminal en una relación lineal con respecto a las dosis empleadas (100, 200 ó 400 g) incrementándose también la concentración de N amoniacal, la fracción soluble en el rumen y la degradabilidad efectiva *in situ* de la MS del alimento de una manera cuadrática hasta la segunda dosis (200 g). La digestibilidad aparente de la MS, la PB, y la FND no se afectaron con el tratamiento enzimático, así como tampoco la excreción urinaria de alantoína y ácido úrico, o las concentraciones de glucosa y urea en sangre.

La bajada de pH como consecuencia de la aplicación de las enzimas mostró una fuerte dependencia del tiempo transcurrido después de la administración del producto; el efecto fue mayor a las 2 h después de la suplementación, observándose una interacción entre el tratamiento y el tiempo de muestreo como resultado quizás de una fermentación más rápida de los carbohidratos liberados con los mayores niveles de enzima, lo cual pudiera estar incidiendo a su vez en las diferencias entre los tratamientos en cuanto a la producción de acetato, el crecimiento microbiano, y las subsiguientes actividades enzimáticas durante el tiempo.

La liberación rápida de carbohidratos disponibles en el rumen como resultado de la suplementación enzimática puede ser ventajoso para el crecimiento microbiano (Khalili y Huhtanen, 1991) pero pudiera inhibir la digestión ruminal de la fibra (Robinson et al., 1987; Bines et al., 1988; Martin y Michalet-Doreau, 1996). En el ensayo de Hristov et al. (2000) se observó un aumento de la degradabilidad efectiva *in situ* de la MS de 10.5 a 15.6%.

Yang et al. (2002) trabajaron en condiciones *in vitro* en un sistema de doble flujo continuo para investigar los efectos de la adición de enzimas fibrolíticas y el pH sobre los parámetros fermentativos, la digestibilidad y la síntesis de proteína microbiana en una ración para vacas lecheras. La concentración total de AGV así como sus proporciones molares se incrementaron linealmente con el aumento del pH en los fermentadores, afectándose a su vez las degradabilidades de la MS, la MO, la fibra y no la degradabilidad de la PB. La suplementación enzimática no afectó la concentración total de AGV, pero sí incrementó las proporciones molares de acetato y redujo las de propionato, como resultado de una mejora de la digestión de FND y FAD, sin alterarse, sin embargo, la degradación de la PB y la síntesis de proteína microbiana por la suplementación enzimática a la ración; se obtuvo además una interacción significativa entre el pH ruminal y la suplementación con enzimas fibrolíticas lo que provocó que el incremento en la digestibilidad de la FND debido al efecto del producto fuera menor (8%) cuando los fermentadores mantuvieron un pH de 5.6 comparado a cuando fue de 6.0 (18%); este resultado indica que la efectividad de las enzimas puede ser reducida en condiciones de bajo pH ruminal. En consonancia con estos resultados, Calsamiglia et al. (2002) encontraron disminuciones en los porcentajes de digestibilidad de la FND en fermentadores desde 53.8 hasta 34.3% cuando se disminuyó el pH de 6.4 a 5.7 en raciones que contenían heno de alfalfa y concentrado.

2.3.1.3.c. *Bovino de cebo*

Comportamiento productivo

Hace aproximadamente cuarenta años, varios estudios mostraron diferencias significativas en la mejora de la GMD y el índice de conversión de los alimentos en el ganado vacuno, mediante la suplementación de la ración con aditivos enzimáticos que presentaban actividad amilolítica, proteolítica y celulolítica (Burroughs et al., 1960; Rovics y Ely, 1962; Perry et al., 1966).

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

Nelson y Damon (1960) demostraron incrementos en la ganancia de peso en el rango de 6.8-24.0% y mejoras en la eficiencia de utilización del alimento (6.0-21.2%) con relación a los animales 'control', cuando se suplementó una dieta compuesta por maíz molido, ensilado de avena, ensilado de maíz y heno de alfalfa con un coctel enzimático que presentaba actividades amilolítica, proteolítica y celulolítica (Agrozyme[®], Merck Sharp and Dohme Research Laboratories). Estos autores obtuvieron durante ese mismo año un incremento en la GMD en niveles del 14% en bovinos en crecimiento alimentados con heno de maíz-alfalfa, y suplementados con una combinación de cuatro preparados enzimáticos diferentes (Agrozyme, Zymo-Pabsto, Rhozyme[®] y Takamine[®]; Merck and Company, Rahway, New Jersey).

El nivel óptimo de adición de enzimas depende del sustrato, lo cual indica la necesidad de determinar los ritmos de aplicación óptimos de cada preparado para sustratos o alimentos específicos (Beauchemin et al., 1995). Por ejemplo, con heno de alfalfa, en ganado en crecimiento, la GMD se incrementó con los menores niveles de enzima, pero no con los más altos (Tabla 2.5), incrementándose la GMD en un 30% por la adición de la enzima en una cantidad cuatro veces superior al nivel más bajo (4×). Para el heno de fleo, las enzimas adicionadas al nivel más alto (16×) mejoraron la GMD en un 36% debido principalmente al incremento en un 17% de la digestibilidad de la fibra.

Algunos estudios (Beauchemin et al., 1995; Tabla 2.5), han demostrado una respuesta cuadrática a la suplementación con enzimas observándose que esta práctica puede causar respuestas reducidas o incluso negativas en el ganado bovino de cebo. Sin embargo, esto por

lo general ocurre cuando se suministran niveles demasiado altos y muy por encima de lo económicamente justificable.

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

Tabla 2.5. Efectos de diferentes niveles de enzimas fibrolíticas aplicadas como aditivos a heno de alfalfa, heno de fleo, y ensilado de cebada en la ración de vacunos de engorde (adaptado de Beauchemin et al., 1995).

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

^{a,b} Medias con diferentes letras dentro de una misma columna difieren a ($P < 0.05$).

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

Con una preparación enzimática similar se elevó el valor nutritivo de las raciones cuando el preparado enzimático fue rociado en el ensilado justo antes de suministrárselo a los animales, necesitándose en este caso altos niveles de enzima para poder lograr una convincente relación dosis-respuesta que provocara los valores de GMD y consumo de MS observados (Tabla 2.6).

Tabla 2.6. Efectos de la suplementación con enzimas fibrolíticas al ensilado de maíz en ganado vacuno (adaptado de Beauchemin y Rode, 1996).

	Nivel de enzima ($\times 1$)			
	0	15 \times	22.5 \times	30 \times
GMD, kg/d	1.06	1.07	1.12	1.23
% del Control	100	101	106	116
MSI, kg/d	6.6	6.3	6.3	6.2
% del Control	100	95	95	94
Conversión, kg MSI/kg	6.22	5.88	5.63	5.05
% del Control	100	95	91	81

En un experimento con toros British mestizos en crecimiento y cebo, Zobell et al. (2000) no encontraron variaciones en la GMD, la MSI, la eficiencia de utilización de los alimentos (EF) o las características de la canal, como resultado de la adición de enzimas fibrolíticas con actividades endoglucanasas y xilanasas, no obstante haberse observado una tendencia a mejorar la EF durante los primeros 28 días de crecimiento en los animales que recibieron las enzimas. Estos autores concluyen que la suplementación con enzimas de este tipo, y en las condiciones en que se desarrolló el experimento, no mejoraron los parámetros productivos de los animales en crecimiento-cebo de esta raza, pudiendo ejercer un efecto beneficioso sobre la EF en la fase inicial de adaptación de los toros a la ración de crecimiento (65:35, relación forraje:concentrado).

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

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

Digestibilidad de nutrientes in vivo y/o in vitro

Lewis et al. (1996) desarrollaron un experimento con 5 toros canulados en un diseño cuadrado latino (5 X 5), para evaluar los efectos sobre la digestión ruminal cuando se añadía una solución enzimática con actividades celulasa y xilanas a una ración forrajera (70:30) en diferentes momentos con relación a la oferta y proporciones (forraje o concentrado). De esta manera, el preparado enzimático se aplicó (1.65 mL/kg de MS del forraje) al forraje 24 h antes de la alimentación (F-24), al forraje en el momento de la alimentación (F-0), a la cebada en el momento de la alimentación (B-0), y un tratamiento en el que se infundía la enzima directamente en el rumen 2 h después de la alimentación (RI). Los consumos de materia seca y FND no resultaron diferentes a lo largo del experimento; el pH ruminal fue menor, mientras que la concentración de AGV totales a las 16 h después de la alimentación resultó mayor, para los toros suplementados con enzimas al compararse con los de la ración 'control'. El ritmo de desaparición de la FND aumentó para el forraje tratado, mientras que para el tratamiento que empleó la infusión ruminal se produjo una menor desaparición de la MS a las 8 y 32 h, de la FND a las 32 h, y de la MS y la FND a las 96 h, al compararse con F-24 y F-0; por otra parte, el ritmo de desaparición de la MS fue mayor para los toros del tratamiento B-0 que para el F-0 y F-24. Las digestibilidades de la MS, la FND y la FAD fueron mayores para los tratamientos F-24 y F-0 con relación al *control*. La concentración de N-NH₃ no se afectó por la aplicación de las enzimas en ninguno de los tratamientos estudiados. El tiempo de tránsito del forraje por el rumen resultó menor y el ritmo de desaparición de la MS mayor,

para el tratamiento B-0 probablemente como resultado de una mayor y más rápida disponibilidad de energía adicional en la incubación para el crecimiento microbiano.

Al parecer, las enzimas no fueron tan eficientes al ser infundidas en el rumen con relación a la aplicación directa en el forraje. Según los autores, es muy posible que las enzimas fueran digeridas o que la solución enzimática permaneciera suspendida en la fracción del líquido ruminal, lo que le permitiría pasar el rumen antes de lograr el contacto necesario con las partículas del forraje para la hidrólisis si se considera que el líquido ruminal pasa este compartimiento a un ritmo mayor que las partículas sólidas (Owens y Goetsch, 1988).

Con relación al pH ruminal, Mould y Ørskov (1983) indicaron que la actividad de los microorganismos celulolíticos se inhibe significativamente a pH por debajo de 6.1, lo que hace que las condiciones para la digestión de la fibra no sean las más adecuadas. Sin embargo, Sheperd y Kung (1994), encontraron que los preparados de enzimas celulasa-hemicelulasa presentaban actividades fibrolíticas óptimas a pH tan bajos como 4.5; si esto es así, las enzimas fibrolíticas exógenas pudieran servir además para minimizar las depresiones en la digestión de la fibra durante los períodos de pH ruminal bajo (inicios de lactación, dietas demasiado concentradas, etc.).

McHan (1986) comprobó que la fermentación ruminal *in vitro* de ensilados tratados con enzimas incrementó la concentración de AGV específicos pero no la concentración total, mientras que Feng et al. (1996) no encontraron efectos sobre los porcentajes molares o la concentración total de AGV cuando aplicaron las enzimas directamente al alimento.

La mejora de los ritmos de desaparición de la MS y la FND a las 32 h de incubación puede haber sido el resultado de un estímulo en la colonización y digestión por parte de los microorganismos de la fracción fibrosa lentamente degradable (Lewis et al., 1996).

Stokes et al. (1987) y Feng et al. (1996) han encontrado también ritmos más rápidos de desaparición de la FND en raciones tratadas con enzimas fibrolíticas directamente al ensilado de una mezcla de gramíneas y leguminosas o a un heno seco de gramíneas, respectivamente.

2.3.1.3.d. Ovinos y caprinos

Comportamiento productivo

Las referencias disponibles hasta el momento de la redacción de este trabajo, contienen relativamente pocos resultados sobre la suplementación con enzimas fibrolíticas en los pequeños rumiantes, y específicamente en las especies de ovinos y caprinos.

En la década de los años 60 se demostró que la alimentación de una mezcla de enzimas amilolíticas, celulolíticas y proteolíticas (Agrozyme[®]; 1.5, 3 y 6g/d), así como una potente

enzima proteolítica (Ficin[®], Merck and Company; 5, 10 y 20 g/d), no afectaron la conversión o GMD de corderos en cebo alimentados con una mezcla de maíz molido y heno de alfalfa (Theurer et al., 1963). Recientemente, McAllister et al. (2000) no encontraron efectos sobre el consumo de alimentos o la GMD de corderos debido a la suplementación con enzimas fibrolíticas a raciones basadas en heno de alfalfa o de cebada.

Más recientemente, Titi y Lubbadah (2004), realizaron un estudio para evaluar la suplementación de una mezcla de enzimas celulolíticas a la ración de ovejas (raza Awassi) y cabras (raza Shami) durante los últimos dos meses de preñez y los primeros 60 días de lactación. Los resultados no revelaron efectos sobre el consumo de materia seca de los animales o el peso al nacer de las crías de ambas especies, observándose sin embargo un incremento del peso al destete de las crías y de la producción de leche en los dos casos en que se suplementó con enzimas. Con respecto a la composición de la leche, los porcentajes de grasa y proteína resultaron mayores con la adición de las enzimas en el caso de las ovejas, no así para las cabras que se mantuvieron constantes o similares a los tratamientos sin suplementar; el contenido en sólidos totales de la leche aumentó en ambas especies con el tratamiento enzimático.

Digestibilidad de nutrientes in vivo y/o in vitro

Fredeen y McQueen (1993), encontraron una mejora de 4 unidades porcentuales en la digestibilidad de la MS de un ensilado de alfalfa-fleo, con la aplicación de un preparado enzimático a la ración de ovinos.

Por su parte, en un experimento desarrollado por Pinos-Rodríguez et al. (2002) se comprobó la efectividad de la aplicación directa de enzimas fibrolíticas en alimentos de diferente valor nutritivo, sobre el consumo y digestión de los nutrientes en corderos; en los dos henos evaluados (de alfalfa y de ryegrass) los corderos incrementaron significativamente el consumo de MS, de MO y PB sin afectarse el de la fracción fibrosa (FND y FAD) cuando se suplementaron con enzimas. Asimismo, el heno de alfalfa mejoró la digestibilidad aparente de la PB, la hemicelulosa y la FND al añadirse el producto y en ambos henos el balance de N mejoró con relación al 'control' probablemente por una mayor retención de N en los corderos suplementados. El heno de alfalfa mostró una mayor digestibilidad *in vivo* de la MS, MO, y PB y mayor retención de N, mientras que la digestibilidad de la FND y la hemicelulosa resultaron mayores para el heno de ryegrass, lo cual concuerda con lo demostrado por varios autores en cuanto a la mayor digestibilidad de la fracción fibrosa en gramíneas en relación a las leguminosas debido a que el efecto de llenado en el rumen es menor en las leguminosas

como consecuencia de una mayor fragilidad de las partículas y un menor tiempo de retención (Oba y Allen, 1999). En este estudio se observó también un aumento de las concentraciones de AGV totales en ambos henos con la aplicación de enzimas.

La administración de cultivos de hongos anaeróbicos o sus enzimas con reconocida actividad fibrolítica ha sido también evaluada en experiencias con ovinos (Lee et al., 2000). La aplicación directa al rumen de ovinos de un cultivo de cepas de hongos (*Orpinomyces* KNGF-2) obtenidas de una cabra nativa de Korea, incrementó la digestibilidad de los nutrientes y la retención de N como resultado de un aumento en el número de bacterias y hongos en el rumen y la alteración de los patrones de producción de AGV; las mejoras en los índices de digestibilidad en el tratamiento del cultivo de hongos con relación al control estuvieron en el orden de los 3.78, 3.88, 5.57, 2.02 y 10.63 unidades porcentuales para la MS, la FND, la FAD la hemicelulosa y la celulosa, respectivamente. Las pérdidas de N fecal se redujeron significativamente con el cultivo, observándose además una tendencia a la reducción del N urinario. El pH ruminal fue significativamente afectado por la administración del cultivo de hongos, lo cual es mayoritariamente considerado como un posible modo de acción de estos microorganismos, y, con excepción de las horas 0 y 9 de fermentación, este indicador mostró valores superiores en el tratamiento suplementado con el cultivo de hongos.

2.4. Actividad enzimática de los productos industriales

A pesar de que se conoce que los productos enzimáticos utilizados en la industria de los alimentos para el ganado, más que contener un simple tipo de enzima presentan una mezcla compleja de proteínas con actividades enzimáticas complementarias (Colombatto, 2000; Colombatto et al., 2003a), en términos de rigor científico y factibilidad comparativa, resultará prácticamente imprescindible determinar la actividad enzimática de los preparados comerciales con los que se pretenda trabajar tanto a nivel comercial como de investigación.

La actividad enzimática se estima ya sea mediante la medición en el tiempo de la desaparición de un sustrato definido o la generación de un producto a partir de una reacción química catalizada por una enzima (McAllister et al., 2001). Las actividades de enzimas para uso en la industria de los alimentos son normalmente medidas usando el segundo enfoque, y son expresadas como la cantidad de producto liberado por unidad de tiempo. Esta medición puede ser conducida bajo condiciones estrictamente definidas con respecto a temperatura, pH, ionización, concentración de sustrato y tipo de sustrato (Headon, 1993).

La actividad enzimática puede ser estimada también mediante el uso de sustratos sintéticos, lo cual usualmente consiste en cromóforos ligados a moléculas químicamente

similares al sustrato natural. En este caso, la actividad enzimática se mide como la cantidad de cromóforo liberado (Biely et al., 1985). Los sustratos sintéticos ofrecen uniformidad entre los ensayos, pero son sujeto de crítica en el sentido de que no representan a los sustratos que normalmente se encuentran en los alimentos o materias primas utilizadas para la alimentación del ganado como son los granos de cereales o forrajes. Por otra parte, los ensayos usados para estimar la actividad enzimática no son representativos de las condiciones del tracto digestivo, donde finalmente el nivel y persistencia de la actividad enzimática puede ser más importante (McAllister et al., 2001).

En monogástricos, debido a que la viscosidad de la digesta intestinal está estrechamente correlacionada con el crecimiento y la eficiencia de la alimentación en aves, la medición de la viscosidad ha sido usada como un standard para la estimación del valor biológico de las carbohidrasas exógenas para aves (Sabatier y Fish, 1996). Para los rumiantes, sin embargo, el valor de las enzimas puede ser estimado actualmente de manera más fidedigna, mediante costosos y duraderos experimentos de producción con ganado, lo cual hace poco práctico el “screening” de considerables grupos de productos comerciales (McAllister et al., 2001). Esta carencia de adecuados métodos biológicos para la estimación del valor de las enzimas exógenas, es quizás el mayor impedimento para el desarrollo de productos enzimáticos más eficaces en rumiantes.

Las enzimas requieren de condiciones óptimas para manifestar plenamente su actividad cuando reaccionan con su respectivo sustrato, necesitando tener un contacto constante e ininterrumpido para expresar el máximo de actividad enzimática; esto por lo general se logra cuando la reacción se produce en un medio acuoso, es por ello que el comportamiento de una enzima se reduce o impide cuando el sustrato es insoluble en agua, de ahí que los sólidos secos sean inertes desde el punto de vista enzimático (Uhlig, 1998). En sentido general, si las condiciones de la reacción enzimática no cambian, el rendimiento del producto se doblará cuando haya transcurrido el doble de tiempo, demostrando que las enzimas normalmente trabajan a un ritmo constante. Por otra parte, el ritmo de conversión del sustrato se reducirá cuando la cantidad de sustrato disponible sea insuficiente o la enzima sea inactivada como resultado de un cambio brusco de temperatura o de pH, los cuales representan dos de los principales factores a tener en cuenta para garantizar una actividad enzimática óptima en cualquier producto enzimático. Cada enzima requiere de un valor de pH específico o rango para expresar una actividad óptima. Se conoce además que el comportamiento de las enzimas por lo general se estimula con el aumento de la temperatura del medio, argumentándose que el ritmo de conversión se duplica cuando la temperatura aumenta en 10 °C, lo cual parece ser

real en un rango entre 10 y 40 °C. La temperatura a la cual la inactivación enzimática comienza es característica para cada enzima, considerándose, en el caso de las enzimas utilizadas en la industria, que el rango óptimo para una reacción enzimática dada será aquel en el cual la enzima se mantiene lo suficientemente estable.

En el primer ensayo desarrollado por Colombatto et al. (2004a) se demostró nuevamente el efecto del pH sobre la actividad enzimática de los productos comerciales así como la variabilidad entre ellos en cuanto a magnitud y tendencias, lo cual según los propios autores no es sorprendente debido a las diferentes cepas de origen de los hongos y probablemente de condiciones de crecimiento; así por ejemplo, la actividad xilanasa del Liquicell 2500 en el rango de pH evaluado fue aproximadamente diez veces mayor a la del Depol 40. En todos los casos, sólo la actividad endoglucanasa no pareció verse afectada (sino estimulada) por las condiciones de acidez del ensilado, mientras que las actividades celulasa y xilanasa, disminuyeron a pH por encima de 4.5, tendencia que se manifestó también en la capacidad hidrolítica al comprobarse una mayor liberación de azúcares reductores a medida que el pH resultaba más bajo.

Colombatto et al. (2003b) desarrollaron también una serie de estudios *in vitro* con el objetivo de determinar los efectos de la adición de un producto enzimático comercial (derivado de *Trichoderma reesei*) sobre la hidrólisis y fermentación de la celulosa, el xilano y una mezcla a partes iguales de estos dos sustratos. Al cabo de 20 h de incubación a 20 °C, en ausencia de líquido ruminal, se obtuvo un incremento en la producción de azúcares reductores en el xilano y la mezcla. Cuando se añadió líquido ruminal a la reacción enzimática en otra serie de incubaciones, se demostró que la aplicación de enzimas aumentó, en un promedio del 85%, las actividades xilanasa, endoglucanasa, y β -D-glucosidasa en la fracción líquida hasta las 6 h desde el comienzo de la incubación. En la fracción sólida, las actividades xilanasa y endoglucanasa también fueron incrementadas por la aplicación del producto, indicando un incremento en la actividad fibrolítica debido a los microorganismos ruminales.

En el estudio de Hristov et al. (2000), la administración del complejo enzimático al rumen de novillas incrementó, de forma lineal, las actividades de carboximetilcelulasa (CMCasa) y xilanasa del líquido ruminal y la actividad β -glucanasa con una tendencia cuadrática, además de disminuir la viscosidad del líquido ruminal sin afectar su actividad amilasa. Los elevados niveles de actividad fibrolítica alcanzados en el rumen resultaron en incrementos de las actividades de CMCasa, xilanasa y β -glucanasa a nivel de la digesta duodenal, así como en aumentos de la actividad amilasa y la concentración de azúcares reductores (AR) de una manera cuadrática. La actividad xilanasa de la MS fecal se incrementó linealmente con los

niveles de enzima aplicados. Estos aumentos en las actividades enzimáticas pudieran ser el resultado no sólo de los efectos directos de las enzimas exógenas, sino también del incremento indirecto de la actividad microbiana del rumen a causa de la suplementación. En este sentido, Varel et al. (1993) obtuvieron mayores cantidades de bacterias celulolíticas cuando se añadió un extracto de fermentación de *Aspergillus oryzae* a un medio *in vitro*.

La actividad de CMCasa en el líquido ruminal de vacas en lactación que recibían una ración basada en 70% forraje: 30% concentrado fue de 42 y 44 nmol de AR mL⁻¹min⁻¹ para raciones basadas en heno y ensilado de alfalfa, respectivamente (Hristov et al., 1998a). Martin y Michalet-Doreau (1995) obtuvieron actividades similares de CMCasa en los microorganismos ruminales adheridos a la fracción sólida después de suministrar raciones de sólo heno o 65% heno y 35% grano de cebada.

Debido al posible rápido flujo de los preparados enzimáticos que son aplicados en soluciones acuosas hacia el intestino delgado, las proteínas solubles en agua pudieran escapar de la fermentación ruminal aunque sean susceptibles a la proteólisis (Hristov y Broderick, 1996), por lo que pudiera esperarse una alta actividad enzimática a estos niveles del tracto digestivo cuando las concentraciones de los productos aplicados y la forma de presentación lo permiten. Volden et al. (1998) observaron un rápido (1 h) y comparativamente alto (hasta el 31%) escape ruminal de los aminoácidos suplementados no protegidos en la alimentación de vacas lecheras. No obstante, la actividad enzimática postruminal puede verse afectada o inactivada por el bajo pH del ambiente abomasal (Hristov et al., 1997).

La actividad xilanasa del líquido ruminal con la aplicación de 100 g/d (Hristov et al., 2000) de enzimas a las novillas se incrementó en 32.5 % al compararse con el 'control', pero los aumentos progresivos en dos y cuatro veces de las concentraciones en los niveles del suplemento representaron únicamente un aumento de la actividad xilanasa en 11.3 y 26.9 %, respectivamente. En cambio, dichos incrementos en las concentraciones hicieron que la actividad xilanasa se viera estimulada a nivel duodenal al 104 y 457%, respectivamente, al compararse nuevamente con el 'control' donde no se detectó actividad xilanasa en la digesta de este compartimiento. Estabilidades proteolíticas similarmente altas de las xilanasas exógenas en condiciones *in vitro* han sido también obtenidas por Fontes et al. (1995) y en animales no-rumiantes por Inbarr et al. (1994).

2.4.1. Factores que afectan la efectividad de los productos enzimáticos

La falta de información sobre los productos enzimáticos usados y los métodos de suministro del producto, hacen aun más difícil la comparación entre estudios. Los resultados

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

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

Se ha demostrado que el ritmo de paso y la estabilidad de enzimas exógenas difiere entre los preparados enzimáticos y los tipos de enzimas (Hristov et al., 1998). No todas las enzimas exógenas resultan igualmente efectivas en la digestión de diferentes sustratos, por lo que la actividad enzimática de un mismo preparado parece variar significativamente cuando el sustrato cambia, evidenciándose por consiguiente una influencia determinante de este factor sobre la eficacia de las enzimas fibrolíticas exógenas (Zobell et al., 2000).

Por otra parte, se ha observado que los efectos de enzimas exógenas son maximizados cuando se aplican al forraje seco soluciones enzimáticas acuosas. En estas condiciones se crea un complejo enzima-alimento estable que incrementa su efectividad. Este complejo estable ocurre rápidamente (en horas) y una vez estabilizado en el forraje seco, las enzimas son estables y efectivas durante algunas semanas.

Aún cuando resulta razonable esperar que exista un efecto de la temperatura en el desarrollo del complejo enzima-alimento, no se han observado diferencias en la eficacia cuando las enzimas son aplicadas al grano de cebada seco en un rango de temperaturas de -30 a +35 °C. Sin embargo, McAllister et al. (1999) observaron una mejora lineal para los parámetros de digestión *in vitro* del ensilado de cebada cuando se incrementaba la temperatura. Si esta diferencia se debe al tipo de alimento o a su contenido de humedad no está claro hasta el momento.

Los forrajes y granos procesados son almacenados antes de su suministro a los animales, lo que proporciona una oportunidad ideal para el uso de los productos enzimáticos (Beauchemin et al., 1995). Las enzimas pueden ser aplicadas durante la fabricación del alimento, teniéndose la adecuada precaución para asegurar que la temperatura empleada durante el procesamiento, esté dentro de los rangos aceptables para los preparados enzimáticos en cuestión. Las temperaturas de procesamiento empleadas en los alimentos tratados con enzimas para aves pueden ser adaptables a rumiantes.

Se ha comprobado que es más difícil obtener respuestas positivas en la suplementación enzimática al ensilado de cebada que al heno seco (Beauchemin et al., 1995). Esta carencia de respuesta en el ensilado de cebada pudiera ser debida a la especificidad del sustrato, al método de aplicación del enzima, al tiempo requerido para que la enzima reaccione con el alimento o al contenido de humedad del alimento.

Tal como ha ocurrido en los estudios con enzimas exógenas en raciones forrajeras, los ensayos con raciones a base de cereales han resultado poco menos que contradictorios. Beauchemin y Rode (1996) encontraron que la cebada presentó mayores niveles de fibra y menores niveles de almidón al compararse con el maíz. Así, los preparados enzimáticos con alta actividad xilanas y celulasa pudieran mejorar la calidad nutritiva de la cebada con mayor eficacia que cuando se aplique al maíz. Este estudio resulta de interés debido fundamentalmente a que resalta algunos de los problemas con los que se enfrenta el experimentador cuando estudia los efectos de las enzimas. En primer lugar, se advierte que aunque la cebada contiene altos niveles de xilanos hay también altos niveles de β -glucanos que contribuyen significativamente a la fracción fibrosa. De hecho, es este componente de la cebada el que ha demostrado ser uno de los principales responsables de su pobre valor nutritivo para aves. El polisacárido β -glucano ha sido por ello el objetivo de las enzimas β -glucanasa en las raciones para aves con gran éxito comercial (Annison, 1993). Las xilanas, por su parte, son mucho menos potentes en cebada y son inefectivas en el caso del maíz, el cual contiene bajos niveles de ambos tipos de polisacáridos. En segundo lugar, raras veces los granos de cereales contienen apreciables cantidades de celulosa por lo que no se debe esperar un gran efecto de enzimas celulasa en estas raciones.

Kung et al. (2000) proponen una posible mayor utilidad del empleo de estos complejos enzimáticos en animales en crecimiento con sistemas enzimáticos no desarrollados completamente y donde los líquidos pudieran sobrepasar ("by-pass") el rumen a través de la gotera esofágica; se refieren a resultados publicados por Baran y Kmet (1987) quienes utilizando un aditivo con actividad pectinasa-celulasa, mejoraron la fermentación ruminal en corderos recién destetados pero no en ovinos adultos con una microflora ruminal ya establecida. Por otra parte se señala que no todas las enzimas están sujetas a una degradación extensiva por parte de las proteasas microbianas en el rumen. Cuando las enzimas son aplicadas al alimento justo antes del suministro a los animales, la adhesión de las enzimas al sustrato puede resultar en un cambio conformacional que las hace más resistentes a la proteólisis; este enfoque alienta sobre la posibilidad de estos preparados para mejorar la digestión de los nutrientes, la utilización, la productividad animal y, al mismo tiempo, reducir

los volúmenes de material de residuo fecal de los animales y sus posibles efectos contaminantes. La aspersión de las enzimas en el alimento justo antes del consumo de los animales, pudiera ofrecer además una mayor flexibilidad en el manejo de la alimentación y evitar las interacciones negativas que se producen en el proceso de ensilado con el comportamiento de las enzimas.

Con relación al peso molecular de las enzimas (que es directamente proporcional a la actividad enzimática), Tanaka et al. (1998) argumentaron una hipótesis referida al peso molecular de las celulasas, explicando que a menor peso molecular de éstas sería más fácil el movimiento a través de los pequeños poros que resultan inaccesibles a las enzimas más grandes o de mayor peso, lo cual primeramente resultaría en la disminución de los efectos sinérgicos entre las diferentes enzimas celulasas (p.ej., endoglucanasa y celobiohidrolasa), y finalmente en una disminución de la hidrólisis. El sobretratamiento con enzimas pudiera a su vez resultar en una reducción de la masticación de los forrajes (si son más rápidamente digeribles), con la consecuente disminución de la producción de saliva y por tanto de su papel en el mantenimiento de la capacidad tampón del ambiente ruminal, lo cual indirectamente afectaría la digestibilidad de la fibra y posiblemente la producción de leche.

Por otra parte, Treacher et al. (1996) propusieron que una adhesión excesiva de enzimas sobre el sustrato podría obstaculizar el ataque de la fibra por parte de los microorganismos ruminales, con una posible liberación además de factores antinutricionales (como compuestos fenólicos) debido a las altas concentraciones de enzimas, lo cual afectaría también la digestión microbiana.

Un estudio realizado por Bowman et al. (2002) buscando investigar un complejo enzimático fibrolítico comercial (Promote N.E.T Agribrands Internacional, St. Louis, MO) caracterizado por actividades celulasa y xilanasas, evaluó el efecto de aplicar las enzimas a una u otra porción de la dieta (forraje, concentrado o premezcla) sobre el comportamiento productivo y digestivo de vacas lecheras. Las digestibilidades en el tracto total de la MO, la FND y la FAD aumentaron con relación al tratamiento control cuando se suplementó el preparado enzimático al concentrado entero en la ración mixta total; cuando las enzimas se añadieron a la porción pequeña de la mezcla (4% de la ración total) se evidenció sólo un efecto numérico en los incrementos en digestibilidad; sin embargo, al aplicarse a la premezcla, sólo se observó una estimulación de la síntesis de N microbiano como resultado quizás de una mayor eficiencia general del funcionamiento del rumen. Los efectos no fueron significativos sobre la producción real y composición de la leche y sí sobre la producción de leche corregida, lo cual sería más explicado por la mejora en digestibilidad al no obtenerse un

aumento del consumo. Estos autores aseguran que, de acuerdo con los resultados obtenidos, resulta evidente que la proporción de la ración a la cual se añade el complejo enzimático es decisiva a la hora de esperar una respuesta efectiva.

La aplicación del producto antes del proceso de peletización, parece haber ejercido un efecto negativo sobre la eficacia de las enzimas al no observarse una mejora en los indicadores de digestibilidad en el tracto total. El proceso de peletización en este trabajo incluyó temperaturas superiores a los 90 °C, lo cual puede haber reducido la actividad enzimática tanto antes como después del consumo por el animal; en este sentido, los autores plantean que una solución pudiera ser la aplicación del producto después del proceso de peletización.

Cuando el complejo enzimático se aplicó a la pequeña porción de la premezcla se puede haber estimulado el ritmo de paso a través del rumen sin dar tiempo a que ocurriera el efecto esperado del mecanismo de “liberación lenta” cuando el alimento es digerido, como postulara Beauchemin et al. (1999). Por otra parte, es posible que la aplicación al concentrado de cebada incrementara la digestión mediante el estímulo de la digestibilidad de la cubierta poco digerible de este grano.

2.4.2. Actividad celulasa

La determinación de las actividades celulolíticas de las enzimas es un proceso complicado y determinado básicamente por dos factores: la heterogeneidad física del sustrato y la complejidad de la celulosa en sí misma (Enari y Markkanen, 1977; Ghose, 1987; Wood y Bhat, 1988). Teniendo en cuenta esta información, resulta imposible intentar comparar los diversos resultados que se obtienen a partir de estimaciones que usan diferentes metodologías (Vahjen et al., 1997). En la década de los 80 Wood y Bhat (1988) revisaron y comentaron las ventajas y desventajas de los métodos disponibles para la determinación de la actividad celulasa, argumentando que los problemas a los que se enfrentaban los investigadores eran de diferente naturaleza (p. ej. temperatura, pH, tiempo de reacción, etc.) y que existía un alto número de unidades arbitrarias para expresar la actividad que actualmente continúan siendo usadas por los diferentes productores de enzimas y laboratorios en todo el mundo (Beauchemin, 2003).

De todos los métodos disponibles, los más comunes son los métodos colorimétricos, los cuales se basan en la medición de la cantidad de azúcares reductores liberados durante las reacciones enzimáticas en un sustrato definido (Sabatier y Fish, 1996; Kung, 1996). Entre

estos, los métodos más referidos son el método alcalino del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959) y el método del cobre de Nelson y Somogyi (Nelson, 1944; Somogyi, 1952).

Se ha observado que el método DNS es más rápido, menos tóxico y más conveniente de usar que el método de Nelson-Somogyi (Bailey et al., 1992), especialmente cuando se requiere comparar una cantidad muy grande de muestras (Vahjen et al., 1997). Sin embargo, algunos autores indican que el método DNS es menos sensible que el de Nelson-Somogyi (Mc Cleary, 1992) y esta diversidad de criterios hace que se continúen empleando indistintamente.

2.4.3. Actividad xilanasa

Los métodos disponibles para la determinación de la actividad xilanasa se basan en, a) los procedimientos para la determinación de azúcares reductores, b) los métodos viscosimétricos, y c) los sustratos cromogénicos (McCleary, 1992) siendo los métodos de azúcares reductores los más utilizados.

McCleary (1992) concluyó que los métodos viscosimétricos, que se basan en la disminución de la viscosidad de determinado sustrato como producto de la acción enzimática, tienen ventajas sobre los azúcares reductores cuando se necesita de una mayor sensibilidad y especificidad.

Sin embargo, la principal desventaja de estos métodos es que son consumidores de tiempo y normalmente se pueden analizar una cantidad limitada de muestras por unidad de tiempo (McCleary, 1992).

Los sustratos cromogénicos (Biely et al., 1985; McCleary, 1992; Baiely et al., 1992) son muy específicos y no se afectan por los altos niveles de azúcares reductores en las muestras. Sin embargo, existen limitaciones sobre el control de la química del sustrato que necesitan ser resueltas con medidas de estandarización con sustratos particulares (McCleary, 1992).

La determinación por el sistema xilanolítico se basa generalmente en la liberación de nitrofenol en sustratos artificiales (Baiely et al., 1992).

2.5. La técnica de producción de gas *in vitro* para estimar la fermentabilidad de alimentos para rumiantes

Se puede afirmar que los nutrientes en los rumiantes son requeridos en dos niveles, primero al nivel de la población microbiana en los pre-estómagos y segundo a nivel del metabolismo intermediario (Tamminga y Williams, 1998). En ambos niveles, los nutrientes se requieren para proveer de energía, primeramente en la forma de adenosin-trifosfato (ATP), y

como precursores para la síntesis de grasa, proteína y carbohidratos. Las raciones deberán por tanto estar balanceadas de manera que estén disponibles en ambos niveles las cantidades suficientes de los nutrientes adecuados.

Hace más de dos siglos, y aún antes de comprender la relevancia de los ecosistemas microbianos, se hicieron los primeros intentos para encontrar métodos alternativos de estimación de la calidad de los alimentos mediante el análisis de muestras representativas y se desarrollaron dos sistemas para describir el valor de los componentes orgánicos en los alimentos (Minson, 1998), en términos de su contribución al suministro de energía (1) y de proteína (2) al rumiante. Las principales desventajas de estos dos métodos fue que se desarrollaron independientemente y que son expresados en unidades completamente diferentes.

Actualmente, existen varias metodologías o técnicas para evaluar los forrajes y/o alimentos para el ganado que se usan con mayor o menor frecuencia y que presentan niveles de efectividad y precisión variables para la predicción de los procesos que ocurren en el sistema digestivo de los animales, siendo relativas a sus respectivos principios y procedimientos. El desarrollo y aplicación exitosos de estos sistemas de evaluación de alimentos y las estrategias de alimentación, depende de la capacidad de los alimentos para suministrar los nutrientes requeridos.

Muchos investigadores han intentado desarrollar ensayos biológicos que pudieran ser más indicativos del valor de los preparados enzimáticos para rumiantes. Estos métodos usualmente incluyen la incubación *in vitro* de enzimas y alimentos con contenido ruminal, y la medición de la desaparición del sustrato (p.ej. granos de cereales, paja, heno) representativos de lo que normalmente el animal consume (Forwood et al., 1990; Varel et al., 1993; Hristov et al., 1996b, 1998a). Alternativamente, la cantidad de gas producido por el cultivo mixto puede ser usado como un indicador de la digestión (Iwaasa et al., 1998), contribuyendo a efectuar rápidos “screening” de productos enzimáticos y sus dosis de aplicación (McAllister et al., 2001).

Las restricciones con relación al tiempo y a otras inversiones requeridas *in vivo* (grandes cantidades de alimentos, coste, etc.), han provocado el desarrollo de técnicas *in vitro* que se usan actualmente para la evaluación de alimentos (Givens y Gill, 1998; Minson, 1998; Tamminga y Williams, 1998). Por otra parte, teniendo en cuenta que el valor energético de los alimentos se estima por lo general a partir de la digestibilidad aparente de la MS o de la MO en el tracto total, el desarrollo de las técnicas *in vitro* ha tenido como objetivo la predicción de la digestibilidad *in vivo* (Givens y Gill, 1998).

Dentro de todo el espectro de técnicas *in vivo* e *in vitro* disponibles hasta el momento, la medición de la producción de gas como producto de la fermentación ha aumentado su importancia en la última década (Tamminga y Williams, 1998; Williams, 2000).

La técnica de producción de gas *in vitro* puede suministrar una valiosa información en el conocimiento de la magnitud en que las enzimas exógenas complementan la actividad digestiva de los microorganismos ruminales, a pesar de que como toda técnica *in vitro* existen detalles o limitaciones que habrá que tener en cuenta en el momento de la interpretación de los resultados que se generen. En tal sentido, es preciso conocer que la extrapolación de la información de este proceso a la situación del animal siempre estará limitada por: (i) las variaciones en la composición microbiana entre los inóculos de los diferentes animales donantes, (ii) las diferencias en el crecimiento de las poblaciones microbianas en el sistema *in vitro* con relación a lo que sucede en rumen, y (iii) la acumulación de productos finales de la fermentación que alteran la actividad enzimática del medio. Adicionalmente, estos ensayos no consideran el posible impacto de parámetros biológicos tales como el consumo de alimento, el ritmo de pasaje, o la digestión postruminal de los nutrientes (McAllister, 2001).

2.5.1. Efectos de la adición de enzimas fibrolíticas sobre la producción de gas *in vitro* de raciones para rumiantes

Los efectos de la adición de enzimas directamente al forraje justo antes de la incubación, han sido estudiados en experimentos *in vitro* por un buen número de investigadores. Autores como Hunt et al. (1995), Feng et al. (1996) y Colombatto et al. (2003a,b) han obtenido mejoras en la degradación *in vitro* de los sustratos evaluados y han comprobado el potencial de los productos enzimáticos fibrolíticos para mejorar el potencial y las características fermentativas de diversas raciones para rumiantes incluyendo forrajes frescos, secos y ensilados.

En el caso del trabajo de Colombatto et al. (2003a), los valores finales de producción de gas *in vitro* no se afectaron a causa de la suplementación con las enzimas, a pesar de que se incrementara el ritmo inicial de producción de gas, como indicativo de una alteración en el ritmo de fermentación del sustrato, lo cual coincide con lo encontrado por Wallace et al. (2001) y con los mayores niveles de degradabilidad del sustrato antes descritos sobre todo a inicios de la fermentación.

En la experiencia desarrollada por Wallace et al. (2001), donde se evaluó la efectividad de preparados de enzimas fibrolíticas suplementarias sobre el incremento de la digestión de la fibra por parte de los microorganismos ruminales, se obtuvieron incrementos en la producción

de gas en ensilados de maíz y de hierba, pero sólo a concentraciones mucho mayores que las recomendadas por los fabricantes. Según estos autores, si algo quedó claro con los resultados obtenidos es que el incremento de la actividad enzimática en el líquido ruminal aumenta los ritmos de fermentación, aunque a concentraciones de productos que no pueden ser extrapoladas a las condiciones reales en los alimentos, sobre todo por el coste económico que representaría.

Recientemente, Colombatto et al. (2004a, b y c) han llevado a cabo una serie de experiencias con el objetivo de evaluar la efectividad de dos preparados enzimáticos fibrolíticos (Depol 40 y Liquicell 2500) al usarse como aditivos en ensilados de maíz (*Zea mays* L.), comprobando los efectos de la temperatura del ensilado, la fuente de enzimas, la dosis de aplicación, y los efectos de las enzimas sobre los niveles de acidificación, la degradación de la fibra durante el ensilado y la fermentación ruminal, y realizando finalmente una comparación de las enzimas obtenidas de fuentes psicrófilas, mesófilas y termófilas.

Al comparar las fuentes psicrófilas, mesófilas y termófilas de cepas de hongos para producir enzimas válidas a utilizar en la preparación de ensilados como aditivos, Colombatto et al. (2004c) comprobaron que en todos los casos se observó una tendencia a la disminución de los contenidos de fibras de los ensilados, con efectos atribuibles a una posible reducción de la fracción de celulosa; los contenidos de almidón fueron reducidos en los tratamientos que incluían enzimas psicrófilas. Los valores finales de producción de gas (96 h) no difirieron entre los tratamientos, y en el caso de las enzimas psicrófilas se evidenció una disminución del ritmo de fermentación en consonancia con la disminución de la concentración de almidón en este tratamiento. La degradabilidad de la MO hasta las 6 h de incubación fue estimulada con la adición de las enzimas de todos los tratamientos.

Liu y Ørskov (2000) estudiaron los efectos del tratamiento con celulasa sobre las características de la fermentación *in vitro* de paja de arroz sometida previamente a pretratamiento químico. La concentración de carbohidratos solubles se incrementó con el aumento de la dosis de enzimas en la paja tratada mientras que la producción de gas *in vitro* potencial y a las 24 h aumentaron igualmente con la carga enzimática en el tratamiento de paja con enzimas. La digestibilidad de la MO, estimada a partir de la ecuación propuesta por Menke y Steingass (1988), fue mayor en el tratamiento con enzima para la paja de arroz pretratada (48.7 % vs. 54.5 %)

Como se ha indicado en todo lo expuesto anteriormente, la gran mayoría de los resultados, tendencias y conceptos en la temática de la suplementación con enzimas fibrolíticas han sido obtenidos en trabajos desarrollados con ganado vacuno. Poco hay publicado con enzimas en

ovinos y, prácticamente nada que se conozca hasta el momento, en el caso de cabras, por lo que el presente trabajo busca contribuir de alguna manera al estudio de los efectos de las enzimas fibrolíticas en la especie caprina, con la evaluación de una mezcla comercial enzimática de reconocida actividad sobre los compuestos de la pared celular.

2.6. Las cabras y su comportamiento alimenticio

En aras de relacionar de forma integral lo referido sobre la utilización de enzimas fibrolíticas en los sistemas de alimentación animal, y de contribuir a la justificación del interés de desarrollar el presente estudio con la especie caprina, a continuación se aborda una síntesis de algunas de las características particulares del hábito de consumo de las cabras para las condiciones de pastoreo y de confinamiento que pudieran ser determinantes en la asimilación de este tipo de productos .

2.6.1. Aparato digestivo

El aparato digestivo de las cabras es muy similar al del resto de los rumiantes representando del 7 al 8% del peso vivo promedio de un ejemplar adulto de la especie (Church, 1976), aunque se conoce que aproximadamente el 85% de los procesos digestivos ocurren en el rumen, por lo que este constituye el compartimiento más importante. La tabla 2.7 presenta una comparación entre las principales especies rumiantes de interés económico, en cuanto a la proporción relativa de cada uno de los estómagos con respecto a su volumen total, y de todos los intestinos con relación al tracto digestivo total.

Tabla 2.7. Volúmenes de los estómagos relativos a su volumen total y de todos los intestinos con relación al tracto digestivo total en diferentes rumiantes (Adaptado de Tisserand et al., 1991).

Especies	Retículo,%	Rumen,%	Omaso,%	Abomaso,%	Intestinos,%
Ovino	11	62	5	22	51-56
Vacuno	-	64*	25	11	37.7
Caprino					
<i>Saanen</i>	-	84*	4	12	52.6
<i>Angora</i>	9	76	4	11	-

(*) Retículo-rumen

Debe tenerse en consideración, no obstante, que el volumen y peso de los estómagos estará en dependencia de los niveles de consumo de alimento, la composición de la ración y el comportamiento de los animales en la alimentación.

2.6.2. Comportamiento en pastoreo

Uno de los atributos más reconocidos de la especie caprina es su capacidad para desarrollarse y producir en condiciones ambientales adversas donde muy probablemente no pudieran sobrevivir muchos de los rumiantes u otras especies de animales domésticos (Devendra y Burns, 1983; Narjisse, 1991).

En condiciones de pastoreo, el proceso de selección y consumo de la ración de estos animales depende de numerosos factores en interacción entre los cuales intervienen, la raza, las experiencias previas con el pasto en oferta, la disponibilidad y calidad del forraje, además de otros factores referidos a las plantas (p.ej., presencia de factores antinutricionales), al ambiente (temperatura, época del año, precipitaciones, etc.) y a mecanismos adaptativos de índole tanto anatómicos como fisiológicos de los propios animales.

Existen numerosos resultados publicados que comprueban que aunque se reconoce que las cabras seleccionan más las plantas de ramoneo que otro tipo de ganado, durante los períodos de escasez de alimento, ocurren déficits en el balance alimentario que son suplidos mediante un aumento del consumo y la presión de pastoreo de las gramíneas u otros forrajes con mayor accesibilidad o disponibilidad, y mediante la suplementación energética y/o proteica con subproductos de la agroindustria, cereales o concentrados.

En estas condiciones se debe tener presente la importancia clave de la carga animal por unidad de área así como otros aspectos relativos al manejo en pastoreo como son el tiempo de estancia, de reposo y de rotación de las parcelas, el momento óptimo de utilización del forraje y evitar prácticas de sobrepastoreo que puedan conducir a efectos negativos secundarios de degradación ambiental.

2.6.3. Comportamiento en comedero

Cuando el forraje se les suministra a las cabras en el comedero, la comida se divide en tres fases principales (Morand-Fehr, 1991):

1. Una fase de exploración, donde la cabra observa y relaciona el alimento ofrecido.
2. Una fase de consumo intenso de alimento, donde satisfacen la mayor parte de su hambre.

3. Una fase de selección, donde el animal selecciona las fracciones de las plantas a ser ingeridas, recesando con frecuencia para beber agua, lamer los bloques de sal, o también para comer alguna fracción de paja de la cama si ésta es fresca. Este proceso se repite frecuentemente si la cabra intenta balancear su consumo de forraje con la ingestión de agua, sales y carbohidratos estructurales.

Se ha comprobado que la primera fase resulta más corta cuando hay más competencia entre los animales en el comedero o cuando el forraje es homogéneo; por el contrario, resultará más larga cuando los comederos son individuales y el forraje es de poca calidad, especialmente a cortos intervalos entre comidas, o cuando está compuesto por una alta variedad de plantas.

Las comidas sucesivas ocurren por lo general entre 1.5 y 2 horas y su duración promedio unitaria sobrepasa los 15 minutos, aunque este factor resulta altamente variable y dependiente de la calidad del alimento, y el tipo o modo de alimentación. Con raciones basadas en un forraje normal suplementado con concentrado y ofrecidas dos veces por día, el tiempo diario total destinado a comer oscila entre 4 y 7 horas.

2.6.3.1. *Comportamiento selectivo*

Debido a que las cabras presentan un hábito característico de selección de sus alimentos que hace que utilicen eficientemente forrajes de baja calidad nutritiva, es prácticamente idealista forzarlas a que no rechacen una considerable porción de la ración ofertada.

En este sentido, el consumo de alimento puede incrementarse considerablemente si la oferta de alimento en base seca supera en cantidades significativas (hasta 60% del rechazo en pajas o henos de baja calidad) la cantidad real a ingerir; este efecto se acentúa cuando el forraje es de poca calidad.

La especie caprina selecciona las fracciones más nutritivas de los forrajes, las hojas más que los tallos, los tallos tiernos más que los viejos y las fracciones más ricas en proteínas y pobres en carbohidratos estructurales. Sin embargo, este comportamiento selectivo se reduce cuando las proporciones de concentrado aumentan en la ración.

Las consecuencias de este comportamiento en el ganado caprino son importantes para las estrategias de alimentación a base de forraje, cualquiera que sea el sistema de producción. El objetivo principal será entonces obtener la mejor utilización del forraje y por tanto el mayor nivel de consumo de materia seca y, sobre todo, de energía.

2.6.4. Eficiencia de digestión

Varios autores han encontrado una mayor concentración de proteína bacteriana en el rumen de cabras en comparación con el de ovejas, lo cual relacionan a una actividad microbiana más intensa (Tisserand, et al., 1991) y en consonancia con esto, con frecuencia se ha argumentado que las cabras poseen una mayor eficiencia digestiva que los ovinos o los vacunos, especialmente en relación a la utilización de la celulosa. No obstante, esto último ha sido objeto de controversia en los últimos años debido a las incongruencias en los resultados e hipótesis planteadas (Devendra y Burns, 1983; Tolkamp y Brouwer, 1993).

Los resultados que apuntan hacia dicha mayor eficiencia digestiva de las cabras sostienen que el ganado caprino es capaz de digerir en mayor cuantía los componentes fibrosos o estructurales de los forrajes que los vacunos o los ovinos. Esta diferencia se estimula cuando los forrajes son de baja calidad (Devendra y Burns, 1983; Morand-Fehr, 1989; Morand-Fehr y Simiane, 1977; Tisserand, et al., 1991; Trung y Devendra, 1987).

Las evidencias que aporten razones para tales diferencias son escasas, aunque por lo general se relacionan aspectos comparativos de fisiología digestiva como las diferencias en los tractos digestivos (p.ej., menor peso de los compartimentos a similar longitud, 22-43 m, en cabras con respecto a ovinos), posible mayor tiempo de retención de la digesta en cabras que en ovejas, una mayor producción de ácidos grasos volátiles, la observación de que las cabras comen con mayor frecuencia, la habilidad para digerir la celulosa como prueba de una composición más balanceada de microorganismos celulolíticos, las diferencias en los ritmos de salivación (p.ej. 848 vs. 502 ml/d de saliva en cabras vs. ovejas; Seth et al., 1976) bajo el mismo régimen de alimentación y explotación, probablemente debido a una masticación, deglución y rumia más rápidas, y la posible asociación además con diferencias en el reciclaje de urea, lo cual es un factor importante a considerar en el proceso de digestión de la fibra.

Por otra parte, hay otros factores interactuantes concernientes a la fisiología digestiva y la utilización de la fibra como son, el tamaño de partícula, la concentración o proporción de microorganismos celulolíticos, el ritmo de fermentación, la capacidad de absorción, las tasas de recambio de agua y de otros líquidos, el ritmo de pasaje y el tiempo de retención.

Las características antes expuestas, además de otras no mencionadas aquí, hacen de la especie caprina uno de los rumiantes domésticos más peculiares; su singularidad en los hábitos de consumo y de aprovechamiento de una amplia gama de alimentos, es preciso tenerla en cuenta a la hora de interpretar los resultados en investigaciones sobre alternativas de alimentación de la especie.

CAPÍTULO 3
Objetivos Experimentales

CAPÍTULO 3: Objetivos Experimentales

El objetivo general de este trabajo ha sido evaluar los efectos del uso de enzimas fibrolíticas sobre el consumo de alimentos, la digestibilidad y el comportamiento de cabras lecheras Murciano-Granadina a mediados de la lactación. En síntesis, se plantea la evaluación de los efectos de la suplementación con enzimas fibrolíticas en la ración de cabras lecheras mediante el análisis de algunos de los principales indicadores productivos y digestivos *in vivo*, la evaluación de la actividad celulolítica y fermentación en presencia o ausencia de líquido ruminal bajo condiciones *in vitro*, y la discusión integral de los resultados obtenidos con lo publicado en trabajos realizados por otros autores en otras especies de rumiantes y en diversas condiciones experimentales.

El cumplimiento del objetivo general se desarrollará a través de los siguientes objetivos específicos:

- 1) Conocer los efectos de la suplementación con Promote™ sobre la producción y composición de la leche y los cambios en peso vivo y condición corporal de cabras a mediados de lactación.
- 2) Determinar los efectos de la suplementación con Promote™ sobre los indicadores de consumo y digestibilidad del alimento en el tracto digestivo y su relación con el comportamiento productivo.
- 3) Evaluar el potencial de producción de gas *in vitro* y los niveles de degradabilidad de la MS, y los componentes de la pared celular (FND y FAD) en cabras y vacas lecheras, como resultado de la suplementación con diferentes dosis de Promote™ a un rango de relaciones forraje:concentrado en raciones típicas para rumiantes.
- 4) Comprobar, en condiciones *in vitro* y en ausencia de líquido ruminal, el efecto de la variación de algunos factores abióticos (pH, temperatura y dosis de adición) sobre la actividad celulolítica de dos productos comerciales con enzimas fibrolíticas (Promote™ y Cellupract® AL 100).

CAPÍTULO 4

Comportamiento en lactación y digestibilidad de cabras lecheras suplementadas con un preparado de enzimas fibrolíticas en el concentrado

(Productive performance and digestibility of lactating dairy goats supplemented with a fibrolytic enzyme complex in the concentrate)

CAPÍTULO 4. Comportamiento en lactación y digestibilidad de cabras lecheras suplementadas con un preparado de enzimas fibrolíticas en el concentrado

(Productive performance and digestibility of lactating dairy goats supplemented with a fibrolytic enzyme complex in the concentrate)

Abstract

Twenty-four multiparous Murciano-Granadina dairy goats in mid lactation (wk 8 to 30) were used in a single cross-over design to evaluate the effect of supplementation with an exogenous fibrolytic enzyme preparation characterized by cellulase and xylanase activities (Promote™, Agribrands International, St. Louis, MO) on feed intake, milk yield and composition, and live-weight and body condition changes. At the end of the lactation trial (wk 26), eight goats were selected to measure the total tract digestibility from wk 27 to 30 of lactation. Degradability of dry matter (DM) and neutral detergent fiber (NDF), as well as gas production, were also studied *in vitro*. Goats received an ad libitum total mixed ration composed of 65% forage and 35% concentrate to which the enzyme was added. Treatments according to concentrate were: control (CON) (without enzyme) and enzyme (PRO, Promote™, included at 0.47 mL/kg of DM in the concentrate). Feed intake, milk yield, 4% fat corrected milk yield, and milk composition were not affected by enzyme supplementation, although milk casein content tended to decrease in the enzyme diet. Body weight change and body condition score change tended to be higher with the enzyme treatment. Digestibilities of DM (CON, 68.9%; PRO, 71.9%) and organic matter (CON, 70.4%; PRO, 72.9%) were higher or tended to be higher, respectively, with enzyme supplementation, while digestibility of N, NDF and acid detergent fiber (ADF) were not affected with the enzyme. Total tract digestibility results could not be supported by the *in vitro* trial where similar values were observed for DM and NDF degradability and gas production in both diets. Supplementing dairy goat concentrate with Promote™ did not affect lactation performance but enhanced *in vivo* DM and organic matter digestibility.

(Key words: fibrolytic enzymes, dairy goat, milk, digestibility)

4.1. Introduction

Restrictions on the use of feed additives and the availability of new enzyme mixtures for ruminants has led to the use of enzymes in farm animals. Enzyme preparations (concentrated fermentation products) containing high levels of cellulase, hemicellulase, xylanase and pectinase have been used to improve the nutritive quality either of forages, silages or diets in non-ruminant species (Chesson, 1993; Bhat, 2000). Nevertheless, the results of the addition of enzyme preparations to ruminant diets are variable in practice. Although several studies have shown substantial improvements in feed digestibility and animal performance (Beauchemin et al., 1999; Rode et al., 1999; Yang et al., 1999), other researchers reported either negative effects or none at all (Beauchemin et al., 2000; Hristov et al., 2000; Kung et al., 2000). This inconsistency in ruminants could be attributed to differences in diet composition, type of enzyme preparation, complement of enzyme activities, amount of enzyme provided, enzyme stability, method of application, proportion of the diet to which enzymes are added, as well as animal differences (Yang et al., 1999; Beauchemin et al., 2002; Bowman et al., 2002). Beauchemin et al. (2002) concluded that ruminant responses are greatest when fibre digestion is compromised or when energy is the first limiting nutrient in the diet.

Most of experiments with enzymes in ruminants have been conducted in cattle (Burroughs et al., 1960; Feng et al., 1996; Beauchemin et al., 2000; Yang et al., 2000; Bowman et al., 2002) and, to a lesser extent, in sheep (Judkins and Stobart, 1987; Yang et al., 2000; Flores et al., 2002; Pinos-Rodríguez et al., 2002) but, to our knowledge, no or few results have been reported in goats.

The aim of this study was to evaluate the effects of adding to the concentrate an exogenous fibrolytic enzyme preparation, characterized by cellulase and xylanase activities, on feed intake, lactation performance and digestibility of Murciano-Granadina dairy goats during lactation. The *in vivo* results were compared with an *in vitro* degradability and gas production trial.

4.2. Materials and Methods

The experiment was conducted on the Experimental Farm of the SIGCE (Servei de Granges i Camps Experimentals) of the Universitat Autònoma de Barcelona in Bellaterra (Spain). Experimental procedures were approved by the Ethical Committee on Human and Animal Experimentation of the Universitat Autònoma de Barcelona (Reference: CEEAH 01/330).

4.2.1. Lactation Experiment

Twenty-four multiparous Murciano-Granadina dairy goats in mid lactation were distributed into two balanced groups (12 goats per group) according to number of lactation and to milk yield, BW and BCS between wk 8 and 10 of parturition. Goat groups were randomly assigned to two experimental treatments: control and enzyme. Experimental design lasted from wk 11 to 26 and consisted of a single cross-over trial divided into two measurement periods of 42 d each with an adaptation period of 14 d (wk 11 and 12) and an intermediate washing-out period of 14 d (wk 19 and 20). Performance recording between wk 8 and 10 was used as a co-variate. Treatments were: Control (CON, concentrate without enzyme) and Enzyme (PRO, concentrate with Promote™ fibrolytic enzyme preparation, Agribrands International, St Louis, MI).

Goats were group fed with an ad libitum TMR composed of 65% forage (dehydrated mixture of 50% alfalfa and 50% maize-whole plant) and 35% concentrate pellets to which the fibrolytic enzyme preparation was or was not added. Enzyme preparation was added to the entire concentrate trying to maximize the proportion of the diet to which the enzyme was applied according to the conclusions of Bowman et al. (2002). With this aim, the liquid enzyme preparation was sprayed (0.47 mL/kg, volume to weight of concentrate DM basis) in a horizontal mixer onto the cold concentrate pellets, previously manufactured, and represented a dosis of 0.2 mL/kg, volume to weight of TMR DM basis. Diet ingredients and nutritional composition are summarized in Table 4.1 and 4.2. The TMR was offered to each group once daily after milking (1000 h) at 130% of the voluntary intake from the previous day. Fresh water supply was permanently available. The DMI was calculated for each goat group as the difference between the total amount of DM offered and refused daily. Samples of the concentrates, forage mixture and orts were separately collected daily and composted in weekly samples which were ground through a 1-mm stainless steel screen and finally composted by period and treatment for analysis.

Table 4. 1. Ingredient composition of the experimental diets.

Ingredient, % as fed	Forage mixture	Concentrate
Maize-whole plant dehydrated	50.0	-
Alfalfa hay dehydrated	50.0	-
Alfalfa meal pellets	-	31.93
Barley meal	-	11.60
Spanish ground corn	-	11.80
Soybean-44 meal	-	20.94
Whole sunflower-seed meal	-	22.40
CaCO ₃	-	1.00
Mineral-vitamin mix ¹	-	0.30
Rovimix E-50 SD ²	-	0.01
Bioplex Zn ³	-	0.02

¹Mineral-vitamin mix was supplied by Agribrands Europe, Barcelona, Spain. The preparation contained 10.5% Ca, 20.0 g/kg Mn, 17.5 g/kg Fe, 15.0 g/kg Zn, 250 mg/kg I, 100 mg/kg Se, 50 mg/kg Co, 3600 kIU/kg of vitamin A, 700 kIU of vitamin D₃, 22000 IU/kg of vitamin E.

²Hoffmann-La Roche Ltd. Vitamins and Fine Chemicals Division (Basel, Switzerland). Contained 50% DL- α -tocopheryl acetate.

³Alltech Ireland Ltd. (Dunboyne, Co. Meath, Ireland). Contained 10% Zn.

Goats were milked once daily (0900 h) in a 12 stall double parallel milking parlour with collecting jars (Westfalia Landtechnik, Granollers, Barcelona) using the normal milking parameters for the breed (42 kPa, 90 pulsation rate, and 60% pulsation ratio) as Peris et al. (1996) indicated. Milk production was recorded weekly for each goat throughout the experiment. One milk sample per goat were collected biweekly and preserved with potassium dichromate for analysis on the same day with two replicates per goat. Goats BW and BCS (on a scale of 1 to 5, according to Hervieu et al., 1991) were recorded weekly, beginning at wk 15 of lactation.

Table 4.2. Chemical composition and nutritive value of feeds used in the experimental diets.

Item	Forage mixture	Concentrates		TMR	
		CON	PRO ¹	CON	PRO
DM content, %	92.66	90.79	90.83	92.01	92.02
Composition, g/kg DM					
OM	915	904	902	911	910
CP	111	237.6	245.9	155.9	158.8
Crude Fiber	309	188	163	267	258
NDF	515	27.5	27.4	43.1	431
ADF	303	168	176	256	259
NE _L , Mcal/kg DM ²	1.36	1.51	1.51	1.41	1.41
Ca, g/kg DM ²	13.8	11.3	11.3	12.9	12.9
P, g/kg DM ²	3.0	5.0	5.0	3.7	3.7

¹Fibrolytic enzyme mixture (Promote, Promote Technologies Group, Agribrands, Minnetonka, MN) applied by spraying onto the concentrate at 0.47 g/kg MS.

²Estimated from INRA tables (Jarrige, 1989).

4.2.2. Digestibility Experiment

Eight goats (four per treatment), with the closest BW, milk yield and composition to the group average, were selected at the end of the lactation experiment (wk 26), in order to measure the total tract digestibility. Goats were housed in individual collection crates from wk 27 to 30 of lactation, with the first two weeks for adaptation and the last week as the collection period, and milked in the crates by using a portable milking apparatus (Westfalia Landtechnik, Granollers, Barcelona) fitted in the same way as in the lactation experiment. Diets and feeding procedure were also similar to those used in the lactation experiment.

During the collection week, offered and refused feed were recorded daily to determine feed intake. Samples of diet and orts were collected daily and composted for each animal. The DM contents of diets and orts were determined by oven drying at 105 °C for 24 h. Total daily feces were collected and weighed and a 10% representative sample per goat was retained. The fecal samples were composted for each animal and stored at -20 °C until analysis.

4.2.3. *In Vitro* Gas Production Experiment

Ruminal fermentation pattern of experimental diets was studied by gas production and DM and NDF disappearance during *in vitro* incubation, following the technique of Theodorou et al. (1994). Representative 1-mm screen ground samples of approximately 800 mg of each TMR, collected during the digestibility experiment, were used as substrate for incubation in duplicate sealed bottles of 110 ml volume, with 80 ml of incubation solution. Duplicate bottles of incubation solution but without substrate were also included as blanks.

Two culled goats from the lactation experiment (1 goat per treatment) were euthanized with sodium pentothal (4 ml i.v., Laboratorios Abbott, Madrid, Spain) before feeding (0730 h); these goats were used as donors of ruminal liquor for the incubations. Total rumen content was removed and equal amounts of cheese-cloth filtered rumen liquor were collected and used for preparation of inoculum solutions at final ruminal liquor to buffer proportion of 1:9. Two incubation series were made using the two inoculum solutions. Bottles were incubated at 39 °C and the pressure of gas produced in each bottle was recorded by means of a manometer with a pressure gauge (Delta OHM, Padua, Italy) after 2, 4, 8, 20, 24, 32 and 48 h of incubation. Pressure readings were converted into volume by using a linear regression previously recorded in the same type of bottles with known air volumes. Gas volume for each incubation time was expressed per unit of incubated substrate DM and obtained data was analysed according to Ørskov and McDonald (1979) considering that nonlinear model fitted to the gas production data. Incubation residues were filtered and analysed for DM and FND disappearance.

4.2.4. Analytical Procedures

Samples of TMR, orts and feces were ground to pass a 1-mm stainless steel screen for analyses of DM and OM according to AOAC (1990). The CP content was calculated after N determination by Kjeldahl method by using a Kjeltac Auto 1030 Analyzer (Tecator, Hogänäs, Sweden). The methods of Van Soest et al. (1991) were used to determine NDF and ADF using the ANKOM²⁰⁰ Fibre Analyser incubator (Ankom Technology, Fainport, NY) adding amylase and sodium sulphite solutions. Milk samples were analysed for total solids, fat, total protein ($N \times 6.38$), true protein, and CN by using near-infrared reflectance spectroscopy analysis (InfraAlyzer 450, Bran+Luebbe SL, Nordersted, Germany) according to Albanell et al. (1999).

4.2.5. Calculations and Statistical Analysis

Energy balance was determined for each goat during the digestibility trial. Net energy for maintenance was calculated by using the specific values calculated by Aguilera et al. (1990) in lactating Granadina dairy goats. Milk energy was calculated as $4\% \text{ FCM (kg)} \times 0.745$ (Mcal/kg). Energy intake was the result of total DMI multiplied by their estimated NE_L content (Jarrige, 1989). The efficiency of energy utilization for milk production was calculated as the ratio of energy output (maintenance and milk) plus the energy retention to NE_L consumed. Energy retention was estimated as $0.91 \times \text{BW change}$ (Aguilera et al., 1990).

Individual data for each goat of milk production and composition, BW change and BCS change, and group data for DMI for each period of the lactation experiment were analyzed by using the PROC MIXED for repeated measurements of SAS (SAS 8.1; SAS Inst. Inc., Cary, NC). The model included the fixed effects of treatment and period, the random effect of goat and the residual error. Performance recording during the pre-experimental period (wk 8 to 10) was used as a co-variate.

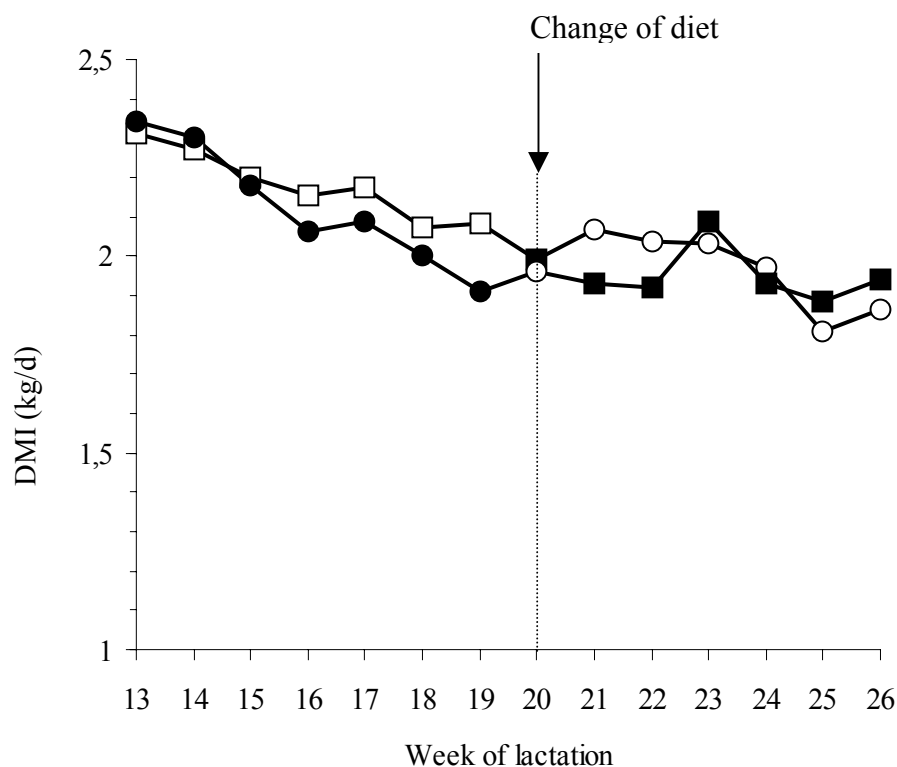
Data of *in vivo* digestibility trial were analyzed by GLM procedure of SAS, while *in vitro* degradability and gas production were analyzed by repeated measurements of SAS analyzing treatment and the inoculum effects. Differences were tested using the PDIFF option and were declared significant at $P < 0.05$; trends were discussed at $P < 0.15$.

4.3. Results and Discussion

4.3.1. Lactation Experiment

Average DMI during the lactation trial was not affected by the enzyme supplementation in the concentrate (Table 4.3). Intake values (4.8% of BW) are similar to those reported at mid lactation with the same breed, milk yield and feeding conditions in dairy goats (Salama et al., 2002ab) and agree with those predicted by INRA (Morand-Fehr and Sauvant, 1989). The lack of any effect of enzyme supplementation on DMI was consistent throughout the experiment including after the switching diet between goat groups (Figure 4.1).

Figure 4.1. Dry matter intake of lactating dairy goats fed a diet supplemented with or without exogenous enzymes. Each point represents the mean of 12 observations (CON, □ and ○; and, PRO, ■ and ●) (SE = 0.041).



This result agrees with other studies in which no differences in DMI were reported in dairy sheep (Flores et al., 2002), beef steers (Feng et al., 1996), heifers (Hristov et al., 2000) or in dairy cows (Beauchemin et al., 1999; Yang et al., 1999; Kung et al., 2000; Bowman et al., 2002) when similar enzyme mixture with cellulase and xylanase activity were added to either

TMR, forage or concentrate. In contrast, other researches have reported a positive effect of enzyme supplementation on DMI of dairy cows (Beauchemin et al., 2000) and feedlot cattle (Burroughs et al., 1960; Beauchemin et al., 1995) but this increase may only lead to higher milk yield in early lactation period because the negative energy balance of this stage (Rode et al., 1999). An increase in DMI was also observed by Pinos-Rodríguez et al. (2002) when fibrolytic enzyme was used in lambs. Differences in DMI among studies could be due to the qualitative differences in the enzyme complex used for each study, or the inherent differences of trial conditions and individual animals.

Actual milk yield and 4% FCM for goats supplemented with enzymes were not different from goats fed with the control diet (Table 4.3 and Figure 4.2) and the average values were slightly lower than those reported by Salama et al. (2002ab) for the same lactation stage. Persistency coefficients were high (96.5% per week) in our case and not affected by enzyme supplementation. These results agree with Beauchemin et al. (1999, 2000) who observed no effect of enzyme supplementation on milk yield, 4% FCM, or SCM in dairy cows. In contrast, others studies have reported that addition of enzymes to the TMR, forage or concentrate, significantly increased milk yield (6 to 10%) without an improvement in milk composition (Rode et al. 1999; Yang et al., 1999; Kung et al., 2000).

In our case, milk composition did not differ between dietary treatments and values were slightly greater than reported by Salama et al. (2002a). Nevertheless, milk CN content was high and tended to decrease as a result of enzyme supplementation ($P < 0.10$).

Enzyme supplementation tended to increase changes of BW ($P < 0.10$) and BCS ($P < 0.15$) during lactation and the effect was more evident in the second half of the experiment (Figure 4.3). On this line, Rode et al. (1999) with a similar enzyme mixture applied to the concentrate of dairy cows stated that increase in ruminal propionate and glucose, as a result of increased post-ruminal digestion, may have stimulated insulin release with the net effect of depressing milk fat synthesis by increasing adipose tissue lipogenesis. These statements are consistent with the numerically lower fat values reported in our experiment (Table 4.3). Moreover, increased growth rate of steers were reported by Burroughs et al. (1960) and Beauchemin et al. (1995) when exogenous enzymes were added to forage diets as a result of the improvement in digestibility.

Table 4.3. Effects of enzyme supplementation on DMI, milk production, and BW and BCS changes of lactating goats.

Item	CON	PRO	SEM	Effect ($P <$)
DMI				
kg/d	2.04	2.00	0.04	0.33
% of BW	4.9	4.7	0.1	0.30
Milk production, l/d				
Actual	1.51	1.53	0.04	0.29
4% FCM ¹	1.78	1.80	0.04	0.54
Milk composition, %				
Total solids	13.99	13.76	0.21	0.39
Fat	5.34	5.16	0.15	0.62
Protein	3.77	3.73	0.10	0.34
True protein	3.54	3.53	0.11	0.39
Casein	2.87	2.81	0.12	0.09
Milk component yield, g/d				
Total solids	210	210	13	0.64
Fat	81	79	11	0.62
Protein	67	67	10	0.58
True protein	52	52	9	0.09
Casein	44	43	9	0.68
FCM/DMI	0.87	0.90	0.02	0.21
BW, kg				
Initial	41.6	41.7	1.4	0.48
Final	41.5	43.6	1.7	0.07
Change	-0.1	1.9	0.4	0.09
BCS, (1 to 5) ²				
Initial	2.34	2.41	0.04	0.12
Final	2.43	2.60	0.12	0.09
Change	0.09	0.19	0.06	0.14

¹Estimated according to equation of Gaines: kg of 4% FCM = $[0.4 + 0.15 \times (\% \text{ fat})] \times \text{kg milk}$.²According to Hervieu et al. (1991).

Figure 4.2. Milk production of lactating dairy goats fed a diet supplemented with or without exogenous enzymes. Each point represents the mean of 12 observations (Milk yield: Actual, — and 4% ECM, -----; CON, □ and ○; and, PRO, ■ and ●) (SE = 0.04 both for actual or 4% ECM).

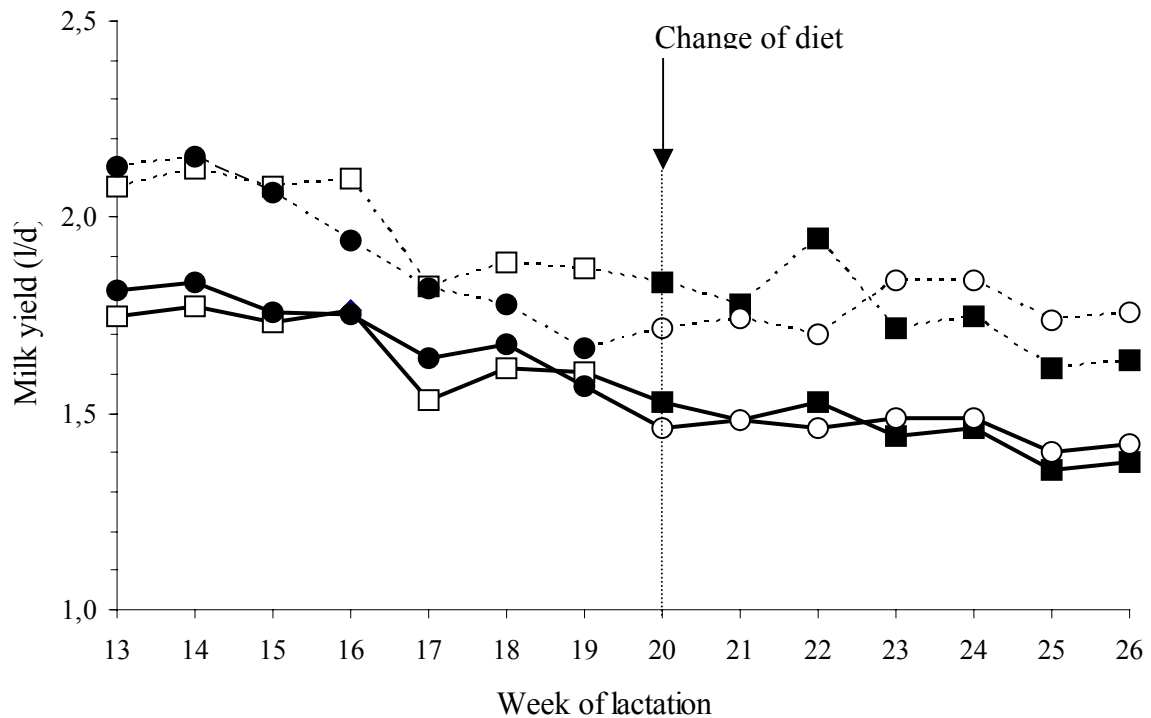
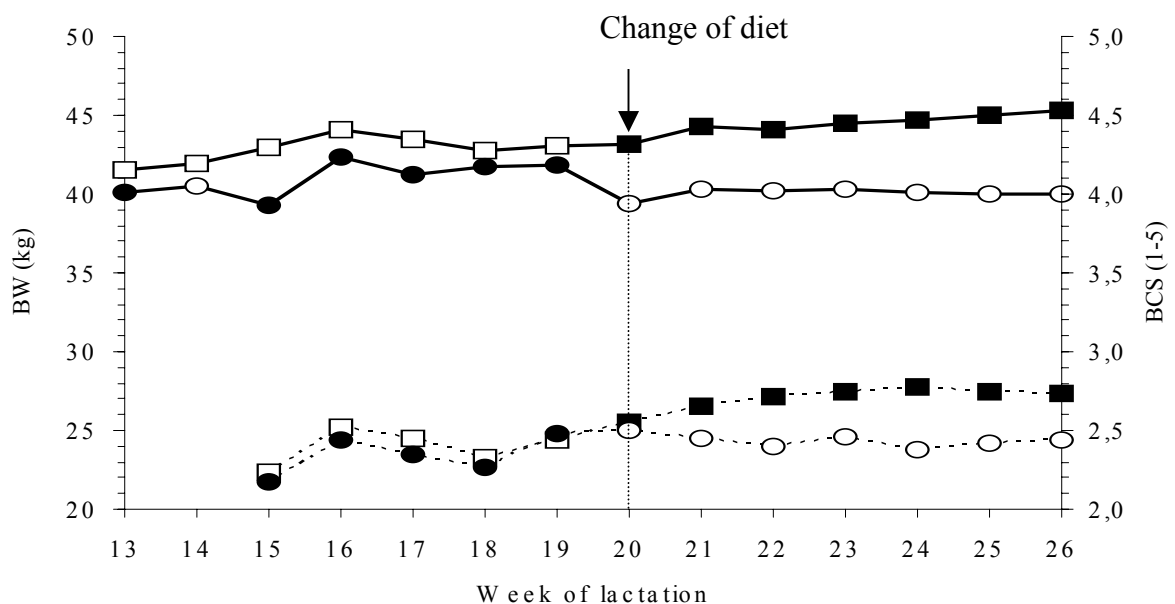


Figura 4.3. Change of body weight (BW, —) and body condition score (BCS, -----) of lactating dairy goats fed a diet with or without exogenous fibrolytic enzymes (CON, □ and ○; and, PRO, ■ and ●; BW: SE = 0.4; BCS: SE = 0.06).



4.3.2. Digestibility Experiment

Although no differences in daily DMI were observed, the enzyme supplemented goats had lower DMI values ($P < 0.05$) when expressed relative to BW or to metabolic BW (Table 4.4). This was a consequence of the difference in the BW of goats produced during the lactation experiment as reported above. Goats of the enzyme supplemented group were approximately 4 kg heavier than 'control' goats and a difference of approximately 40 g DM/d (2.2 g/d/BW $\text{kg}^{0.75}$) over the control group was expected according to the intake prediction of Morand-Fehr and Sauvant (1989). The calculated difference in favor of the 'control' diet was greater than 12 g/d (10%) of DMI relative to metabolic weight and, consequently, a negative effect of the enzyme supplementation on DMI at the end of lactation was considered. This conclusion agrees with the observed trend of DMI during the lactation experiment (Figure 4.1).

Digestibility of DM was significantly higher ($P < 0.05$) for the enzyme supplemented diet than for 'control' diet (Table 4.4) and a similar tendency was observed on OM digestibility ($P < 0.07$). In contrast, CP, crude fiber, ADF and NDF digestibilities were not significantly affected by enzyme supplementation.

Improved total tract DM and OM digestibilities caused by enzyme supplementation ranged between 3 and 12% in other studies reported in dairy cattle (Beauchemin et al., 1999; Rode et al., 1999; Yang et al., 1999). Nevertheless, no differences were observed in digestibilities of ruminal OM (apparent and corrected) and OM entering the intestine (Beauchemin et al., 1999; Yang et al., 1999).

On the contrary, no significant effects of enzyme supplementation on DM and OM total tract digestibilities were noted by Judkins and Stobart (1987) in lambs and Burroughs et al. (1960) or Krause et al. (1998) in fattening cattle.

Yang et al. (2000) tried to support the improvement of DM digestibility observed in dairy cows with two digestion experiments in lambs without significant effects between 'control' and enzyme supplemented diets. They concluded that sheep respond differently to enzyme supplementation than dairy cattle as a consequence of considerable potentially digestible feed escaping rumen digestion due to the relatively short retention time and the low ruminal pH. As DMI relative to BW in our experiment in dairy goats (4.8%) was greater than the values estimated from data of Yang et al. (2000) in dairy cows (3.1%) and in lambs (2.4%), this hypothesis seems to be also applicable to explain the increase in DM and OM digestibilities in our case.

Table 4.4. Effects of enzyme supplementation on intake, digestibility and energy balance of dairy goats.

Item	CON	PRO	SEM	Effect ($P <$)
Animal, no.	4	4		
Feed intake				
kg DM/d	2.177	2.130	0.106	0.77
g DM/d/BW kg	49.90	44.84	1.08	0.02
g DM/d/BW kg ^{0.75}	128	118	3	0.04
Digestibility, %				
DM	68.89	71.89	0.81	0.01
OM	70.37	72.88	0.87	0.07
CP	59.59	63.03	2.20	0.28
NDF	52.59	55.26	1.51	0.25
ADF	46.35	50.46	1.98	0.19
Milk production, L/d				
Actual	1.41	1.35	0.12	0.73
4% FCM	1.69	1.69	0.08	0.97
BW, kg	43.63	47.50	2.21	0.26
Change in BW, g/d	7	17	3	0.20
Energy balance, Mcal/d				
NE _L intake	3.05	3.00	0.15	0.78
Milk energy output ¹	1.26	1.26	0.07	0.95
Maintenance requirement ²	1.48	1.58	0.05	0.25
Energy balance ³	0.32	0.15	0.08	0.17
Energy efficiency ⁴	0.912	0.989	0.027	0.14

¹Estimated from composition.

²Calculated according to Aguilera et al. (1990).

³Energy consumed – energy output for maintenance and milk.

⁴Energy output for milk, gain, and maintenance/energy consumed.

Consistent with our results, no effects of enzyme supplementation in cell wall digestibility were observed by Burroughs et al. (1960) and Hristov et al. (2000) in fattening cattle and heifers, respectively. Moreover, Judkins and Stobart (1987) did not observe differences in

diets consisting of 25% of grain supplemented with two doses of an enzyme preparation in lambs. However, when grain was reduced to 10%, cell wall digestion was greater for the highest enzyme dose. Yang et al. (2000) and Pinos-Rodríguez (2002) also reported non significant effects of enzyme supplementation on NDF and ADF digestibilities in lambs.

Conversely, other studies have reported an increase in NDF and ADF digestibilities with a similar fibrolytic enzyme mixture to the one we used. Beauchemin et al. (1999) and Rode et al. (1999) observed a difference in favor of enzyme supplemented diets for digestibilities of NDF (5 to 20%) and ADF (9.5 to 32%) in early lactation dairy cows. Level of inclusion of enzyme showed a quadratic effect on NDF and ADF digestibilities in dairy cows (Beauchemin et al., 1995, 2000; Yang et al., 1999) so arguing the convenience of using intermediate doses. Fibrolytic enzyme supplementation also improved NDF and ADF digestibilities in other experiences with beef steers fed forage diets (Feng et al., 1996; Beauchemin et al., 1995; Krause et al., 1998).

By another hand, increased digestibility due to enzyme supplementation have translated into increased milk yield (Rode et al. 1999; Yang et al., 1999; Kung et al., 2000) or into increased growth rate in fattening cattle (Burroughs et al., 1960; Beauchemin et al., 1995). In our experience, goats BW and BCS tended to increase with enzyme supplementation as a result of the improved efficiency in energy balance ($P < 0.15$) which is shown in Table 4.4.

4.3.3. *In Vitro* Gas Production Experiment

Cumulative gas production was not affected by enzyme supplementation (Table 4.5). There were no effects either of inoculum or experimental treatments. The disappearance of DM (51.8%) and NDF (37.7%) did not vary for inoculums and diets at 48 h of fermentation. Thus, the improvement in DM digestibilities observed in the *in vivo* experiment could not be confirmed in the *in vitro* conditions. Analogous conclusions were reported by Yang et al. (2000) in a similar experiment comparing *in vitro* and *in vivo* conditions.

Recently, Wallace et al (2001) have demonstrated that *in vitro* gas production in silages were dependent on concentration of the fibrolytic enzyme solution added to the medium. Response in gas production declined from 50 to 4% when concentration of enzyme solution added to the fermentation liquid decreased approximately 10 times (from 0.33 to 0.04 mL/100 ml).

Table 4.5. Effect of fibrolytic enzymes on cumulative gas production, and dry matter or NDF disappearance.

Item	CON	PRO	SEM	Effect ($P <$)	
				Inoculum	Treatment
Gas production ¹					
a + b, ml/100 mg DM	142.4	143.9	0.18	0.34	0.44
c, h ⁻¹	0.056	0.051	0.001	0.28	0.29
DM disappearance, %	52.5	51.1	1.1	0.18	0.20
NDF disappearance, %	39.6	35.7	4.1	0.21	0.32

¹Data analyzed using equation $y = a + b(1 - e^{-ct})$ for time, (a + b) is potential gas production (mL/100 mg dry matter), c is the rate constant of gas production per hour.

Moreover, the lack of response in our *in vitro* experiment may also be a consequence of the static fermentation conditions used, characteristic of the GP technique. This explanation agrees with the previously discussed differences between lambs and dairy cattle digestibility experiments (Yang et al., 2000), in which response to enzyme supplementation was justified by rumen retention and ruminal pH differences.

4.4. Conclusions

Supplementing dairy goat diets with fibrolytic enzyme, under the conditions of this experiment, did not affect lactation performance and enhanced DM and tended to enhance OM digestibility of the diet and energy efficiency in lactating dairy goats. Although concentration of the fibrolytic enzyme mixture may be responsible for the lack of differences between ‘control’ and enzyme supplemented diets, further research is necessary to clarify if the application mode, forage:concentrate ratio or lactation stage are among the main factors of variation.

CAPÍTULO 5

Efectos de la relación forraje:concentrado y la naturaleza del inóculo sobre la fermentación *in vitro* de dietas para rumiantes suplementadas o no con enzimas fibrolíticas

(Effects of forage:concentrate ratio and nature of inoculum on in vitro fermentation of ruminant diets supplemented or not with fibrolytic enzyme)

CAPÍTULO 5: Efectos de la relación forraje:concentrado y la naturaleza del inóculo sobre la fermentación *in vitro* de dietas para rumiantes suplementadas o no con enzimas fibrolíticas

(Effects of forage:concentrate ratio and nature of inoculum on in vitro fermentation of ruminant diets supplemented or not with fibrolytic enzyme)

Abstract

The effectiveness of supplementary fibrolytic enzymes was assessed by *in vitro* fermentation using the cumulative gas production (GP) technique. Four forage:concentrate (F:C) ratios were evaluated, and consisted in high forage (HF), high moderate forage (HMF), low moderate forage (LMF), and low forage (LF) mixed rations. Each diet was incubated by triplicate in two consecutive incubation runs, with two different sources of inoculum (dairy cow, C; or dairy goat, G) and supplemented with PromoteTM (PRO) at two levels each (1 mL/kg of dry matter, PRO-1; and 2 mL/kg of dry matter, PRO-2). GP profiles, and dry matter (DM), neutral detergent fiber (NDF), and acid detergent fiber (ADF) degradations, and fitted curve parameters, were determined. GP kinetic was affected ($P < 0.05$) by F:C ratio (HF < HMF < LMF < LF), and by nature of inoculum (G > C; $P < 0.001$). Responses to enzyme supplementation were positively related to the level of forage proportion in the diet, and also differed ($P < 0.001$) for source of inoculum. GP profiles of LMF and LF diets were not, or were negatively, affected ($P < 0.05$) by enzyme supplementation. DM degradation was higher with goat inoculum ($P < 0.001$) but favorable changes ($P < 0.05$), with enzyme addition, were produced in HF for both inoculum, and for HMF diets in C treatments. NDF and ADF degradation were depressed ($P < 0.05$) by the level of concentrate in the substrates fermented with C, and were not altered, but even enhanced, in G sets. Total VFA in G inoculum increased with concentrate level and enzyme supplementation, being related to the increase of propionate and the depression of acetate to propionate ratios. Furthermore, the addition of enzymes tended to increase ($P < 0.10$) the predicted potential of gas production (A) in HF diet, to improve rate constants (a and b), while lag time (L) was on average reduced. Overall results suggest that increasing starch proportion affects microbial fermentation, and although differences were found between supplemented and unsupplemented diets in fermentation kinetics, no influences were detected in the improvement of cell wall degradation.

(Key words: gas production, fibrolytic enzyme, inoculum, degradation.)

5.1. Introduction

Despite the improvements achieved through forage breeding programs and agronomic advances, forage cell wall digestibility continues to limit the intake of available energy by ruminants, and correspondingly, contributes to excessive nutrient excretion by livestock (Beauchemin et al., 2003). The use of exogenous fibrolytic enzymes holds a promise as an environmental friendly technology alternative, for increasing forage utilization and improving the productive efficiency of ruminants.

Seeing the variety of enzyme products and experimental conditions, the findings of using feed enzymes by ruminants have been variable. Responses observed when enzymes are added to ruminant diets are not due to a single effect, rather, they are the result of a combination of pre- and postfeeding mechanisms (Colombatto et al., 2003), most of which have yet evaluated (Wallace et al., 2001).

Among these factors, it is known and demonstrated that enzyme addition level and forage:concentrate ratio can actually affect the expected effectiveness of commercial exogenous fibrolytic enzyme preparations currently used in livestock feeding. For the enzyme addition level, has been reported either *in vitro* or *in vivo* linear (Wallace et al., 2001) or quadratic responses (Beauchemin et al., 1995; Colombatto et al., 2003) as the dose of enzyme supplementation increases. Whereas for F:C ratio, positive results has been obtained with the supplementation of high fiber fed animals, and/or a negative marked effect of high levels of readily soluble carbohydrates (starch or sugars) in cell wall digestibility (Noziere et al., 1996; Hristov et al., 1999; Fondevila et al., 2002). On the other hand, it has been shown that exogenous enzymes can enhance fiber degradation both *in vitro* and *in vivo* (Feng et al., 1996; Yang et al., 1999) helping to solve this kind of limitation.

Although being yet imperfect for measuring fermentation by rumen microorganisms, the technique of *in vitro* gas production is convenient to use as a first approximation, and it is particularly useful for comparative purposes; measuring the impact of enzymes on rumen fermentation is one of those applications for which it would be expected to be most valid (Wallace et al., 2001).

The objective of the present study was to evaluate the microbial fermentation characteristics of a range of forage:concentrate ratio diets, with two enzyme addition level, by using inocula from the rumen fluid of dairy cows and dairy goats.

5.2. Materials and methods

The evaluation of microbial fermentation of ruminant diets supplemented or not with exogenous fibrolytic enzymes, was carried out by means of the cumulative gas production technique (Theodorou et al., 1994) in the Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

5.2.1. Experimental diets and treatments

Ingredient composition and chemical composition of forages, concentrate and total mixed rations (TMR) used in experimental diets, and traditionally used in ruminant diets in Spanish farms, are shown in Table 5.1 and 5.2, respectively. According to the experimental purpose, diets contained the adequate levels of cell wall components (NDF and ADF) to allow possible activity of a fibrolytic enzyme preparation (PromoteTM, PRO; Agribrands International Inc., St. Louis, Missouri, USA), derived from a fungi strain of *Trichoderma longibrachiatum* with recognized cellulase and xylanase activities. NDF and ADF contents were reduced as the concentrate proportion increased in the diet.

Experimental treatments were planned as the combinations of four forage:concentrate (F:C) ratios, prepared with several rates of a forage mixture (50% alfalfa dehydrated hay, and 50% fescue dehydrated hay), as the main source of effective fiber, and a concentrate, as a source of starch, sugars, and other readily fermentable elements.

Treatments were, i) a representative high forage (HF) diet with a composition of 100% of forage, ii) a representative high moderate forage (HMF) diet composed of 70% forage mixture and 30% concentrate, iii) a representative low moderate forage (LMF) diet composed of 50% forage mixture and 50% concentrate, and iv) a representative low forage (LF) diet composed by 30% forage mixture and 70% concentrate. Simultaneously, treatments were considered 'control' (CON), and PRO-1 or PRO-2, for those diets (irrespective of F:C ratio) unsupplemented or supplemented with two doses (1 or 2 $\mu\text{L/g}$ of DM of substrates) of the fibrolytic enzyme preparation, respectively. Each combination of treatments was replicated for the two sources or nature of inoculum.

Table 5.1. Ingredient composition of the experimental diets.

Ingredient, % as fed	Forage mixture	Concentrate
Fescue dehydrated hay	50.0	-
Alfalfa dehydrated hay	50.0	-
Barley	-	40.49
Corn USA	-	9.00
Gluten feed	-	14.00
Soybean-44 meal	-	11.28
Alfalfa meal	-	17.30
Sugarcane molasses	-	2.15
Fat	-	0.50
By-pass fat	-	1.00
NaHCO ₃	-	1.00
CaCO ₃	-	1.20
CaHPO ₄ ·2H ₂ O	-	1.38
Salt (NaCl)	-	0.50
Microminerals supplement	-	0.20

Table 5.2. Nutritional composition of the feeds used in the experimental diets

Component	Alfalfa hay	Fescue hay	Concentrate	TMR			
				HF	HMF	LMF	LF
DM content, %	90.83	92.08	89.57	91.45	90.89	90.51	90.13
Composition, g/kg DM							
OM	901.2	893.9	913.5	897.5	902.3	905.5	908.7
CP	241.6	180.7	185.6	211.1	203.5	198.4	193.3
NDF	347.8	512.4	185.9	430.1	356.8	308.0	259.2
ADF	279.9	252.3	70.3	266.1	207.4	168.2	129.0

5.2.2. Inoculum preparation, inoculation and incubation

Two multiparous Holstein Friesian dairy cows (C) fitted with a rumen cannula, and two culled Murciano-Granadina dairy goats (G), which were euthanized with sodium pentothal (4 ml i.v., Laboratorios Abbott, Madrid, Spain) after two weeks of adaptation to a 50:50 ratio of forage:concentrate diet, were used as donors of ruminal liquor for the *in vitro* fermentation studies. Similarly, cows were given a daily 50:50 ratio forage:concentrate diet. Equal amounts of rumen content from the donor animals were obtained before the morning feeding (0700) for cows, and at the same time (0700), after euthanasia, for goats; afterwards, the ruminal liquors were pooled and hand squeezed, and immediately transported into pre-warmed thermos flask to the laboratory .

Approximate amounts of 800 mg DM of samples, ground to pass a 1-mm stainless steel screen, were batch incubated at 39°C with 100 ml of incubation solution (90 ml of anaerobic medium, according to Menke and Steingass (1988) added 12 h before inoculation, and 10 ml of squeezed ruminal liquor).

The 125 ml serum flasks were rinsed (distilled water) and dried, and then flushed with CO₂ prior to the addition of incubation solution and at the moment of adding the inoculum in the morning. For each incubation run two additional flasks without substrate were included as blanks, for correction purposes.

5.2.3. Gas measurement, residual substrate

Four replicates per treatments in two incubation runs (for each inoculum source) were used to measure the volume of gas production. Gas reading was performed at 3, 6, 9, 12, 15, 24, 36, 48, 60, 72 and 96 h post-inoculation. The gas measurements were made using a manual pressure transducer HD 8804 (Delta Ohm, Caselle Di Selvazzano, PD, Italy). Pressure readings were taken by inserting the needle, connected to the three-way stopcock, through the stopper by withdrawing the accumulated gas into a flask until the transducer display unit showed zero (equal to ambient pressure) and an estimate of volume of gas produced was made. The gas was discarded and the flasks returned to the bath incubator. The bottles were shaken just after each recording of accumulated pressure and volume.

A sample pool of the final residual per treatment (filtered and after dried at 60°C during 48 h) was used to estimate DM, NDF and ADF degradation at the end of the 96 h fermentation period. DM from the original incubated samples and the residual were determined according

to AOAC (1990) and the methods of Van Soest et al. (1991) were used to determine NDF and ADF using the ANKOM²⁰⁰ Fibre Analyser incubator (Ankom Technology, Fainport, NY) adding amylase solution and sodium sulphite. All analyses were performed by duplicates, and average values were used for calculations.

Gas volumes obtained were corrected for the quantity of DM incubated and gas released from the controls. For each time of reading, a mean value obtained from bottles in the same treatment, as average of the two incubation runs per inoculum source, was used to generate gas production profiles and to estimate gas production parameters.

At the end of 96 h incubations, with goat inoculum treatments, samples for VFA analysis were obtained and prepared as indicated by Jouany (1982). One milliliter of a solution made up of a 0.2% (wt/wt) solution of mercuric chloride, 0.2% (wt/wt) of 4-methylvaleric acid as an internal standard, and 2% (vol/vol) orthophosphoric acid, was added to 4 ml of residual incubation medium fluid and frozen. Samples were centrifuged at $3,000 \times g$ for 30 min, and the supernatant was analyzed by gas chromatography (model 6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using a polyethylene glycol TPA treated capillary column (BP21, SGE, Europe Ltd., UK) at 275 °C in the injector and 29.9 ml/min gas flow rate.

5.2.4. Curve fitting and statistical analysis

The data from cumulative gas production were fitted to the equation proposed by France et al. (1993) in order to estimate the evolution of microbial fermentation:

$$Y = A [1 - \exp\{-b(t - L) - c(\sqrt{t} - \sqrt{L})\}], t \geq L$$

Curve Expert v 1.37 (Hyams, 2001) was used to estimate the parameters where Y denotes cumulative gas production (ml), t is the incubation time (h), A is the asymptote (total predicted gas production; ml), b and c are the rate constants (h^{-1} and $\text{h}^{-1/2}$, respectively), and L is lag phase (h).

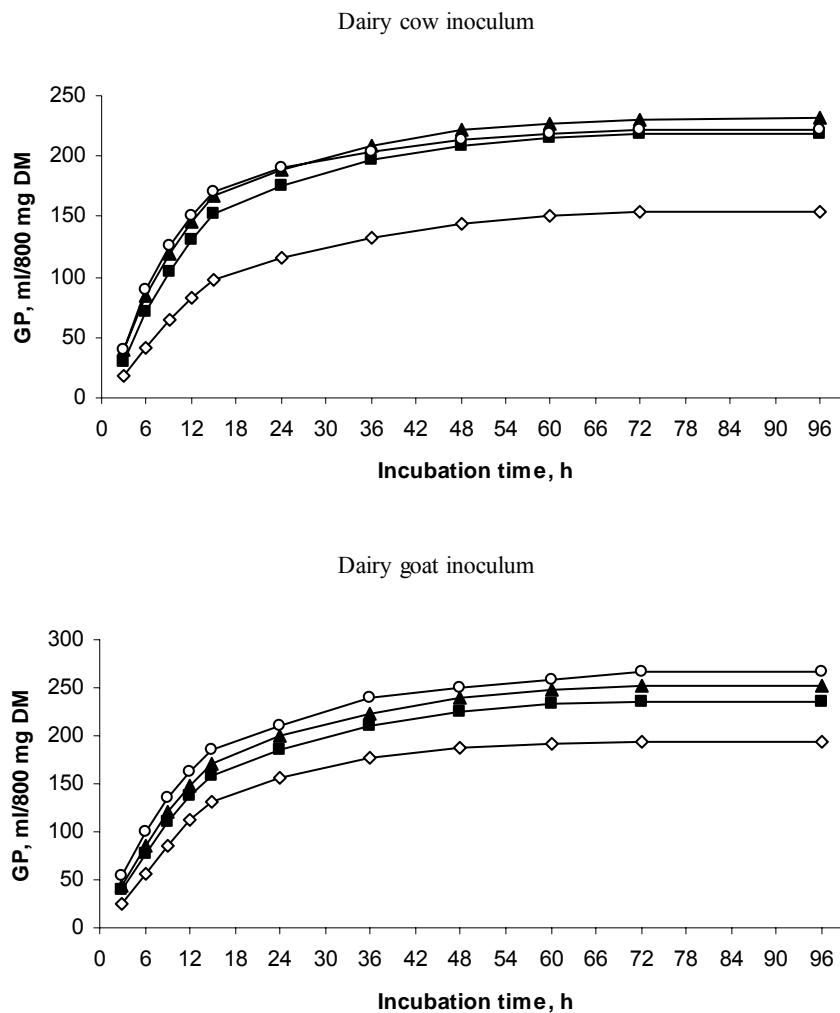
A factorial design was used with a statistical model including forage:concentrate ratio, enzyme dose, and source of inoculum as fixed effects. Data were analyzed using the PROC MIXED procedure of SAS v 8.1 (1999), and nonorthogonal contrasts between source of inoculum, between control and each enzyme dose, and between enzyme doses, were performed. Significance was declared at 5% of probability, and tendencies were discussed at 10% of probability level. Comparisons between means were tested by the LSmeans procedure of SAS.

5.3. Results

5.3.1. Cumulative gas production

Due to GP volumes and to patterns being affected ($P < 0.05$; Figure 5.1) by forage:concentrate ratio, data were analyzed separately for each evaluated diet.

Figure 5.1. Average cumulative gas production kinetic as affected by forage:concentrate ratio (HF (◇); HMF (■); LMF (▲); and LF (○)). Results from the ‘Control’ treatment of each diet (n = 8).



The *in vitro* cumulative GP profiles, as the average result of two 96 h incubation runs with the two sources of inoculum used, are shown in Table 5.3 to 5.6, for experimental diets HF, HMF, LMF, and LF, respectively.

There were high differences ($P < 0.001$) between the two sources of inoculum, with average higher GP volumes for dairy goat inoculum with regard to dairy cow inoculum; these differences were maintained throughout the whole experiment and for all forage:concentrate ratios, with exception of incubation times from 6 to 15 h in diets HMF and LMF (Table 5.4 and 5.5).

When the enzyme supplementation and doses were analyzed, there were significant effects for both inocula. On average, a positive and higher response of enzyme addition was obtained in diets with high proportion of forage (HF and HMF), irrespective of inoculum source; when higher concentrate diets (LMF and LF) were incubated, lower or negative effects by enzyme addition were found in GP profiles.

In HF diet (Table 5.3), fibrolytic enzyme was more effective ($P < 0.05$) at the highest level of addition (PRO-2) for cow inoculum, and no differences were observed between control and low enzyme dose, which was constant throughout the whole fermentation period of this diet.

A different and quadratic response to enzyme addition level was attained for the goat inoculum set, except for the earlier incubation stages (3 to 9 h) where, although an effect ($P < 0.05$) of enzyme addition was found, no differences were detected between PRO-1 and PRO-2. For the incubation runs with G inoculum in this diet, the highest gas volumes were obtained with the lower enzyme level.

An average tendency ($P < 0.10$) was observed for differences between unsupplemented and low enzyme dose treatments, being different according to inoculum source (negative for cows and positive for goats).

On average, when PRO-2 and CON were compared, the highest positive effects ($P < 0.001$) were detected. Differences between PRO-1 and PRO-2 were negligible for extreme incubation stages (3 to 9 h, and 72 to 96 h), and effective ($P < 0.05$) from 12 to 60 h of incubation.

For HMF diet (Table 5.4), fewer differences were obtained for comparison of average GP values between the two sources of inoculum for each incubation time.

Comparing CON and PRO-1 treatments, average GP values had a negative tendency ($P < 0.10$; from 3 to 24 h) or responded negatively ($P < 0.05$; from 36 to 96 h) to enzyme addition. In contrast, average improved fermentation characteristics were observed for CON vs. PRO-2, or PRO-1 vs. PRO-2 comparisons, respectively.

As concentrate proportion increased (diets LMF and LF; Table 5.5 and 5.6), a lower effect of enzyme supplementation on gas production profile was evident for each treatment; a negative average effect ($P < 0.05$) was obtained at the highest enzyme dose when compared to

'control' from 12 up to 96 h of incubation. At highest concentrate diet (LF) no positive effects at all were found with the enzyme addition treatment (Table 5.6), and markedly negative effects ($P < 0.05$) were detected with PRO-2 and dairy goat inoculum.

Table 5.9 shows average total VFA values after 96 h of fermentation with dairy goat inoculum, and molar proportions of acetate, propionate and butyrate for each treatment. Acetate:propionate ratio are also shown.

The total concentrations and propionate proportions showed a typical pattern in response to the increase of concentrate fraction in experimental diets, and, as expected, average total VFA production was higher and acetate proportion were lower as more concentrate was included in the TMR. On average, supplementation with fibrolytic enzymes increased ($P < 0.05$) total VFA concentration when compared to 'control' and this was consistent with an increase of propionate proportion for all supplemented diets; this effect was more evident in HF diet.

In contrast, there were no differences in molar acetate proportion when 'control' and enzyme supplemented treatments were compared for all diets; therefore, average acetate:propionate ratio diminished with enzyme supplementation.

5.3.2. *In vitro* substrate degradation

Consistent with GP patterns, average final *in vitro* degradation of DM, NDF and ADF were greatly affected ($P < 0.001$) by inoculum source ($G > C$) (Table 5.7).

Forage:concentrate ratios were observed to have different effects on average final degradation values; positive effects were detected for DM degradation in HF with high enzyme dosis for both inocula; meanwhile for dairy cow inoculum, quadratic effects were detected in NDF and ADF degradation values for HMF with PRO-1 and PRO-2, and for HMF with PRO-1.

In treatments with dairy goat inoculum, as proportion of concentrate increased, average *in vitro* DM, NDF and ADF degradation also tended to increase ($P < 0.10$), irrespective of enzyme addition dose. In dairy cow inoculum treatments, results showed a different trend, with decreasing degradation values as the proportion of concentrate was increased, with the exception of the quadratic response found for DM degradation; on average, either DM, NDF or ADF degradation values in C treatments were also affected ($P < 0.05$) by enzyme addition and doses (Table 5.7).

Response to enzyme addition dose for DM degradation with cow inoculum, are consistent with final GP patterns in treatments with HF, LMF, and LF diets (Table 5.3, Table, 5.5 and 5.6 vs. Table 5.7), while different patterns were observed in HMF diets (Table 5.4 vs. Table

5.7, respectively), in which inverse quadratic responses were obtained. On the other hand, DM degradation results for goat's inoculum contrast with final GP patterns found with HMF, LMF and LF, and are consistent with final GP patterns in HF diet.

As described above, as more concentrate was included in the diet of G treatments, less effective (or negative) resulted the supplementation with the fibrolytic enzyme preparation in the GP profiles; however, this did not occur with DM degradation pattern where no effects were found by enzyme supplementation (Table 5.4 to 5.6 vs. Table 5.7).

When the effects of enzyme addition and dose were examined for cell wall component (NDF and ADF) degradation results, a high consistency for C inoculum and its diets with the concomitant DM degradation pattern was detected; differences with GP profiles remained for HMF diet. In the case of G inoculum treatments, enzyme addition and its doses, did not alter NDF and ADF degradation values which corresponded to DM degradation tendency for all diets, and differed from final GP value performances; the effect of enzyme addition observed in DM degradation for HF diet was not maintained in NDF or ADF degradation, probably because enzyme addition enhanced fermentation of elements other than cell wall constituents.

A depressed ($P < 0.05$) ADF degradation was found with supplementation of enzyme in the more concentrated diets (LMF and LF) for both inocula.

5.3.3. Fitted curve parameters

The curve parameters obtained, fitted to the equation proposed by France et al (1993), are presented in Table 5.8, with the fractional rates of gas production estimated at 12 and 24 h of incubation.

Consistent with the GP analysis described above, there was an effect ($P < 0.05$) of substrate and enzyme addition on the potential GP predicted by the model (A). More concentrated diets and incubations with goat's inoculum had a higher ($P < 0.05$) GP potential. Effects of enzyme supplementation level were similar to those mentioned before for GP profiles. As average, lag phase (L) results were consistent with differences in fermentation observed between inocula, and, for G inoculum, results tended to be lower as the proportion of concentrate increased, being negatively correlated (data not presented) with the GP values at the earliest (3h) incubation time. Fractional degradation rates either at 12 or 24 h of fermentation, and constant rates b and c proved to be enhanced by the concentrate proportion of the diet in both inocula, and have variable responses to enzyme supplementation, in some cases related to GP and DM degradation profiles.

Table 5.3. Cumulative gas production (ml/g DM) of experimental diets supplemented or not with two dose of Promote™ as a result of 96 h incubation with two sources of inoculum. I. HF.

Incubation time (h)	Treatment ^a								Contrasts			
	Dairy cow				Dairy goat							
	Control	PRO-1	PRO-2	S.E.M.	Control	PRO-1	PRO-2	S.E.M.	C vs. G	0 vs. 1	0 vs. 2	1 vs. 2
3	17.89a	17.00a	21.17b	0.841	25.77a	29.48b	28.56b	0.748	***	†	**	†
6	41.84a	41.93a	47.73b	1.164	55.76a	63.48b	61.77b	1.034	***	†	*	†
9	64.30a	64.89a	71.84b	1.548	85.92a	96.98b	94.19b	1.376	***	†	*	†
12	82.43a	83.71a	91.83b	1.873	111.79a	125.01b	121.38c	1.666	***	†	**	*
15	97.81a	98.99a	107.61b	2.108	131.71a	147.58b	142.82c	1.874	***	†	**	*
24	115.32a	116.70a	126.48b	2.535	156.14a	175.95b	169.77c	2.254	***	†	**	*
36	132.03a	131.86a	143.58b	3.120	176.19a	199.72b	192.06c	2.774	***	†	**	*
48	143.82a	141.57a	153.88b	3.893	187.87a	213.84b	205.82c	3.461	***	†	**	*
60	150.24a	144.66ab	158.04ac	4.491	191.57a	219.49b	211.86c	3.993	***	†	*	*
72	153.17a	145.83ab	159.86ac	5.022	192.87a	221.93b	214.01b	4.465	***	†	*	†
96	153.60a	145.83ab	159.86ac	5.165	193.55a	222.68b	214.28b	4.592	***	†	*	†

NS: not significant

^a For two source of inoculum (dairy cow, C; and dairy goat, G), three diet treatments: Control, PRO-1, PRO-2: Promote™ added or not (0, control) at 1 and 2 ml/kg DM of diet, respectively.

† $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. a, b, c: Within rows and source of inoculum, and for each incubation time, means with different letters differ at $P < 0.05$

Table 5.4. Cumulative gas production (ml/g DM) of experimental diets supplemented or not with two doses of Promote™ as a result of 96 h incubation with two sources of inoculum. II. HMF.

Incubation time (h)	Treatment ^a								Contrasts			
	Dairy cow				Dairy goat				C vs. G	0 vs. 1	0 vs. 2	1 vs. 2
	Control	PRO-1	PRO-2	S.E.M.	Control	PRO-1	PRO-2	S.E.M.				
3	30.44a	38.77b	34.92c	0.923	39.08	38.77	39.37	0.754	***	†	†	†
6	71.34a	71.53a	76.91b	1.404	76.82a	73.60b	77.17a	1.147	NS	†	†	†
9	103.95a	103.53a	110.19b	1.626	110.01a	105.82b	110.10a	1.327	NS	†	†	*
12	130.02a	128.93a	136.55b	1.770	136.87a	132.39b	136.73a	1.445	NS	†	†	*
15	151.65a	150.04a	158.97b	1.801	158.35a	154.22b	159.27a	1.471	NS	†	†	*
24	175.43a	170.44a	182.32b	2.076	186.08a	181.03b	186.84a	1.695	***	†	†	*
36	196.42a	188.47b	201.49c	2.573	209.47a	203.26b	210.38a	2.101	***	*	†	*
48	208.65a	202.29ab	214.70ac	3.101	224.68a	216.58b	226.36a	2.532	***	**	†	*
60	214.97a	208.49ab	221.60ac	3.614	232.64a	222.02b	233.64a	2.951	***	*	†	*
72	219.11a	212.80ab	226.94ac	4.015	235.72a	224.71b	235.39a	3.278	*	**	†	†
96	219.11a	212.80ab	227.15ac	5.165	236.13a	224.71b	235.39a	4.592	*	*	†	†

NS: not significant

^a For two source of inoculum (dairy cow, C; and dairy goat, G), three diet treatments: Control, PRO-1, PRO-2: Promote™ added or not (0, control) at 1 and 2 ml/kg DM of diet, respectively. † $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

a, b, c: Within rows and source of inoculum, and for each incubation time, means with different letters differ at $P < 0.05$

Table 5.5. Cumulative gas production (ml/g DM) of experimental diets supplemented or not with two doses of Promote™ as a result of 96 h incubation with two sources of inoculum. III. LMF.

Incubation time (h)	Treatment ^a								Contrasts			
	Dairy cow				Dairy goat				C vs. G	0 vs. 1	0 vs. 2	1 vs. 2
	Control	PRO-1	PRO-2	S.E.M.	Control	PRO-1	PRO-2	S.E.M.				
3	39.05	38.33	39.86	0.709	43.05	45.77	45.97	0.582	***	NS	NS	NS
6	84.13a	86.59b	87.89b	1.040	85.48a	87.07b	89.09c	0.854	NS	*	NS	NS
9	118.80	121.95	119.91	2.182	119.87a	120.96a	114.48b	1.790	NS	NS	NS	†
12	145.55a	149.17ab	144.54ac	2.056	148.29a	145.25ab	142.67b	1.686	NS	NS	*	†
15	166.53a	170.57ab	164.20ac	2.186	171.30a	166.82b	165.40b	1.793	NS	†	†	†
24	188.41a	192.55a	182.99b	2.533	199.30a	193.54b	192.45b	2.078	*	†	*	NS
36	208.08a	212.10a	198.63b	3.015	223.55a	216.89b	214.29b	2.473	***	†	*	†
48	221.33a	223.51a	208.22b	3.659	239.37a	233.46ab	228.96b	3.001	***	†	*	†
60	227.35a	228.38a	212.90b	4.446	248.17a	242.48ab	236.65b	3.647	***	†	*	†
72	230.77a	230.86a	215.75b	4.796	251.31a	246.09ab	238.98b	3.933	***	†	*	†
96	231.94a	230.86a	215.75b	4.896	251.93a	246.64ab	239.82b	4.016	***	†	*	†

NS: not significant

^a For two source of inoculum (dairy cow, C; and dairy goat, G), three diet treatments: Control, PRO-1, PRO-2: Promote™ added or not (0, control) at 1 and 2 ml/kg DM of diet, respectively.

† $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

a, b, c: Within rows and source of inoculum, and for each incubation time, means with different letters differ at $P < 0.05$

Table 5.6. Cumulative gas production (ml/g DM) of experimental diets supplemented or not with two doses of Promote™ as a result of 96 h incubation with two sources of inoculum. IV. LF.

Incubation time (h)	Treatment ^a								Contrasts			
	Dairy cow				Dairy goat				C vs. G	0 vs. 1	0 vs. 2	1 vs. 2
	Control	PRO-1	PRO-2	S.E.M.	Control	PRO-1	PRO-2	S.E.M.				
3	39.85a	36.17b	40.95a	1.846	52.67a	53.20a	49.53b	1.795	***	NS	†	†
6	89.30a	84.73b	89.90a	2.164	101.91	99.39	96.85	2.225	**	NS	NS	NS
9	125.03a	119.65b	123.69a	2.852	140.18 a	134.47b	132.75b	2.773	*	NS	NS	NS
12	150.46	146.80	147.40	3.272	171.29a	162.38b	160.74b	3.181	**	†	NS	†
15	170.31	167.41	165.71	4.047	196.47a	186.18b	181.02b	3.935	**	NS	NS	NS
24	190.04	187.83	184.45	4.960	226.32a	210.73b	207.49b	4.822	**	NS	NS	NS
36	204.21	203.67	200.53	6.313	252.11a	238.93b	229.48b	6.138	**	†	NS	NS
48	213.93	215.57	209.75	7.445	270.35a	249.59b	243.72b	7.239	**	NS	NS	†
60	219.21	222.30	215.09	8.218	279.19b	258.09a	251.97b	7.991	**	†	NS	NS
72	221.71	226.03	217.58	8.884	282.05a	266.05b	255.17b	8.639	**	NS	NS	NS
96	221.71	226.38	217.58	9.122	282.65a	267.08b	256.69b	8.870	**	NS	NS	NS

NS: not significant

^a For two source of inoculum (dairy cow, C; and dairy goat, G), three diet treatments: Control, PRO-1, PRO-2: Promote™ added or not (0, control) at 1 and 2 ml/kg DM of diet, respectively.

† $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

a, b, c: Within rows and source of inoculum, and for each incubation time, means with different letters differ at $P < 0.05$

Table 5.7. *In vitro* degradation of dry matter (DMD), neutral detergent fiber (NDFD), and acid detergent fiber (ADF) of experimental diets supplemented or not with two doses of Promote™ as a result of 96 h incubation with two sources of inoculum.

Incubation time (h)	Treatment ^a								Contrasts			
	Dairy cow				Dairy goat				C vs. G	0 vs. 1	0 vs. 2	1 vs. 2
	Control	PRO-1	PRO-2	S.E.M.	Control	PRO-1	PRO-2	S.E.M.				
DMD, g kg ⁻¹												
HF	745.3a	737.1a	773.8b	5.65	785.9	796.1	797.8	5.02	***	*	†	†
HMF	746.2a	766.7b	735.1c	4.20	839.7	841.1	839.2	3.43	***	†	†	†
LMF	750.8a	765.5b	752.5a	6.52	875.5	868.4	873.5	5.35	***	NS	NS	NS
LF	748.8a	707.6b	746.0a	4.86	898.4	891.6	892.8	4.72	***	NS	NS	†
NDFD, g kg ⁻¹ NDF												
HF	603.8a	584.9a	618.3b	8.76	670.9	664.7	668.7	7.79	***	NS	NS	NS
HMF	477.3a	529.6b	449.5c	8.68	685.5	692.0	689.4	7.08	***	*	†	*
LMF	462.9a	467.5a	435.8b	13.03	715.5	708.9	716.0	10.68	***	NS	NS	NS
LF	336.6	311.6	339.9	12.30	733.1	718.6	716.3	12.65	***	†	NS	†
ADFD, g kg ⁻¹ ADF												
HF	524.6a	508.0a	535.2b	10.49	606.6	610.0	619.4	9.33	***	NS	NS	NS
HMF	359.1a	426.7b	321.6c	10.54	631.6	633.2	643.5	8.60	***	NS	*	**
LMF	318.0a	335.0a	297.6b	16.46	663.4	646.7	651.6	13.50	***	NS	NS	NS
LF	208.5	186.4	199.6	15.15	682.0a	655.5b	659.8b	14.73	***	†	†	NS

NS: not significant; ^a For two source of inoculum (dairy cow, C; and dairy goat, G), three diet treatments: Control, PRO-1, PRO-2: Promote™ added or not (0, control) at 1 and 2 ml/kg DM of diet, respectively. † $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ a, b, c: Within rows and source of inoculum, and for each incubation time, means with different letters differ at $P < 0.05$

Table 5.8. Fitted gas production parameters, estimated by using France et al. (1993) equation, from the fermentation of experimental diets supplemented or not with two doses of Promote™ and two sources of inoculum.

Parameter ^a	Treatment ^a								Contrasts			
	Dairy cow				Dairy goat							
	Control	PRO-1	PRO-2	S.E.M.	Control	PRO-1	PRO-2	S.E.M.	C vs. G	0 vs. 1	0 vs. 2	1 vs. 2
A, mL												
HF	156.0a	146.3b	160.7a	4.24	193.2a	222.9b	214.8b	8.86	***	*	†	*
HMF	220.4a	213.8a	228.8b	4.34	238.2a	225.3b	237.5a	4.19	*	†	†	*
LMF	233.6a	231.8a	216.5b	5.43	254.5a	250.5a	241.8b	3.75	**	NS	*	*
LF	221.8	217.9	219.0	2.63	285.8a	270.2ab	259.6a	7.61	**	NS	NS	†
b, h ⁻¹												
HF	0.032	0.058	0.050	0.0077	0.070	0.060	0.056	0.0042	*	*	*	NS
HMF	0.036	0.037	0.030	0.0022	0.040	0.055	0.040	0.0050	*	NS	NS	*
LMF	0.020	0.036	0.026	0.0047	0.034	0.027	0.039	0.0035	*	**	NS	**
LF	0.030	0.018	0.020	0.0037	0.030	0.020	0.020	0.0033	*	*	*	NS
c, h ^{-1/2}												
HF	0.190	0.110	0.140	0.0233	0.037	0.081	0.090	0.0164	**	**	*	NS
HMF	0.238	0.219	0.280	0.0180	0.177	0.110	0.150	0.0195	***	†	*	**
LMF	0.321	0.300	0.370	0.0207	0.212	0.242	0.190	0.0151	**	*	*	*
LF	0.375	0.390	0.420	0.0132	0.237	0.290	0.310	0.0218	**	†	**	NS

NS: not significant; ^a For two source of inoculum (dairy cow, C; and dairy goat, G), three diet treatments: Control, PRO-1, PRO-2: Promote™ added or not (0, control) at 1 and 2 ml/kg DM of diet, respectively. † $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. a, b, c: Within rows and source of inoculum, and for each incubation time, means with different letters differ at $P < 0.05$.

Table 5.8 (Continued)

Parameter ^a	Treatment ^a								Contrasts			
	Dairy cow				Dairy goat				C vs. G	0 vs. 1	0 vs. 2	1 vs. 2
	Control	PRO-1	PRO-2	S.E.M.	Control	PRO-1	PRO-2	S.E.M.				
<i>L</i> , h												
HF	1.83	1.79	1.64	0.058	1.42	1.48	1.52	0.029	**	NS	**	*
HMF	1.77	1.36	1.71	0.128	1.32	1.10	1.24	0.064	***	***	†	**
LMF	1.67	1.70	1.69	0.009	1.36	1.25	1.06	0.088	***	NS	†	†
LF	1.76	1.87	1.72	0.045	1.29	1.28	1.41	0.042	***	NS	*	*
μ at 12 h, %/h												
HF	0.038	0.029	0.033	0.0027	0.019	0.024	0.025	0.0021	**	**	NS	NS
HMF	0.047	0.044	0.054	0.0027	0.038	0.029	0.033	0.0026	***	†	**	*
LMF	0.059	0.058	0.069	0.0033	0.043	0.047	0.040	0.0020	**	NS	†	NS
LF	0.070	0.071	0.076	0.0019	0.046	0.054	0.057	0.0032	**	*	*	NS
μ at 24 h, %/h												
HF	0.054	0.041	0.047	0.0038	0.026	0.035	0.036	0.0030	**	**	**	NS
HMF	0.067	0.063	0.076	0.0039	0.053	0.040	0.047	0.0037	***	NS	**	*
LMF	0.084	0.082	0.097	0.0047	0.060	0.066	0.056	0.0028	***	NS	†	*
LF	0.099	0.100	0.108	0.0027	0.065	0.076	0.081	0.0046	**	†	*	*

NS: not significant; ^a For two source of inoculum (dairy cow, C; and dairy goat, G), three diet treatments: Control, PRO-1, PRO-2: Promote™ added or not (0, control) at 1 and 2 ml/kg DM of diet, respectively. † $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

Table 5.9. Average total volatile fatty acid (VFA) concentration (mmol/l) and molar acetate, propionate and butyrate proportions (%) after 96 h of *in vitro* incubation of experimental diets with dairy goat inoculum.

Diet, Treatment	Total VFA, mM	Molar proportions, %			Acet: Prop. ratio
		Acetate	Propionate	Butyrate	
HF,					
CON	54.51b	63.74	22.01b	7.69a	2.90a
PRO-1	70.85a	63.50	22.51a	7.29b	2.82b
PRO-2	77.59a	63.93	22.87a	6.87c	2.80b
S.E.M.	9.02**	0.08	0.20*	0.16*	0.02*
HMF,					
CON	74.25c	62.59	21.96c	9.17a	2.85a
PRO-1	82.80a	61.81	22.59b	9.05a	2.74b
PRO-2	77.90b	62.41	23.22a	8.31b	2.69b
S.E.M.	0.74**	0.38	0.22*	0.20*	0.03*
LMF,					
CON	79.20b	60.81	22.81b	9.89a	2.67a
PRO-1	78.60b	61.21	22.85b	9.23b	2.68a
PRO-2	84.60a	61.32	24.03b	8.54c	2.55b
S.E.M.	1.29*	0.40	0.18*	0.25*	0.03*
LF,					
CON	83.90b	60.09	23.63	9.93a	2.54a
PRO-1	91.10a	59.41	24.57	9.49b	2.42b
PRO-2	89.78a	59.62	24.31	8.79c	2.45b
S.E.M.	2.53*	0.21	0.22	0.13*	0.03*

Control, PRO-1, PRO-2: Promote™ added or not (0, control) at 1 and 2 mL/kg DM of diet, respectively.

a, b, c: For the same diet and parameter, means with different letters differ at $P < 0.05$

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

5.4. Discussion

5.4.1. Effects of concentrate level on the response of enzyme supplementation in ruminant diets

The supplementation of forage diets with readily fermentable carbohydrates is known to depress ruminal fiber degradation rate (Tamminga, 1993; Fondevila et al., 2002), with a magnitude depending on the forage (Nozière et al., 1995), and more precisely on the nature of the cell wall polysaccharides; but mechanisms involved in these associative effects between forage and concentrate are still not well known, although it is biochemically recognized that lignin, and possibly also phenolic acid contents, may determine the accessibility of cell wall polysaccharides to microbial enzymes (Nozière et al., 1996).

Here we used the GP technique of Theodorou et al. (1994), adapted by Fondevila et al. (Personal Communication), to evaluate and estimate associative effects between forage and concentrate, as a function of the level of starch in the diet, and its relationship with the use of fibrolytic enzymes to enhance fiber digestion.

As expected, in our results the gas production profiles differed among experimental substrates. This can be clearly seen in Figure 5.1 and the adjusted parameters to France et al. (1993) equation (Table 5.8). We found that increases in concentrate proportion of the diet stimulated the average gas production values of diets (Table 5.3 to Table 7) (which could be related to the inherent change of reaction stoichiometry, Tamminga and Williams, 1998) but with a depressed NDF and ADF degradation in treatments with C inoculum, as the level of concentrate increased. These findings are in agreement with the above related concept of variations in enzyme activities as a result of a shift in the microbial population and/or activity away from cell wall degradation towards starch utilization (Tamminga, 1993; Nozière et al., 1996; Fondevila et al., 2002), and the subsequent inhibition of microorganisms attachment to the feed particles due to the medium acidification.

Competition between fibrolytic and amylolytic bacteria for nitrogen and other necessary nutrients (Firkins et al 1991), and the shifts in substrate utilization by the non-obligate fibrolytic bacteria, may also be involved in the depression of the fibrolytic potential of C treatments.

Other authors have similar conclusions from experiments with dairy cows. Hristov et al. (1999) obtained a lower ruminal CMCase and xylanase activities, but higher ruminal amylase activity in cattle fed concentrate than animals fed high fiber diets.

On the other hand, no changes in cell wall component degradation were observed in the case of G inoculum treatments, or even a tendency was observed to the enhancement of cell wall component degradation when comparing HF diet with the concentrate supplemented (HMF, LMF, and LF). Trying to explain similar results, a report of Nozière et al. (1996) suggested that most of the cellulolytic microbial population is also able to degrade hemicelluloses, considering that increases in the proportion of barley in the diet induced a non-linear decrease in polysaccharidase activities, and probably because of the increased colonization of forages with a lower fibrolytic/non-fibrolytic microorganisms ratio in the adherent population as observed *in situ* (Silva et al., 1987) and *in vitro* (Firkins et al 1991).

As previously described, best responses were obtained with HF and HMF diets in GP profiles when fibrolytic enzyme was added to the several combined diets, however, without a concomitant or uniform increase in cell wall component degradation. The increase in the rate and extent of GP with enzyme addition agrees with Colombatto et al. (2003b), who indicated an increase in the fermentability of the pure substrate cellulose and xylan with increasing levels of enzyme product.

Related positive quadratic responses to enzyme addition have been also reported *in vitro* (Colombatto et al., 2002a) and *in vivo* (Beauchemin et al., 1995; Lewis et al., 1999) either with or without effects on digestibility indicators. Similarly, and with dairy cows, Nsereko et al. (2002) obtained an increase in the number of total viable bacteria in a quadratic way. Morgavi et al. (2000) hypothesized that elevated levels of enzyme product decreased the attachment of the rumen bacterium *Fibrobacter succinogenes* in a competition for available binding sites, finding different responses in complex (corn) or pure substrates.

On the other hand, the decreased lag phase (L ; Table 5.8) values in both inoculum at the effective dose, is in agreement with Wallace et al. (2001) who considered that increasing the initial rate of fermentation would be one of the most likely mode of action of enzyme addition. The effective role of exogenous enzyme addition to ruminant diets under controlled conditions has been defended by Morgavi et al. (2000), who detected a substantial synergism between

exogenous and ruminal enzymes, such that the net hydrolytic effect is much greater than previously believed.

Unaffected molar proportion of acetate (Table 5.9) agrees with Wang et al. (2001) findings and the observation that exogenous enzymes tend to lower the NDF and ADF contents of feeds (Gwayumba and Christensen, 1996; Hristov et al. 1996b) as a result of an enhancement of ruminal microorganisms to access internal readily digestible tissues via stomata, lenticels or damaged areas (Cheng et al. 1984).

Results in average tendency of total VFA values are consistent with potential GP predicted (A) (Table 5.8) in dairy goat treatments, from which a positive relationship between GP and VFA tendencies could be reasonable; this assumption looks less acceptable as the rate of concentrate in the diet increases.

The absence of changes in acetate proportions and the increase of propionate, in response to the enzyme addition in the present experiment, did result in a significant reduction in the ratio of acetate to propionate which is in agreement with Rode et al. (1999) and Sutton et al. (2003) and, on the basis of regressions calculated by Sutton et al. (1988), would have been sufficient on average to account for the small reduction in milk fat content with enzyme treatments as have been obtained by González et al. (2002) in Murciano-Granadina dairy goats and Flores et al. (2002) in dairy ewes.

5.4.2. Effects of source of inoculum for the *in vitro* GP response of enzyme supplementation in ruminant diets

From the analysis and comparison of average GP profiles of C vs. G treatments, we can assume that inoculum from goats were better suited to digest fiber than inoculum from dairy cows in this experiment. In that regard, intrinsic and combined characteristics of specific nature of each inoculum are implicated and would therefore limit the effect of modifications in microbial activity on the substrate degradation rates.

Several studies have suggested that goats have superior digestive efficiency than cattle or other ruminants, arguing the linkage to differences in mean retention time of digesta in the gastrointestinal tract (Sponheimer et al., 2003), among other factors of evolutionary adaptation to hard environmental and feeding conditions.

Greater digestibility of forages by goats comparing with other ruminants has been also obtained by other authors (Doyle et al., 1984; Reid et al., 1990). Doyle et al. (1984) suggested that a greater ability of goats to digest low quality forages resulted from longer ruminal retention times and, possibly, a higher capacity to recycle and conserve nitrogen.

Tolkamp and Brouwer (1993) in a statistical review of digestion in goats compared with other ruminants, found no differences in apparent organic matter digestibility between species on poor quality diets, but a slightly higher organic matter digestibility in goats on medium quality diets. This seemed to conflict with the view that digestive capacity in ruminants is positively related to animal size (Udén and Van Soest, 1982; Illius and Gordon, 1991), as well as with the frequently published opinion that, especially on poor quality feeds, goats are superior digesters compared with other ruminants (Devendra and Burns, 1983; Morand-Fehr, 1989; Tisserand et al., 1991; Trung and Devendra, 1987). Difference between species tends to increase when feed quality decreases. Van Soest (1982) attributed this to a positive correlation between species size and retention time of digesta in the digestive tract, however, relative gut size is frequently higher in sheep and goats than in cattle. In our study, the high qualities of the experimental diets do not support this hypothesis.

Although anatomically similar, the gastrointestinal systems of the common domestic and wild ruminants have significant functional differences. Researchers are not in agreement on whether these species also differ in their digestive capacity, and if so, which has the most efficient digestion (Huston et al., 1986). Factors other than diet composition that affect digestibility include level of intake and ruminoreticular retention time of digesta. Hoppe (1984) suggested that the strategy of digestion in large ruminants is for maximal utilization of consumed diet. This concept is consistent with a slow turnover rate (TR) and long total tract retention time (RT) resulting in a high diet digestibility.

It is obvious that a diet having a higher proportion of a fast digesting pool should support a faster rate of digestion compared with a diet with a proportionately smaller fast-digesting pool. Less obvious is whether the same diet when exposed to microbial populations from different sources will support different rates of digestion.

Huston et al. (1986) reported a great inconsistency in the *in vitro* estimates compared with the *in vivo* goat values and found that mean *in vitro* rate of digestion was not different for cattle, sheep and goats, suggesting that variation in *in vivo* digestibility was associated with time of

exposure (RT) of dietary substrates to the digestion medium rather than a greater digestive capacity of the goat inoculum. So, the lower *in vivo* digestibility values observed in goats compared with either those of the companion species or the *in vitro* estimates for goats were strong evidence that digestibility of a given diet was solidly related to TR or reciprocally, RT. This assumption helps to explain that greatest rates of fermentation obtained in our experiment with dairy goat inoculum could be the result of a higher digestibility at similar RT, compared to dairy cow inoculum.

5.5. Conclusions

Under the conditions of this experiment, the effects of increasing starch proportion in ruminant diets on microbial fermentation and cell wall digestion were demonstrated. Differences in nature of inoculum were evident and predisposed the response to either forage:concentrate ratio or fibrolytic enzyme supplementation. Although differences were found between supplemented and unsupplemented diets in fermentation kinetics, no influences were detected in the improvement of cell wall degradation by fibrolytic enzyme addition.

CAPÍTULO 6

Rangos de óptima actividad celulolítica en productos fibrolíticos comerciales usados en dietas para rumiantes

(Ranges of optimal cellulase activity of commercial fibrolytic enzyme preparations used in ruminant diets)

CAPÍTULO 6. Rangos de óptima actividad celulolítica en productos fibrolíticos comerciales usados en dietas para rumiantes

(Ranges of optimal cellulase activity of commercial fibrolytic enzyme preparations used in ruminant diets)

Abstract

An in vitro study was conducted to investigate factors by which cellulase activity of fibrolytic enzyme preparations for ruminants are affected. Two liquid commercial enzyme products, PromoteTM (PRO) and Cellupract[®] AL 100 (CEL), both isolated from aerobic fungus (*Trichoderma sp.*) and with recognized cellulase activity, were used to examine the effects of pH, temperature, enzyme dose, and their interactions. Cellulase activity was determined in a factorial design ($3 \times 4 \times 3$) for three pH (4.0, 5.5 and 6.5), four temperatures (30, 40, 50 and 70 °C), and three doses (1, 2 and 3 $\mu\text{L/g}$ DM of substrate). Average and extreme values for experimental treatments were selected according to practical criteria either for current ruminal or industrial conditions. Carboxymethyl cellulose was used as substrate, and concentrations of reducing sugars were determined in the absence of ruminal liquor by the Nelson-Somogyi copper reduction method with glucose as standard. There were no significant differences for the average cellulolytic activities between products ($P = 0.652$). Cellulolytic activity was affected by pH, temperature, and enzyme dose, and their interactions ($P < 0.05$). Maximum cellulolytic activities were obtained for pH 4.0, temperature 50 °C and the biggest dose of 3 $\mu\text{L/g}$ DM. Significant interactions between experimental factors were observed. Optimal conditions for commercial enzyme products evaluated in this experiment were outside the normal ranges in ruminal environment, and seem to be favourable for acidic conditions and initial phases of ensiling processes.

(Keywords: Fibrolytic enzymes; Cellulase activity; Sugar release.)

6.1. Introduction

Recently, there has been renewed interest in the use of enzymes in ruminant diets because some fibrolytic (cellulases and hemicellulases) enzymes have proved to be stable when incubated with protease enzymes (Kung, 2001). The enzyme products commonly used in animal nutrition are generally mixtures of proteins containing several enzymatic activities (Vahjen and Simon, 1999). However, most enzyme products are poorly defined, which does little to improve our understanding of their possible modes of action in ruminants (Colombatto et al., 2003a).

Enzyme activity measurements should be conducted under conditions closely defined with respect to temperature, pH, ionic strength, substrate concentration, and substrate type, since all these factors will affect the activity of an enzyme (Beauchemin et al., 2003). Based on the results of Wallace et al. (2001), we may assume that it would be possible to improve the effectiveness of enzyme preparations by increasing cellulase activity (Beauchemin et al., 2003). Each enzyme requires a specific pH value or pH range for optimal activity. This factor is of prime importance when choosing an enzyme for an industrial process, in order to operate with the maximum enzyme efficiency (Uhlig, 1998).

Temperatures at which enzymes are stable or labile are of great significance for many technical processes. Beyond the optimal temperatures, enzymes may be denatured, and the temperature at which inactivation begins is characteristic for every enzyme. Manufacturing processes for the application of fibrolytic enzyme products to feeds, as well as the environment of the ruminal ecosystem, involves some phases on which temperature may be a limiting factor for enzymatic activity of commercial preparations. A temperature of approximately 60 °C and a pH between 4 and 5 are the optimal conditions for most commercial enzymes (Coughlan, 1985). However, the optimal temperature and pH for assessing enzyme activity are not representative of the conditions in the rumen, which are closer to a pH of 6.0 and 39 °C (Van Soest, 1994).

The level of enzyme addition has a recognized effect on expected effectiveness of enzyme preparations in ruminant diets (Beauchemin et al., 2003; Kung et al., 2000). Although a lot of investigations have been carried out with fibrolytic enzymes, either under *in vitro* or *in vivo* conditions, is still necessary to have more information about factors which determine the efficacy of these products, and to search and discuss the optimum conditions for maximum enzyme activity.

The objective of this study was to examine the effects of pH, temperature, enzyme dose, and their interactions, on cellulase activity of two commercial fibrolytic enzyme products used in ruminant diets.

6.2. Materials and Methods

6.2.1. Treatments

Cellulase activity, specifically endo- β -1,4-glucanase (EC 3.2.1.4), was studied in a factorial design ($3 \times 4 \times 3$) for two commercial enzyme preparations at three pH values (4.0, 5.5 and 6.5), four temperatures (30, 40, 50 and 70 °C), three enzyme product doses (1, 2 and 3 μ L/g DM), and their interactions. Average and extreme values for experimental treatments were selected according to practical criteria, either for current ruminal or industrial conditions. Each treatment was carried out in duplicate in two runs of in vitro incubation.

6.2.2. Enzyme products

Two liquid commercial enzyme products, PromoteTM (PRO; Agribrands International Inc., St. Louis, Missouri, USA) and Cellupract[®] AL 100 (CEL; Biopract GmbH, Berlin, Germany), were evaluated. According to the information provided by the manufacturers, PRO is a mixture of enzymes derived from fungi strains of *Trichoderma longibrachiatum* with recognized cellulase and xylanase activities, whereas CEL is obtained from *Trichoderma reesi* M 18.2 strain with cellulase, β -glucanase and xylanase activities. Both products are of similar consistency (slightly viscous, brown, and opaque liquid), and smell (similar to yeast).

6.2.3. Range of pH

The average and extreme pH values of buffer solutions (50 mM) were selected for a range (from 4.0 to 6.5) in which they are theoretically included, and were: i) the normal pH (4.0-5.0) for maximum cellulolytic activity of *Trichoderma* sp. (McAllister et al., 2001) by using sodium citrate and citric acid as buffer (pH 4.0); ii) a medium pH value (5.5) by using sodium acetate and acetic acid; and, iii) the pH value (6.5) for optimal and efficient cellulolytic activity in rumen ecosystem (Van Soest et al., 1994; Beauchemin et al., 2003) by using sodium phosphate and phosphoric acid.

6.2.4. Range of temperature

Temperature range was considered as the optimum, and the possible extreme values for which enzymes could be denatured or inactivated, and were: i) usual industrial temperature for enzyme application in pelleted concentrates (70 °C); ii) the optimum temperature range for

a given enzyme reaction in rumen environment or during the critical initial phase of the ensiling process (40 °C) (McDonald et al., 1991; Weinberg and Ashbell, 1994); iii) low reference temperature (30 °C); and, iv) high reference temperature (50 °C).

6.2.5. Range of enzyme product dose

The levels of enzyme product dose used were in the range of the levels normally (0.5 to 2 µL/g of TMR DM) used as ruminant feed additives (Beauchemin et al., 2003; Colombatto et al., 2002). The three enzyme product doses selected were 1, 2 and 3 µL/g of substrate DM.

6.2.6. Analysis of reducing sugars release

Cellulase (EC 3.2.1.4) activity, as indicator of polysaccharidase activity, was measured by using the buffer solutions described above, and carboxymethyl cellulose (sodium salt, medium viscosity; C-5678 Sigma, St. Louis, Missouri, USA) as substrate. A solution was prepared by adding 1, 2 or 3 µL of enzyme product solution (representing dose of 1, 2 or 3 g/kg DM of TMR) and 250 µL of substrate solution (4%) to a tube containing 250 µL of buffer. Three buffer solutions were prepared in order to achieve the same amounts for the experimental pH levels (4.0, 5.5 and 6.5). In all cases, the mixture was batch incubated at different temperatures according to treatments (30, 40, 50 or 70 °C) for 3 h, and the reaction was stopped by adding Somogyi reagent and boiling for 10 min. For background corrections, incubations were also carried out with samples without substrate, and enzyme solutions alone plus buffer solution. Concentrations of reducing sugars were determined by the Nelson-Somogyi copper reduction method (Somogyi, 1952) with glucose as the standard. Reducing sugars were quantified spectrophotometrically (Spectrophotometer UV-120-01, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) at 520 nm. The unit of enzyme activity was expressed as the amount of enzyme required to release 1 µmol of reducing sugars as glucose equivalent $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ of the enzyme product sample, according to the equation:

$$\text{Enzyme activity (units/}\mu\text{L)} = (\text{M} \times \text{DF}) / (\text{T} \times \text{m})$$

where: M = µmol of glucose released, determined from the standard curve; DF = dilution factor; T = time of incubation (min); and, m = microliters enzyme used.

6.2.7. Statistical analysis

Due to the significance of interactions found, data were analyzed separately, for each product, by pH, temperature, and enzyme dose. The PROC MIXED procedure of SAS (SAS 8.1; SAS Inst. Inc., Cary, North Carolina, USA) was used, and significance among means was

checked using a LSmeans test. For analysis of cellulolytic activity data, the model used included enzyme product, pH, temperature, dose, and the interactions. Model was:

$$Y_{ijklmn} = \mu + E_i + pH_j + T_k + D_l + pH \times T_{jk} + pH \times D_{jl} + T \times D_{kl} + pH \times T \times D_{jkl} + \epsilon_{ijklm}$$

Where: μ = overall mean; E_i = enzyme product ($i = 1$ and 2); pH_j = buffer solution pH ($j = 1$ to 3); T_k = incubation temperature ($k = 1$ to 4); D_l = enzyme dose ($l = 1$ to 3); $pH \times T_{jk}$ = pH by temperature interaction; $pH \times D_{jl}$ = pH by dose interaction; $T \times D_{kl}$ = temperature by dose interaction; $pH \times T \times D_{jkl}$ = pH, temperature and dose interaction; and, ϵ_{ijklm} = residual error. Factor effects were deemed significant at $P < 0.05$.

6.3. Results and Discussion

Values and tendencies of all cellulase activities observed in PRO and CEL were similar (Table 6.1; Figure 6.1), showing no significant differences between enzyme products for assay conditions (561 and 631 μmol of released sugar $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ for CEL and PRO, respectively). As determined by assays, cellulase activities of evaluated products were affected ($P < 0.05$) by pH, temperature and enzyme product dose, as well as by pH \times temperature and pH \times temperature \times dose interactions, which shows the dependence of these factors.

6.3.1. pH effects

As expected, pH influenced ($P < 0.05$) the cellulolytic activities of PRO and CEL. The cellulase from both enzyme preparations were more active in the range of pH 4.0 to pH 5.5 with an average of 854 and 749 μmol of released sugar $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ of the enzyme product applied for pH 4.0 and 5.5, respectively; cellulase activity decreased when pH increased to 6.5 (Figure 6.1). This result agrees with Kung (2001) and the results of Vicini et al. (2003) who encountered that endoglucanase from two enzyme samples were active between pH 2.6 and 8.0 with an average optimum pH between 4.0 and 5.0.

Colombatto et al. (2004a) reported a strong inverse relationship between endoglucanase activity and pH either for Liquidcell 2500 or Depol 40 (the two fibrolytic enzyme preparations evaluated). The endoglucanase activity of both products was reduced at higher pH levels. These findings agree with Pitt (1990) who collected data from previous studies and concluded that activity would rapidly decrease above pH 4.5.

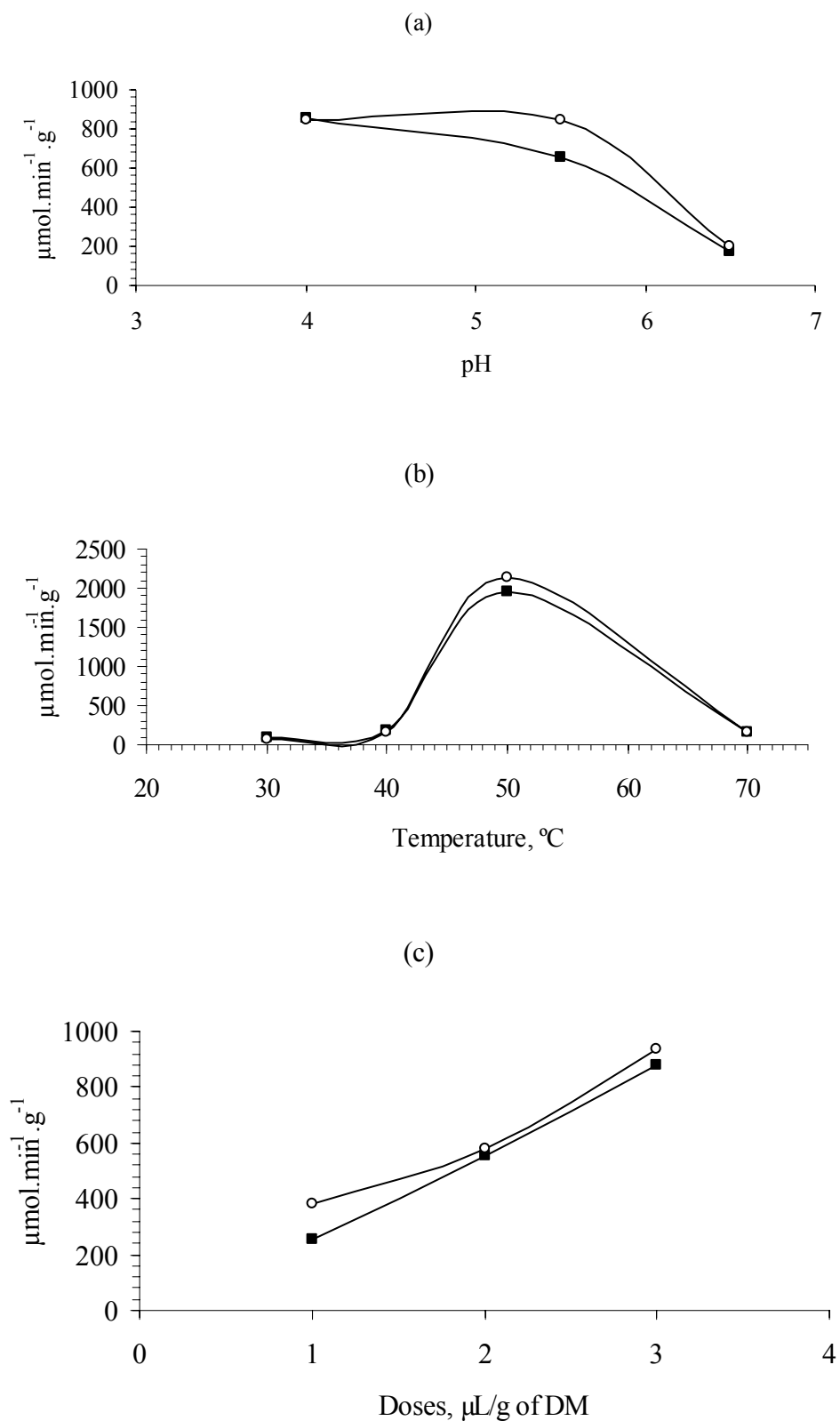
Table 6.1. Effects of pH, temperature and doses of application on average cellulolytic activities ($\mu\text{mol of RS min}^{-1} \text{g}^{-1}$ of the enzyme applied) of *Trichoderma sp.*-derived enzyme preparations.

	Promote TM	Cellupract [®] AL 100
pH		
4.0	849.57 (± 401)a	859.19 (± 427)a
5.5	842.06 (± 408)a	655.43 (± 399)a
6.5	202.78 (± 89)b	169.97 (± 49)b
Temperature, °C		
30	78.34 (± 19)a	83.19 (± 24)a
40	166.69 (± 41)b	176.05 (± 50)b
50	2145.20 (± 523)c	1948.59 (± 575)c
70	152.40 (± 51)ab	148.06 (± 20)ab
Dose, $\mu\text{L/g DM}$		
1	378.56 (± 151)a	255.10 (± 106)a
2	582.20 (± 292)a	552.51 (± 290)a
3	933.65 (± 388)b	876.97 (± 404)b

a, b, c, d: Within columns and factors, means without a common letter differ at $P < 0.05$.

Based on these results, the pH activity profiles clearly suggested that the cellulase activities from these enzyme product samples would be less efficient in the rumen because pH would not be optimum. An explanation of this phenomenon may come from comparing the pH optima of the fibrolytic enzymes produced by ruminal microorganisms with the pH optima of exogenous fibrolytic enzymes produced by aerobic fungi (McAllister et al., 2001). It is well documented that growth of fibrolytic bacteria is inhibited (Russell and Dombrowski, 1980) and that fibre digestion is severely compromised (Hoover et al., 1984) when pH falls below 6.2. Most of the fibrolytic enzymes produced by ruminal microorganisms function optimally at pH values above 6.2 (Matte and Forsberg, 1992). On the contrary, the optimum pH of fibrolytic enzymes produced by aerobic fungi typically range from 4.0 to 6.0 (Gashe, 1992).

Figure 6.1. Effect of pH (a), temperature (b), and dose of application (c), on average cellulase activities (endoglucanase) of enzyme preparations (Promote™, O; Cellupract® AL 100, ■)



In contrast, and in agreement with Colombatto et al. (2004a), it might appear that endoglucanases would be favoured by the acidic conditions found in silages, taking into account that for enzymes to be effective as silage additives, they should be optimally active at acidic pH values, and stable over an extended period of time. Colombatto et al. (1999) found that commercial fungal enzymes released more sugars from maize and grass silages when incubated at pH 4.5 than at 5.3 or 6.0, indicating that not only the activities, but also the hydrolytic capacity, would be higher at lower pH values.

6.3.2. Temperature effects

There was a strong dependence of cellulolytic activity from temperature; the highest cellulolytic activity was observed at 50 °C with an average of 2047 μmol of released sugar $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ of the enzyme product applied (Table 6.1). Above this temperature the enzyme is rapidly deactivated (Figure 6.1). Average values obtained for treatments with an incubation temperature of 70 °C had no significant differences with treatments with either 40 or 50 °C of incubation temperature (Table 6.1).

Most of the enzyme products currently used in ruminant nutrition are derived from mesophilic fungal sources, such as *Trichoderma* and *Aspergillus* spp. (Muirhead, 2001; Colombatto et al. 2004c). Enzymes derived from these microorganisms typically display optimal temperatures of 45-60 °C (Coughlan, 1985; Kung, 2001). Vicini et al. (2003) found a cellulase and xylanase optimal activities for two enzyme samples at 50 °C; in that study, enzyme activities from both enzyme samples showed only 10% of the optimal activity up to 20 °C, and enzyme activities increased sharply with an increase in temperature up to 50 °C and decreased sharply above this point. Up to 40 °C, the endoglucanase from both enzyme samples showed only 20% of the optimal activity.

As occurred with pH, the temperature activity profiles suggested that endoglucanase activities from the enzyme samples evaluated, would be less efficient in the rumen because temperature would not be optimum, which agree with Vicini et al. (2003), and Van Soest (1994) about optimal conditions for non starch polysaccharides digestion in rumen environment. Colombatto et al. (2004a), evaluating fibrolytic enzymes in ensiling process, indicated that higher temperature negatively influenced thermal stability under changing pH conditions of xylanases contained in two products. However, this negative action was evident after 48 h of incubation, which suggests that the enzymes may be stable during the critical initial phases of ensiling, during which temperatures can rise to 40 °C (McDonald et al., 1991;

Weinberg and Ashbell, 1994). Furthermore, when pH drops rapidly, its effects on the stability of the enzymes may be less noticeable.

Optimal average interactive cellulolytic activities were obtained for the set pH 4.0-50 °C, and for an enzyme dose of 3 µL/g DM (Table 6.2) (2931 and 4608 µmol of released sugar min⁻¹ g⁻¹ of the enzyme product applied, respectively). According to Coughlan (1985), a temperature of approximately 60 °C and a pH between 4 and 5 are the optimal conditions for most commercial enzymes. However, the optimal temperature and pH for assessing enzyme activity are not representative of the conditions in the rumen, which are closer to a pH of 6.0 to 6.7 and 39 °C (Van Soest, 1994). Thus, the activities quoted for commercial enzyme products are considerably higher than for those that would be measured at a pH and temperature similar to that of the rumen.

Table 6.2. Optimal average endoglucanase activities (µmol of RS min⁻¹ g⁻¹ of enzyme applied) of *Trichoderma sp.* –derived enzyme preparations as a result of pH × temperature, and pH × temperature × dose interactions.

	Promote TM	Cellupract [®] AL 100	SEM
pH × T°C			63.29
4.0 × 50°C	2925.10 (±76.3)	2937.67 (±57.2)	-
pH × T°C × dose			109.62
4.0 × 50°C × 3 µL/g DM	4411.01 (±99.1)	4804.53 (±221.4)	-

Our results agree with the findings of Vicini et al. (2003) who stated that pH optima (approximate pH = 4 to 5) were more acidic, and the optimum temperature (50 °C) was greater than normal pH and temperature in the rumen. According to these authors, if fibrolytic activity in the rumen is a major mechanism of action of supplemental fibrolytic enzymes, it appears that considerable activity of these preparations was lost due to conditions in the rumen.

The lack of productive responses in our previous results (Flores et al., 2002; González et al. 2002) and the pH and temperature optimum values suggested that the enzymatic activity for degradation of cellulose and hemicellulose could be limited in the environment of the rumen of supplemented animals. Typical pH of the rumen is higher than the optima pH that was obtained, and ruminal temperature is lower than the optimal temperature for enzymatic

activity. In general, at pH = 6 most of the enzymatic activities will be reduced by about two thirds of their optimal activity, and at 38 °C, these activities will be further reduced by two-thirds. Colombatto et al. (2004b) reported that incubation at 39 °C, and at a pH higher than 5.6, greatly reduced endoglucanase activity, as activity recovery after 360 h only approached 54% (at pH 5.6) and 35% (at pH 6.8) of the original activity. Therefore, the combined effects of pH and temperature that exist in the rumen suggest that moderate fibrolytic activity, compared with the amount added, could occur within the rumen with these exogenous enzymes. Contrarily, optimal conditions seem to be favourable for using these products as additives for ensiling. Nevertheless, there is still a risk in predicting the potential of increasing cell wall digestion in the rumen using exogenous feed enzymes based only on their biochemical characterization, taking into consideration that enzyme activities are measured on model substrates that do not represent the complexity of plant cell wall material (Beauchemin et al., 2003).

6.3.3. Enzyme dose effects

Some of the variability associated with the use of exogenous enzyme products in ruminant diets is due to supplementation with insufficient or excessive enzyme activities (Beauchemin et al., 2003). The release of reducing sugars in our study was positively related to the level of enzyme product applied (Figure 6.1). Although there was no significant differences in average cellulase activities between 1 and 2 $\mu\text{L/g}$ DM doses, the dose 3 $\mu\text{L/g}$ showed the maximum reducing sugars average value (905 μmol of released sugar $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ of the enzyme product applied) (Table 6.1).

Similar findings were reported by Colombatto et al. (2003b) in an *in vitro* study; the increase of enzyme product dose was positively related to the increase in reducing sugar profiles of cellulose, xylan and a mixture of both, after incubation at 20 °C for 20h. In contrast, this result is different to those reported by Kung et al. (2000) under *in vivo* conditions; these authors obtained best responses with low level supplemented cows and a decreasing tendency with the increase of enzyme dose supplementation. Beauchemin et al. (1995) obtained a nonlinear response to the level of enzyme supplementation in an experiment with beef, and Nsereko et al. (2002) reported a quadratic response in total bacterial numbers in ruminal fluid with increasing levels of an enzyme preparation.

According to Beauchemin et al. (2003), high levels of enzyme addition can be less effective than low levels, and the optimal level of enzyme supplementation may depend on

the diet; however, the rationale for reduced efficacy of added enzymes at high levels of incorporation is not clear.

6.4. Conclusions

Cellulolytic activity (endoglucanase) of both products was affected by pH, temperature, and enzyme product dose, as well as by pH × temperature and pH × temperature × dose interactions. Optimal conditions for commercial enzyme products evaluated in this experiment, proved to be outside the normal conditions for ruminal environment, and seem to be favourable for acidic conditions found in silages and for stability during critical initial phases of ensiling, during which temperatures can rise 40°C. Other studies are needed including characterization of other enzyme activities.

CAPÍTULO 7
Conclusiones

CAPÍTULO 7: Conclusiones

La evaluación de la suplementación con enzimas fibrolíticas a la ración de cabras lecheras, desarrollada en las investigaciones aquí descritas, nos conduce a las siguientes conclusiones:

- 1) La suplementación con Promote™ (0,2 mL/kg MS) en cabras Murciano-Granadinas alimentadas con 65% forraje y 35% concentrado, no produjo efectos significativos sobre los parámetros productivos.
- 2) Sin embargo, la digestibilidad aparente de la materia seca en condiciones *in vivo* aumentó de forma significativa (68.89 vs. 71.89%) lo que puede explicar las tendencias observadas en la mejora de la CC y el PV de las cabras suplementadas durante la lactación.
- 3) La dosis de Promote™ utilizada (recomendada por la empresa fabricante) pudo ser insuficiente para mostrar los efectos esperables de la acción de las enzimas fibrolíticas en la ración forrajera.
- 4) En condiciones *in vitro*, la utilización de Promote™ a dosis elevadas (1 y 2 mL/kg MS), tuvo efectos significativos sobre la producción de gas y la desaparición de la MS, siendo este efecto más marcado al aumentar la relación forraje:concentrado.
- 5) Se han encontrado diferencias en la capacidad fermentativa y la respuesta a la suplementación enzimática al utilizar inóculos de vaca y cabra alimentadas con raciones semejantes (50% forraje, 50% concentrado), obteniéndose valores medios superiores con el inóculo de cabra.
- 6) La concentración de AGV totales con inóculo de cabras aumentó con el nivel de concentrado en la ración y con la suplementación enzimática, lo que estuvo relacionado con el incremento del propionato y la disminución de la proporción acetato:propionato, posiblemente ligados a la disminución en la grasa de la leche y la mejora en PV y CC obtenidos *in vivo*.
- 7) La comparación de la actividad del Promote™ con otro producto fibrolítico comercial (Cellupract AL-100) en condiciones *in vitro* y en ausencia de líquido ruminal, mostró resultados similares y efectos significativos al variar las condiciones de pH y temperatura del medio y la dosis de enzima utilizada (de 1 a 3 mL/kg de MS).

- 8) Las condiciones óptimas para la expresión de la actividad celulolítica de los productos evaluados fueron: pH = 4, temperatura = 50°C y dosis = 3 mL/kg MS, que se apartan de las condiciones deseables para el ambiente ruminal y resultan próximas a las ideales para las primeras fases de fermentación en ensilados.
- 9) Las experiencias *in vitro* sirvieron para confirmar los resultados obtenidos en condiciones *in vivo*, considerándose que las enzimas fibrolíticas podrán tener efecto cuando se apliquen en las condiciones recomendadas.

CAPÍTULO 8
Referencias Bibliográficas

CAPÍTULO 8: Referencias Bibliográficas

- Aguilera, J.F., Prieto, C., and Fonollá, J. 1990. Protein and metabolism of lactating Granadina goats. *British J. Nutr.* 63:165-175.
- Akin, D.E. 1989. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. *Agron. J.* 81:17-25.
- Albanell, E., Cáceres, P., Caja, G., Molina, E., and Gargouri, A. 1999. Determination of fat, protein, and total solids in ovine milk by Near-Infrared Spectroscopy. *J. AOAC Internat.* 82:753-758.
- Ali, B.R.S., Zhou, L., Graves, F.M, Freedman, R.B., Black, G.W., Gilbert, H.J., and Hazlewood, G.P. 1995. Cellulases and hemicellulases of the anaerobic fungus *Piromyces* constitute a multiprotein cellulose-binding complex and are encoded by multigene families. *FEMS Microbiol. Lett.* 125:15-22.
- Aman, P. 1993. Composition and structure of cell wall polysaccharides in forages. In: H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield and J. Ralph (Ed.) *Forage Cell Wall Structure and Digestibility.* pp183-195. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, USA.
- Annison, G. 1992. Commercial enzyme supplementation of wheat-based diets raises ileal glycanase activities and improves apparent metabolisable energy, starch and pentosan digestibilities in broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 38: 105-121.
- Annison, G. 1993. The role of wheat non-starch polysaccharides in broiler nutrition. *Aust. J. Agric. Res.* 44:405.
- Annison, G., and Choct, M. 1991. Anti-nutritive activities of cereal non-starch polysaccharides in broiler diets and strategies minimizing their effects. *World's Poult. Sci. J.* 47:232.
- Association of Official Analytical Chemists. 1990. *Official Methods of Analysis.* 15th Ed. AOAC, Arlington, VA.
- Bae, H.D., McAllister, T.A., Kokko, E.G., Leggett, F.L., Yanke, L.J., Jakober, K.D., Ha, J.K., Shin, H.T., and Cheng, K.-J. 1997. Effect of silica on the colonization of rice straw by ruminal bacteria. *Anim. Feed Sci. Technol.* 65:161-181.
- Baiely, M.J., Biely, P., and Poutanen, K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* 23:257-270.
- Baran, M., and V. Kmet. 1987. Effect of pectinase on rumen fermentation in sheep and lambs. *Arch. Anim. Nutr. Berlin.* 7/8:643-646.
- Bayer, E.A., Chanzy, H., Lamed, R., and Shoham, Y. 1998. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology* 8:548-557.
- Beauchemin, K.A, Rode, L. M., and Sewalt, V.J.H. 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. *Can. J. Anim. Sci.* 75:641-644
- Beauchemin, K.A., and Rode, L.M. 1996. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. In: *Animal Science Research Development. Meeting Future Challenges. Proceedings of the Canadian Society of Animal Science Meeting.* Ed. L.M. Rode. Lethbridge, Alberta, pp. 103-130.
- Beauchemin, K.A., Jones, S.D., Rode, L.M., and Sewalt, V.J.H. 1997. Effects of fibrolytic enzyme in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 77:641-644.
- Beauchemin K.A., Rode, L.M, Yang, W.Z., and McAllister, T.A. 1998. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. *Proceedings of the 33rd Pacific Northwest Nutrition Conference.* Vancouver, British Columbia, pp. 121-135.

- Beauchemin, K.A., Yang, W.Z., and Rode, L.M. 1999. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:378-390
- Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Maekawa, M., Morgavi, D.P., and Kampen, R. 2000. Evaluation of a nonstarch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. *J. Dairy Sci.*, 83:543-553.
- Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P., and Yang, W.Z. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81(E. Suppl. 2), E37-E47.
- Bedford, M.R. 1993. Mode of action of feed enzymes. *J. Appl. Poult. Res.* 2:85-92.
- Bedford, M.R. 2000. Exogenous enzymes in monogastric nutrition__their current value and future benefits. *Anim. Feed Sci. Technol.* 86:1-13
- Bedford, M.R., and Morgan, A.J. 1996. The use of enzymes in poultry diets. *World Poult. Sci. J.* 52 :61-68.
- Béguin, P., and Aubert, J.P. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS. Microbiol. Rev.* 13:25-58.
- Bhat, M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18:355-383.
- Bhat, M.K., and Bhat, S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applicayions. *Biotech. Advances* 15:583-620.
- Bhat, M.K., and Hazlewood, G.P. 2001. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: *Enzymes in farm animal nutrition.* M.R. Bedford and G.G. Partridge (Eds.) CABI Publishing, Oxon, UK. pp. 11-49.
- Biely, P., Mislovicova, D., and Toman, R. 1985. Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4-(3-glucanases and 1,4-(3-xylanases in gels. *Analytical Biochemistry* 144:142-146.
- Bines, J.A., Broster, W.H., Sutton, J.D., Broster, V.J., Napper, D.J., Smith, T., and Siviter, J.W. 1988. Effect of amount consumed and diet composition on the apparent digestibility of feed in cattle and sheep. *J. Agric. Sci.* 110:249-259.
- Boudet, A. M. 1998. A new view of lignification. *Trends in Plant Science* 3:67-71.
- Bowman, G.R., Beauchemin K.A., and Shelford. 2002. The proportion of the diet to which fibrolytic enzymes are added affects nutrient digestion by lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:3420-3429.
- Burroughs, W., Woods, W., Ewing, S.A., Greig, J., and Theurer, B. 1960. Enzyme additions to fattening cattle rations. *J. Anim. Sci.* 19:458-464.
- Calsamiglia, S., Ferret, A., and Devant, M. 2002. Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 85:574-579.
- Cecava, M.J., Merchen, N.R., Berger, L.L., and Nelson, D.R. 1990. Effect of energy level and feeding frequency on site of digestion and postruminal nutrient flows in steers. *J. dairy Sci.* 73:2470-2479.
- Cheng, K.J., Stewart, C.S., Dinsdale, D. and Costerton, J.W. 1984. Electron microscopy of bacteria involved in the digestion of plant cell walls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:93-120.
- Chen, K.H., Huber, J.T., Simas, J., Theurer, C.B., Yu, P., Chan, S.C., Santos, F., Wu, Z., and Swingle, R.S. 1995. Effects of enzyme treatment or steam-flaking of sorghum grain on lactation and digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78:1721-1727.
- Chesson, A. 1993. Feed enzymes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 45:65-79.

- Chesson, A. 1994. Manipulation of fibre degradation : An old theme revised. In : T.P. Lyons and K.A. Jacques (Ed.) Biotechnology in the Feed Industry. pp. 83-98. Proceedings Alltech's 10th Annu. Symp., Nottingham University, Press, Loughborough, U.K.
- Chesson, A., and Forsberg, C.W. 1997. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In: Hobson, P. and Stewart, C. (Eds) The Rumen Microbial Ecosystem, 2nd Edn. Chapman & Hall Ltd, Andover, UK, pp. 329-381.
- Chesson, A., Stewart, C.S., Dalgarno, K., and King, T.P. 1986. Degradation of isolated grass mesophyll, epidermis and fibre cell walls in the rumen and by cellulolytic rumen bacteria in axenic culture. *J. Appl. Bacteriol.* 60:327-336.
- Church, D.C. 1976. Digestive physiology and nutrition of ruminants. In: Church D.C. (Ed.): Digestive Physiology, Vol. 1, O. & Books, Corvallis, Oregon (USA).
- Classen, H.L., Graham, H., Inbarr, J., and Bedford, M.R. 1991. Growing interest in feed enzymes to lead to new products. *Feedstuffs* 63:22-24.
- Colombatto, D. 2000. Use of enzymes to improve fibre utilisation in ruminants. A biochemical and in vitro rumen degradation assessment. Ph.D. Thesis. The university of Reading, Reading, U.K.
- Colombatto, D., Bhat, M.K., Mould, F.L., and Owen, E. 1999. Characterisation and evaluation of a commercial enzyme for improving the nutritive value of ruminants feeds. *Proc. Br. Soc. Anim. Sci.*, p. 211 (Abstract).
- Colombatto, D., Mould, F.L., Bhat, M.K., and Owen, E. 2002a. The effect of fibrolytic enzyme application on the rate and extent of alfalfa stem fermentation, assessed in vitro. *Proc. Br. Soc. Anim. Sci.*, Penicuik, Page 209, U.K.
- Colombatto, D., Morgavi, D.P., Furtado, A.F., and Beauchemin, K.A. 2002b. Screening of fibrolytic enzymes as feed additives for ruminants: Can the effect of enzyme additives on in vitro fermentations be predicted by enzyme activities and feed hydrolysis? *J. Dairy Sci.* 85 (Suppl. 1), 354-355 (Abstract).
- Colombatto, D., Mould, F.L., Bhat, M.K., and Owen, E. 2003a. Use of fibrolytic enzymes to improve the nutritive value of ruminants diets. A biochemical and in vitro rumen degradation assessment. *Anim. Feed Sci. Technol.* 107: 201-209.
- Colombatto, D., Mould, F.L., Bhat, M.K., Morgavi, D.P., Beauchemin, K.A., and Owen, E. 2003b. Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentation of pure cellulose and xylan by mixed ruminal microorganisms in vitro. *J. Anim. Sci.* 81: 1040-1050.
- Colombatto, D., Mould, F.L., Bhat, M.K., Phipps, R.H., and Owen, E. 2004a. 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. Technol.* 111: 111-128.
- Colombatto, D., Mould, F.L., Bhat, M.K., Phipps, R.H., and Owen, E. 2004b. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage. II. Effects on rate of acidification, fibre degradation during ensiling and rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 111: 129-143.
- Colombatto, D., Mould, F.L., Bhat, M.K., Phipps, R.H., and Owen, E. 2004c. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage. III. Comparison of enzymes derived from psychrophilic, mesophilic or thermophilic sources. *Anim. Feed Sci. Technol.* 111, 145-159.
- Considine, P.J., and Coughlan, M.P. 1989. Production of carbohydrate-hidrolizing enzyme blends by solid-state fermentation. In: Coughlan, M.P. (Ed.) Enzyme System for Lignocellulose degradation. Elsevier Applied Science, New York, pp. 273-281.

- Coughlan, M.P., 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. In: Russell, R. (Ed.), *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, vol. 3, pp. 39-109.
- Craig, W.M. Broderick, G.A., and Ricker, D.B. 1987. Quantification of microorganisms associated with particular phase of rumen ingesta. *J. Nutr.* 117:56-62.
- Dehority, B.A., and Tirabasso, P.A. 1998. Effect of ruminal cellulolytic bacterial concentrations on in situ digestion of forage cellulose. *J. Anim. Sci.*, 76:2905-2911.
- Devendra, C. 2001. Small ruminants: Imperatives for productivity enhancement improved livelihoods and rural growth-A review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 10:1483-1496.
- Devendra, C., and Burns, M.1983. *Goat production in the tropics*. Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK, pp. 183.
- Dijkstra, J., and Tamminga, S. 1995. Simulation of the effects of diet on the contribution of rumen protozoa to degradation of fibre in the rumen. *Br. J. of Nutr.* 74: 617-634.
- Din, N., Gilkes, N.R., Tekant, B., Miller, R.C., Jr, Warren, R.A.J., and Kilburn, D.G. 1991. Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulase. *Bio/Technology* 9: 1096-1099.
- Doerner, K.C., and White, B.A. 1990. Assessment of the endo- β -1,4-glucanase components of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1844-1850.
- Doreau, M., Legay, F., Bauchart, D., Poncet, C., and Doreau, M. 1991. Effect of source and level of supplemental fat on total and ruminal organic matter and nitrogen digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74:2233-2242.
- Doyle, P.T., Egan, J.K., and Thalen, A.J. 1984. Intake, digestion, and nitrogen and sulphur retention in Angora goats and Merino sheep fed herbage diets. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.*, 24:165.
- Ensminger, M.E., Oldfield, J.E., and Heineman, W.W. 1990. Food and animals, a global perspective. In: *Feeds and Nutrition*. Ensminger, M.E., Oldfield, J.E. y Heineman (Eds.). Ensminger Publishing Company, CA, USA, pp. 4-17.
- Fanutti, C., Ponyi, T., Black, G.H., Hazlewood, G.P., and Gilbert, H.J. 1995. The conserved noncatalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain. *J. Biol. Chem.* 49:29314-29322.
- FAO 2003. FAOSTAT Statistic. www.fao.org
- Feng, P., C.W. Hunt, W.E. Julien, K. Dickinson, and T. Moen. 1992a. Effect of enzyme additives on in situ and in vitro degradation of mature cool-season grass forage. *J. Anim. Sci.* 70(Suppl 1):309 (Abstr.).
- Feng, P., C.W. Hunt, W.E. Julien, S.C. Haenny, and G.T. Pritchard. 1992b. Effect of enzyme additives to cool-season grass forage on voluntary intake and digestive function in mature beef steers. *J. Anim. Sci.* 70(Suppl 1):310. (Abstr.)
- Feng, P., Hunt, C.W., Pritchard, G.T., and Julien, W.E. 1996. Effect of enzyme preparations on in situ and in vitro digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. *J. Anim. Sci.* 74: 1349-1357.
- Ferlay, A. Legay, F., Bauchart, D., Poncet, C., and Doreau, M. 1992. Effect of a supply of raw or extruded rapeseeds on digestion in dairy cows. *J. Anim. Sci.* 70:915-923.
- Firkins, J.L., Bowman, J.G.P., Weiss, W.P., and Naderer, J. 1991. Effects of protein, carbohydrate and fat sources on bacterial colonization and degradation of fiber in vitro. *J. Dairy Sci.* 74: 4273-4283.
- Flores, C., Caja, G., Casals, R., Albanell, E., Such, X., Vera, G., and González, E. 2002. Supplementation of a fibrolytic enzyme complex in the concentrate of dairy ewes during lactation. *J. Dairy Sci.* 85(Suppl. 1):357. (Abstr.)

- Fondevila, M., Barrios Urdaneta, A., Balcells, J., and Castrillo, C. 2002. Gas production from straw incubated in vitro with different levels of purified carbohydrates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 101:1-15.
- Fontes, C.M.G.A., Hall, J., Hirst, B.H., Hazlewood, G.P., and Gilbert, H.J. 1995. The resistance of cellulases and xylanases to proteolytic inactivation. *Appl. Microb. Biotech.* 43:52-57.
- Forbes, J.M. 1995. Voluntary food intake and diet selection in farm animals. CAB International, Wallingford, UK.
- Forsberg, C.W., and Cheng, K. Jr. 1992. Molecular strategies to optimise forage and cereal digestion by ruminants. In: Bills D.D. and Kung S.-D. (Eds) *Biotechnology and Nutrition*, pp 107-147. Butterworth Heinemann, Stoneham.
- Forsberg, C.W., Cheng, K. Jr., and Phillips, J.P. 1993. Establishment of rumen microbial gene pools and their manipulation to benefit fibre digestion by domestic animals. *Proceedings VII World Conference on Animal Production*, pp. 281-316. World Association for Animal Production, Edmonton.
- Forsberg, C.W., Cheng, K. Jr., and White, B.A. 1997. Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. In: Mackie, R.I. and White, B.A. (Eds) *Gastrointestinal Microbiology*. Chapman & Hall, New York, pp. 319-379.
- Forwood, J.R., Sleper, D.A., and Henning, J.A. 1990. Topical cellulose application effects on tall fescue digestibility. *Agronomy J.* 82:900-913.
- France, J., Dhanoa, M.S., Theodorou, M.K., Lister, S.J., Davies, D.R., and Isac, D. 1993. A model to interpret gas accumulation profiles associated with in vitro degradation of ruminants feeds. *J. Theor. Biol.* 163:99-111.
- Fredeen, H., and Moqueen, R.E. 1993. Effects of enzyme additives on quality of alfalfa/grass silage and dairy cow performance. *Can. J. Anim. Sci.* 73:581.
- Gardner, P.T., Wood, T.J., Chesson, A., and Stuchbury, T. 1999. Effect of degradation on the porosity and surface area of forage cell walls of differing lignin content. *J. Sci. of Food and Agricult.* 79:11-18.
- Gasa J., Holtenius K., Sutton J.D., Dhanoa, M.S., and Napper, D.J. 1991. Rumen fill and digesta kinetics in lactating Friesian cows given two levels of concentrates with two types of grass silage ad lib. *Br J Nutr.* 66:381-98.
- Gashe, B.A. 1992. Cellulase production and activity by *Trichoderma sp.* A-001. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 79-82.
- Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulose activity. *Pure Appl. Chem.* 59:257-268.
- Gilbert, H.J. and Hazlewood, G.P. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.* 139:187-194.
- Girard, I.D., and Dawson, K.A. 1995. Stimulation of ruminal bacteria by different fractions derived from cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strain 1026. *J. Anim. Sci.* 73 (Suppl. 1):264.
- González, E., Caja, G., Albanell, E., Flores, C., Casals, R., Such, X., Castro, A., Bach, A., and Torres, C. 2002. Effects of fibrolytic enzyme supplementation for dairy goats in mid lactation. *J. Dairy Sci.* 85(Suppl. 1):355. (Abstr.)
- Grabber, J.H., Hatfield, R.D., and Ralph, J. 1998. Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. *J. Sci. of Food and Agricult.* 77:193-200.
- Gwayumba, W. and Christensen, D.A. 1996. The effect of fibrolytic enzymes on protein and carbohydrate degradation fractions in forages. In: *Proc. 46th Annual Meeting, Canadian Society of Animal Science*, p. 2. Lethbridge, Alberta, Canada.
- Haenlein, G.F.W. 2001. Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *J. Dairy Sci.* 84:2097-2115.

- Harris, B. 2001. The importance of fiber in feeding dairy cattle. In: [http://edis.ifas.ufl.edu/scripts/htmlgen.exe? DOCUMENT_DS064](http://edis.ifas.ufl.edu/scripts/htmlgen.exe?DOCUMENT_DS064). Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, University of Florida, FL.
- Headon, D.R. 1993. Activity analysis of enzyme under field conditions. In: Wenk C. and Boessinger, M. (Eds.) Enzymes in Farm Animal Nutrition. Proceedings of the 1st Symposium. Kartause, Switzerland, pp. 233-240.
- Hervieu, J., Morand-Fehr, P., Schmidely, Ph., Fedele, V., and Delfa, R. 1991. Mesures anatomiques permettant d'expliquer les variations des notes sternales, lombaires et caudales utilisées pour estimer l' état corporel des chèvres laitières. Options Méditerranéennes, Série Séminaires 13:43-56.
- Hoover, W.H., Kincaid, C.R., Varga, G.A., Thayne, W.V., and Junkins, L.L. Jr. 1984. Effects of solids and liquid flows of fermentation in continuous cultures. IV. pH and dilution rates. J. Anim. Sci. 58: 692-699.
- Hoppe, P.P.1984. Strategies of digestion in African herbivores. In: F.M. Gilchrist and R.I. Mackie. (Ed.) Herbivore Nutrition in the Subtropics and Tropics. pp. 222-243. The Science Press, Johannesburg.
- Hristov A.N., and Broderick, G.A. 1996. Synthesis of microbial protein in ruminally cannulated cows fed alfalfa silage, alfalfa hay, or corn silage. J Dairy Sci. 79:1627-1637.
- Hristov, A.N., McAllister, T.A., and Cheng, K. Jr. 1996a. Exogenous enzymes for ruminants: Modes of action and potential applications. Proceedings 17th Western Nutrition Conference, Edmonton, Alberta.
- Hristov, A.N., Rode, L.M., Beauchemin, K.A., and Wuerfel, R.L. 1996b. Effect of a commercial enzyme preparation on barley silage *in vitro* and *in sacco* dry matter degradability. Poceedings of the Western Section, American Society of Animal Science 47:282-284.
- Hristov, A.N., McAllister, T.A., and Cheng, K. Jr. 1998a. Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polisaccharide-degrading enzyme supplementation on rumen fermentation and nutrient digestibility. J. Anim. Sci. 76:3146-3156.
- Hristov, A.N., McAllister, T.A., and Cheng, K. Jr. 1998b. Stability of exogenous polisaccharide-degrading enzyme in the rumen. Anim. Feed Sci. Technol. 76:165-172.
- Hristov, A.N., McAllister, T.A., and Cheng, K. Jr. 1999. Effect of diet, digesta processing, freezing and extraction procedure on some polysaccharide-degrading activities of rumen contents. Can. J. Anim. Sci. 79:73-81.
- Hristov, A.N., McAllister, T.A., and Cheng, K.Jr. 2000. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: Effects on nutrient digestion in cattle fed a barley grain diet. J. Anim. Sci. 78:477-487.
- Hristov, A.N., McAllister, T.A., Treacher, R.J., and Cheng, K.-J. 1997. Stability of exogenous polysaccharide-degrading activities of ruminal content. Can. J. Anim. Sci. 79:73-81.
- Hughes, R.J., and Zviedrans, P. 1999. Influence of dietary inclusion rate of wheat on AME, digesta viscosity and enzyme response. Proc. Aust. Poult. Sci. Symp. 11:101-104.
- Hungate, R.E. 1988. Introduction: the ruminant and the rumen. In: Hobson P.N. (Ed) The Rumen Microbial Ecosystem, pp 1-19. Elsevier Applied Science, New York.
- Hunt, C.W., Feng, P., Treacher, R., and Pritchard, G.T. 1995. Effect of fibrolytic enzyme additives on *in vitro* degradability of alfalfa and tall fescue. Proc. Western Sect. ASAS 46:349.
- Huston, J.E., Rector, B.S., Ellis, W.C., and M.L. Allen.1986. Dynamics of digestion in cattle, sheep, goats and deer. J. Anim. Sci. 62:208-215.

- Hyams, D. 2001. Curve Expert 1.3. A comprehensive curve fitting system for Windows. Starkville, MS, USA.
- Illius, A.W., and Gordon, I.J. 1991. Prediction of intake and digestion in ruminants by a model of rumen kinetics integrating animal size and plant characteristics. *J. Agric. Sci.* 116:145-157.
- Inbarr, J., Van Der Meulen, J., and Puhakka, J. 1994. Nutritional implications of feeding enzyme-treated wheat bran to pigs. 1. Recovery of added enzyme activities in the stomach and terminal ileum. *Agric. Sci. Finl.* 3(Suppl. 2):1-22.
- INRA 1989. Ruminant nutrition. Recommended allowances and feed tables. R. Jarrige (Ed.). Libbey Eurotex, Paris, France.
- Iwaasa, A.D., Rode, L.M., and Beauchemin, K.A. 1998. Cumulative gas production of alfalfa forage treated with different cell wall-degrading enzymes. *J. Dairy Sci.* 81(Suppl. 1): 291.
- Jarrige, R. 1989. Ruminant Nutrition. Recommended allowances and feed tables. Institut National de la Recherche Agronomique, John Libbey and Co., Ltd., London. 389 pp.
- Jouany, J.P. 1982. Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sci. des Aliments* 2:131-144.
- Judkins, M.B., and Sobart, R.H. 1987. Influence of two levels of enzyme preparation on ruminal fermentation, particulate and fluid passage and cell wall digestion in wether lambs consuming either a 10% or 25% grain diet. *J. Anim. Sci.* 66:1010-1015
- Jung, H.G., and Ralph, J. 1990. Phenolic-carbohydrate complexes in plant cell walls and their effect on lignocellulose utilization. In: D.E. Akin, L.G. Ljungdahl, Wilson, J.R. and Harris, P.J. (Ed.) *Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminants.* pp. 173-182.
- Jung, H.G., and Allen, M.S. 1995. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J. Anim. Sci.* 73:2774-2790.
- Jung, H.G., and Deetz, D.A. 1993. Cell wall lignification and degradability. In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., Ralph, J. (Eds), *Forage cell wall structure and digestibility.* ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI, USA, pp. 315-346.
- Khalili, H., and Huhtanen, P. 1991. Sucrose supplements in cattle given grass silage-based diet. 1. Digestion of organic matter and nitrogen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 33:247-261.
- Knowlton, K.F., McKinney, J.M., and Cobb, C. 2002. Effect of a direct-fed fibrolytic enzyme formulation on nutrient intake, partitioning, and excretion in early and late lactation Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 85:3328-3335.
- Krause, D.O., Dalrymple, B.P., Smith, W.J., Mackie, R.I., and McSweeney, C.S. 1999. 16SrDNA sequencing of *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*: design of a signature probe and its application in adult sheep. *Microbiology* 145:1797-1807.
- Krause, M., Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Farr, B.I., and Nørgaard, P. 1998. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. *J. Anim. Sci.* 76:2912-2920.
- Kreikemeier, K.K., Harmon, D.L., Peters, J.P., Gross, K.L., Armendariz, C.K., and Krebbiel, C.R. 1990. Influence of dietary forage and feed intake on carbohydrase activities and small intestinal morphology. *J. Anim. Sci.* 68:2916-2929.
- Kung, L. Jr. 1996. Direct fed microbial and enzyme feed additives. In: Muirhead S. (Ed.) *Direct fed microbial, Enzyme and Forage Additive Compendium.* The Miller Publishing Company, Minnetonka, Minnesota, pp. 15-20.

- Kung, L. Jr. 2001. Enzymes for lactating dairy cows: new theories and applications. In: Proceedings of the XII Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, Florida, USA, pp. 29-43.
- Kung, L. Jr, Sheperd, A.C., Smagala, A.M., Endres, K.M., Bessett, C.A., Ranjit, N.K., and Glancey, J.L. 1998. The effect of preservatives based on propionic acid on the fermentation and aerobic stability of corn silage and a total mixed ration. *J Dairy Sci.* 81:1322-1330.
- Kung, L. Jr, Treacher, R.J., Nauman, G.A., Smagala, A.M., Endres, K.M., and Cohen, M.A. 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:115-122.
- Ladisich, M.R., Lin, K.W., Voloch, M., and Tsao, G.T. 1983. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme Tech.* 15:90-99.
- Lam, T.B.T., Iiyama, K., and Stone, B.A. 1990. Primary and secondary walls of grasses and other forage plants: taxonomic and structural considerations. In: Akin D.E., Ljungdahl, L.G., Wilson, J.R., and Harris, P.J. (Eds.) *Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminants.* pp. 43-69. Elsevier Science Publishers, London, UK.
- Lapierre, C. 1993. Application of new methods for the investigation of lignin structure. In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., Ralph, J. (Eds.), *Forage Cell Wall Structure and Digestibility.* American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, WI, pp. 133-166.
- Lee, S.S., Ha, J.K., and Cheng, K. Jr. 2000. Influence of an anaerobic fungal culture administration on in vivo ruminal fermentation and nutrient digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.* 88:201-217.
- Legay-Carmier, F., and Bauchart, D. 1989. Distribution of bacteria in the rumen contents of dairy cows given a diet supplemented with soya-bean oil. *Br. J. Nut.* 61:725-740.
- Lenhinger, A.L. 1985. *Short Course in Biochemistry.* Worth Publishers, Inc., NY.
- Lewis, G.E., Hunt, C.W., Sánchez, W.K., Treacher, R., Pritchard, G.T., and Feng, P. 1996. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. *J. Anim. Sci.* 74:3020-3028.
- Lewis, G.E., Sanchez, W.K., Hunt, C.W., Guy, M.A., Pritchard, G.T., Swanson, B.I., and Treacher, R.J. 1999. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:611-330.
- Lewis, G.E., Sánchez, W.K., Treacher, R., Hunt, C.W., and Pritchard, G.T. 1995. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on lactational performance of midlactation Holstein cows. En: *Proceedings of Western Section American Society Animal Science.* 46:310.
- Liu, J.X., and Orskov, E.R. 2000. Cellulase treatment of untreated and steam pre-treated rice straw - effect on in vitro fermentation characteristics. *Anim. Feed Sci. Technol.* 88:189-200.
- Luchini, N.D., Broderick, G.A., Hefner, D.L., Derosa, R., Reynal, S., and Treacher, R. 1997. Production response to treating forage with fibrolytic enzymes prior to feeding to lactating cows. *J. Dairy Sci.* 80 (Suppl. 1): 262.
- Mandels, M. 1985. Applications of cellulases. *Biochemical Society Transactions* 13:414-415.
- Marquardt, R.R., Boros, D., Guenter, W., and Crow, G. 1994. The nutritive value of barley, rye, wheat and corn for young chicks as affected by use of a *Trichoderma reesei* enzyme preparation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 45:363-378.
- Martin, C., and Michalet-Doreau, B. 1995. Variations in mass and enzyme activity of rumen microorganisms: effect of barley and buffer supplements. *J. Sci. Food Agric.* 67:409-415.

- Martin, C., and Michalet-Doreau, B. 1996. Influence of barley and buffer supplements on quantitative aspects of ruminal fiber digestion of cows. *Arch. Anim. Nutr.* 49:203-211.
- Martin, S.A. and Nisbet, D.J. 1992. Effect of direct fed microbials on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 75:1736-1744.
- Matte, A., and Forsberg, C.W. 1992. Purification, characterization, and mode of action of endoxylanases 1 and 2 from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. and Env. Microb.*, 58:157-168.
- McAllister, T.A., Hristov, A.N., Beauchemin, K.A., Rode, L.M., and Cheng, K. Jr. 2001. Enzymes in ruminants diets. In: Bedford, M., Partridge, G. (Eds.), *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. CABI Publishing, Oxon, UK.
- McAllister, T.A., Hristov, A.N., Bae, H.D., Yanke, L.J., and Cheng, K. Jr. 1993. Effect of condensed tannins from birdsfoot trefoil on endoglucanase activity and the digestion of cellulose filter paper by ruminal fungi. *Can. J. Microbiol.* 40:298-305.
- McAllister, T.A., Oosting, S.J., Popp, J.D., Mir, Z., Yanke, L.J., Hristov, A.N., Treacher, R.J., and Cheng, K. Jr. 1999. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 79:353-360.
- McAllister, T.A., Standford, K., Bae, H.D., Treacher, R.J., Hristov, A.N., Baah, J., Shelford, J.A., and Cheng, K.Jr. 2000. Effect of a surfactant and exogenous enzymes on digestibility of feed and on growth performance and carcass traits of lambs. *Can. J. Anim. Sci.* 80:35-44.
- McCleary, B.V. 1992. Measurement of endo-1,4-3-D-xylanase. In: Visser, J. Beldman, G., Kusters-van Someren, M.A. and Voragen, A.G.J. (Eds.) *Xylans and xylanases*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 161-170.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., and Morgan, C.A., 2002. Carbohydrates 14-31. In: *Animal Nutrition, Sixth Edition*. Pearson Education Limited, Harlow, UK. 693 p.
- McDonald, P., Henderson, A.R., and Heron, S.J.E. 1991. *The Biochemistry of Silage*. Chalcombe Publications, London, UK.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., and Morgan, C. A. 1995. *Nutrición Animal (5th Ed.)*. Addison Wesley Longman Limited. London, UK.
- McHan, F. 1986. Pretreatment of coastal bermudagrass with sodium hydroxide and cellulase before ensiling. *J. Dairy Sci.* 69:1837.
- Menke, K.H., and Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28:7-55.
- Michalet-Doreau, B., Fernandez, I., Peyron, C., Millet, L., and Fonty, G. 2001. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reprod. Nutr. Dev.* 41:187-194.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analyt. Chem.* 31:426-428.
- Minson, D.J. 1990. *Forage in Ruminant Nutrition*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Minson, D.J. 1998. In vitro techniques as tools to predict nutrient supply in ruminants. In: Occasional Publication No. 22. BSAS, E.R. Deaville, E. Owen, A.T. Adegosan, C. Rymer, J.A. Huntington and T.L.J. Lawrence (Eds.) pp.13-19.
- Morand-Fehr, P. 1989. Goat nutrition and its particularities in the dry subtropics. In: ESE Galal, M.B. Aboul-Ela and M.M. Shafie (compilers), *Ruminant Production in the Dry Subtropics: Constraints and Potentials*. EAAP Publication No. 38, Pudoc Wageningen (The Netherlands), pp. 215-229.

- Morand-Fehr, P., and De Simiane, M. 1977. L' alimentation de la chèvre (Goat Nutrition). In: EAAP. Symposium on goat breeding in mediterranean countries, Málaga-Grenada-Murcia (Spain), 3-7 Oct., 1977, pp. 101-145.
- Morand-Fehr, P., and Sauvant, D. 1989. Goats. Chapter 11 In: INRA Ruminant nutrition Recommended allowances and feed tables. R. Jarrige, Ed. Libbey Eurotex, Paris, France Pages 169-180.
- Morand-Fehr, P., Owen, E., and Giger-Reverdin, S. 1991. Feeding behaviour of goats at the trough. In: P. Morand-Fehr (Ed.), Goat Nutrition. EAAP Publication No. 46, Pudoc Wageningen (The Netherlands), pp. 3-12.
- Morgavi, D.P., Beauchemin, K.A., Nsereko, V.L., Rode, L.M., Iwaasa, A.D., Yang, W.Z., McAllister, T.A., and Yang, W.Z. 2000. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. J. Dairy Sci. 83:1310-1321.
- Mould, F. L., and E. R. Ørskov. 1983. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. Anim. Feed Sci. Technol. 10:1.
- Muirhead, S. 1996. Direct feed microbial, Enzyme and Forage Additive Compendium, 3rd Edn. The Miller Publishing Company, Minnetonka, Minnesota, 391 pp.
- Nagaraja, T.G., Newbold, C.J., Van Nevel, C.J., and Demeyer, D.I. 1997. Manipualtion of ruminal fermentation. In: The Rumen Microbial Ecosystem 2nd Edn. Ed. P. N. Hobson and C. S. Stewart. Blackie Academia & Professional; London, UK. pp. 523-632.
- Narjisse, H. 1991. Feeding behaviour of goats on rangelands. In: P. Morand-Fehr (Ed.), Goat Nutrition. EAAP Publication No. 46, Pudoc Wageningen (The Netherlands), pp. 14-31.
- Nelson, F., and Damon, V. 1960. Comparison of different supplemented enzymes with and without diethylstilbestrol for fattening steers. J. Anim. Sci. 19:1279
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153:375-380.
- Newbold, C.J., Brock, R., and Wallace, R.J. 1992a. The effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the growth of fungi and ciliate protozoa in the rumen. Letters in Appl. Microb. 15:109-112.
- Newbold, C.J., Frumholtz, P.P., and Wallace, R.J. 1992b. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on rumen fermentation and blood constituents in sheep given diets of grass hay and barley. J. Agric. Sci. Cambridge 119:423-427.
- Nisbet, D.J., and Martin, S.A. 1993. Effect of fumarate, L-malate, and an *Aspergillus oryzae* fermentation extract on D-lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. Curr. Microbiol. 26 :133-136.
- Nozière, P., Besle, J.M., Martin, C., and Michalet-Doreau, B. 1996. Effect of barley supplement on microbial fibrolytic activities and cell wall degradation rate in the rumen. J. Sci. Food Agric. 72:235-242.
- Nozière, P., Martin, C., Durier, C., and Michalet-Doreau, B. 1995. Influence of nature and level of concentrate in the diet on in vivo in sacco degradation of two different hays. Ann. Zootech. 44:212.
- 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 Wang, Y. 2002. Effect of fibrolytic enzyme preparations from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. Can. J. Microbiol. 48, 14-20.
- Nussio, L.G., Huber, J.T., Theurer, C.B., Nussio, C.B., Santos, J., Tarazon, M., Lima-Filho, R.O., Riggs, B., lamoreaux, M., and Treacher, R.J. 1997. Influence of a

- cellulase/xylanase complex (C/X) on lactational performance of dairy cows fed alfalfa hay based diets. *J. Dairy Sci.* 80: (Suppl. 1): 220.
- Oba, M., and Allen, M.S. 1999. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:589-596.
- Orpin, C.G. 1983. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:121-143.
- Ørskov, E.R., and McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen for incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 92: 499-503.
- Owens, F. N., and A. L. Goetsch. 1988. Ruminant Fermentation. In: D.C. Church (Ed.) *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition*. pp 141-171. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Peoples, A.C., and Gordon, F.J. 1989. The influence of wilting and season of silage harvest and the fat and protein concentration of the supplement on milk production and food utilisation by lactating cattle. *Anim. Prod.* 48:305-317.
- Peris, S., Such, X., and Caja, G. 1996. Milkability of Murciano-Granadina dairy goats. Milk partitioning and flow rate during machine milking according to parity, prolificacy and mode of suckling. *J. Dairy Res.* 63:1-9.
- Perry, T.W., Purkhiser, E.D., and Beeson, W.M. 1966. Effects of supplemental enzyme on nitrogen balance, digestibility of energy and nutrients and on growth and feed efficiency of cattle. *J. Anim. Sci.* 25:760-764.
- Pinos-Rodríguez, J.M., González, S.S., Mendoza, G.D., Bárcena, R., Cobos, M.A., Hernández, A., and Ortega, M.E. 2002. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and ryegrass hay fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 80:3016-3020.
- Piquemal, J., Lapiere, C., Myton, K., O'Connell, A., Schuch, W., Grima-Pettenati, J., and Boudet, A.-M. 1998. Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. *Plant Journal* 13:71-83.
- Pitt, R.E. 1990. A model for cellulose and amylase additives in silage. *J. Dairy Sci.* 73:1788-1799.
- Preston, T.R., and Leng, R.A. 1987. *Matching Ruminant Production Systems with Available Resources in the Tropics and Sub-Tropics*. Penambul Books, Armidale, Australia.
- Ralph, J. 1997. Fake plastic trees. *Chemistry and Industry*, p. 708.
- Ralston, A.T., Church, D.C. and Oldfield, J.E. 1962. Effect of enzymes on digestibility of low quality roughage. *J. Anim. Sci.* 21: 306-308.
- Reid, R.L, Jung, G.A., and Thayne, W.A. 1988. Relationships between nutritive quality and fibre components of cool season and warm season forages: a retrospective study. *J. Anim. Sci.* 66:1275-1291.
- Reid, R.L., Jung, G.A., Cox-Ganser, J.M., Rybeck, B.F., and Townsend, E.C. 1990. Comparative utilization of warm and cool-season forages by cattle, sheep and goats. *J. Anim. Sci.* 68:2986-2994.
- Robinson, P.H.S., Tamminga, S., and Van Vuuren, A.M. 1987. Influence of declining level of feed intake and varying the proportion of starch in the concentrate on milk production and whole tract digestibility in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 17:19-35.
- Rode, L.M., Yang, W.Z., and Beauchemin, K.A. 1999. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.*, 82:2121-2126.
- Romney, D.L., Blunn, V., and Leaver, J.D. 1997. The responses of lactating dairy cows to diets based on grass silage of high or low DM and supplemented with fast and slowly

- fermentable energy sources. In: Proceedings of the British Society of Animal Science, 1997, Scarborough. British Society of Animal Science, Edinburgh.
- Rose, A.H. 1987. Yeast culture, a microorganism for all species: a theoretical look at its mode of action. In: Biotechnology in Feed Industry Ed. T. P. Lyons. Alltech Technical Publications, Nicholasville, KY. pp. 113-118.
- Rovics, J.J., and Ely, C.M. 1962. Response of beef cattle to enzyme supplement. *J. Anim. Sci.* 21:1012.
- Rusell, J.B., and Dombrowski, D.B., 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. and Env. Microbiol.*, 39:606-610.
- Rust, J.W., Jacobsen, N.L., McGilliard, A.D., and Hotchkiss, D.K. 1965. Supplementation of dairy calf diets with enzymes. II. Effect on nutrient utilization and on composition of rumen fluid. *J. Anim. Sci.* 24:156-160.
- Ryu, D.D., and Mandels, M. 1980. Cellulases: biosíntesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology* 2:91-101.
- Sabatier, A.M., and Fish, N.M. 1996. Method of analysis for feed enzymes: methodological problems? *J. Appl. Poultry Res.* 5:408-413.
- Salama, A. A. K., Caja, G., Garin, D., Albanell, E., Such, X., and Casals, R.. 2002b. Effects of adding a mixture of malate and yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on milk production of Murciano-Granadina dairy goats. *Anim. Res.* 51: 285-291.
- Salama, A., Caja, G., Albanell, E., Such, X., Casals, R., and Plaixats, J. 2002a. The role of zinc methionine in milk production, udder health, and zinc metabolism in dairy goats. *J. Dairy Res.* 69: 1-14.
- Sánchez, W.K., Hunt, C.W., Guy, M.A., Pritchard, G.T., Swanson, B., Warner, T., and Treacher, R.J. 1996. Effect of fibrolytic enzymes on lactational performance of dairy cows. In: Proceedings of American Dairy Science Association. Crovallis, Oregon.
- SAS Institute, Inc. 1999. SAS® User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Schingoethe, D. J., Stegeman, G. A., and Treacher, R. J. 1999. Response of lactating dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding. *J. Dairy Sci.* 82:996-1003.
- Scott, T.C., Losgrove, J.M., Coon, C.L., Kenney, J.A., and Scott, C.D. 1995. Use of cellulose from *Pseudomonas fluorescens* for the hydrolysis of waste paper in an attrition bioreactor. *Appl. Biochem. Biotech.* 51/52:537-543.
- Seth, O.N., Rai, G.S., Yadav, P.C., and Randey, M.D.1976. A note on the rate of secretion and chemical composition of parotid saliva in sheep and goats. *Indian J. Anim. Sci.*, 46:660-663.
- Sheperd, A.C., and Kung, L.-J. 1994. Composition, rumen fermentation, and digestibility of enzyme-treated corn silages. *J. Anim. Sci.* 72(Suppl. 2):125. (Abstr.)
- Sheppy, C. 2001. The current feed enzyme market and likely trends. In: *Enzymes in farm animal nutrition*. Eds., M:R. Bedford and G.G. Partridge, UK.
- Silva, A.T., Wallace, R.J. and Ørskov, E.R. 1987. Use of particle-bound microbial enzyme activity to predict the rate and extent of fiber degradation in the rumen. *Br. J. Nutr.* 57: 407-415.
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195:19-23.
- Sponheimer, M., Robinson, T., Roeder, B., Hammer, J., Ayliffe, L., Passey, B., Cerling, T., Dearing, D., and Ehleringer, J. 2003. Digestion and passage rates of grass hays by llamas, alpacas, goats, rabbits, and horses. *Small Rumin. Res.* 48:149-154.
- Steenfeld, S., Mullertz, A., and Jensen, J.F. 1998. Enzyme supplementation of wheat-based diets for broilers. 1. Effect on growth performance and intestinal viscosity. *Anim. Feed Sci. Technol.* 75:27-43.

- Stokes, M.R. 1987. The effect of a commercial enzyme mixture on rumen degradation of grass-legume silage. *Nutr. Rep. Int.* 36:919.
- Stokes, M.R., and Zheng, S. 1995. The use of carbohydrase enzymes as feed additives for early lactation cows. 23rd Biennial Conference on Rumen Function, Chicago, IL.
- Sutton, J.D., Broster, W.H., Schuller, E., Napper, D.J., Broster, V.J. and Bines, J.A. 1988. The influence of plane of nutrition and diet composition on rumen fermentation and energy utilization by dairy cows. *J. Agric. Sci.* 110:261-270.
- Sutton, J.D., Phipps, R.H., Beever, D.E., Humphries, D.J., Hartnell, G.F., Vicini, J.L., and Hard, D.L. 2003. Effect of method of application of a fibrolytic enzyme product on digestive processes and milk production in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 86:546-556.
- Tamminga, S. 1993. Influence of feeding management on ruminant fiber digestibility. In: *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, Eds. Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., Ralph, J. (Eds.) ASA CSSA SSSA, Madison, WI, USA.
- Tamminga, S., and Williams, B.A. 1998. In vitro techniques as tools to predict nutrient supply in ruminants. In: *Occasional Publication No. 22. BSAS*, E.R. Deaville, E. Owen, A.T. Adegosan, C. Rymer, J.A. Huntington and T.L.J. Lawrence (Eds.) pp.1-11.
- Tanaka, A., Karita, S., Kosuge, Y., Senoo, K., H. Obata, and N. Kitamoto. 1998. Thermal unfolding of the starch binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62:2127-2132
- Teller, E., Vanbelle, M., and Kamatali, P. 1993. Chewing behaviour and voluntary grass silage intake by cattle. *Liv. Prod. Sci.* 33:215-227.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., Mc Allan, A. B., and France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:185-197.
- Theurer, B., Woods, W., and Burroughs, W. 1963. Influence of enzyme supplements in lamb fattening rations. *J. Anim. Sci.* 22:150-154.
- Tisserand, J.L., Hadjipanayiotou, M., and Gihad, E.A. 1991. Digestion in goats. In: P. Morand-Fehr (Ed.), *Goat Nutrition*. EAAP Publication No. 46, Pudoc Wageningen (The Netherlands), pp. 46-60.
- Titi, H., and Lubbadah, W.F. 2004. Effect of feeding cellulase enzyme on productive responses of pregnant and lactating ewes and goats. *Small Rum. Res.* 52:137-143.
- Tolkamp, B.J., and Brouwer, B.O. 1993. Statistical review of digestion in goats compared with other ruminants. *Small Rum. Res.*, 11:107-123.
- Travis, A.J., Hirst, D.J., and Chesson, A. 1996. Automatic classification of plant cells according to tissue type using anatomical features obtained by the distance transform. *Annals of Botany* 78:325-331.
- Treacher, R., McAllister, T.A., Popp, J.D., Mir, Z., Mir, P. and Cheng, K. Jr. 1996. Effects of exogenous cellulases and xylanases on feed utilization and growth performance of feedlot steers. *Can. J. Anim. Sci.* 77:541. (Abstr.)
- Treacher, R., McAllister, T.A., Popp, J.D., Mir, Z., Mir, P., and Cheng, K. Jr. 1997. Effects of exogenous cellulases and xylanases on feed utilization and growth performance of feedlot steers. *Can. J. Anim. Sci.* 77:541.
- Trinci, A.P.J., Davies, D.R., Gull, K., Lawrence, M.I., Nielsen, B.B., Rickers, A., and Theodorou, M.K. 1994. Anaerobic fungi in herbivorous animals. *Mycological Research* 98:129-152.
- Trung, L.T., and Devendra, C. 1987. Options for increasing the utilization of cereal straws. In: O.P. Santana, A.G. da Silva and W.C. Foote (Eds.), *Proc. IVth Int. Confer. Goats*, 8-13 March 1987, Brasilia (Brazil), Vol. II: 1161-1183.

- Udén, P., and Van Soest, P.J. 1982. Comparative digestion of timothy (*Phleum pratense*) fibre by ruminants, equines and rabbits. *Br. J. Nutr.*, 47:267-272.
- Uhlig, H., 1998. *Industrial enzymes and their applications*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Vahjen W, Glaser K, Froeck M, and Simon O. 1997. Non starch polysaccharide hydrolyzing enzymes as feed additives: detection of enzyme activities and problems encountered with quantitative determination in complex samples. *Arch Tierernahr.* 50(4):331-45.
- Vahjen, W., and Simon, O. 1999. Biochemical characteristics of non-starch polysaccharide hydrolysing enzyme preparations designed as feed additives for poultry and piglet nutrition. *Arch. Anim. Nutr.* 52:1-14.
- Van Soest, P.J. 1982. In: *Nutritional Ecology of the Ruminant*. O & B Books, Inc., Corvallis, OR.
- Van Soest, P.J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2nd Edn. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., and Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fibre and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Varel, V.H., Kreikemeier, K.K., Jung, H.G., and Hatfield, R.D. 1993. In vitro simulation of forage fiber degradation by ruminants microorganisms with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3171-3176.
- Vicini, J.L., Bateman, H.G., Bhat, M.K., Clark, J.H., Erdman, R.A., Phipps, R.H., Van Amburgh, M.E., Hartnell, G.F., Hintz, R.L., and Hard, D.L. 2003. Effect of feeding supplemental fibrolytic enzymes or soluble sugars with malic acid on milk production. *J. Dairy Sci.* 86:576-585.
- Viikari, L., Tenkanen, M., Buchert, J., Ratto, M., Bailey, M., Siika-Apo, M., and Linko M. 1993. Hemicellulases for industrial applications. In : Saddler JN, (Ed.). *Bioconversion of forest and agricultural plant residues*. Wallingford, UK: CAB International. pp. 131-182.
- Volden, H., Velle, W., Harstag, O.M., Aulie, A., and Sjaastad, Ø. V. 1998. Apparent ruminal degradation and rumen escape of lysine, methionine, and threonine administered intraruminally in mixtures to high-yielding cows. *J. Anim. Sci.* 76:1232-1240.
- Wallace, R.J., Wallace, S.J.A., McKain, N., Nsereko, V.L., and Hartnell, G.F. 2001. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 79:1905-1916.
- Wang, Y., and McAllister, T.A. 2003. Rumen microbes enzymes and feed digestion. http://rumen.snu.ac.kr/symposium/Lectures/McAllister_T.A.pdf.
- Wang, Y., McAllister, T.A., Rode, L.M., Beauchemin, K.A., Morgavi, D.P., Nsereko, V.L., Iwaasa, A.D., and Yang, W. 2001a. Effects of an exogenous enzyme preparation on microbial protein synthesis, enzyme activity and attachment to feed in the Rumen Simulation Technique (Rusitec). *Br. J. Nut.* 85:325-332.
- Wang, Y., McAllister, T.A., Yanke, L.J., Beauchemin, K.A., Morgavi, D.P., Rode, L.M., and Yang, W. 2001b. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on the digestion of alfalfa hay and barley straw by cellulolytic ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.* 79(Suppl. 1):285. (Abstr.)
- Weimer, P.J., Waghorn, G.C., Odt, C.L., and Mertens, D.R. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:122-134.
- Weinberg, Z.G., and Ashbell, G. 1994. Changes in gas composition in corn silages in bunker silos during storage and feedout. *Can. Agric. Eng.* 36:155-158.

- West, J.W. 2000. Feed Additives For Dairy Cattle. <http://www.ces.uga.edu/pubcd/b988-w.htm>. Cooperative Extension Service. The University of Georgia College of Agricultural & Environmental Sciences.
- Wiedmeier, R.D., Arambel, M.J., and Walters, J.L. 1987. Effects of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrients digestibility. *J. Dairy Sci.* 70:2063-2070.
- Williams, A.G., Withers, S.E., and Strachan, N.H. 1989. Postprandial variations in the activity of polysaccharide-degrading enzymes in microbial populations from the digesta solids and liquor fractions of rumen contents. *J. Appl. Bacteriol.* 66:15-26.
- Williams, B. 2000. Cumulative gas production techniques for forage evaluation. In: Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. D.I.Givens, E.Owen, R.F.E. Axford and H.M.Omed (eds.). CAB International, Wallingford, UK, pp. 189-213.
- Wilson, J.R. and Kennedy, P.M. 1996. Plant and animal constraints to voluntary feed intake associated with fibre characteristics and particle breakdown and passage in ruminants. *Aust. J. Agric. Res.* 47:199-225.
- Wood, T.M., and Bhat, M.K. 1988. Methods for measuring cellulose activities. In: Wood, W.A., Kellogg, S.T. (Eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 160. Academic Press, CA, USA, pp. 87-112.
- Yang, W.Z., Beauchemin, K.A., and Rode, L.M. 1999 Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:391-403.
- Yang, W. Z., Beauchemin, K.A., and Rode, L.M. 2000. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. *J. Dairy Sci.* 83:2512-2520.
- Yang, W.Z., Beauchemin, K.A., and Rode, L.M. 2002. Effects of Particle Size of Alfalfa-Based Dairy Cow Diets on Site and Extent of Digestion. *J. Dairy Sci.* 85:1958-1968
- Yang, W.Z., Rode, L.M., and Beauchemin, K.A., 1998. Effects of fibrolytic enzyme additives on milk production of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 76(Suppl. 1):320. (Abstr.)
- Yanke, L.J., Selinger, L.B., and Cheng, K. Jr. 1995. Comparison of cellulolytic and xylanolytic activities of anaerobic rumen fungi. *Proceedings of the 23rd Biennial Conference on Rumen Function*, p 32. Chicago. USA.
- Yokohama, M.T. and Jonson, K.A. 1993. Microbiología del rumen e intestino. In: *El rumiante: Fisiología digestiva y nutrición*. C.D. Church (Ed.). Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 137-159.
- Zheng, W., Schingoethe, D. J., Stegeman, G. A., Hippen, A. R., and Treacher, R. J. 2000. Determination of when during the lactation cycle to start feeding a cellulase and xylanase enzyme mixture to dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:2319-2325.
- Zobell, D.R., Wiedmeier, R.D., Olson, K.C., and Treacher, R. 2000. The effect of an exogenous enzyme treatment on production and carcass characteristics of growing and finishing steers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87:279-285.