



**EVALUACION DE LA UTILIZACION DE UNA ENZIMA
CELULOLITICA, PRODUCIDA APARTIR DE LA CEPA VML-2
EN DIETAS QUE INCLUYEN NOPAL (*Opuntia ficus indica*) Y
MAGUEY (*Agave salmiana*.) SOBRE LA RESPUESTA
PRODUCTIVA EN BOVINOS**

GUSTAVO LOPEZ GUARIN

TESIS

Presentada como requisito parcial

para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

EN ZOOTECNIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

TESIS:

EVALUACION DE LA UTILIZACION DE UNA ENZIMA CELULOLITICA,
PRODUCIDA APARTIR DE LA CEPA VML-2 EN DIETAS QUE INCLUYEN
NOPAL (*Opuntia ficus indica*) Y MAGUEY (*Agave salmiana*.) SOBRE LA
RESPUESTA PRODUCTIVA EN BOVINOS

POR:

GUSTAVO LOPEZ GUARIN

Elaborada bajo supervisión del comité particular de asesoría y
aprobada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN ZOOTECNIA

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal. Dr. Jesús M. Fuentes Rodríguez

Asesor Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

Asesor Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Asesor Dr. Roberto García Elizondo


Dr. Fernando Ruiz Zarate
Subdirector de posgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Diciembre 2013

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme culminar este ciclo de mi vida y por enviarme a tres de las personas más importantes en mi vida.

A mi comité de asesores:

Dr. Jesús M. Fuentes Rodríguez, Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez Dr. Roberto García Elizondo, Dr. Mario Alberto Cruz Hernández, por compartir sus conocimientos y por su valiosa colaboración en la elaboración de este proyecto.

Al CONACyT por el apoyo económico brindado durante estos dos años

A la UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO por el financiamiento del proyecto otorgado y por la facilidad de las instalaciones para realizar este trabajo

COMPENDIO

EVALUACION DE LA UTILIZACION DE UNA ENZIMA CELULOLITICA, PRODUCIDA APARTIR DE LA CEPA VML-2 EN DIETAS QUE INCLUYEN NOPAL (*Opuntia sp*) Y MAGUEY (*Agave sp.*) SOBRE LA RESPUESTA PRODUCTIVA EN BOVINOS

TESIS:

POR:

GUSTAVO LOPEZ GUARIN

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ZOOTECNIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, Diciembre 2013

Dr. Jesús Manuel Fuentes Rodríguez

Palabras clave: bovinos, enzimas, nopal, maguey, parámetros productivos.

En los sistemas de producción pecuaria bajo condiciones de estabulación, la alimentación ocupa del 70 al 80% de los costos totales de producción. Por lo tanto contar con ingredientes alternativos que permitan abaratar los costos de producción sin afectar la productividad es sumamente importante valiéndose de nuevas tecnologías que puedan ser implementadas para el mismo objetivo. Con respecto a lo anterior existen otros ingredientes que ya forman parte de la alimentación de rumiantes pero que sin embargo, la mayoría de ellos necesita mejorar su valor nutricional, ayudados por nuevas tecnologías como el uso de las enzimas. En este contexto el presente trabajo se encuentra dividido en dos etapas primeramente se aisló un microorganismo productor de enzimas celulolíticas, a partir de la cepa VML-2 (vaca alimentada con masilla y levadura) en agar scheidler (49.6 g/1000 ml), identificando las cepas macroscópicamente y microscópicamente mediante una tinción de gram, una vez identificado el microorganismo se produjo la enzima en un medio mineral específico que contenía las siguientes cantidades en porcentaje, (NaCl 0.5, KCl 0.3, KH_2PO_4

0.5, MgSO_4 0.01), en condiciones de anaerobiosis a una temperatura constante de 39°C . y finalmente para obtener el extracto enzimático se centrifugo a 5000 rpm. Como segunda etapa una vez obtenida la enzima se empleo una prueba en 25 bovinos de la raza beefmaster evaluando parámetros productivos, dichos animales eran alimentados con una dieta que incluía nopal o maguey como forraje verde el cual era asperjado con la enzima 60 min antes de ser ofrecido como alimento, los ingredientes restantes de la dieta fueron (avena, grano de sorgo, gallinaza, cascarilla de arroz, melaza y una combinación de sal mineral) el T1 fue el tratamiento que incluye nopal sin enzima el T2 incluía nopal previamente asperjado con enzima, el T3 fue el que tenia maguey sin asperjar, el T4 incluía maguey tratado con el extracto enzimático, el T5 (tratamiento testigo) dietas que no incluían ni nopal ni maguey. El alimento era servido en dos tiempos 8.00 am y 16.00 pm, se peso el alimento servido y el rechazado para obtener consumo diario de materia seca (CDMS), los animales se pesaron al inicio y al final de la prueba para determinar la ganancia diaria de peso (GDP) y por ende la conversión alimenticia (CA), una vez concluida la prueba se tomaron muestras de sangre para el análisis de metabolitos, y muestras de liquido ruminal para determinar ácidos grasos volátiles y pH, los resultados de proteína celular y extracelular mostraron un valor de 0.00094 mg. La cinética enzimática en nopal y maguey mostró la mayor actividad de la enzima a los 60 minutos de haberla aplicado con valores de 2900 U. para el nopal y 3751 U. para el maguey. Para la prueba de parámetros productivos se muestra diferencia significativa ($P < 0.05$) en (GDP, CDMS, y C.A). el T2 (nopal + extracto enzimático) mostró mejores rendimientos, en el caso de los metabolitos sanguíneos la glucosa muestra diferencia significativa ($P < 0.05$) en el T2, no siendo así con los demás metabolitos (proteínas totales, queratina, colesterol, calcio y fosforo) analizados. Para los AGV se observo un aumento del acido acético mostrando diferencia significativa el T2 comparado con los otros tratamientos. Y finalmente el pH ruminal el T2 conservó mejor las condiciones del rumen (6.4), por último se puede deducir que la utilización de enzimas celulolíticas en dietas que incluyen nopal como forraje verde ayudan a mejor los parámetros productivos de los animales obteniendo con ello resultados atractivos para los pequeños y medianos productores.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	III
COMPENDIO	IV
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Justificación	2
1.2 Objetivo general	2
1.3 Objetivo específico	2
II REVISION DE LITERATURA	3
2.1 Generalidades	3
2.2 Nopal y maguey como forraje	3
2.3 Carbohidratos	5
2.4 Degradación de la celulosa	8
2.5. Generalidades de enzimas	9
2.6 Celulasas	10
2.7 Microorganismos ruminales productores de celulasa	11
2.8 Fermentación ruminal	12
2.8.1 Procesos en el retículo rumen	13
2.8.2 Microorganismos del retículo rumen	15
2.8.3 Condición del medio ruminal	17
2.9 Metabolismo de carbohidratos	18
2.10 Ácidos grasos volátiles	20
2.10.1 Formación de gas	21
2.10.2 Relación entre ácidos grasos volátiles	22
2.11 Cinética de hidrólisis enzimática	23
2.12 Enzimas en la nutrición animal	25
2.12.1 Enzimas fibrolíticas	26
2.12.1.1 Enzimas fibrolíticas en la alimentación de rumiantes	26
2.13 Actividades enzimáticas involucradas en la digestión de la pared celular	27
2.14 Método para proporcionar enzimas	28
2.15 Antecedentes en la respuesta animal	29

III MATERIALES Y METODOS	
3.1 Material orgánico para evaluación	31
3.2 Material biológico	31
3.2.1 Preparación de medio solido	32
3.2.2 Tinción de gran	32
3.3 Fermentación para producción de celulasas en medio liquido mineral especifico	33
3.3.1 Cuantificación de proteína extracelular y celular	34
3.3.2 Cinética enzimática en nopal y maguey	35
3.4 Evaluación del comportamiento productivo	35
3.4.1 Animales utilizados	35
3.4.2 Tratamientos	35
3.4.3 Preparación de animales	36
3.4.4 Variables determinadas en el experimento	36
3.4.5 Comportamiento productivo	37
3.4.6 Determinación de metabolitos sanguíneos	37
3.4.7 Determinación de ácidos grasos volátiles	37
3.4.8 Análisis estadístico	37
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1 Análisis bromatológico de nopal y maguey	38
4.2 Fermentación para la producción del extracto enzimático, a partir de un microorganismo aislado de rumen bovino	41
4.2.1 Determinación de proteína celular y extracelular por el método de Biuret	42
4.2.2 Cinética enzimática en nopal	43
4.2.3 Cinética enzimática en maguey	44
4.3 Comportamiento productivo	45

4.3.1 Ganancia diaria de peso, consumo diario de materia seca y conversión alimenticia	45
4.3.2 Metabolitos sanguíneos	47
4.3.3 Ácidos grasos volátiles	48
4.3.4 pH	50
V. CONCLUSIONES	52
VI. RESUMEN	53
VII. LITERATURA CITADA	55
VIII. APENDICE	60

No.	INDICE DE CUADROS	PAG.
1	Enzimas involucradas en la hidrólisis enzimática de la celulosa	11
2	Proporción de AGV producidos de acuerdo a la proporción forraje - concentrado en la dieta, dado en proporción molar	23
3	Composición del medio líquido específico para producción de celulasa.	33
4	Preparación de muestras para cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret	35
5	Ingredientes de los diferentes tratamientos	36
6	Contenido nutricional de <i>Opuntia ficus indica</i>	39
7	Contenido nutricional de <i>Agave salmiana</i>	39
8	Análisis estadístico de las variables de comportamiento productivo	46
9	Concentración de metabolitos sanguíneos de bovinos, alimentados con una dieta a base de nopal y maguey con una enzima celulasa.	47
10	Perfil de AGV's de bovinos alimentados con una dieta a base de nopal y maguey adicionado enzima celulasa.	49
11	pH de bovinos alimentados con una dieta a base de nopal y maguey adicionado con enzima celulasa	50

No.	INDICE DE FIGURAS	PAG.
1	Esquema de enlaces β 1–4 de la celulosa y α 1–4 del almidón y el glucógeno.	7
2	Esquema de los procesos que sufre el alimento en el retículo-rumen	15
3	Carbohidratos de la dieta son transformados en piruvato	18
4	Vías metabólicas ruminales de acetato, butirato y propionato	19
5	Representación esquemática de los tres ácidos grasos volátiles producidos en el retículo-rumen que son aprovechados por el rumiante	21
6	Representación de la reacción de Oxido reducción	22
7	Representación de la vía oxaloacetato	22
8	Fotografía de las cepas aisladas conservadas en tubos de cultivo con AS	32
9	Comparación nutricional de <i>Opuntia ficus indica</i> y <i>Agave salmiana</i>	40
10	Características macroscópicas de la cepa VML-2 en medio solido	41
11	Observación microscópica (100X) de microorganismos producidos por la cepa VML-2.	42
12	Degradación enzimática de celulosa en nopal <i>Opuntia ficus indica</i> . Utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2	44
13	Degradación enzimática de celulosa en maguey (<i>Agave salmiana</i>) utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2	45

I. INTRODUCCIÓN

Los rumiantes presentan particularidades distintivas en relación con el resto de los mamíferos, porque el rumen y el retículo, dos de los compartimientos pre-estomacales, se encuentran habitados por una de las más variadas, densas y activas poblaciones microbianas conocidas en la naturaleza (protozoos, bacterias y hongos), que desempeñan un papel significativo en la degradación del alimento que consumen los animales (Estrada *et al.*, 1993). Estos compartimientos no producen enzimas capaces de atacar las uniones β 1,4 y 1,6 glucosídicas presentes en la celulosa y otros componentes que constituyen los carbohidratos estructurales de las paredes celulares de los vegetales; sin embargo, contienen el mayor complejo enzimático que se conoce, es el sitio principal de degradación de la celulosa y hemicelulosa presentes en los materiales fibrosos (Dijkstra y Tamminga, 1995).

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, siempre que sean termodinámicamente posibles. Una enzima hace que una reacción química sea energéticamente posible, pero que transcurre a una velocidad muy baja, es decir, que sea cinéticamente favorable, lo que significa que puede transcurrir a mayor velocidad que sin la presencia de la misma. En estas reacciones, las enzimas actúan sobre unas moléculas denominadas sustratos, los cuales se convierten en moléculas diferentes denominados productos. Casi todos los procesos en las células necesitan enzimas para que ocurran todas sus reacciones a una tasa significativa. A las reacciones mediadas por enzimas se las denomina reacciones enzimáticas (Galindo, 2005). Debido a que las enzimas son extremadamente selectivas con sus sustratos y su velocidad crece sólo con algunas reacciones, el conjunto (*set*) de enzimas sintetizadas en una célula determina el tipo de metabolismo que tendrá cada célula. A su vez, esta síntesis depende de la regulación de la expresión génica.

1.1 Justificación

Los microorganismos ruminales capaces de producir enzimas de interés biotecnológico son blanco de estudio debido a que a nivel industrial el empleo de enzimas en la alimentación animal es escasa, por lo que su producción y uso representan un área de oportunidad para la producción de las mismas a nivel semi-preparativo y piloto, así como su empleo para el aprovechamiento efectivo del alimento en las dietas suministradas a los animales. *Opuntia* sp y *Agave* sp representa un componente fehaciente para emplearse en dietas para rumiantes debido a que soportan sequías, variaciones de temperatura y su uso comercial es limitado.

1.2 Objetivo general

Determinar los beneficios que aportan en bovinos las dietas hechas a base de nopal y maguey, tratadas antes de la alimentación con la enzima producida en laboratorio a partir de la cepa VML-2 y de esta manera emitir un juicio sobre su uso racional sustentado.

1.2.1 Objetivos específicos

- ❖ Aislar el microorganismo de la cepa VML-2 y producir la enzima en medio mineral específico.
- ❖ Caracterizar físico-química la materia prima (*Opuntia ficus indica* y *Agave salmiana*).
- ❖ Caracterizar micro y macroscópicamente la cepa VML-2
- ❖ Realizar una cinética enzimática empleando la enzima producida por VML-2 empleando nopal y maguey como sustrato.
- ❖ Evaluar 5 dietas en una prueba de alimentación para determinar parámetros productivos empleando becerros Beefmaster.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades

El nopal se ha aprovechado de múltiples maneras, desde la comercialización del fruto así como en la alimentación humana como verdura, de igual forma se le ha encontrado más modos de uso, una de ellas es como forraje para ganado, en la industria farmacéutica y cosmética, para la conservación de suelos especialmente aquéllos que son poco fértiles (Flores y Ramírez, 1995) y como una fuente de colorante natural en la producción de la “grana cochinilla”. Sin dejar de lado que en las comunidades rurales de las zonas áridas y semiáridas de México el nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) constituye una fuente de ingreso considerable (Flores y Olvera, 1995). En México, los agaves han tenido y tienen una gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos, que los han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras duras extraídas de las hojas (ixtle), abono, construcción de viviendas y elaboración de implementos agrícolas, entre otros usos. Los magueyes fueron una de las primeras plantas aprovechadas por los pobladores de Mesoamérica para alimentarse, de lo cual se hallan restos en cuevas en el Valle de Oaxaca, el de Tehuacán y en Coahuila en este último sitio, además de restos de fibras mascadas, se recuperaron cordeles de ixtle y sandalias elaboradas con fibras de maguey. El empleo como alimento y fibras pervive en México desde hace por lo menos siete mil años (García, 2002).

2.2. Nopal y maguey como forraje

Como forraje el nopal (*Opuntia* spp.) se ha utilizado desde el establecimiento de las diferentes culturas en México pero a finales del siglo XX fue que concibió su importancia como planta forrajera, pues a partir de este momento se buscó controlar su uso debido a la inclusión desmedida ya sea como complemento en las dietas alimenticias o como alimento del

ganado en pastoreo, para evitar la tala irracional de la cual eran objeto las nopaleras por parte de los productores. Y desde ese entonces se ha promovido su plantación para industrializarlo y para reforestar amplias áreas sin vegetación, buscando con ello controlar la erosión del suelo y su extinción (Anaya *et al.*, 2004).

Para el consumo de nopal en ovinos se ha recomendado de acuerdo a investigaciones realizadas tomando en cuenta que el requerimiento energético para la supervivencia de una oveja de 35 Kg es de aproximadamente 350 g de nutrientes digestibles totales (TDN, por sus siglas en inglés) por día, arrojando que para satisfacer esta necesidad la oveja necesita ingerir 538 g de cactus seco, considerando que los cladodios frescos sin espinas contienen 90 por ciento de agua el animal debe consumir de 5 a 6 Kg de cactus fresco diariamente, pero la oveja solo puede comer un promedio de 4 Kg diarios (Kock, 2003), sin embargo en condiciones extremas se ha reportado que ovinos adultos pueden consumir hasta 9 a 10 Kg de nopal en base real por día como única ración (López, 2003). En el caso de los bovinos requieren 2.85 Kg de TDN por día para satisfacer los requerimientos de un animal de 400 Kg de peso, para esto el animal requeriría consumir 4.4 Kg de cactus seco lo cual representa una ingestión diaria de 44 a 45 Kg de cladodios frescos, sin embargo el animal generalmente no consume más de 40 Kg de cactus al día (Kock, 2003).

La importancia socioeconómica y agroecológica del maguey se hace evidente en el uso que se le da como forraje para la alimentación del ganado, ya que es una alternativa forrajera, debido a la alta eficiencia en el uso del agua y a la adaptación del recurso a diferentes hábitats, sobre todo en las zonas semidesérticas. Del agave se utilizan las hojas e incluso la piña para darlo como suplemento a los animales ya que les proporcionan: altos niveles de energía digestible, minerales y agua, los cuales cubren los nutrimentos de mantenimiento y producción de ganado. Se hace notar que para lograr obtener el beneficio del potencial de su alta digestibilidad es necesario suplementar con nitrógeno (N), mismo que las bacterias del rumen necesitan para digerir la fibra. Los ganaderos acostumbran picarlo en el

campo o en el corral y combinarlo con otras fuentes de alimentos como los residuos de cosecha.

De acuerdo con Pinos-Rodríguez *et al.*, (2008), la parte superior y baja de las hojas de *Agave salmiana* son buena fuente de carbohidratos solubles. Sin embargo tiene bajos contenidos de proteína cruda por lo cual es necesario un complemento proteínico. *Agave salmiana* ensilado disminuye su concentración de saponinas, teniendo una fermentación aceptable. El análisis de la composición química sugiere que las plantas maduras (piña) y los brotes son los estados más deseables del Agave para ser usado como forraje para rumiantes.

En estudios recientes mencionan que la combinación de agave-alfalfa mejora la calidad nutricional, la digestibilidad ruminal permitiendo el ensilado de agave; la inclusión de alfalfa mejora las características nutricionales del ensilado de agave para rumiantes (Zamudio *et al.*, 2009).

Silos (2010), menciona que las hojas de maguey contienen el 89 % de humedad 10% de materia seca, 5% de proteína cruda, 17.03 % de fibra detergente neutro, 14.39 % fibra detergente ácido (FDA), 2.61% lignina, 0.31 de nitrógeno ligado a FDA y menciona que lo mas sobresaliente es el 3.03 % de proteína disponible. Además considera que el maguey representa un forraje de mejor calidad en comparación al heno de maíz, avena y el nopal.

Etgen *et al.*, (1990), en relación a minerales encontraron mayoritariamente Ca, P, Zn y Fe y pueden cubrir la cantidad requerida para una vaca en lactancia. Además menciona que se ha demostrado que al utilizar hojas de maguey como complemento en la ración, induce un incremento de la producción de leche (por el alto contenido de agua), así como también mejora la digestión (contenido de fibra), además incrementa el número de calorías (por el contenido de carbohidratos) y se incrementa el peso del animal.

2.3 Carbohidratos

Un carbohidrato es un compuesto orgánico formado por carbono, hidrógeno y oxígeno, y distribuido de tal forma que en cada carbono se encuentra una molécula de agua, es decir dos H y un O.

También se les conoce como hidratos de carbono, azúcares o sacáridos. Los carbohidratos presentes en los alimentos se encuentran en formas físicas y químicas muy distintas lo que afecta a la fermentación de los mismos. Se puede clasificar a los carbohidratos en tres grandes grupos de acuerdo a su ubicación/función en la planta:

- a) De contenido celular
- b) De almacenamiento
- c) Estructurales

En el contenido celular se encuentran tanto azúcares solubles como pectina que esta última está asociada a la membrana celular. Estos carbohidratos son de fácil digestión porque son de fácil acceso para los microorganismos y su estructura es relativamente sencilla. El carbohidrato de almacenamiento, o azúcar de reserva de las plantas, es el almidón. Este también es considerado de fácil digestión una vez abierto el grano. La celulosa y la hemicelulosa son los carbohidratos estructurales de la planta. Constituyen las paredes celulares y corresponden a la fracción fibrosa del alimento. A estos compuestos se asocia la lignina (que no es un carbohidrato) y que dificulta la digestión de la fibra. Por este motivo y por la forma que toman las moléculas de celulosa y hemicelulosa, estos carbohidratos son considerados de difícil digestión. Los carbohidratos estructurales y los de almacenamiento son polímeros de glucosa. Una diferencia importante entre los mismos es el tipo de enlace entre las moléculas de glucosa. En el almidón las moléculas de glucosa se unen por enlaces α 1-4, mientras en la celulosa y la hemicelulosa las glucosas se unen por enlaces β 1-4. La importancia de esto está en que los vertebrados sólo tienen enzimas para romper los enlaces β 1-4, por lo que se desprende que los animales (y el hombre) no poseen enzimas propias del organismo que puedan digerir celulosa ni hemicelulosa. Estos carbohidratos sólo pueden ser digeridos con la ayuda de enzimas de origen microbiano (Figura 1), y éste es el fundamento de la simbiosis entre el rumiante y los microorganismo en su ambiente ruminal (Van, 2008).

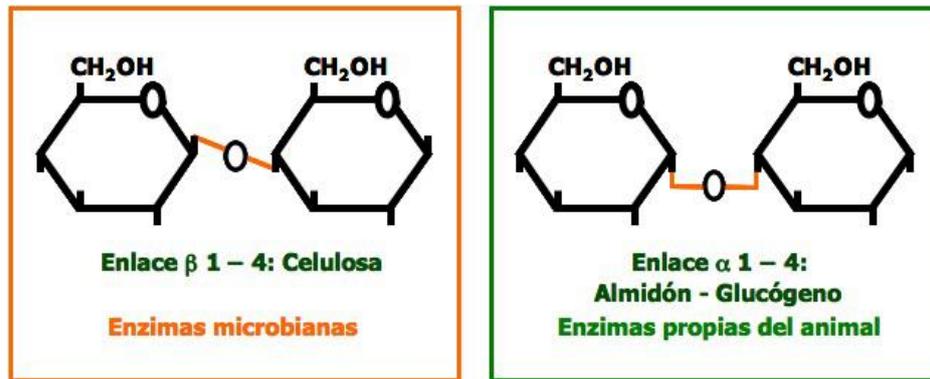


Figura 1: Esquema de enlaces β 1–4 de la celulosa y α 1–4 del almidón y el glucógeno (Van, 2008).

Los enlaces β 1–4 solo pueden ser digeridos por enzimas microbianas, mientras que los enlaces α 1–4 pueden ser digeridos tanto por enzimas microbianas como propias del animal. El almidón es un polisacárido compuesto por cadenas lineales de unidades de glucosa, con enlaces glucosídicos α 1-4, sin cadenas laterales (amilosa) o con cadenas laterales (amilopectina). En este último caso las cadenas ramificadas se forman con enlaces α 1-6. Tanto los enlaces α 1- 4 como los α 1-6 son hidrolizados por amilasas, enzimas que se encuentran en las secreciones digestivas (salivales o pancreáticas) de la mayoría de los animales, aunque los rumiantes no tienen amilasa salival (Van, 2008).

La celulosa se encuentra en la pared celular donde sus fibras forman una especie de trama que es embebida por otro carbohidrato estructural: la hemicelulosa. La celulosa es un polisacárido de glucosa unidas por enlaces β 1-4, mientras que la hemicelulosa es un polisacárido de xilosa, una pentosa, también con enlaces β 1-4. Si comparamos una célula vegetal joven con una vieja, se puede ver que la pared celular aumenta su espesor cuando la célula envejece. A medida que la planta envejece la hemicelulosa es sustituida por lignina, que si bien no es un carbohidrato sino una sustancia fenólica, siempre forma parte de la pared celular de las células vegetales, aumentando su porcentaje en aquellas fibras viejas o forraje seco como heno y paja. La lignina es muy resistente a los ácidos y a la acción de los microorganismos, por lo que su degradación es prácticamente nula, incluso en rumiantes. Además reduce la digestibilidad del resto de los componentes de la pared celular ya que tiene tendencia a recubrirlos. Otro

punto a considerar es que en las células viejas la celulosa cambia su configuración volviéndose más cristalina, por lo que presenta mayor dificultad para ser atacada por los microorganismos; este hecho se soluciona, en parte, con un aumento de la remasticación del alimento (rumia) (Van, 2008).

2.4 Degradación de la celulosa

El objetivo de los microorganismos es degradar la celulosa hasta glucosa para luego utilizar la misma como nutriente para su propio metabolismo. Sin embargo, la degradación de los carbohidratos en el retículo-rumen no se detiene en la glucosa como en la degradación glandular, sino que son alterados en mayor grado hasta dar ácidos grasos volátiles (AGV). Los productos finales de ese metabolismo de la glucosa por parte de los microorganismos son los AGV, y los gases dióxido de carbono (CO_2) y metano (CH_4). De estos productos los AGV y el metano aún contienen energía pero sólo los AGV pueden ser utilizados por el rumiante como nutriente, ya sea como precursores de grasa o de glucosa (Van, 2008).

La glucosa es un nutriente fundamental para los animales, y en los monogástricos es lo que se absorbe en el intestino delgado luego de la digestión glandular de los carbohidratos. En el caso de los rumiantes la cantidad de glucosa que se absorbe en el intestino delgado es mínima debido a la fermentación microbiana en el retículo-rumen. Casi nada de glucosa se escapa a la fermentación. Si el medio ruminal fuera aerobio, entonces la degradación de la glucosa llegaría a CO_2 y agua por la presencia de oxígeno. En estas condiciones no le quedaría nada al rumiante para aprovechar. Por eso el medio anaeróbico del rumen es fundamental porque en estas condiciones la degradación de la glucosa no puede ser total y los productos finales del metabolismo de los microorganismos aún son moléculas valiosas para el rumiante.

La anaerobiosis del medio ruminal es otro aspecto fundamental de la simbiosis entre el rumiante y los microorganismos. Para llegar a la glucosa, los microorganismos utilizan dos complejos enzimáticos. El primer complejo es la celulasa extracelular: como la celulosa es demasiado grande

para ingresar a los microorganismos, éstos se adhieren a las fibras de celulosa y las enzimas necesarias para pasar la celulosa a celobiosa forman parte de la envoltura de las bacterias. La propia adherencia de los microorganismos a la fibra permite la acción de estas enzimas que se encuentran en la pared de los mismos. Sobre la celobiosa actúan las enzimas celobiasas para dar las moléculas de glucosa. La glucosa obtenida por esta fermentación, así como otros monosacáridos provenientes de otros carbohidratos, se encuentran en el líquido ruminal y son absorbidos por los microorganismos donde sirve de sustrato energético para su metabolismo.

2.5. Generalidades de enzimas

Desde hace cientos de años se han venido empleando enzimas en procesos de fermentación tales como la fabricación de quesos, fabricación del pan, vino y cerveza. Fue en 1860 cuando Luis Pasteur comunicó que las enzimas estaban íntimamente ligadas con la estructura vital de las células de la levadura. En 1876, Willian Kuhne propuso el nombre de enzima. Este término deriva de las palabras griegas *en* (en) y *zyme* (levadura). Posteriormente en 1897, Eduard Buchner probó que las enzimas podían ser extraídas de las células de las levaduras y ser usadas por sí mismas. A partir de este descubrimiento y del empleo de diversos sustratos, se empezaron a extraer enzimas muy diversas y con destinos diferentes que hicieron que su empleo se extendiera a distintas ramas de la industria; empleándolas como detergentes, fabricación del papel, fabricación textil, tratamiento de cueros, farmacia, destilería, aceites y grasas, almidones y azúcares, etc. En 1982 la compañía finlandesa Cultor comienza a desarrollar enzimas alimenticias para nutrición animal quien pone en el mercado finlandés el primer producto enzimático y en 1986 es cuando empieza a comercializarse una enzima específica para aves. Fue hasta el año de 1988 que se desarrolla una enzima específica para cerdos que mejoraba la producción y la absorción de nutrientes. Esta enzima comenzó a emplearse en lechones para arranques muy precoces y destetes más rápidos (Van, 2008).

2.6 Celulasas

La hidrólisis de la celulosa puede llevarse a cabo tanto por vía química, utilizando álcalis o ácidos, como por vía enzimática, ya que no requiere condiciones tan extremas de pH y temperatura. La transformación de la celulosa por vía enzimática implica la acción de un sistema multienzimático; el complejo celulasas, constituido básicamente por tres enzimas; **endoglucanasa**, que ataca al azar enlaces 1, 4-glicosídicos de la cadena de celulosa; **exoglucosanasa**, que actúa sobre el extremo no reductor de la cadena dando lugar a unidades de celobiosa, y **glucosidasa**, que hidroliza específicamente celobiosa para dar lugar a glucosa (Lucas *et al.*, 2009).

Una vez degradadas las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucosanasa y exoglucosanasa (Beldman, 1988). Finalmente, una etapa que limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa mediante la acción de la β 1-4 glucosidasa; porque las glucosanasas son inhibidas por la celobiosa (Lee, 1997).

La hidrólisis de la celulosa está catalizada por la celulasas, que es una mezcla compleja de varias enzimas con diversas actividades hidrolíticas (Cuadro 1), preparada mediante fermentación en fase semisólida o sumergida, utilizando sacarosa (disacárido dímero de la glucosa) como inductor (Lara, 2007).

Cuadro 1. Enzimas involucradas en la hidrólisis enzimática de la celulosa
(Fuente: Lara, 2007).

NOMBRE	SINÓNIMOS	REACCIÓN
Celulasas	Factor C _x Endo-β 1-4 glucanasa	Endo-hidrólisis de enlaces 1,4β-D-Glucosídicos
Celulasas 1,4β-celobiohidrolasa	Factor C ₁ Exo-β 1-4 glucanasa	Exohidrólisis de enlaces 1,4-β D-glucosídicos con formación de celobiosa a partir de celulosa o glucooligosacáridos 1,4-β
		El ataque se produce por el extremo no reductor.
1,4 β-glucosidasa	Celobiasa	Hidrólisis de restos terminales de β-D glucosa en β glucanos.

2.7 Microorganismos ruminales productores de celulasas

Las enzimas celulasas son producidas por una variedad de bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Sin embargo solo algunos de ellos producen la enzima celulasa extracelular, capaz de hidrolizar la celulosa (Eriksson, 1985). De entre los microorganismos capaces de producir celulasas, los rendimientos que se obtienen utilizando hongos son superiores a los conseguidos con bacterias, por lo que la mayor parte de las investigaciones se centran en la producción de este complejo enzimático a partir de hongos (Lucas *et al.*, 2009). Otros microorganismos productores de celulasas incluyen las bacterias aeróbicas mesófilas y termófilas (*Cellulomonas sp*, *Cellvibrio sp*, *Microbispora* y

Thermomonospora sp) y las bacterias anaeróbicas mesofílicas y termofílicas (*Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Clostridium thermocellum*). Entre estos microorganismos, los termofílicos son de interés por su capacidad para producir enzimas celulolíticas termoestables, las cuales son en general estables bajo condiciones severas, incluso en niveles de pH altamente ácidos o alcalinos así como temperaturas hasta de 90° C.

2.8 Fermentación ruminal

Según Leng *et al.*, (1991), para nutrir a los animales rumiantes a partir de manipular los procesos fermentativos en el rumen es necesario tener en consideración los siguientes principios o requisitos:

- a) Establecer una fermentación eficiente
- Optimizar el crecimiento microbiano, lo que se logra al incrementar la eficiencia de síntesis de proteína microbiana ruminal
- Maximizar la digestión de la fibra
- b) Lograr un metabolismo y balance de nutrientes eficiente
- c) Tener en consideración la nutrición de los microorganismos del rumen y la del animal hospedero
- Proteína de sobrepaso, que provee de aminoácidos esenciales al animal.
- Almidón de sobrepaso, que provee un suministro de glucosa adicional
- Suministro de lípidos que contienen ácidos grasos de cadena larga para la síntesis de tejidos y grasa de la leche.

Leng (1991) menciona que el propósito de un sistema ruminal eficiente es alcanzar altas tasas de síntesis de proteína microbiana en relación con la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y, consecuentemente, mayor consumo de alimentos (2.5 - 3 % del PV). Esto depende de diversos factores, entre ellos: disponibilidad de nutrientes esenciales, fundamentalmente amonio, azufre, aminoácidos ramificados, fósforo, péptidos y minerales trazas. Igualmente, se deberá trabajar en la obtención de alta digestión de compuestos estructurales (celulosa, hemicelulosa, lignina, y otros); incrementos en la proporción molar de ácido

propiónico y sustratos glucogénicos totales; así como en la reducción de la proteólisis, amilólisis y metanogénesis ruminal.

Una de las prácticas más acertadas y relativamente fáciles de realizar en materia de manipulación, es la referida a balancear la dieta teniendo en consideración los requerimientos nutricionales del animal y de los microorganismos que habitan en el rumen (Sales *et al.*, 2000. Galindo *et al.*, 2001) Así, por ejemplo, si los rumiantes se alimentan con fuentes proteicas como las leguminosas, algunas de las cuales presentan proteínas solubles altamente degradables en el rumen, es necesario garantizar la energía suficiente para que se produzca la adecuada síntesis de proteína microbiana o la inclusión de agentes protectores de la misma a la proteólisis ruminal (Mosimanyana, 1992). En Cuba se han desarrollado diferentes estudios que dan respuesta a esta problemática (Fonseca *et al.*, 2000).

Según Galindo (2000) para manipular la fermentación microbiana ruminal a partir de la dieta que se suministra, se pueden utilizar dos vías: la primera comprende un conjunto de acciones encaminadas a optimizar dicha fermentación mediante el empleo de diferentes métodos de manejo de la ración y la segunda, se refiere a la modificación del alimento antes del suministro a los animales. La fermentación ruminal es la actividad metabólica de los microorganismos presentes en el rumen. Tiene aspectos que difieren de la digestión glandular propia de los animales monogástricos (como el cerdo). La digestión propia de la mayoría de los mamíferos ocurre en el estómago y el intestino delgado por enzimas producidas por el animal mismo. Esto se denomina 'digestión autoenzimática. En los rumiantes, la degradación de los sustratos moleculares por la acción de bacterias y otros microorganismos se realiza por una hidrólisis enzimática igual que en la digestión glandular; la diferencia mayor es que las enzimas digestivas en la fermentación son de origen microbiano, por lo que se le denomina digestión aloenzimática. Esta digestión fermentativa es más lenta y los sustratos son alterados en mayor grado que en la digestión glandular. Además la fermentación ocurre en un medio anaerobio.

La digestión aloenzimática puede ocurrir en solo dos sitios del tracto gastrointestinal. Estos sitios son el ciego y/o colon por un lado y por otro lado en el retículo-rumen. En el primer caso se habla de fermentación

ceto-alcohólica (o post-gástrica) y en el segundo caso de fermentación pre-gástrica, la cual corresponde a los rumiantes.

2.8.1 Procesos en el retículo-rumen

El alimento que ingresa al aparato digestivo no está directamente disponible para ser utilizado por el animal. El alimento consiste de macromoléculas que deben ser degradadas a compuestos más simples para que puedan ser absorbidas a partir del Tracto Gastrointestinal (digestión glandular). Previo a la digestión glandular el alimento sufre acción mecánica en la masticación cuando el animal ingiere los alimentos. Esta acción mecánica sirve para reducir el tamaño de las partículas pero no es suficiente para permitir la absorción de nutrientes. En los rumiantes el alimento sufre una transformación adicional en el retículo-rumen por acción de la rumia y de los microorganismos presentes. Los rumiantes presentan la particularidad de remasticar su alimento, lo que se llama rumia. En estos animales se distinguen claramente diferentes etapas durante el día, en donde los animales están cosechando alimento (pastoreo), están rumiando o están descansando. La masticación durante el pastoreo es somera. Cuando la capacidad del retículo-rumen está colmada, el animal comienza la rumia. La remasticación en la fase de rumia es más importante que la masticación inicial, y cada bocado que regresa del retículo-rumen a la boca es minuciosamente masticado por casi un minuto (50 a 70 segundos) (Van, 2008).

El material vegetal consumido por los rumiantes posee poco valor energético por lo que deben comer grandes cantidades para satisfacer sus necesidades energéticas pero con la limitante de que el llenado del retículo-rumen impide que el animal pueda seguir ingiriendo alimento (consumo limitado). Como consecuencia de esto el animal come durante muchas horas en el día (4 a 8 hrs), alternando los períodos de ingesta con los períodos de rumia, para permitir el avance del material ingerido hacia el omaso y abomaso. En el retículo-rumen ingresa alimento, agua y saliva, que se mezcla continuamente por las contracciones de las paredes del órgano (Figura 2). Sobre este contenido retículo-ruminal actúan los microorganismos, y el conjunto de fenómenos transforma a la ingesta. Como

resultado de la fermentación se producirá proteína microbiana, productos finales del metabolismo microbiano, residuos alimenticios y gases. Los productos finales son los nutrientes que en última instancia van a alimentar al rumiante junto con las proteínas microbianas. Gran parte de los productos finales se absorben directamente a la sangre a través de la pared del rumen. Lo que no se absorbe pasa al omaso y abomaso junto con las proteínas microbianas y los residuos alimenticios. Estos residuos van a formar parte de las heces en el intestino grueso. El gas es eliminado principalmente por la eructación.

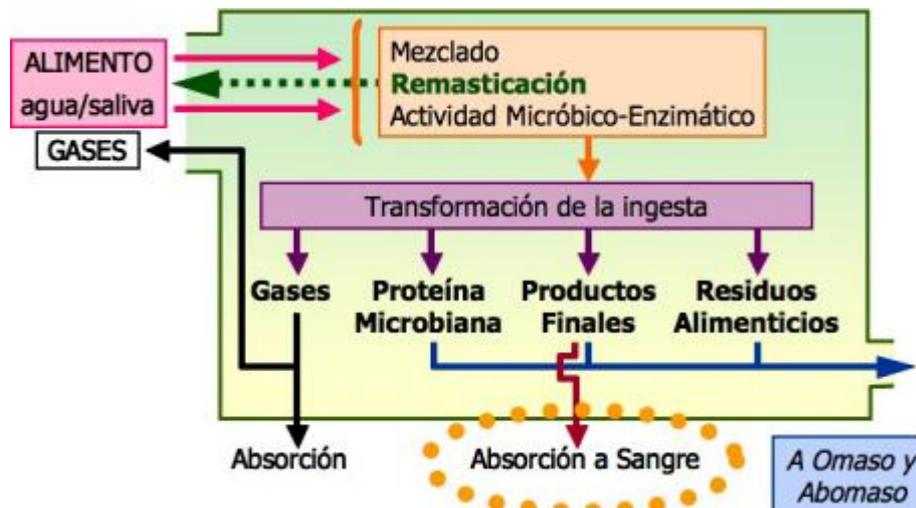


Figura 2. Esquema de los procesos que sufre el alimento en el retículo-rumen (Van 2008).

2.8.2 Microorganismos retículo-rumen

La mayoría de los microorganismos que se encuentran en el retículo rumen son anaerobios estrictos aunque existen algunos facultativos. Estos microorganismos son principalmente bacterias, protozoarios, y hongos del tipo de las levaduras. Aparecen ubicados en tres sitios diferentes en el rumen:

- a) Adheridos a la pared (flora epimural)
- b) Asociados a partículas alimenticias (SAB: solid adherent bacteria)
- c) Libres, flotando en el líquido ruminal (LAB: liquid associated bacteria)

Las bacterias adheridas a la pared hidrolizan la urea y consumen el poco oxígeno que pueda llegar con el alimento ingerido o que difunde a través de la pared del rumen; al resto de los microorganismos el

oxígeno les resulta tóxico. Las bacterias asociadas a partículas atacan sustratos no solubles, hidrófobos (bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas) mientras que las que flotan en el líquido ruminal atacan sustratos solubles, hidrófilos. La biomasa que representa la cantidad de bacterias ruminales (10¹⁰-10¹¹ células/mL de contenido ruminal) es similar a la de protozoarios (50-50%) pero dado que el tamaño de los protozoarios es mucho mayor al de las bacterias, su número es menor que el de éstas (10⁵-10⁶ células/mL de contenido ruminal). Las bacterias se clasifican generalmente según el sustrato que utilizan o según los productos finales de la fermentación que realizan; de este modo se tienen bacterias celulolíticas, las cuales predominan en dietas con alto contenido en forraje, bacterias hemicelulolíticas y pectinolíticas. Las bacterias amilolíticas predominan en el rumen con el consumo de dietas con alto contenido de almidón. Las bacterias que utilizan ácidos intermedios realizan la fermentación secundaria de los productos finales de otras bacterias. Entre estos ácidos se pueden encontrar el lactato, succinato y metanoato. El lactato puede ser fermentado hasta acetato, propionato o ácidos grasos de cadena más larga, el succinato es convertido en propionato y CO₂ y el metanoato es utilizado como precursor para la producción de metano. Las bacterias proteolíticas poseen proteinasas y muchas de ellas tienen también exopeptidasas para una posterior degradación de oligopéptidos hasta aminoácidos y péptidos más pequeños. Las bacterias productoras de amoníaco lo obtienen mediante la desaminación de aminoácidos (Van, 2008).

El amoníaco se puede obtener también de la hidrólisis de la urea y en este proceso actúan bacterias ureolíticas. Las bacterias lipolíticas hidrolizan triglicéridos y fosfolípidos dando glicerina y ácidos grasos. Las bacterias productoras de metano están muy asociadas a la fermentación de forraje y sobreviven en condiciones ruminales similares a las en que sobreviven las bacterias celulolíticas. Estos dos tipos de bacterias se inhiben con pH bajo (6.5 o menos). La tasa de reproducción de las bacterias es mucho más alta que la de los protozoarios; además éstas sufren un constante arrastre hacia la zona de tracto bajo (abomaso-intestinos) por lo que la población tiene un rápido y continuo recambio. Por el contrario, los protozoarios no tienen esta alta tasa reproductiva por lo que deben

protegerse para evitar ser 'lavados' hacia el tracto bajo. Esto lo logra bajo el fenómeno que se conoce como 'autosecuestro', donde los protozoarios se ubican en lugares estratégicos (sacos ciegos caudo-dorsal y caudo-ventral), o se adhieren a las partículas alimenticias de mayor tamaño para evitar el arrastre.

La mayoría de las especies de protozoarios ruminales son ciliadas, aunque existen también algunas flageladas. Los protozoarios no son fundamentales para la digestión en el rumen; se ha visto que los rumiantes pueden sobrevivir sin la presencia de protozoarios ruminales. Su función no está del todo dilucidada, pero se sabe que enlentecen la digestión de sustratos altamente digestibles (almidón), englobándolos en su interior y protegiéndolos así de la rápida acción bacteriana. Los hongos presentes en el retículo-rumen tampoco son esenciales para la vida en los rumiantes, pero tienen una función importante en la digestión de las paredes celulares de los vegetales, sobre todo en aquellos de baja calidad.

2.8.3 Condiciones del medio retículo-ruminal

Para que se produzca una correcta fermentación bacteriana hay parámetros ruminales que deben considerarse, ya que fuera de sus rangos normales provocan alteraciones de la digestión. Las condiciones del medio ruminal deben estar en un rango compatible con el crecimiento de microorganismos que sean adecuados para la fermentación.

Ecosistema abierto y continuo: Para que una población de microorganismos pueda desarrollarse y mantenerse en un medio, este debe permitir una entrada continua de sustratos y también una salida permanente de desechos y de microorganismos muertos. **Aporte constante de sustratos:** Los microorganismos necesitan nutrientes para poder desarrollarse, multiplicarse y mantenerse como población. Por lo tanto la ingesta que realiza el rumiante provee a los microorganismos los sustratos para su sustento. **Tiempo de retención:** Los procesos fermentativos son más lentos que la digestión tal como ocurre en el estómago e intestino delgado. Para que esa fermentación sea eficiente, el contenido ruminal debe ser retenido en el retículo-rumen tiempo suficiente para permitir la acción

microbiana. La conformación del rumen, el diámetro pequeño del orificio-retículo-ruminal, la función de selección del retículo y el sitio motor del retículo-rumen garantizan un tiempo adecuado de retención. **Medio acuoso:** las reacciones bioquímicas se realizan en un medio acuoso. Gran parte de las enzimas bacterianas son extracelulares y actúan en el líquido ruminal. **Anaerobiosis:** el ambiente ruminal es anaerobio. En presencia de oxígeno en lugar de obtener productos que se utilizan como fuente de energía disponible para el animal, como los ácidos grasos volátiles, obtendríamos CO₂ y H₂O. **Osmolaridad:** la fermentación normal se lleva a cabo con una osmolaridad entre 260 y 340 mOsm. Este parámetro se ve alterado tras la ingestión de concentrados (pudiendo llegar a 400 mOsm). Con alta osmolaridad se inhibe la digestión del almidón y fibra (por inhibición de las bacterias ruminales) y se altera la rumia. **pH:** Puede variar entre 5.8 y 7.0. Luego de la ingesta de concentrados el pH baja considerablemente (por la rápida fermentación producida lo cual genera un medio ácido). Las bacterias celulolíticas se inhiben a pH menor de 6.0. A pH menor de 5.5 suelen ser anormales tanto la función ruminal como la del animal como consecuencia de la acidosis. **Temperatura:** debido a la enorme cantidad de procesos metabólicos que se producen en el rumen la temperatura suele ser 1 o 2 grados por encima de la temperatura corporal del animal (38 a 42 °C). Se pueden lograr descensos de la temperatura ruminal con ingesta de agua o forraje frío (Galindo 2001).

2.9 Metabolismo de los carbohidratos

Todos los carbohidratos, independientemente de su clasificación, son fermentados en el retículo-rumen hasta glucosa y toda la glucosa pasa a piruvato (Figura 3). Por distintas vías metabólicas, el piruvato es transformado en acetato, propionato o butirato. El rendimiento de una glucosa es 2 piruvatos ya que el piruvato tiene 3 carbonos. Para la formación de acetato y butirato, el piruvato se transforma en acetil-coenzima A (Acetil-CoA) y en el proceso pierde un carbono. Un Acetil-CoA pasa a acetato, y para formar butirato se utilizan 2 Acetil-CoA.



Figura 3. Carbohidratos de la dieta son transformados en piruvato (Galindo 2001).

En la formación de propionato no hay pérdida de carbonos. Hay diferentes vías para llegar a propionato. La primera vía es la reductiva directa, donde el piruvato pasa a lactato, el lactato a acrilil-coenzima A, y esta a propionato, sin que se ganen ni se pierdan carbonos. La vía aleatoria es vía el oxaloacetato. En este caso se incorpora un carbono al piruvato para formar oxaloacetato, que pasa a succinato (4 carbonos) y de ahí a propionato perdiendo el carbono que se había incorporado (Figura 4). En la vía aleatoria se produce oxígeno molecular.

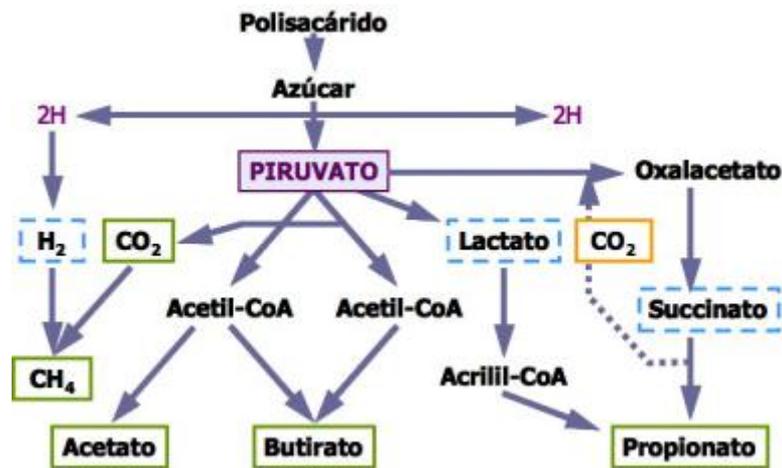


Figura 4. Vías metabólicas ruminales de acetato, butirato y propionato (Cunningham 2002).

Los AGV son sustratos energéticos importantes para el rumiante. Se puede apreciar la elegancia de la relación simbiótica de la digestión fermentativa al considerar el metabolismo de los AGV. Los AGV son los productos de desecho del metabolismo anaeróbico de los

microorganismos, de la misma manera que el dióxido de carbono es el producto final del metabolismo aeróbico. Si se permitiera que se acumulasen los AGV, estos suprimirían o alterarían el proceso fermentativo al disminuir el pH del retículo-rumen. Sin embargo, el rumiante mantiene las condiciones para la fermentación al tamponear los cambios de pH y al eliminar los AGV del retículo-rumen por absorción de los mismos. El beneficio para el rumiante está en la energía química que contienen los AGV. Estos productos bacterianos de desecho representan compuestos gastados en cuanto a la energía que se pueda obtener en el marco del sistema de fermentación anaeróbico, pero aún contienen cantidades considerables de energía que pueden ser aprovechadas con el metabolismo aeróbico. En rumiantes los AGV son los combustibles energéticos de mayor importancia, y en gran medida cumplen el mismo rol que la glucosa en animales monogástricos omnívoros. Los herbívoros grandes como el caballo, utilizan también AGV como fuente energética, pero estos son derivados de la fermentación microbiana en el intestino grueso (colon y ciego). Esta fermentación 'post-gástrica' es muy parecida a la fermentación 'pre-gástrica' en el retículo-rumen en cuanto a los carbohidratos se refiere.

2.10 Ácidos grasos volátiles

La fermentación microbiana da lugar a la aparición de muchos AGV distintos. Muchos son intermediarios del metabolismo de los microorganismos. Esta fermentación microbiana es el resultado del metabolismo de muchas especies de bacterias, protozoarios y hongos. Resulta imposible separar las distintas vías metabólicas utilizadas por las distintas especies ya que el producto final de una especie puede ser el sustrato para otra. Esto crea una interdependencia entre distintos microorganismos que forman consorcios para poder sobrevivir en el rumen.

Hay tres AGV que se producen en cantidades tales que no son completamente utilizados en los procesos metabólicos de los microorganismos y éstos están disponibles para el rumiante. Estos AGV son el ácido acético, el ácido propiónico y el ácido butírico. Como se aprecia en la figura 5, estos tres AGV son de cadena muy corta. El ácido acético consta de 2 carbonos, el propiónico de 3 y el butírico de 4. También se forman

pequeñas cantidades de ácido fórmico, isobutírico y valérico, importantes desde el punto de vista metabólico ya que son esenciales para la síntesis de lípidos de membrana de cadena larga. Estos AGV son ácidos débiles, por lo que pueden encontrarse en forma disociada (o ionizada) y en ese estado reciben los nombres de acetato, propionato y butirato. Por cada molécula de glucosa (que tiene 6 carbonos) se puede generar 2 acetatos, o 2 propionatos o un butirato. Esto implica que en la formación de acetato y butirato se pierden dos carbonos, mientras en la formación de propionato no se pierde ninguno. Estos carbonos que se pierden van a formar los gases dióxido de carbono y metano como se verá más adelante. Luego de la absorción de los AGV por las paredes del rumen, el acetato y el butirato son utilizados para la síntesis de grasa corporal y de la leche. El propionato es transformado en glucosa en el hígado, y por lo tanto es el precursor de la lactosa de la leche, entre otras cosas (Van 2008).

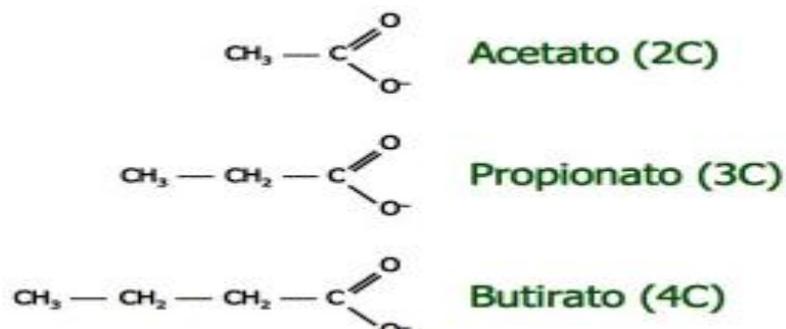


Figura 5. Representación esquemática de los tres ácidos grasos volátiles producidos en el retículo-rumen que son aprovechados por el rumiante (Van, 2008).

2.10.1 Formación de gas

El gas formado en el retículo-rumen consiste principalmente en dióxido de carbono y metano y la composición es muy distinta a la de la atmósfera. Una vaca lechera de alta producción, que tiene un alto consumo de alimento, puede producir unos 600 litros de gas por día. Claro está que ese gas tiene que ser eructado para que no provoque problemas respiratorios.

Cualquier proceso que evite la eructación implica una acumulación del gas en el rumen (meteorismo) que lleva a distensión de ese órgano que comprime los pulmones. Si no se toman medidas, una vaca con

meteorismo muere por asfixia. En el rumen existen bacterias metanogénicas que facilitan la reducción de CO₂ y H₂ en metano y agua, consumiendo los hidrogeniones provenientes de los co-factores. Sin las bacterias metanogénicas no se puede formar metano. Estas bacterias son muy sensibles a cambios en el medio ruminal, especialmente a cambios en el pH. Su rango óptimo es de 6.5 a 7.0 aproximadamente y es similar al de las bacterias celulolíticas. Estos dos tipos de bacterias están íntimamente relacionadas y están asociados a la producción de acetato. En la formación de acetato se libera CO₂ necesario para la formación de metano, por lo que existe una relación directa entre la formación de acetato y metano (Figura 6).

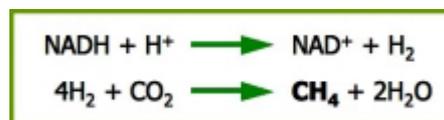


Figura 6. Representación de la reacción de Oxido reducción (Van, 2008).

El otro mecanismo para oxidar a los co-factores es la formación de agua a partir de hidrogeniones y oxígeno. Si bien el oxígeno no abunda en el rumen, cuando se produce propionato por la vía aleatoria (vía oxaloacetato) se libera oxígeno molecular y éste puede ser utilizado para formar agua (Figura 7).



Figura 7. Representación de la vía oxaloacetato (Van, 2008).

Esto implica que si se produce menos metano, se tiene que producir más propionato, ya que los hidrogeniones deben ser captados en algún proceso para que se regeneren los cofactores (Van, 2008).

2.10.2 Relación entre AGV's

El AGV que siempre se produce en mayor cantidad es el acetato (Cuadro 2). Es el producto típico de rumiantes consumiendo forraje y depende del tipo de microorganismo presente. La celulosa y la hemicelulosa son los principales carbohidratos de los forrajes y su presencia en el rumen

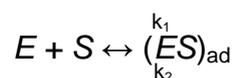
induce el crecimiento de las poblaciones de bacterias celulolíticas, hemicelulolíticas y metanogénicas. Cuando se agregan concentrados a la dieta, se está agregando almidón que es un carbohidrato de fácil digestión; esto induce el crecimiento de una flora amilolítica que está asociado a un cambio de pH en el rumen. En estas condiciones se aumenta la proporción de propionato en el rumen.

Cuadro 2: Proporción de AGV producidos de acuerdo a la proporción forraje/concentrado en la dieta, dado en proporción molar (Adaptado de Church, 1988).

Relación			
forraje- concentrado (%)	Acetato (%)	Propionato (%)	Butirato (%)
100-0	71.4	16.0	7.9
75-25	68.2	18.1	8.0
50-50	65.3	18.4	10.4
40-60	59.8	25.9	10.2
20-80	53.6	30.6	10.7

2.11. Cinética de hidrólisis enzimática

Como la celulosa es un sustrato insoluble, sus características cinéticas difieren sustancialmente de las usuales reacciones homogéneas catalizadas por enzimas. La hidrólisis de un sustrato insoluble de celulosa requiere la adsorción previa de la enzima sobre el mismo. El proceso de adsorción/desorción puede ser descrito según:



Donde: E, representa la concentración de enzima, S, la del sustrato, $(ES)_{ad}$, la concentración de enzima adsorbido sobre el sustrato, y k_1 y k_2 son las constantes para la adsorción y desorción, respectivamente. La etapa de adsorción ha sido modelada, por numerosos autores, por medio de la isoterma de Langmuir o por modificaciones de ésta. Si se considera la

relación k_1/k_2 igual a la constante de adsorción K_{12} , el modelo de Langmuir puede escribirse:

$$E_{ad} = \frac{E_{sat} K_{12} E_f}{1 + K_{12} E_f}$$

Donde: E_{ad} , representa la concentración de enzima adsorbido en el equilibrio, E_{sat} , la cantidad de enzima adsorbido a saturación y E_f , la concentración de enzima libre en disolución en el equilibrio.

La ecuación cinética de Michaelis-Menten asume que la formación del complejo enzima-sustrato (ES) es un requisito previo para la reacción enzimática:



Donde: k_a y $k_{a'}$, representan las constantes directa y reversible de formación del complejo activado, respectivamente, k_b , la velocidad de reacción y P, el producto de reacción.

Si la relación enzima/sustrato es pequeña y las concentraciones de sustrato están comprendidas entre los límites de saturación, la velocidad de reacción inicial (v) puede expresarse:

$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$

Donde: V_m , representa la velocidad máxima de reacción (a saturación de enzima) y K_m , la constante media de saturación ($K_m = (k_{a'} + k_b)/k_a$).

La aplicación de la ecuación clásica de Michaelis-Menten permite calcular los parámetros de velocidad máxima de hidrólisis a saturación ($V_{m\acute{a}x}$) y la constante de media saturación (K_m), que proporcionan información útil

sobre el mecanismo de hidrólisis. Sin embargo, si se toma en cuenta que la reacción se produce en un sólido hidratado, en el que es prácticamente imposible cambiar la concentración de los lugares específicos del sustrato, parece más conveniente establecer la velocidad de hidrólisis en función de la concentración de enzima que en función de la concentración de sustrato, tal y como lo expresa la ecuación de Michaelis-Menten. Además, teniendo en cuenta que el efecto sinérgico del complejo enzimático desaparece a altas concentraciones de enzima, como las utilizadas normalmente en el ámbito industrial, es apropiado expresar la velocidad de reacción en función de la concentración de enzima. De forma análoga a la ecuación propuesta por Michaelis-Menten se puede calcular una velocidad máxima de hidrólisis a saturación ($V_{em\acute{a}x}$) y una constante de media saturación (K_e), según la siguiente ecuación:

$$v_0 = \frac{V_{em\acute{a}x} [E_0]}{k_e + [E_0]}$$

Donde:

V_0 : velocidad inicial de hidrólisis.

$V_{em\acute{a}x}$: velocidad máxima de hidrólisis a saturación de enzima.

k_e : constante de media saturación.

$[E_0]$: concentración inicial de enzima.

La modelización de la cinética de hidrólisis, incluyendo la etapa adsorción de enzima, ha ocupado un gran número de trabajos en el cual los modelos asumen que la velocidad inicial de hidrólisis es proporcional a la concentración del complejo enzima-sustrato formado (Morán *et al.*, 2008).

2.12 Enzimas en la nutrición animal

En los últimos años se han utilizado enzimas como aditivos en dietas para rumiantes debido al interés que se ha tenido por eficientar el aprovechamiento integral de los nutrientes que componen las raciones. El uso de las enzimas exógenas ha sido muy diverso pues se han implementado para aumentar la digestibilidad de los nutrientes, para

complementar la actividad de las enzimas endógenas y para eliminar los factores anti-nutricionales de los nutrientes existentes (Classen *et al.*, 1991).

2.12.1 Enzimas fibrolíticas

Como ya se mencionó anteriormente las enzimas son proteínas globulares que catalizan reacciones químicas específicas en sistemas biológicos. Estas enzimas digestivas están involucradas en la transformación de macromoléculas complejas (celulosa, hemicelulosa, almidones, proteínas, etc.) presentes en las dietas de los rumiantes, en moléculas más simples (azúcares, péptidos, aminoácidos, etc.) y son esenciales para el animal, ya que las macromoléculas no se absorben directamente en el tracto digestivo a menos que sean degradadas a moléculas más simples (Dean, 2008).

El mecanismo de acción de las enzimas fibrolíticas exógenas es a través de la hidrólisis de algunos componentes de las plantas que impiden la digestión, incrementando por tanto el valor nutritivo de la ración. Por ejemplo, la celulosa es hidrolizada a través de un proceso complejo que involucra la acción de diferentes celulasas, incluyendo endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. En general, las endoglucanasas hidrolizan las cadenas de celulosa aleatoriamente para producir oligómeros de celulosa de varios grados de polimerización; las exoglucanasas hidrolizan la cadena de celulosa desde el lado no reducido produciendo celobiosa y las β -glucosidasas hidrolizan las cadenas cortas de celulosa y la celobiosa hasta glucosa (Beauchemin *et al.*, 2003).

2.12.1.1 Enzimas fibrolíticas en la alimentación del rumiante

Es conocido que las enzimas fibrolíticas pueden aumentar la digestibilidad de la dieta y en algunas investigaciones que se han realizado se ha mostrado que el resultado ha sido positivo. Se ha demostrado además que las enzimas mejoran la digestibilidad de la MS y fibra de las dietas en vacas lecheras (Beauchemin *et al.*, 1999, Rode *et al.*, 1999). También se han hecho estudios en donde se encontró que las enzimas fibrolíticas mejoraron

la digestibilidad de la MS tanto en estudios *in vitro* como en estudios *in situ*. Sin embargo, algunos investigadores no han logrado respuestas positivas similares cuando se utilizan enzimas fibrolíticas. Algunos investigadores informaron que muchos factores deben ser considerados cuando se utilizan enzimas fibrolíticas ya que su utilización puede en determinado caso no influir sobre el rendimiento animal, debido a factores como: preparación de la enzima, cantidad de enzima, pre incubación, contenido de humedad del sustrato, y la interacción de la enzima con el sustrato (Beauchemin, 2002).

Varios estudios recientes han examinado el uso de productos de enzimas exógenas en las dietas de alto forraje para alimentar al ganado en crecimiento. Hay evidencia de que la adición de enzimas fibrolíticas a dietas de forraje puede mejorar la digestibilidad de la fibra, el incremento de la digestibilidad mejora el rendimiento del ganado el cual puede depender del estado fisiológico del ganado y las condiciones del experimento (Medina *et al.*, 2006).

2.13. Actividades enzimáticas involucradas en la digestión de la pared celular

La medición de actividades enzimáticas debe llevarse a cabo bajo condiciones estrictas, con respecto a la temperatura, pH, fuerza iónica, concentración de sustrato, y el tipo de sustrato; todos estos factores afectan a la actividad de una enzima (Ramírez *et al.*, 2004), por lo cual es necesario dar las condiciones óptimas para su mejor y mayor actividad. Las actividades enzimáticas de los productos comerciales más comunes, son medidas proporcionando al microorganismo las características adecuadas en el medio ambiente en el cual tienen su actividad (Torres *et al.*, 2009). La mayoría de las enzimas comerciales necesita una temperatura de aproximadamente 60° C y un pH entre 4 y 5 (Coughlan, 1985). Sin embargo, la temperatura óptima y pH para evaluar la actividad enzimática no son representativos de las condiciones en el rumen, que son más cercanas a un pH de 6.0 a 6.7 y 39° C (Van Soest, 1994). Así, las actividades citadas para los productos enzimáticos comerciales son

considerablemente más altos que para los que miden un pH y una temperatura similar a la del rumen. Además, debido a las condiciones de los ensayos y el método de expresar la actividad enzimática varía entre los fabricantes, es difícil comparar los productos enzimáticos o predecir la eficacia del producto (Beauchemin *et al.*, 2002).

Los efectos de algunas enzimas fibrolíticas exógenas sobre la degradación de forraje son sustanciales, por lo tanto, se considera importante examinar los cambios en la formación de productos finales de la fermentación. El aumento de GP y degradación de la MS se espera que conduzca a un incremento importante en la producción de AGV, sin embargo, los cambios en la porción molar de AGV pueden ser inconsistentes debido a que estos están en función de las actividades enzimáticas suministradas por la enzima fibrolítica exógena y su impacto en la degradación ruminal de la fibra y forraje en actividades microbianas (Marín, 2007).

2.14. Método para proporcionar la enzima en los rumiantes

La aplicación de enzimas fibrolíticas exógenas en una forma líquida sobre el alimento antes de su consumo puede tener un efecto positivo en el rendimiento animal según estudios que se han realizado (Beauchemin, *et al.*, 2002). En contraste, en otras investigaciones la inclusión de las enzimas en el rumen no ha sido eficaz (Sutton *et al.*, 2001). La estrecha asociación de enzimas con la alimentación puede permitir alguna forma de ataque pre digestible de las enzimas sobre la fibra de la planta y / o potenciar la unión de las enzimas a la alimentación, lo que aumenta la resistencia de las enzimas a la proteólisis en el rumen (Montes *et al.*, 2002). Aparentemente, hay poco o ningún requisito para una fase de reacción o tiempo de incubación entre el tratamiento y la alimentación de forrajes. Pero en un estudio se observó un aumento en la digestibilidad en el total del tracto digestivo cuando una solución de enzimas se aplicó a heno antes de la alimentación, pero no había diferencia entre aplicar la enzima inmediatamente antes de la alimentación o en un período de incubación de 24 horas (Lewis, 1996). También se han realizado estudios *in vitro* que han reportado resultados similares (Colombatto, 2000).

Se puede esperar que las enzimas exógenas sean más eficaces cuando se aplica a alimentos de alta humedad (por ejemplo, ensilajes) en comparación con los piensos secos, debido al mayor contenido de humedad. El requisito de agua en la hidrólisis de azúcares solubles a partir de polímeros complejos es un principio fundamental bioquímico. Además, los valores de pH de ensilaje son por lo general óptimos para la mayoría de las enzimas fúngicas. Sin embargo, en la práctica, algunas enzimas exógenas son más eficaces cuando se aplican en forma líquida al forraje seco en comparación con el forraje húmedo (Beauchemin *et al.*, 2002). Feng *et al* citado por (Beauchemin-1996) aplicaron una solución de enzima directamente a la hierba y no se observó ningún efecto cuando se añadió al forraje fresco o marchito, sin embargo, cuando se aplicó a la hierba seca, las enzimas incrementaron la digestibilidad de MS y fibra.

2.15. Antecedentes en la respuesta animal

En general, los resultados con ganado vacuno y vacas lecheras indican una respuesta positiva a las enzimas, pero los resultados son variables. Aunque esta variabilidad puede ser vista como una indicación de que los aditivos enzimáticos no son una tecnología adecuada para rumiantes, se cree que gran parte de la variabilidad puede atribuirse a factores como el tipo de enzima, el nivel de suplementación, método de aplicación de enzima, la energía y equilibrio de los animales de ensayo (Beauchemin, 2007).

De igual manera en ovinos y caprinos las respuestas han sido variables, pues se han obtenido resultados muy heterogéneos; en un estudio realizado en ovinos se utilizó una mezcla de enzimas fibrolíticas (celulasa y xilanasas), adicionadas a un alimento granulado, se agregó aproximadamente 0.5g/d de enzima al alimento, en ovejas lecheras de dos razas distintas con diferente nivel de ingestión y producción de leche. La comparación de ambas razas se realizó en los periodos de cría y ordeño, lo que permitió el estudio de los efectos de las enzimas en condiciones muy diversas. Los resultados que se obtuvieron indicaron la ausencia de efectos significativos en la

ingestión, producción y composición de leche de los dos tipos de ovejas y condiciones productivas (Caja *et al.*, 2003).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente se pudo observar que el uso de un producto de enzimático mejoró la digestibilidad de la dieta cuando se evaluó en las vacas lecheras, pero no en las ovejas. Estos resultados indican que las enzimas exógenas y fibrolíticas mejoran la digestión de la alimentación cuando la digestibilidad potencial de la dieta no es alcanzada, porque la digestión se ve afectada. Esta es la "pérdida" de la energía digestible que se capta con el uso de enzimas para alimentación animal (Beauchemin, 2007).

2.16 Hipótesis

La inclusión de una enzima producida en laboratorio a dietas elaboradas con nopal y maguey, ofrecida a bovinos mejora el rendimiento productivo de los animales.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios del Departamento de Producción Animal (laboratorio de microbiología) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, localizado en Buenavista, Saltillo, Coahuila, a 8km de la ciudad de Saltillo. Sus coordenadas geográficas son 25°20´ latitud norte y 101°26´ longitud oeste, con una altura promedio de 1,752msnm. La prueba de comportamiento con becerros se desarrolló en el rancho propiedad del Sr. José Luis de León A, ubicado en el libramiento J. López Portillo al norte de la ciudad de Saltillo en los límites del municipio de Ramos Arizpe.

Etapas I. Caracterización bromatológica del nopal y maguey

3.1 Material orgánico de evaluación

Se evaluaron nutricionalmente muestras de nopal (*Opuntia ficus indica*), y maguey (*Agave salmiana*), las cuales se llevaron a cabo por medio de las técnicas de la A.O.A.C. (1990). Para:

- Determinación de materia seca total
- Determinación de humedad
- Determinación de proteína (método de microkjeldahl)
- Determinación de cenizas totales (minerales)
- Determinación de extracto etéreo o grasa
- Determinación de fibra cruda
- Determinación de fibra detergente neutro (FDN)
- Determinación de fibra detergente ácido (FDA)

Etapas II. Fermentación para la producción del extracto enzimático a partir de un microorganismo aislado del rumen bovino

3.2 Material biológico

Las cepas de los microorganismos VML-2 (aislado de una vaca alimentada con masilla y levadura) (figura 8) que fueron utilizadas en esta investigación fueron tomadas de cultivos puros aislados e identificados por

Valdez (2010) pertenecientes al cepario del Departamento de Producción Animal.



Figura 8. Fotografía de las cepas aisladas conservadas en tubos de cultivo con AS (Valdez, 2010).

3.2.1 Preparación de medio sólido

Se prepararon varias cajas Petri con agar Schaedler (BD BBLTM), agregando 6.28 g por cada 150 ml de agua destilada dentro de un matraz Erlenmeyer de 250 ml, esto se disolvió con flama de un mechero hasta que el liquido presentara una coloración cristalina, posteriormente se esterilizó el medio en un autoclave a 121°C y 15 Lb de presión durante 15 min. Para llevar a cabo la siembra se utilizó el medio sólido, transcurrido el tiempo de esterilización del medio se retiró del autoclave para posteriormente realizar el vaciado del medio en las cajas Petri las cuales estaban previamente estériles, se realizaron siembras en las cajas, por el método de estría abierta cruzada sobre el agar Schaedler, después se incubó a 37°C por 24 horas bajo condiciones de anaerobiosis, hasta observar crecimiento sobre el medio. Para la creación del ambiente en condiciones anaerobias y favorecer el crecimiento del microorganismo, para llevar a cabo la anaerobiosis se utilizaron botes de plástico con tapa de rosca, dentro del cual se colocaron las cajas Petri ya sembradas, se colocó una vela prendida en el centro del bote y se cerró, colocando cinta alrededor de la tapa para que no hubiese presencia de oxígeno que pudiera interrumpir la anaerobiosis, cuando la vela se apaga indica la ausencia de oxígeno dentro del bote, obteniendo así las condiciones para el crecimiento de las enzimas.

3.2.3 Tinción de Gram

Se realizó la técnica de tinción de Gram para observar las características morfológicas de los microorganismos empleados. Para ello se utilizó un asa la cual fue esterilizada llevándola al fuego del mechero para que no hubiese contaminación a la hora de tomar la muestra, cuando esta se retiró del fuego se dejó enfriar en una de las extremidades del medio para enfriarla, se tomó la muestra del cultivo puro y se disolvió en un portaobjetos a este se agregó una gota de agua destilada, se homogenizó la suspensión de bacterias, posteriormente se fijó la muestra con calor en el mechero. Una vez fijada la muestra se cubrió con cristal violeta dejándolo reaccionar por 60 segundos y se enjuagó suavemente al chorro del agua; se cubrió de nuevo la superficie con una solución de yodo (Iugol) y se dejó reaccionar por 1 minuto; se enjuagó suavemente y se decoloró utilizando una solución de alcohol-acetona por unos segundos, después enjuagarse finalmente se cubrió la superficie con una solución de safranina y se dejó actuar por 1 minuto para después enjuagarse con agua destilada. Se dejó secar la preparación por completo para después observar los microorganismos teñidos empleando un microscopio óptico a 100X con aceite de inmersión.

3.3 Fermentación para la producción de celulasa en medio líquido específico

Se preparó un medio líquido específico (cuadro 3) para la degradación de celulosa con la siguiente composición.

Cuadro 3: Composición del medio líquido específico para producción de celulasa.

Componente	Cantidad (%)
NaCl	0.5
NaNO ₃	0.3
KCl	0.5
Fuente de C (celulosa)	1
Carboximetil celulosa de sodio (GOLDEN BELL)	
KH ₂ PO ₄	0.2
MgSO ₄	0.01

3.3.1 Producción de celulasas

Se preparó el medio líquido específico para inducir al microorganismo a la producción de celulasas. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se agregaron 70 mL de agua destilada y se disolvieron NaCl, NaNO₃, KCl, KH₂PO₄, MgSO₄, posteriormente se solubilizaron y esterilizaron en un autoclave a 121°C y 15Lb de presión durante 15min. La fuente de carbono (celulosa), previamente esterilizada en lámpara V fue disuelta en 30 mL de agua destilada, fue adicionada a los matraces donde fueron disueltos los minerales una vez que el medio se encontraba a temperatura ambiente esto se realizó por duplicado y teniendo un control. Posteriormente se hizo una suspensión celular, de cada uno de los matraces se tomó 1 ml y del control se agregaron 6 ml estas fueron tomadas con una micropipeta y utilizando puntillas de 1 ml para agregarlos al cultivo puro haciendo un barrido con la misma puntilla que se tomaron las muestras, realizando la suspensión se tomó 0.5 ml para cada matraz excluyendo el control, se incubaron a 40° C y se realizó anaerobiosis esto se realizó por un tiempo de 96 horas. Los experimentos se realizaron por duplicado, se centrifugó el medio en tubos de ensayo a 5000 revoluciones por un tiempo de diez minutos, con la finalidad de separar el extracto enzimático de la biomasa. El extracto enzimático se depositó en un matraz Erlenmeyer de 250 ml para determinar proteína extracelular por el método de Biuret.

3.3.2 Cuantificación de proteína extracelular y celular

Para la cuantificación de proteína celular y extracelular se tomaron varios tubos de ensayo estériles para agregar cada una de las muestras a analizar, se realizó mediante la técnica de proteínas totales. La técnica consiste en agregar 10 µL de las muestras y 500 µL de reactivo Biuret a cada tubo (cuadro 4) y leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm. Para conocer el efecto de las condiciones de reacción sobre la enzima se prepararon una muestra patrón y una muestra blanco.

Cuadro 4: Preparación de muestras para cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret

	Blanco	Patrón	Muestra
Agua destilada	10 µl	-----	-----
Biomasa	-----	-----	10 µl
Extracto enzimático	-----	-----	10 µl
Reactivo Biuret	500 µl	500 µl	500 µl
TP	-----	10 µl	-----

Para el análisis de datos se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Conc. de Prot. Tot.} = \frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patron}} \times \text{conc. Patron}$$

A= absorbancia

3.4 Etapa III. Evaluación del comportamiento productivo en bovinos

3.4.1 Animales utilizados

Se utilizaron 25 bovinos machos, 5 bovinos por tratamiento, todos de raza beefmaster, con una edad promedio aproximada de 10 meses, con un peso promedio de 195 kg.

3.4.2 Tratamientos

En el experimento se evaluaron cinco tratamientos, (cuadro 5) se avalúo el efecto de la enzima producida en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Cuadro 5. Ingredientes de los diferentes tratamientos

Tratamiento	T1	T2	T3	T4	T5
/ Ingredientes	%	%	%	%	(testigo) %
Nopal	20	0	0	0	0
Nopal+enzima	0	20	0	0	0
Maguey	0	0	20	0	0
Maguey+enzima	0	0	0	20	0
C. de arroz	0	0	0	0	20
Sorgo	30	30	30	30	30
Avena	25	25	25	25	25
Gallinaza	18	18	18	18	18
Melaza	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
S. mineral	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

3.4.3 Preparación de los animales

Antes de iniciar el experimento se dio un periodo de adaptación de 15 días en el que se ajustaron los criterios de selección de alimento se pesó cada uno de los animales, además y fueron vacunados contra las principales enfermedades de la región y desparasitados.

3.4.4 Variables determinadas en el experimento

Las variables analizadas en el experimento fueron las siguientes:

a). Comportamiento productivo

- Consumo diario de materia seca (CDMS)
- Ganancia diaria de peso (GDP)
- Conversión alimenticia (CA)

b). Metabolitos en suero sanguíneo

- Glucosa
- Urea
- Creatinina
- Colesterol

- Proteínas totales
- c). Concentración de AGV'S
- Acético
 - Propiónico
 - Butírico

3.4.5 Comportamiento productivo

Diariamente se anotaba e el alimento que era ofrecido a cada uno de los animales ajustándose al consumo de cada tratamiento, al retirar cada mañana el alimento rechazado éste se pesaba, de esta manera se obtuvo por diferencia el CDMS (alimento ofrecido menos alimento rechazado).

Como ya se mencionó los animales fueron pesados antes de iniciar la prueba y al finalizar el experimento se pesaron de nuevo, y en base a esta diferencia se determinó la GDP. Para determinar la conversión alimenticia se utilizaron las variables anteriores dividiendo CDMS/GDP.

3.4.6 Determinación de metabolitos

Una semana antes de finalizar la prueba se extrajo una muestra de sangre de cada tratamiento para determinar los metabolitos sanguíneos, Las muestras se extrajeron de la vena aorta ubicada en el cuello de los animales.

3.4.7 Determinación de AGV's

Para determinar la concentración de ácidos grasos volátiles se extrajo líquido ruminal de cada uno de los animales, la extracción fue llevada a cabo al finalizar la prueba. La técnica utilizada correspondió a las técnicas según Tejada (1992).

3.4.8 Análisis estadístico

Las variables correspondientes a comportamiento productivo (CDMS, GDP y CA) en conjunto con metabolitos sanguíneos (creatinina, urea, colesterol, glucosa y proteínas totales) y concentración de AGV'S se analizaron conforme a un diseño estadístico de 5 bloques completamente al

azar. Todas las variables fueron analizadas utilizando la prueba de Tukey mediante el programa R Statistical Software.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis bromatológico de muestras de nopal (*Opuntia ficus indica*) y maguey (*Agave salmiana*)

El cuadro 6 muestra los resultados obtenidos del contenido nutricional del nopal, el cual muestra que el contenido de fibra cruda es diferente. Sáenz (2006), indica en su investigación que el nivel de proteína es mayor en nopales jóvenes, siendo la fibra cruda la que aumenta con el paso del tiempo, llegando a 17.1 por ciento en los tallos suberificados; esta tendencia se pierde en cuanto al porcentaje de cenizas, debido a las propiedades que componen a esta y su alta relación con la composición química de los suelos. Por su parte, Rodríguez Félix y Cantwell (1988), indican que la composición química de los nopales frescos es principalmente agua (91%) y 1.5% de proteínas, 0.2% de lípidos; 4.5% de hidratos de carbono totales, 1.3% de cenizas, de la cual 90 % es calcio, además, contiene 11 mg/100 g de vitamina C y 30 mg/100 g de carotenoides; y un contenido de fibra (del 1.1%).

Fuentes *et al.*, (2004), quienes evaluaron el contenido nutricional de cuatro variedades de nopal (*Opuntia spp*) forrajero, reportaron los siguientes resultados: proteína entre 5-12%, extracto etéreo entre 0.45-1.89%, fibra cruda entre 10.7-11.4%, ceniza entre 18-35%, MST entre un rango de 88-96%. Mientas que para FAD y FND de las dos especies utilizadas se obtienen valores semejantes comparando con los citados por Mata, (2011), quien menciona es su evaluación de dos variedades de *Opuntia* que el contenido de FAD se encuentra alrededor de 15 y 16% y el contenido de FND entre 32 y 37% aproximadamente.

Cuadro 6. Contenido nutricional de *Opuntia ficus indica*

Componente (%)	<i>Opuntia ficus indica</i>
MST	90.1
Humedad	9.9
Proteína cruda	5.3
Cenizas	21.63
Materia orgánica	69.76
Grasa	1.80
Fibra cruda	9.36
FDN	36.80
FDA	14.95

Por otra parte el Análisis bromatológico del maguey arrojo los resultados que se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Contenido nutricional de *Agave salmiana*

Componente (%)	<i>Agave salmiana</i>
MST	12.0
Humedad	88.0
Proteína cruda	5.8
Cenizas	5.57
Materia orgánica	87.20
Grasa	2.86
Fibra cruda	2.72
FDN	3.18
FDA	6.10

Martínez (1994), quien realizó un trabajo con dos especies de maguey, en las que reporto los siguientes valores: materia seca 11.12%, proteína cruda 4.96 %, extracto etéreo 1.64%, fibra cruda 18.89% y cenizas 16.89%.

Según Gonzales (1994), reporta los siguientes valores para materia seca 11.14%, proteína 4.62% extracto etéreo 1.33% cenizas 20.51% fibra 17.24% al evaluar dos especies de maguey forrajeras (*Agave salmiana* y *Agave atrovierens*) utilizadas en zonas áridas del norte del México en relación a sus características fenológicas.

En la figura 9 se puede observar una comparación nutricional de *Opuntia ficus indica* y de *Agave salmiana* en la que se puede apreciar que los valores nutricionales expresados en porcentajes son semejantes para proteína (5.3 y 5.8), materia seca total (9.9 y 12), grasa (1.8 y 2.86), mostrando diferencia para fibra cruda (9.36 y 2.72), materia orgánica (69.76 y 87.2) y fibra detergente neutro (36.8 y 3.18) respectivamente.

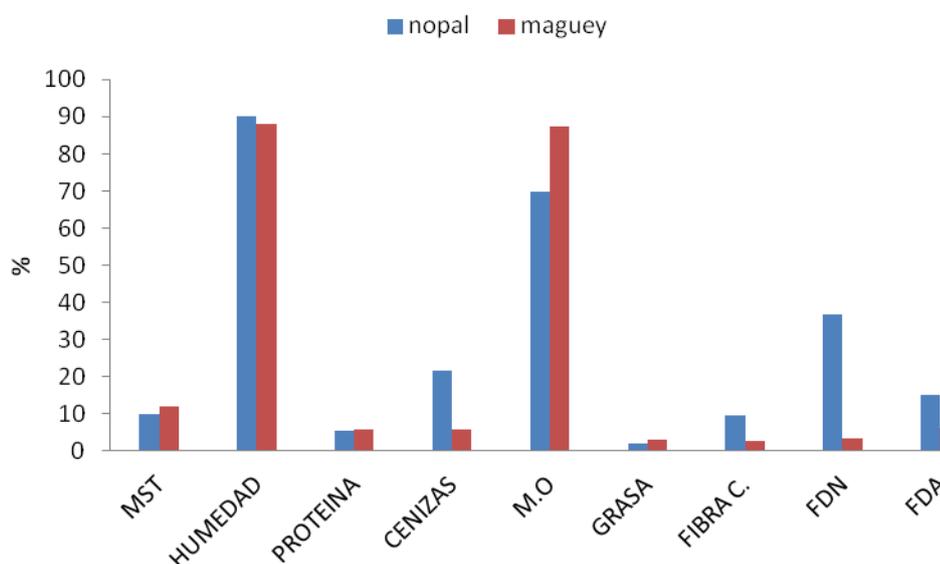


Figura 9. Comparación del contenido nutricional de *Opuntia ficus indica* y *Agave salmiana*

4.2 Fermentación para la producción del extracto enzimático a partir de un microorganismo aislado del rumen bovino

La cepa VML-2 presenta las siguientes características macroscópicas: una coloración blanca, elevación convexa, forma irregular, aspecto húmedo y consistencia suave (Figura 10). Mata (2011) y Valdez (2010) presentan resultados muy similares en relación a estas características. Valdez (2010) proclamó a este microorganismo como un excelente productor de la enzima celulasa, por lo que posteriormente se empleó para la degradación de celulosa del nopal.



Figura 10. Características macroscópicas de la cepa VML-2 en medio sólido.

La evaluación microscópica de las células puras que fueron teñidas mediante la técnica de Gram presentaron las siguientes características: bacilos cortos Gram negativos, no agrupados (Figura 11). Estas características concuerdan con las descritas por Valdez (2010) y Mata (2011).



Figura 11. Observación microscópica (100X) de microorganismos producidos por la cepa VML-2.

4.2.1. Determinación y cuantificación de proteína celular y extracelular por el método de Biuret.

En el cuadro 8 se representa la cantidad de proteína extracelular y celular a las 96 horas de fermentación, obteniendo valores de 0.94 mg/ml para proteína extracelular y celular, estos valores son similares a los obtenidos por Mata (2011) dónde presenta que a las 96 horas de fermentación obtiene 0.95 mg/ml para los dos tipos de proteína. Estos valores son un poco elevados en comparación con lo mencionado por Valdez (2010). En dicho estudio utilizando enzimas degradadoras de celulosa producidas por la cepa VML-2, en un tiempo de fermentación de 24 horas obtuvo una mayor cantidad de proteína extracelular (0.65 mg/ml), afirmando que la cantidad de proteína extracelular disminuye conforme aumenta el tiempo de fermentación, también señala que a un tiempo de 96 horas de fermentación aumenta la concentración de proteína, la cual puede ser debido a que los microorganismos en condiciones de estrés (medio de cultivo) producen proteasas que son liberadas al medio de cultivo provocando diferentes grados de proteólisis.

Cuadro 8. Contenido de proteína celular y extracelular a las 96 horas de fermentación.

Muestra	Proteína extracelular	Proteína celular
Extracto enzimático	0.00094 mg	-----
Biomasa	-----	0.00094 mg

4.2.2. Cinética enzimática en (*Opuntia ficus indica*) Somogy-Nelson

En la figura 12 se puede observar que las enzimas celulasas producidas por la cepa VML-2 tienen gran actividad en los primeros 45 minutos, a partir de ahí se observa una fase de estabilidad en un rango de 45 a 90 minutos para posteriormente continuar con su máxima actividad que se presentó a los 120 minutos ya que de ahí presentó un descenso drástico hasta las 96 horas lo que significa agotamiento de sustrato, con una máxima actividad de 2900 U. Mata (2011) utilizando *Opuntia lindheimeri* menciona que las enzimas celulasas producidas por la cepa VML-2 presentaron su mayor actividad enzimática en los primeros 60 minutos, lo que significa que en el transcurso de ese tiempo presentó la mayor cantidad de azúcares reductores que significa la ruptura de la celulosa y su conversión en azúcares más simples, un ejemplo de ello es la glucosa. Estas enzimas mostraron un rápido descenso en un rango de 60 a 90 minutos, presentando una actividad enzimática de 1430 U, a partir de este tiempo su descenso se presentó lentamente.

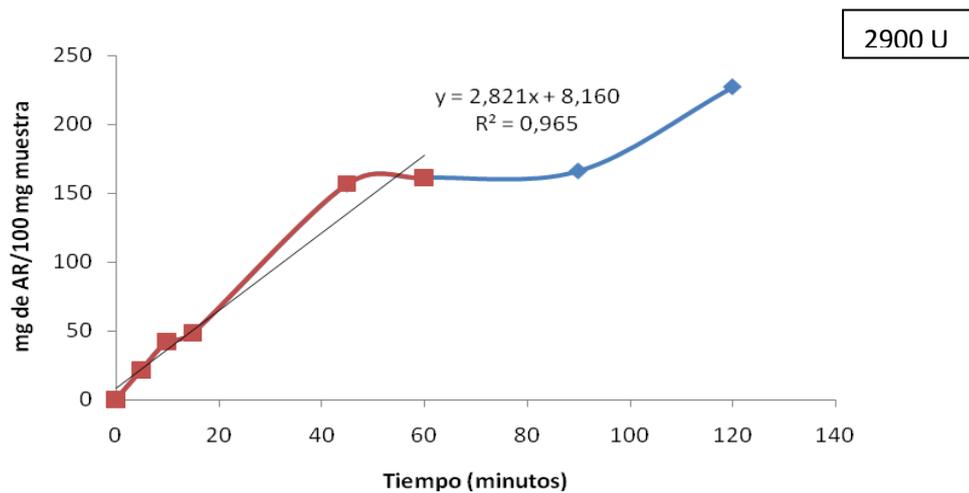


Figura 12. Degradación enzimática de celulosa en nopal *Opuntia ficus indica*. Utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2.

4.2.3 Cinética enzimática en maguey *Agave salmiana*

La figura 13 representa la tasa de degradación de celulosa en maguey (*Agave salmiana*) en la que se puede observar que durante los primeros 5 minutos la enzima celulasa presenta gran actividad, después de los 5 minutos y hasta los 15 presenta poco incremento en la actividad, de los 15 minutos a los 30 minutos vuelve a presentar gran actividad celulasa hasta los 90 minutos que fue la mayor actividad presentada con valores de 3751 U, posteriormente comienza la disminución de actividad. Gonzales. (2011) utilizo varias especies de nopal y menciona que durante los primeros 5 minutos presenta una fase de adaptación, a partir de los 5 a los 120 minutos presento gran actividad de celulasas. No presentando fase de adaptación y disminuyendo drásticamente hasta las 24 horas su mayor actividad empleando de estas variedades fue de 1557 U.

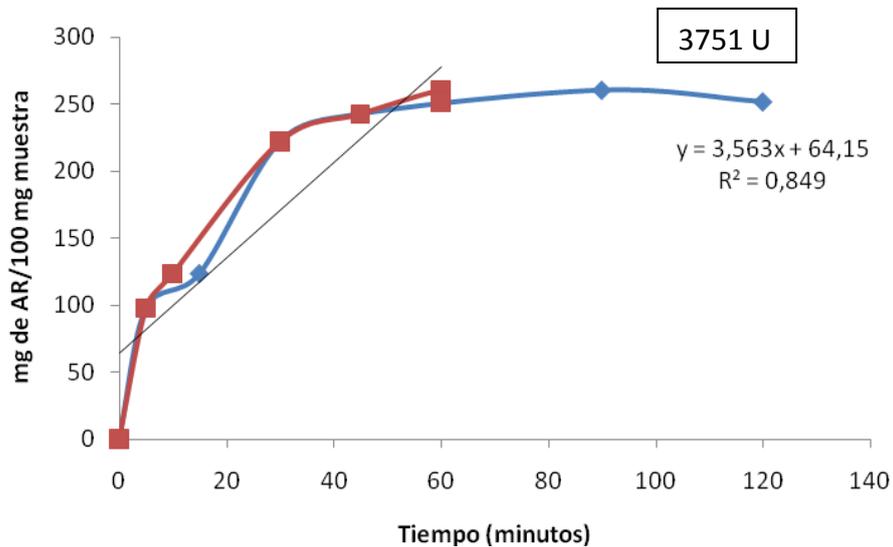


Figura 13. Degradación enzimática de celulosa en magüey (*Agave salmiana*) utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2.

Tomando como referencia lo anterior la finalidad de tener una degradación previa de nopal y magüey es proporcionar a los microorganismos del rumen, monómeros de glucosa que les permitiera agilizar los procesos metabólicos y generar energía al rumiante de una manera más eficiente, ya que estos son los encargados de producir en su mayor parte la energía que requiere el animal para llevar a cabo los procesos metabólicos como la glucólisis, ciclo de Krebs y transferencia de electrones, logrando con esto una mayor eficiencia alimenticia, así como la obtención de un alimento con mayor valor nutritivo.

Conjuntamente hay diferentes motivos que sugieren la necesidad de implementar tecnologías que ayuden a la mejor digestión de los nutrientes que se ofrecen al rumiante, como puede ser la aplicación de una enzima, como por ejemplo:

- La digestibilidad de la materia orgánica en rumiantes raramente supera el 90% y resulta con frecuencia considerablemente menor.
- Se dispone actualmente de nuevos alimentos para rumiantes, muchos de ellos subproductos de baja calidad, en lo que las enzimas pueden ser de especial utilidad para mejorar sus posibilidades digestivas (Torres *et al.*, 2009).

4.3. Comportamiento productivo

4.3.1 Ganancia diaria de peso, consumo de materia seca y conversión alimenticia.

Terminada la prueba de comportamiento se analizaron los datos obtenidos para comportamiento productivo, los cuales se muestran en el Cuadro 8

Cuadro 8. Resultados de las variables de comportamiento productivo

Variables	Tratamientos				
	T1	T2	T3	T4	T5
CDMS Kg/d*	6.7 ^b	7.2 ^a	7.1 ^b	6.7 ^b	6.7 ^b
GDP Kg/d*	0.792 ^b	1.034 ^a	0.867 ^b	0.851 ^b	0.751 ^b
CA Kg*	8.54 ^{ab}	7.0 ^b	8.3 ^{ab}	8.0 ^{ab}	9.1 ^a

*CDMS: Consumo diario de materia seca, *GDP: Ganancia diaria de peso, *CA: Conversión alimenticia.

Como se puede observar al analizar las variables de comportamiento productivo se encontró que existe diferencia significativa ($P > 0.05$) para el T2 mostrando un valor de consumo de 7.2 kg/día, no siendo así para T1, T3, T4 y T5 que tienen medias de consumo de 6.7 Kg/día, 7.1 Kg/día, 6.7 Kg/día y 6.7Kg/día respectivamente, es decir que a los animales que se les ofreció nopal mas el extracto enzimático mostraron un mayor consumo comparado con los otros tratamientos, por ende esto se ve reflejado en la GDP donde el T2 (1.034 Kg/día) muestra un diferencia significada comparada con los T1 (0.792 Kg/día), T3 (0.867 Kg/día), T4 (0.851 Kg/día) y T5 (0.751). Siguiendo la misma tendencia de las 2 variables anteriores la CA, presenta una diferencia significativa en el T2 (7.0 kg) en comparación con los tratamientos antes mencionados ya que estos comparten una misma literal. Estos resultados difieren en los encontrados por Treacher *et al* (1996), en donde se aplicó un preparado enzimático para degradar celulosa empleado por medio de aspersión diariamente a la base de fibra de la ración, no se observaron efectos sobre la ganancia de peso, sin embargo sí hubo un aumento en la ingestión del alimento. En los 60's fue cuando por primera

vez se emplearon las enzimas como degradadores previos del alimento ofrecido a rumiantes (González, 2004), y fue entonces cuando se llevó a cabo un estudio donde se probó una mezcla de enzimas amilolíticas, celulolíticas, y proteolíticas, además de que se agregó una enzima proteolítica eficaz y sin embargo no hubo diferencia en la ganancia media diaria de peso (GMD o GDP) en los ovinos de engorda alimentados con la suplementación de ambas enzimas, cabe mencionar que la mezcla enzimática se aplicó a toda la dieta de los mismos (Theurer *et al.*, 1963). Igualmente no se encontraron efectos en el consumo de alimento y la GDP en borregos suplementados con enzimas fibrolíticas a raciones basadas a heno de alfalfa (González, 2004).

García-Herrera, (2010) menciona que en animales con raciones bien formuladas, donde se combinan diversos alimentos para que se logre una óptima digestión, hay una digestibilidad del maguey arriba del 80 %, dependiendo de la parte de la planta (penca, piña, y quiote), de su edad y del estado fisiológico.

4.3.2. Metabolitos sanguíneos

Al finalizar la prueba de comportamiento se analizaron las muestras sanguíneas de cada ovino, los resultados se presentan en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Concentración de metabolitos sanguíneos de bovinos, alimentados con una dieta a base de nopal y maguey con una enzima celulasa.

Variables	Tratamientos				
	T1	T2	T3	T4	T5
Glucosa mg/dl	38.9 ^b	49.72 ^a	34.62 ^b	32.42 ^b	31.44 ^b
Urea mg/dl	10.7 ^a	9.56 ^a	10.2 ^a	10.5 ^a	10.6 ^a
Proteínas mg/dl	33.0 ^a	36.24 ^a	32.16 ^a	33.5 ^a	32.7 ^a
Colesterol mg/dl	199.4 ^a	166 ^a	181 ^a	171.2 ^a	180.2 ^a
Creatinina mg/dl	8.99 ^a	11.2 ^a	10.3 ^a	9.42 ^a	10.1 ^a
	9.78 ^a	10.14 ^a	9.86 ^a	10.08 ^a	9.9 ^a

Calcio mg/dl

Fosforo mg/dl 4.76^a 5.12^a 4.96^a 4.78^a 4.38^a

Como se puede observar en el cuadro 9 no hay diferencia significativa ($P>0,05$) entre tratamientos para ninguna de las variables que se consideraron, únicamente para la glucosa del T2 que mostro un valor de 49.72 mg/dl. Estos resultados coinciden con los arrojados en el estudio de Knowlton *et al* (2002), el cual estudió el efecto de la adición de enzimas, las vacas a las cuales se les aplicó el alimento con la enzima se encontraban al inicio o al final de la lactación y éstas tenían una dieta a base de forraje que se incluían en la ración al 45 y 61% respectivamente. En este estudio se pudo denotar que la GDP mejoró en los animales suplementados con la enzima pero que estos efectos no pudieron ser respaldados con el incremento de los residuos analizados en la sangre, metabolitos, ellos no encontraron diferencia significativa entre tratamientos cuando evaluaron la urea y el fósforo que se encontraba en las muestras de sangre de las vacas evaluadas.

En otro estudio llevado a cabo por Hristov *et al.*, (2000), el cual evaluó la digestibilidad aparente incluyendo MS (materia seca), PB (proteína bruta) y la FDN (fibra detergente neutra), además de evaluar la excreción urinaria de alantoína y ácido úrico y conjuntamente la concentración de glucosa y urea en sangre en becerras novillonas. Este estudio no mostró ningún efecto significativo en ninguna de las variables mencionadas anteriormente incluyendo las concentraciones de glucosa y urea en sangre.

Como se pudo observar al comparar los resultados que se analizaron de cada una de las muestras sanguíneas obtenidas de cada unidad experimental de esta investigación, con los resultados de otros reportes, se observa que se asemejan y se puede inferir que la enzima celulasa en general producida en la universidad no tienen ningún efecto positivo sobre la respuesta en metabolitos.

4.3.3 Ácidos grasos volátiles

Al analizar estadísticamente los datos obtenidos al estudiar el líquido ruminal de cada unidad experimental con la técnica mencionada anteriormente, arrojó los resultados presentados en el cuadro 10.

Cuadro 10. Perfil de AGV's de bovinos alimentados con una dieta a base de nopal y maguey adicionado enzima celulasa.

Tratamientos					
Variables	T1	T2	T3	T4	T5
Acetato $\mu\text{M}/\text{dl}$	24.8 ^b	29.9 ^a	26.3 ^b	26.2 ^b	25.5 ^b
Propionato $\mu\text{M}/\text{dl}$	7.3 ^a	7.4 ^a	7.7 ^a	7.1 ^a	6.6 ^a
Butirato $\mu\text{M}/\text{dl}$	6.7 ^a	6.1 ^a	6.5 ^a	6.4 ^a	6.9 ^a

*Las medias que no comparten una misma literal son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Con la adición de la enzima celulasa al nopal en la dieta de los bovinos a excepción del acetato, no se encontró diferencia significativa entre tratamientos cuando se analizaron los AGV's de las muestra. Lo cual coincide con Feng *et al.*, (1996), ellos aplicaron enzimas directamente sobre el alimento y no encontraron efectos sobre los porcentajes molares o la concentración total de AGV's, este estudio fue realizado *in vitro*. Igualmente en una investigación realizada por Yang *et al.*, (2002) se encontró que la suplementación enzimática no afectó la concentración total de AGV's, pero sí aumentaron las proporciones molares de acetato y redujo las de propionato, lo cual coincide en el resultado del aumento en la producción de acetato arrojado en esta investigación, pues como se observa en el cuadro anterior la única variable en la cual hubo diferencia significativa entre tratamientos es en la producción de acetato.

Relacionado con lo anterior, cabe mencionar que hay autores (Caja, 2003) que coinciden en que el mayor efecto positivo en rumiantes se ha obtenido cuando la enzimas fibrolíticas (celulasas y xilanasas) se han empleado en animales en lactancia y crecimiento, pues es en estos dos casos ha sido cuando ha habido mejor respuesta en los animales.

Existen otros estudios (González, 2003) que menciona en su trabajo de campo que ha encontrado un efecto positivo con la inclusión de enzimas en la dieta de vacas lecheras, en las cuales se utilizó una ración a base de heno de alfalfa, ensilaje de heno de alfalfa y trigo tratados con un preparado de enzimas fibrolíticas en donde la producción de leche aumentó en un 14.8%. También menciona otra investigación donde se suplementaron vacas lecheras incluyendo enzimas fibrolíticas en las raciones y las vacas a las cuales se les incluyó la enzima en la dieta produjeron 1.3kg/d más de leche que las del tratamiento control.

Por lo tanto, de acuerdo al cuadro 11 se puede observar que las enzimas aplicada a nopal tienen efectos similares; también se observó que hubo diferencia significativa entre tratamientos en la variable de producción de ácido acético y se puede ver que aunque entre tratamientos no hay diferencia significativa, sí existe una tendencia en la cual se puede observar que el resultado, aunque por muy poca diferencia, fue mejor cuando se utilizó la enzima ya sea en nopal o maguey que cuando no se aplicó.

4.3.4 pH

De acuerdo al análisis estadístico aplicado las muestras de líquido ruminal analizadas arrojaron diferencia significativa entre tratamientos ($P < 0.05$), los resultados que se obtuvieron se presentan en el Cuadro 11

Cuadro 11. pH de bovinos alimentados con una dieta a base de nopal y maguey adicionado con enzima celulasa.

Tratamientos					
Variable	T1	T2	T3	T4	T5
pH	6.7 ^a	6.4 ^b	6.9 ^a	6.9 ^a	6.7 ^a

Nota: Las medias que no comparten una misma literal son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

El pH óptimo del rumen se considera dentro de los rangos 5.5 y 6.9 (Relling *et al.*, 2003), en el cuadro anterior se puede observar que el tratamiento que mejor conservó las mejores condiciones de pH ruminal es el tratamiento 2, es importante mencionar que este tratamiento es el de los

bovinos suplementados con la enzima producida dentro de las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

En relación a lo anterior y comparando los resultados existen investigaciones en las cuales se ha encontrado que al utilizar enzimas fibrolíticas el pH en el rumen ha disminuido lo cual es opuesto a los resultados que se obtuvieron en esta investigación. Hristov *et al.*, (2000) llevaron a cabo un experimento en el cual se probó la aplicación de enzimas fibrolíticas con actividad β -glucanasa en novillas canuladas, en donde se utilizó una ración basada en granos y ensilados, ambos de cebada, en respuesta a la aplicación de enzima sobre el alimento ofrecido a las novillas el pH ruminal disminuyó.

V. CONCLUSION

La inclusión de la enzima celulasa en dietas para bovinos alimentados con una ración del 20% de nopal como fuente de forraje, produce un efecto positivo sobre el comportamiento animal.

La cepa VML-2 es capaz de producir una enzima celulasa degradadora de la pared celular de nopal (*Opuntia ficus indica*).

La enzima celulasa producida por la cepa bacteriana VML-2 puede ser considerada como una opción para competir con enzimas de origen fúngico comerciales.

La enzima producida en el laboratorio por la cepa VML-2 representa una alternativa eficiente y económica para mejorar el aprovechamiento de las dietas de rumiantes, y de esta manera hacer uso de los recursos de la región.

VI. RESUMEN

Con la finalidad de probar la hipótesis de que la inclusión de nopal y maguey tratado previamente con una enzima celulolítica, adicionado a dietas que es ofrecida a bovinos, mejora el rendimiento productivo se llevo a cabo un experimento, donde primeramente se aisló el microorganismo productor de la enzima celulasa en agar scheidler, caracterizándolo macroscópicamente y microscópicamente, posteriormente se preparo un medio mineral específico con los siguientes compuestos (NaCl , KCl , KH_2PO_4 , MgSO_4) y como fuente de carbono carboximetilcelulosa. A una temperatura de $39\text{ }^\circ\text{C}$; en condiciones de anaerobiosis y un tiempo de 120 horas. Finalmente para separar el extracto enzimático centrifugando a 5000 rpm. Para confirmar que realmente hubiese actividad enzimática, primero se determino proteína celular y extracelular por el método de Biuret, y después se llevo a cabo una cinética enzimática con muestras de nopal y maguey. Como segunda etapa del proyecto se realizo una prueba con 25 bovinos de la raza beefmaster con un peso promedio de 200 kg. Aplicando un diseño completamente al azar, los 5 tratamientos consistían en T1 una dieta más nopal, T2 dieta más nopal tratado con la enzima, T3 dieta más maguey, T4 dieta más maguey tratado con enzima y T5 (testigo). Se estudiaron diversas variables, el comportamiento productivo, analizando específicamente consumo diario de materia seca (CDMS), ganancia diaria de peso (GDP), conversión alimenticia (CA). Además se determino metabolitos en suero sanguíneo, determinación de ácidos grasos volátiles (acético, propionico y butírico), finalmente se analizo el pH de cada una de las muestras tomadas. Los resultados arrojaron que las características macroscópicas de la cepa son una coloración blanca, elevación convexa, forma irregular, aspecto húmedo y consistencia suave y las microscópicas bacilos cortos Gram negativos, no agrupados. La determinación de proteína celular y extracelular muestra un valor de 0.00094 mg. Y la cinética enzimática en nopal y maguey muestra la mayor actividad de la enzima a los 60 minutos de haberla aplicado con valores de 2900 U. para el nopal y 3751 U. para el maguey. Para la prueba de parámetros productivos Se muestra diferencia significativa ($P < 0.05$) en (GDP, CDMS, y C.A). siendo el T2 (nopal + extracto enzimático) el que mejores rendimientos mostro, en el caso de los metabolitos

sanguíneos la glucosa muestra diferencia significativa ($P < 0.05$) en el T2, no siendo así con los demás metabolitos analizados. Para los AGV se observó un aumento del ácido acético mostrando diferencia significativa el T2 comparado con los otros tratamientos. Y finalmente el pH ruminal el T2 fue quien mejor conservó las condiciones del rumen (6.4)

Por último se puede inferir que los animales que fueron alimentados con nopal como forraje previamente tratado con una enzima celulolítica mostraron mejores rendimientos que otros tratamientos que incluían maguey y maguey con extracto enzimático. Por lo que se sugiere adicionar la enzima producida en el laboratorio a partir de microorganismo ruminales

VII. LITERATURA CITADA

- Aguilera S.J.I., G. Lozano, F. Méndez. 2005. Utilización de nopal como alimento animal. Sistema de Educación Continua en Producción Animal en México A.C. México.
- Anaya, M., R. Bautista. 2004. El nopal forrajero en México: del siglo XVI al siglo XX. Universidad Autónoma de Chapingo. México. pp. 169.
- Awafo, V.A., Chahal, D.S., Simpso, B.K. & Le, G.B.B. 1996. Production of cellulase systems by selected mutants of *Trichoderma reesei* in solid- state fermentation and their hydrolytic potentials. Applied Bioch. and Biotech.(USA).V. 57/58 461-470
- Bedford, M.R. 1993. Mode of action of feed enzymes. J. Appl. Poult. Res. 2:85-92.
- Carrera, J. 2002. Enzimas Industriales, Biorreactores, Variables de Control, Guías de Laboratorio y Biotecnología Agrícola y Vegetal. *Grupo de investigación Asubagroin*. México. pp. 15.
- Castellanos, A. Llamas, G. Shimada A. 1990. Manual de Técnicas de investigación en Ruminología. Primera Edición. Sistema de Educación Continua en Producción Animal en México A.C. México, D.F. pp. 144.
- Castillo, F., M.D. Roldán, R. Blasco, M.J. Huertas, F.J. Caballero, C. Moreno, M. Martínez. 2005. Biotecnología ambiental. Editorial Tébar. México. pp. 594.
- Castillo, M. R., M. Gutiérrez, J. Linden, R. P. Tengerdy. 1994. Mixed cultura solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production. Biotechnol. Lett 16(9): 967-972.
- Castillo, M. R., M. Gutiérrez, J. Linden, R. P. Tengerdy. 1994. Mixed cultura solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production. Biotechnol. Lett 16(9): 967-972.
- Coutiño, L. B del C. (2011). Empleo de microorganismos ruminales para la producción y cuantificación de actividad celulasa usando diversas fuentes de carbono (papel periódico, papel filtro y caboximetil celulosa). Tesis Licenciatura. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. pp. 80.

- Church CD, 1988: El Rumiante, Fisiología digestiva y nutrición. Edición en lengua española 1993. Editorial Acribia, S.A..
- Cirio A, Tebot I, 1998: Fisiología Metabólica de los Rumiantes. Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Montevideo. Bolsa del Libro.
- Cunningham JG, 2002: Textbook of Veterinary Physiology. Third Edition. WB Saunders Company.
- Dijkstra, J. & Tamminga, S. 1995. Simulation of the effects of diet on the contribution of rumen protozoa to degradation of fibre in the rumen. Br. J. Nutr. 74 :617
- Eliécer, C.J. 2003. Producción y aplicación de enzimas industriales. Tesis licenciatura. Universidad de Cauca. Colombia. Pp. 3.
- Eskin Michael.1990. Biochemistry of Foods. Academic Press Inc. San Diego California. P: 492.USA.
- Estrada, J.A., Gaviria, J.M. & García, F.G. 1993. Hongos anaeróbicos del rumen. Archivo Latinoamericano Producción Animal. 1:111
- Flores V., C.A., J.M. de Luna E. y P.P. Ramírez. 1996. Mercado mundial de nopalito. ASERCA-CIESTAM-Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Flores, V., C.A. y J. Olvera. 1995. La producción de nopal verdura en México. Memorias del VI Congreso Nacional y IV Congreso Internacional sobre el conocimiento y aprovechamiento del nopal. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.
- Flores, V., Claudio A. 2003. Nopalitos y tunas, producción, comercialización, poscosecha e industrialización. 1. Ed. Centro de Investigaciones a Económicas, sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM). Universidad Autónoma de Chapingo. México.
- Fonseca, N., Ponce, I., Costa, P., Vázquez, J., Sánchez, J. & Miranda, M. 2000. Uso de banco de proteína con *Leucaena leucocephala* en ovejas Pelibuey cubana. I Congreso Internacional sobre Mejoramiento Animal. C. Habana, Cuba. p. 513
- Galindo, J. 2001. Fermentación microbiana ruminal y pasaje hacia las partes bajas del tracto gastro intestinal de árboles, arbustos y leguminosas. Memorias del Curso: Sistemas Sivopastoriles, una opción sustentable. Tantakín, Mérida. p. 132

- Galindo, J., Elías, A., Palenzuela, T., Pérez, M.C. & Aldama, A.I. 2004b. Effect of monensin on the *in vitro* methane production in three ruminal ecological systems. Cuban J. Agric. Sci. 37:181
- Galindo, J., Marrero, Y., González, N. & Aldana, A.I. 2004a. Caracterización de la actividad celulolítica en el líquido de rumen filtrado. Rev. Cubana Cienc. Agric. 38:259 Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 39, Número Especial, 2005.
- Gaitán, B. D. M., L, I. P. Pérez. (2007). Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y de compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Cali, Colombia. pp. 114.
- García, A. M. 2003. La familia de las cactáceas: Alternativa para la agricultura en zonas áridas en el siglo XXI. Editorial Trillas. México pp. 3-4.
- González, G. E. 2004. Utilización de enzimas fibrolíticas en cabras lecheras. Evaluación de su actividad y características fermentativas *in vitro*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. España. Pp. 146.
- Govea, R. 2005. Descripción morfológica de hongos anaerobios del rumen de ovinos y efecto de la fibra en su actividad *in vitro*. Tesis doctorado. Universidad de Colima. Manzanillo, Colima. pp. 131.
- Granados, S.D., y P.A.D. Castañeda. 1991. El Nopal: Historia, fisiología, genética e importancia frutícola. México: Trillas. Pp. 227.
- Kock, G. 2006. El uso del nopal como forraje en las zonas áridas de Sudáfrica. Estudio FAO producción y protección vegetal. Revista Salud Pública y Nutrición. Monterrey, Nuevo León. pp. 126.
- L.G., J.J., J.M. Fuentes, A. Rodríguez. 2003. Producción y uso de *Opuntia* como forraje en el centro-norte de México. Estudio FAO producción y protección vegetal. Revista Salud Pública y Nutrición. Monterrey, Nuevo León. pp. 39-40.
- Lojewska J, Miskowicz, Pronienwicz LM. 2005. Cellulose oxidative and hydrolytic degradation: In situ FTIR approach. Polymer Degradation and Stability. Journal Animal Science. 35:1014-1019
- López, J.J. 2011. Uso y manejo del nopal forrajero en el noreste de México. IX Simposium-Taller Nacional y II Internacional de producción del nopal y el magüey. Escobedo, Nuevo León, México.

- Leatherwood, J.M. 1965. Cellulasa from *Ruminococcus albus* and mixed rumen microorganisms. *Appl. Microbiol.* 13:771
- Leng, R., Preston, T., Sansoucy, R. & Kunju, G. 1991. Multinutrient blocks as a strategic suplement for ruminants. *World Animal Review.* 62:11
- Li , A.D. & Forsberg, C.W. 1987. Isolation of cellodextrinase from *Bacteroides succinógenes*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 53:1034
- Marín, A. R. M., O. Salazar. 2007. Caracterización y expresión recombinante de una celulasa de origen antártico. Tesis Maestría. Universidad de Chile. Santiago de Chile. pp. 78.
- Mattioli, G., Relling A. 2003. Fisiología Digestiva y metabólica en rumiantes. Facultad de ciencias veterinarias. Tesis licenciatura. Barcelona, España. pp. 72.
- Medina, M., G. Tirado, I. Mejía, I. Camarillo, C. Cruz. Digestibilidad *in situ* de dietas con harina de nopal conteniendo un preparado de enzimas fibrolíticas exógenas. Instituto tecnológico el Llano, Aguascalientes, México. pp. 5.
- Montes, H. C., I. Magaña. 2002. Enzimas con aplicación industrial. Editorial Santillana. México. Pp. 18.
- Morán, J., A. Vázquez, V. P. Cyras. (2008). Extracción de celulosa y obtención a partir de fibra Sisal- Caracterización. Tesis maestría. Universidad de Chile. Santiago de Chile. pp. 6.
- Molina, L.R., Rodríguez, N.M. & Goncalves, L.C. 2003. Effect of tannin on *in situ* degradability of the dry matter and crude protein of six sorghum silage genotypes (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), harvested at dough stage. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 55:203
- Mosimanyama, B.M. 1992. Rumen protection of heat-treated soybean proteins. *Canadian Journal of Animal Science.* 72:71
- Murillo, A. B. 2003. El nopal, alternativa para la agricultura de zonas áridas en el siglo XXI. Centro de investigaciones del noreste. Monterrey, Nuevo León. Pp. 1-2.
- Nava, C.C., A. Díaz. 2001. Introducción a la digestión ruminal. Tesis licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. pp. 76.

- Nazareno, M. A., C. A. Padrón. 2011. Nuevas tecnologías desarrolladas para el aprovechamiento de cactáceas en la elaboración de alimentos, componentes funcionales y propiedades antioxidantes. Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional del Estero. Argentina. pp. 37.
- NRC. 2000. Nutrient requirements of dairy cattle (7th Ed.). National Academy Press, Washington, D.C. pp. 45-85.
- Ovando, L., K. N. Waliszewski. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*, pp. 113-122.
- Padrón, C.A., M.J. Moreno, 2010. Evaluación del uso de enzimas y filtración por gravedad para la clarificación de una mezcla diluida de pulpa de frutos cactus (*Opuntia boldinghii* Britton & Rose), jugos de naranja y toronja. Tesis de maestría. Barcelona, España. pp. 35
- Prado, B. L. A, S. Huerta, G. Rodríguez, G. Saucedo. 1999. Avances en purificación y aplicación de enzimas en Biotecnología. Editorial Casa Abierta al Tiempo. México. pp. 367.
- Ramírez, O. L., F. A. Urrego. 2003. Producción de celulasas a partir del hongo *Trichoderma sp.* y aprovechamiento de la fibra prensada de palma como medio de cultivo. Tesis Maestría. Universidad de Chile. Santiago de Chile. pp. 5.
- Sánchez, W.K., Hunt, C.W., Guy, M.A., Pritchard, G.T., Swanson, B., Warner, T. Y Treacher, R.J. (1996) En: *Proceedings of American Dairy Science Association*. Crovallis, Oregon.
- Scheinvar, L., C. Gallegos, G. Olalde. 2010. Estado del conocimiento de las especies del nopal (*Opuntia spp.*) productoras de xocostles silvestres y cultivadas. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp 25.
- Sun X. F. 2004. Comparative study of crude and purified cellulose from wheat straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.;52:8.
- Tejada, I. 1992. Control de Calidad y Análisis de Alimentos para Animales. Tesis licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 86.
- Theurer, B. Woods, W., Borrougghs, W. 1963. Influence of enzyme supplements in lamb fattening rations. *J. Anim. Sci.* 22:150-154.
- Torres, G. G., T. Arbaiza, F. Carcelén, O. Lucas. (2009). Comparación de las técnicas *in situ*, *in vitro* y enzimática (celulasa) para estimar la

digestibilidad de forrajes en ovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 20 (1): pp. 5-9.

- Treacher, R., McAllister, T.A., Poop, J.D., Mir, P., 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.).
- Valdez, S.L.G. 2010. Estudio microbiológico de líquido ruminal de ganado Holstein alimentado con dietas enriquecidas con productos de la industria cervecera (Masilla y levadura). Tesis licenciatura. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. pp. 39.
- Vilches, P. L. (2006). Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. Tesis de Maestría. Universidad de Perú. Caraz, Perú. pp. 9.
- Walker, L. P., D. B. Wilson. Enzymatic hydrolysis of cellulose: an Overview. *Bioresource Technology*. *J Dairy Sci* 71:3458-65.
- Yang, W.Z., Beauchemin, K.A., Rode, L.M. 1999. Effects of enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *J.Dairy Sci.* 82:391-403.