

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P DE MEDICINA VETERINARIA

**Evaluacion de dos complejos enzimaticos fibroliticos  
comerciales sobre la digestibilidad y la cinetica de  
digestion en el cogollo de caña de azucar (*Saccharum  
officinarum*)**

TESIS

Para optar el titulo de medico veterinario

AUTOR

Jose Luis Delgado Sánchez

Lima – Perú

2012

A mis queridos padres Alejandro y Catalina, cuya capacidad de sacrificio, fuerza de voluntad y sencillez han constituido motor impulsor en mi vida.

A mis hermanos, Elizabeth, Edith, Toribia y Alexis por todo su apoyo, confianza y cariño.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Felipe San Martín; por la oportunidad de hacer la tesis bajo su asesoría, además por todo el apoyo, el cual lo hace ser un amigo más que el haber sido mi consejero. Muchas Gracias!

Al Ing. Juan Olazabal por su amistad, consejos, apoyo moral y por las facilidades brindadas cuando los necesité, un gran amigo. Muchas Gracias!

Al Dr. Fernando Carcelén; por su colaboración, disposición y entusiasmo para la realización de la presente tesis. Muchas Gracias!

Al Dr. Miguel Ara; por su colaboración y apoyo para realizar los análisis estadísticos de esta tesis. Muchas Gracias!

A la Dra. Teresa Arbaiza; por su colaboración, disposición y apoyo para realizar la presente tesis. Muchas Gracias!

A Karina Bardales, por su colaboración, disposición y apoyo en la parte práctica de la presente tesis. Muchas Gracias!

A la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a todos los profesores que la integran; por las enseñanzas instruidas en las aulas de esta querida *alma mater*. Muchas Gracias!

## CONTENIDO

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
CONTENIDO.....	iii
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE CUADROS.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 CARBOHIDRATOS ESTRUCTURALES Y SU UTILIZACIÓN POR RUMIANTES.....	3
2.1.1 La pared celular.....	3
2.1.2 Estructura de la pared celular.....	4
2.1.3 Composición de la pared celular.....	5
2.1.3.1 Celulosa.....	5
2.1.3.2 Hemicelulosa.....	6
2.1.3.3 Lignina.....	7
2.1.3.4 Ácidos Fenólicos.....	7
2.1.3.5 Pectinas.....	8
2.1.4 Utilización por los rumiantes.....	9
2.2 COGOLLO DE CAÑA AZÚCAR.....	11
Composición química y aporte energético.....	12
2.3 UTILIZACION DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS.....	12
2.3.1 Propiedades de las enzimas.....	12
2.3.2 Condiciones que afectan la actividad enzimática.....	13

2.3.3 Fuentes de enzimas para la alimentación animal.....	14
2.3.4 Mecanismo de acción de las enzimas fibrolíticas.....	15
2.3.5 Enzimas en la alimentación animal.....	16
2.3.6 Empleo de enzimas en rumiantes.....	16
2.3.7 Experiencias de uso de enzimas fibrolíticas.....	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1 Lugar de ejecución.....	20
3.2 Descripción del material experimental.....	20
3.2.1 Animal.....	20
3.2.2 Tratamientos.....	21
3.3 Diseño experimental.....	21
3.3.1 Procedimiento para la prueba de digestibilidad <i>in situ</i> de la materia seca.....	21
3.3.2 Cinética de digestión.....	23
3.3.3 Parámetros a evaluados.....	24
3.3.3.1 Digestibilidad inicial (a).....	24
3.3.3.2 Fracción degradable (b).....	24
3.3.3.3 Tasa de degradación (c).....	24
3.3.3.4 Digestión potencial (a+b).....	25
3.3.3.5 Tiempo medio, $h(T_{1/2})$ .....	25
3.3.4 Análisis químico nutricional.....	25
3.4 Análisis de la información.....	25
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4.1 Análisis proximal del cogollo de caña de azúcar.....	27

4.2 Digestibilidad <i>in situ</i> y cinética de digestión del cogollo de caña de azúcar.....	28
V. CONCLUSIONES.....	34
VI. RECOMENDACIONES.....	35
VII. LITERATURA CITADA.....	36

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de dos complejos enzimáticos comerciales, sobre la digestibilidad *in situ* y la cinética de digestión de la materia seca del cogollo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). El cogollo de caña de azúcar fue secado a 65 °C por 48 h, molido con un tamiz de 3 mm y tratado 30 min antes de la incubación con las enzimas Allzyme Vegpro® (T1), y la enzima Rovabio Excel® (T2). Los complejos enzimáticos representaron el 1% respecto al sustrato. El sustrato sin ser tratado con enzimas fue considerado el tratamiento control (T0). El diseño experimental fue el de bloques al azar, con cuatro periodos, tres tratamientos (T0, T1 y T2) y dos repeticiones por periodo. Las muestras pesadas (1.8 g) fueron colocadas en bolsas de dacrón y vertidas al compartimiento 1 de la alpaca; luego de concluido el tiempo (6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas) se retiraron, procediendo al lavado, secado y pesado. Los parámetros evaluados en cinética de digestión fueron: digestibilidad inicial, fracción degradable, tasa de degradación, digestión potencial y tiempo medio. Las variables fueron analizadas mediante análisis de varianza de dos vías y para la diferencia múltiple de medias se utilizó la prueba de Tukey. La digestibilidad *in situ* de la materia seca (DISMS) no mejoró en las distintas horas evaluadas, encontrándose solo pequeñas diferencias ( $p < 0.05$ ) a las 6, 12 y 48 horas pero sin importancia biológica. No se observaron diferencias entre tratamientos ( $p > 0.05$ ) para la digestibilidad inicial, tasa de degradación, tiempo medio y la digestión potencial, solo se encontró diferencia ( $p < 0.05$ ) en la fracción degradable a favor de T1 versus T0 y T2. Se concluye que las enzimas fibrolíticas comerciales en la dosis utilizada no mejoran la digestibilidad ni la cinética de digestión del cogollo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).

Palabras clave: Enzima fibrolítica, cogollo de caña, digestibilidad *in situ*, alpaca.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the *in situ* effect of two commercial enzymes on the digestibility and kinetics of the dry matter sugarcane bud (*Saccharum officinarum*). The sugarcane bud was dried at 65°C for 48 hours, ground with a 3 mm sieve, and incubated for 30 minutes with the Allzyme Vegpro ® enzymes (T1), and the Rovabio Excel ® enzyme (T2). The enzymes were used at 1% of the body weight. The substrate without treatment was considered the control treatment (T0). It was used a randomized experimental design, with four periods, three treatments (T0, T1 and T2), and two replicates for treatment period. The samples were weighing (1.8 g), imputed in dracon bags and placed alpaca 1 compartment. The bags were removed after digestion in different hours (6, 12, 24, 48, 72, and 96), proceeding to the wash and then drying and weighing. The parameters evaluated in digestion kinetics were: initial digestibility, degradable fraction, degradation rate, potential digestion and average time. The results were analyzed using two-way ANOVA and Tukey's test is used to mean multiple differences. This study showed that digestibility *in situ* dry matter (ISDMD) did not improve. It was found only small differences ( $p < 0.05$ ) at 6, 12 and 48 hours but without biological significance. There were no differences among treatments ( $p > 0.05$ ) for initial digestibility, degradation rate, potential digestion and the average time, but there was difference ( $p < 0.05$ ) in the degradable fraction between T1 vs. T0 and T2. It is concluded that in the used dose fibrolytic enzymes do not increase digestibility or kinetics of digestion of the sugarcane bud (*Saccharum officinarum*).

Key words: Enzyme fibrolytic, sugarcane bud, *in situ* digestibility, Alpaca



## LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Tratamientos, periodos, tiempos de digestión, y números de bolsas.....	22
Cuadro 2. Análisis proximal del cogollo de caña de azúcar utilizado en el experimento (% Base seca).....	27
Cuadro 3: Digestibilidad <i>in situ</i> de la materia seca del cogollo de caña de azúcar en función al tiempo de incubación.....	28
Cuadro 4: Parámetros de la cinética de digestión de la materia seca del cogollo de caña de azúcar.....	39

## I. INTRODUCCIÓN

Se estima que para el año 2025 la población humana se incrementara en un 60%; con el correlato un aumento en la demanda de alimentos. Por ello la producción de alimentos de origen animal enfrentará un importante desafío para incrementar de manera considerable la oferta; conjuntamente con ello la demanda de fuentes energéticas para la alimentación animal será de mayor importancia. Así mismo, la producción de alimentos de origen animal debe realizarse en el marco de la sustentabilidad, incrementando la productividad por animal y por unidad de superficie. En ese sentido, el aumento de los niveles de producción de los rumiantes es una de las principales alternativas, teniendo en cuenta la capacidad de generar productos de alto valor biológico a partir de alimentos pocos o no utilizables para otras especies (Delgado *et al.*, 1999).

Los recursos forrajeros juegan un papel fundamental en la nutrición de rumiantes; los cuales han desarrollado una relación benéfica mutua con sus microorganismos; estos microorganismos poseen enzimas para utilizar los carbohidratos presentes en la pared celular de los forrajes (Wilkins, 2000). El mayor obstáculo para la degradación eficiente de la pared celular en el rumen, lo constituyen los cruces entrelazados entre la celulosa, la hemicelulosa, la lignina y otros compuestos que limitan el acceso de las enzimas a los sustratos. Por ello buscar productos alternativos que mejoren la digestibilidad beneficiará al sector ganadero.

Las enzimas fibrolíticas exógenas han sido ampliamente usadas para mejorar el valor nutritivo de los alimentos en monogástricos; en rumiantes hace más de 50 años se hicieron estudios sobre su efectividad en la suplementación (Burroughs *et al.*, 1960; Rovics y Elly, 1962), pero no es hasta la última década donde se investiga con mayor intensidad estos aditivos (Beauchemin *et al.*, 1999, 2000; Yang *et al.*, 1999; Kung *et al.*, 2000), usándolos principalmente en vacunos de carne y de leche. Es así que la suplementación con enzimas fibrolíticas exógenas, a pesar de la incertidumbre e inconsistencia de los resultados obtenidos hasta hoy, se presenta como una de las alternativas tecnológicas capaces de contribuir a estimular los complejos mecanismos de degradación de la pared celular de los forrajes. Por tal razón, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de dos complejos enzimáticos comerciales, sobre la digestibilidad *in situ* y la cinética de digestión de un producto forrajero de amplia disponibilidad pero que no es aprovechado por su complejo contenido fibroso como, el cogollo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 CARBOHIDRATOS ESTRUCTURALES Y SU UTILIZACIÓN POR RUMIANTES**

La transformación de los pastos y otros alimentos en nutrientes de alta calidad, por parte de los rumiantes, es de gran importancia para su sustento y también es de gran significación económica. Este proceso ocurre gracias a que poseen un estómago especializado, donde habitan diversos microorganismos; cuya acción simbiótica hace posible la digestión de las paredes celulares de las plantas (Ramírez *et al.*, 2000); los cuales constituyen del 35 al 80 % de la materia orgánica de los tejidos vegetales aproximadamente (Ramírez *et al.*, 2002).

#### **2.1.1 La pared celular**

La pared celular es una capa rígida que se localiza en el exterior de las células, tiene como función, proteger el contenido celular, proporcionar la forma y rigidez a la estructura de la planta, provee el medio para la circulación y distribución del agua, minerales y otras moléculas pequeñas y contiene moléculas especializadas que regulan el crecimiento y protegen a la planta de enfermedades (Wilson y Hatfield, 1997). Determina, en gran medida la morfología y, en menor grado, la función celular y podría estar involucrada en la regulación de la expansión celular (Ramírez *et al.*, 2002).

### 2.1.2 Estructura de la pared celular

La pared celular se puede dividir en tres capas fundamentales: la sustancia intercelular o lámina media, la pared primaria y la pared secundaria; la lámina media se inicia como placa celular en el momento de la división celular, es amorfa, conformada por polisacáridos, principalmente pectina; se encuentra entre las paredes celulares de células adyacentes y es la primera región que se forma cuando la célula se divide (Wilson y Hatfield, 1997).

La pared primaria, presente en la mayoría de las células vegetales, se inicia entre las células que están concluyendo su división, antes de que la célula complete su crecimiento, donde se generó una placa celular que dará origen a la lámina media; consta de dos capas, que contienen fibras longitudinales y transversales de celulosa depositadas en forma de hélice alrededor del eje celular; está asociada a protoplastos vivos, por lo que los cambios que experimenta son reversibles (Wilson y Hatfield, 1997).

La pared secundaria se desarrolla entre la pared primaria y la membrana plasmática, cuando la célula detiene su crecimiento y alcanza su máximo volumen. Ésta puede tener una gran variedad de patrones (espiral, anularreticulado y éscalariforme) y se caracteriza por la presencia de depresiones y cavidades de profundidad y extensión variable, denominadas punteaduras que interrumpen la continuidad de la pared celular; es fuertemente refringente al microscopio debido a la alta proporción de celulosa (Ohara *et al.*, 1998).

Cuando están presentes ambos tipos de pared celular, la primaria y la secundaria, en una célula vegetal y se ha completado su desarrollo, la primera es de menor grosor. La pared celular secundaria es diferente a la pared primaria en estructura, morfología, composición y características bioquímicas; además, es común que su grosor se modifique a lo largo de la superficie celular (Salisbury y Roos, 1992). Sin embargo, las células juveniles en crecimiento, algunas de almacenamiento maduras, las células del parénquima y algunos otros tipos celulares, vistos con microscopio electrónico, generalmente muestran sólo dos regiones en la estructura que las rodea: la pared

primaria y la lámina media. Esta última es el componente que mantiene unidas entre sí a dos células adyacentes (Salisbury y Roos, 1992).

### **2.1.3 Composición de la pared celular**

La pared celular de los forrajes está compuesta de microfibrillas de celulosa (Fase cristalina), inmersa en una matriz amorfa, compuesta de polisacáridos no celulósicos (hemicelulosa) pectinas, proteínas y lignina (Fase no cristalina), los cuales constituyen 30 al 80% de la materia seca y representa la principal fuente de energía para los rumiantes; sin embargo, menos del 50% de esta fracción es rápidamente digerida y utilizada por el animal (Lam *et al.*, 1990; Hatfield *et al.*, 1999).

La pared celular de las plantas consiste principalmente en celulosa (40-45%), hemicelulosa (30-35%) y lignina (20-23%) (Ladisich *et al.*, 1983). Los forrajes contienen una gran proporción de su materia orgánica (35–80%) en forma de pared celular. La composición y organización de los componentes individuales en la pared controlan su estructura y función, por lo que resulta necesario conocer detalles de los componentes más importantes.

#### **2.1.3.1 Celulosa**

La celulosa es el principal componente estructural de las paredes celulares de las plantas. Es un polímero de fórmula general:  $(C_6 H_{10} O_5)_n$ , constituido por unidades lineales de glucosa, unidos por enlaces  $\beta$  1-4 glicosídicos. Las unidades de glucosa se rotan  $180^\circ$  unas sobre otras, lo que significa que la verdadera unidad repetitiva es el dímero celobiosa (Adesogan *et al.*, 2000). La celulosa está fuertemente unida a cadenas de hidrógeno conformando la fibra, la que es en su mayoría cristalina, aunque contiene regiones amorfas; el grado de cristalinidad de las microfibrillas de la celulosa es dependiente de la fuente, la edad, y el pretratamiento del material vegetal del que provenga (Lam *et al.*, 1990).

Esta estructura es rígida y altamente insoluble en H<sub>2</sub>O, desde el punto de vista químico es simple, pero físicamente es muy compleja. Los enlaces hidrógeno entre polímeros paralelos forman microfibrillas fuertes que proveen la fuerza y rigidez requerida en las paredes celulares de las plantas (Gardner *et al.*, 1999).

Los diseños formados por las microfibrillas son muy variables (Gardner *et al.*, 1999). En la pared primaria, las fibrillas están entrelazadas, dispuestas aparentemente al azar y en la secundaria están dispuestas paralelamente, presentando una orientación diferente cada lámina (Béguin y Aubert, 1994), lo cual es conocido como arreglo helicoidal que tiene implicancias importantes con los procesos de degradación.

### **2.1.3.2 Hemicelulosa**

Son carbohidratos estructurales no celulósicos que existen como polímeros lineales y ramificados, en asociación con otros carbohidratos. La xilosa, manosa y galactosa, frecuentemente forman su estructura vertebral, mientras que la arabinosa y la galactosa están presentes en los lados de la cadena (Kirby *et al.*, 1998). Las hemicelulosas son solubles en álcalis, pero no en agua; se considera generalmente que la hemicelulosa más importante es el xilano.

Las hemicelulosas contienen dos tipos diferentes de polisacáridos: polisacáridos de cadena corta (o celulosanas), que consisten de pentosanas y hexosanas, que forman parte de la propia estructura de la celulosa y están orientadas en la estructura micelar, y polisacáridos amorfos incrustados, que se asocian íntimamente con la lignina de la membrana celular. Las hemicelulosas que se encuentran aparentemente unidas a la lignina para formar un componente estructural de la membrana celular contienen tanto azúcares como ácidos urónicos (Kirby *et al.*, 1998).

### **2.1.3.3 Lignina**

Polímero fenólico tridimensional, de estructura muy compleja, constituye el principal polímero natural junto con la celulosa y es responsable de la rigidez de la planta, resistencia de los tejidos vasculares, conducción de solutos, agua y sales minerales necesarias para la supervivencia de la planta, además de la protección contra fenómenos oxidativos y de ataques de parásitos (Barthes, 1992).

La lignina es comúnmente dividida en; “Core lignina” la cual contiene una matriz fenilpropanoide altamente polimérica y condensada con un alto peso molecular y “Non-core lignina”, formada por monómeros fenólicos, principalmente ácido coumárico y ferúlico. Ambos tipos de lignina actúan juntos como una barrera físico-química que limita la degradación anaeróbica de los componentes de la pared por los microorganismos del rumen. La heterogeneidad de la “core” lignina es causada por variaciones en la composición monomérica de la lignina y por los enlaces intramoleculares fuertes con otros componentes de la pared celular (Cherney, 2000).

El contenido de lignina en los forrajes es muy variable, ya que, de acuerdo como avanza la madurez fisiológica de la planta, aumenta el contenido de lignina. Las especies tropicales de gramíneas tienen valores más elevados de lignina, que las especies de zonas templadas. Por lo tanto, la lignina es el componente químico de la fibra que se asocia con mayor frecuencia a la indigestibilidad de los nutrientes y se ha demostrado su utilidad para predecir la cuantía de la digestión de la fibra (Church, 1993).

### **2.1.3.4 Ácidos Fenólicos**

Los principales ácidos fenólicos en los forrajes son el ácido p-coumárico y el ácido ferúlico. Los ácidos fenólicos constituyen agentes entrecruzadores en los complejos lignina - carbohidratos, e inhiben la utilización de los residuos de carbohidratos asociados a ellos. Los compuestos fenólicos se han aislado de las



paredes celulares por extracción con álcali o tratamiento con celulasas, están unidos a los residuos de glucanos y xilanos. Además, los monómeros fenólicos actúan también como constituyentes tóxicos de las paredes celulares por inhibir la adhesión de los microorganismos a las partículas vegetales y su actividad fermentativa (Sudekum *et al.*, 1995). Se ha demostrado que los ácidos fenólicos libres, especialmente el ácido p - coumárico, cuando se adiciona a la incubación *in vitro*, inhiben los protozoos entodiniomorfos, la digestión de la fibra y la celulosa y afectan además, la actividad de las bacterias que predominan en la digestión de la fibra en los forrajes (Ramírez *et al.*, 2000).

### **2.1.3.5 Pectinas**

Las sustancias pécticas son un grupo de polisacáridos estrechamente asociados, solubles en agua caliente y que aparecen como constituyentes de las paredes primarias de las células y las regiones intercelulares de las plantas superiores. Los carbohidratos en este grupo incluyen los poligalacturonanos (ramnogalacturonanos) y los polisacáridos neutrales tales como los arabinanos, galactanos y arabinogalactanos (Chesson, 1994). Se ha demostrado que las pectinas pueden contener enlaces de ésteres con ácidos fenólicos, tales como el ácido ferúlico; están presentes en la pared celular de todas las plantas constituyendo el cemento de la pared celular de las plantas (Van Soest *et al.*, 1991).

Los contenidos en pectinas son particularmente importantes en las plantas dicotiledóneas; en la alfalfa (*Medicago sativa L.*) por ejemplo, la pectina constituye una proporción significativa del total de los polisacáridos estructurales de la pared celular, estando en el rango entre 100 a 200 g/kg en tallos y de 250 a 300 g/kg en hojas (Hatfield, 1993); mientras que, en gramíneas, las sustancias pécticas constituyen una menor proporción en la pared celular primaria (Hatfield, 1993).

#### **2.1.4 Utilización por los rumiantes**

La estructura de la pared celular vegetal es muy compleja y variable, tanto química como histológicamente, y es la que condiciona el modo de ataque microbiano a los polisacáridos estructurales y el ritmo y extensión de la degradación por los microorganismos ruminales; no solo las diferencias anatómicas e histológicas de las diferentes fracciones botánicas de las plantas y la fase del desarrollo de las mismas influyen en el proceso de degradación de la pared celular, la especie vegetal desempeña un papel preponderante en el ritmo y extensión de la degradación de los forrajes por los microorganismos ruminales (Ramírez *et al.*, 2002). En este sentido, se ha demostrado que las paredes celulares de las gramíneas y leguminosas presentan una composición de carbohidratos muy similar, sin embargo, los enlaces intermoleculares fuertes que se establecen entre estos componentes difieren en ambas especies. Por otra parte, las características de las fuentes no convencionales, como los forrajes tropicales, sugieren un mayor grado de engrosamiento de la planta, que las puede hacer menos aprovechables y menos fermentables (Wilson y Hatfield, 1997).

Los carbohidratos que componen la pared celular, principalmente la hemicelulosa, la celulosa y las pectinas, son degradados por los microorganismos en el rumen, lo cual permite a los rumiantes utilizar fuentes de energía que no pueden ser utilizadas eficientemente por los monogástricos. Aproximadamente del 35 al 80 % de la materia orgánica de los tejidos vegetales está contenida en la pared celular, sin embargo, los rumiantes obtienen sólo de 30 a 40 % de la energía digestible consumida de la pared celular del forraje (Ramírez *et al.*, 2002); múltiples estudios muestran que cuando los animales consumen niveles elevados de forraje con alta concentración de pared celular presentan una baja digestibilidad y, por lo tanto, una disponibilidad de energía limitada (Ramírez *et al.*, 2002).

La digestión microbiana de los polisacáridos estructurales en el rumen se lleva a cabo en dos etapas; la colonización y adhesión íntima de los microorganismos a sustratos que llegan al rumen y la acción enzimática sobre dichos sustratos; la magnitud de tal proceso digestivo está íntimamente relacionada con la naturaleza de la pared

celular vegetal, las características de la población microbiana implicada en los mismos y las condiciones del ambiente ruminal para favorecer o limitar estos procesos (Forsberg, 2000).

La lignificación de la planta es uno de los factores que más afecta a la degradación microbiana de los forrajes, tanto por su indigestibilidad *per se*, como en cuanto a su relación con las cadenas de carbohidratos estructurales; se han propuesto tres posibles mecanismos mediante los cuales la lignificación puede limitar la fermentación microbiana o hidrólisis enzimática de los polisacáridos de la pared celular (Sudekum *et al.*, 1995 y Sewalt *et al.*, 1996), el efecto tóxico de esta en los microorganismos del rumen, que inhibe la adhesión de los microorganismos a las partículas vegetales y su actividad fermentativa; el medio ambiente creado por esta que impide la acción de las enzimas al ser de carácter hidrofóbico y por último la limitación de espacio causada por los enlaces lignina-polisacáridos que limitan el acceso de las enzimas a los carbohidratos específicos. Esta lignificación ha sido correlacionada con una reducción de la degradabilidad de la materia seca, degradabilidad de la pared celular y la concentración *in vitro* de los ácidos grasos volátiles (AGV) del forraje (Moore y Jung, 2001 y Ramírez *et al.*, 2002). La inhibición varía entre componentes de la pared, tejidos, especies de plantas y las fracciones morfológicas de la planta (Sewalt *et al.*, 1996), tal es así que en gramíneas se produce esterificación de la lignina con los arabinosilanos, mientras que en las leguminosas ocurre solo con los residuos de arabinosa y galactosa y no con los xilanos, lo que provoca una menor tasa de la degradación de las paredes celulares de las gramíneas; además, la lignina en las leguminosas está concentrada en el anillo xilemático, mientras que en las gramíneas se distribuye en todos los tipos celulares, hecho que explica las mayores tasas de digestión de las paredes celulares de las leguminosas.

Otro factor importante que puede limitar la degradación de carbohidratos estructurales serían los compuestos fenólicos, especialmente el ácido p-coumárico, el cual es tóxico para la población microbiana ruminal (Vadiveloo, 2000); sin embargo su concentración en el contenido ruminal es probablemente insuficiente para generar este efecto. No obstante, su solubilización a partir de las paredes celulares pudiera provocar

en las zonas de activa degradación una concentración de fenoles próxima a los niveles tóxicos, por lo que pueden inhibir la actividad fibrolítica bacteriana (Adesogan *et al.*, 2000).

## **2.2 COGOLLO DE CAÑA DE AZUCAR**

La investigación y creación de tecnologías apropiadas y viables para el aprovechamiento de residuos agroindustriales con potencial, en bienes económicos, están comprobando su importancia económica y social; en este contexto, por espacio de muchos años los residuos agrícolas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), fueron calificados como recursos de poca utilización por su relativo bajo valor agregado y hasta indeseable por sus efectos contaminantes al medio ambiente; esta cuestionable y limitada valoración ha quedado atrás, dando ahora espacio a criterios cada vez más extendidos, respecto al enorme potencial que los mismos ofrecen hoy día.

Durante los últimos años se observa una constante baja disponibilidad de forrajes tradicionales, especialmente durante el invierno (junio - Agosto) que es la época con condiciones favorables para que el animal pueda expresar su mejor performance productivo. Ante este escenario el uso de cogollo de caña se presenta como una alternativa forrajera a evaluar por su bajo costo para complementar la ración en rumiantes.

En nuestro país el cultivo de la caña de azúcar ha tenido en los últimos diez años incrementos importantes en área y uso de tecnología, los residuos de cosecha de este cultivo como las puntas o cogollos de caña representan una importante fuente de forraje no tradicional (Fernández y Gómez, 2010), debido a la cantidad de producción, tal es así que se reporta de 15,82 a 36,73 % de cogollo, respecto al total de la planta (Molina, 1995; Martín, 1997); lo cual indica que este forraje puede ser utilizado estratégicamente en la alimentación en rumiantes, principalmente por su aporte de fibra por lo que representa una buena alternativa en épocas de baja disponibilidad de forraje.

## **Composición química y aporte energético**

La composición química del cogollo de caña es de: materia seca 31.4% (25.6 a 39.9), proteína 6% (4.5 a 7.3), fibra cruda 32.6% (31 a 35), ceniza 9.5% (6.2 a 12.5) y grasa 2.3% (1.7 a 3.0); pudiendo variar de acuerdo al momento de la cosecha, la variedad de caña de azúcar y el clima; el contenido energético depende de su composición química y adicionalmente el momento en el que el forraje es cosechado; de acuerdo a su aporte energético el cogollo de caña presenta en promedio 55% (53.0 a 57.5) de NDT, mientras que la chala de 60 a 65% y la panca 50%; y EN Lactación, Mcal/kg de 1.25, mientras que la chala presenta de 1.45 a 1.55 y la panca 1.1 (Fernández y Gómez, 2010).

## **2.3 UTILIZACION DE ENZIMAS FIBROLITICAS**

Las enzimas son catalizadores biológicos, y pertenecen a la clase de las proteínas globulares. Todas las reacciones químicas del metabolismo celular se realizan gracias a la acción de catalizadores, estas tienen como función acelerar y facilitar dichas reacciones, es decir, convierten moléculas complejas en sus constituyentes más simples (glucosa, xilosa y celobiosa), tanto en bacterias como en el rumen (Huber, 1985).

La sustancia sobre la que actúa una enzima se denomina sustrato. La digestión es una reacción química, en la cual diferentes enzimas se unen para formar complejos enzimáticos y actuar sobre moléculas de alimento (sustrato) de alto peso molecular (Frumholtz y Beauchemin, 2000).

### **2.3.1 Propiedades de las enzimas**

Las enzimas son efectivas en pequeñas cantidades y sus características principales residen en la especificidad de reacción, es decir, la enzima sólo cataliza un tipo de reacción, por ejemplo la hidrólisis de enlaces glucosídicos. Esta especificidad sirve de base a la clasificación de estos catalizadores bioquímicos. Además, presenta

especificidad en el sustrato, propiedad que resulta del hecho de que toda reacción enzimática implica la fijación del sustrato, en puntos específicos de la proteína enzimática, por medio de puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals (Huber, 1985).

Las enzimas son muy eficientes para acelerar la transformación de sustratos a productos finales; una sola molécula de enzima puede efectuar el cambio de 10 000 a 1 millón de moléculas de sustrato por minuto. Esta propiedad y el hecho de que la enzima no se consume ni altera durante la reacción, explica por qué se necesitan pequeñas cantidades de la enzima, para efectuar los procesos celulares (Huber, 1985).

Las enzimas son inestables en el sentido de que son vulnerables, es decir, su actividad puede disminuir o destruirse de manera significativa por una gran variedad de condiciones físicas o químicas, pero existen grandes diferencias entre enzimas; algunas se inactivan por pequeñas alteraciones del medio. La susceptibilidad a ser destruidas por agentes físicos o químicos, repercute en una pérdida de las funciones celulares en las que intervienen, hecho que comprueba su naturaleza vital (Huber, 1985).

### **2.3.2 Condiciones que afectan la actividad enzimática**

Entre las condiciones que afectan la actividad de las enzimas se encuentran: a) concentración de la enzima, b) concentración del sustrato, c) pH y d) temperatura. En términos generales, existe una relación óptima entre la concentración de la enzima y del sustrato para obtener su actividad máxima; además, cada enzima funciona de manera óptima a pH y temperatura particulares. Variaciones extremas en el pH pueden destruir la mayor parte de las enzimas y temperaturas extremadamente bajas detienen la actividad enzimática pero no la destruye. Sin embargo, muchas enzimas se pueden conservar manteniéndolas a 0 ° C o temperaturas más bajas (Huber, 1985). Por lo cual la actividad o respuesta se mide en términos de la actividad total necesaria para el desarrollo cuando todas las enzimas y sistemas enzimáticos funcionan de manera armónica en las células. La situación es enteramente diferente para determinar la actividad de una enzima aislada y purificada (Huber, 1985).

### 2.3.3 Fuentes de enzimas para la alimentación animal

Las enzimas fibrolíticas se obtienen de algunos microorganismos por medio de procesos de fermentación controlada (Frumholtz y Beauchemin, 2000). Aunque existe una gran variabilidad de productos enzimáticos comercializados para el ganado (Muirhead, 1996), los más utilizados derivan fundamentalmente de un número limitado de bacterias y hongos, los cuales se mencionan a continuación:

- Bacterias: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus Plantarum*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus faecium*.

- Hongos: *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma spp.* y *Saccharomyces cerevisiae*. Otras especies de hongos, incluyendo *Humicola insolens* y *Thermomyces amiginosus*, están siendo comercializadas pero en una menor medida; *Trichoderma reesei* y *T. longibrachiatum* son los microorganismos más utilizados para la obtención de estos modificadores metabólicos (Pendleton, 1998).

La digestión completa de alimentos complejos requiere literalmente de la intervención de cientos de enzimas. Los preparados enzimáticos para rumiantes son comercializados primeramente sobre la base de su capacidad para degradar la pared celular de las plantas y, como tal, son frecuentemente referidos como celulasas o xilanasas. Sin embargo, ninguno de estos productos comerciales constituye una preparación exclusiva con la participación de una sola enzima aislada, presentando actividades enzimáticas secundarias como amilasas, proteasas o pectinasas (Beauchemin y Rode, 1996).

La degradación de la celulosa y la hemicelulosa requiere de enzimas específicas, y la diferencia en sus proporciones relativas y actividades individuales determinará la eficacia para la degradación de la pared celular de las mezclas comerciales. Incluso dentro de una especie microbiana aislada, los tipos y actividades enzimáticas pueden variar ampliamente, dependiendo de la cepa seleccionada, del sustrato de crecimiento y de las condiciones de cultivo empleadas (Gashe, 1992).

En la práctica, la diversidad de actividades enzimáticas presentes en los preparados comerciales puede resultar ventajosa, en el sentido de que una amplia variedad de sustratos puede ser cubierta por un solo producto pero, al mismo tiempo, representa un problema en el control de calidad y la extrapolación de los resultados obtenidos.

#### **2.3.4 Mecanismo de acción de las enzimas fibrolíticas**

El mecanismo de acción de las enzimas fibrolíticas exógenas es semejante al de las enzimas (E) elaboradas por los microorganismos ruminales; es decir, el sitio activo se une con un sustrato (S) determinado por medio de puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals, para formar el complejo enzima sustrato (ES). Este complejo (ES) tiene dos destinos posibles: a) Puede disociarse en E y S, o b) puede formar un nuevo producto (P) al romper los enlaces que unen a los carbohidratos (Stryer, 1998).

En rumiantes estas enzimas exógenas podrían afectar la utilización de los alimentos a través de sus efectos en el alimento; antes de ser consumidos, como a través de un estímulo de digestión en el rumen y/o en el tracto post-ruminal. Se sugiere cuatro modos de acción de las enzimas exógenas en rumiantes (McAllister *et al.*, 2001):

- a. Las enzimas actúan sobre el alimento antes de ser consumido para predigerir y reblandecer estructuras que impiden o reducen la digestión microbiana en el rumen.
- b. En el rumen las enzimas exógenas pueden hidrolizar directamente el alimento o bien actuar sinérgicamente con los microorganismos ruminales para mejorar la digestión del alimento.
- c. En el intestino delgado las enzimas exógenas pueden optimizar la absorción de nutrientes reduciendo la viscosidad del quimo o hidrolizando sustratos que escaparon de la fermentación ruminal.
- d. En las heces las enzimas pueden incrementar la descomposición.



### **2.3.5 Enzimas en la alimentación animal**

El hombre ha utilizado las enzimas desde la antigüedad, aun sin conocer su mecanismo de acción; utilizándolas para la fabricación de quesos (Sheppy, 2001). La industria para la fabricación de enzimas para alimentación animal comenzó en 1982 donde una compañía finlandesa (Cultor) pone al mercado el primer producto enzimático; en 1986 se empieza a comercializar una enzima específica para aves; en 1988 se desarrolla una enzima específica para cerdos que mejora la producción y la absorción de nutrientes, (Frumholtz y Beauchemin, 2000).

Los componentes del alimento se dividen para su aprovechamiento durante el proceso digestivo gracias a las enzimas (Annison, 1997), en los animales superiores estas enzimas pueden ser producidas por el animal o bien por microorganismos que habitan en el tracto gastrointestinal (Bedford, 2000).

Las enzimas exógenas han sido ampliamente utilizadas en los monogástricos, principalmente en aves, con los objetivos de eliminar los factores antinutricionales, aumentar la digestibilidad de los nutrientes, complementar la actividad de las enzimas endógenas y homogenizar la respuesta de alimentos, animales y medio ambiente (Sheppy, 2001).

El uso de enzimas fibrolíticas exógenas pretende mejorar el proceso digestivo al proveer al animal de enzimas que no produce o bien que produce y/o adquiere en cantidades insuficientes, por lo cual las ineficiencias en el proceso digestivo tienen repercusiones económicas y ecológicas (Beauhemin *et al.*, 2000).

### **2.3.6 Empleo de enzimas en rumiantes**

En rumiantes, los primeros trabajos de investigación sobre el empleo de enzimas exógenas proceden de la década de los 60 (Burroughs *et al.*, 1960; Rovics y Ely, 1962; Rust *et al.*, 1965); la variabilidad de los resultados obtenidos, unido al elevado costo de las enzimas, hicieron desistir en su empleo.

En la actualidad, la reducción en los costos de producción y la existencia de preparados enzimáticos de actividad mejor definida, han vuelto a plantear el interés por el estudio del papel de las enzimas fibrolíticas en la alimentación de los rumiantes (Chen *et al.*, 1995; Beauchemin *et al.*, 1997; Mc Allister *et al.*, 1999). Así algunos trabajos han demostrado que la suplementación con enzimas exógenas (celulasas y xilanasas) puede mejorar la digestibilidad ruminal y aumentar la producción de leche o el crecimiento de rumiantes (Yang *et al.*, 1999). Estos resultados llegan a ser sorprendentes para algunos autores al considerar el extenso potencial de las enzimas fibrolíticas endógenas de la microflora del rumen. Entre las razones que justifican el empleo de enzimas en rumiantes, destacan (Beauchemin y Rode, 1996; Hristov *et al.*, 1996):

a.- La digestibilidad de la materia orgánica en rumiantes raramente supera el 90% y resulta con frecuencia considerablemente menor.

b.- Actualmente se dispone de nuevos alimentos para rumiantes, muchos de ellos subproductos de baja calidad, en los que las enzimas pueden ser de especial utilidad para mejorar sus posibilidades digestivas.

### **2.3.7 Experiencias de uso de enzimas fibrolíticas**

Pinos *et al.* (2005), con el objetivo de evaluar el efecto de enzimas fibrolíticas exógenas sobre ingredientes alimenticios usados en la alimentación de rumiantes y sobre la producción de leche en vacas holstein, muestra que estos aditivos incrementaron significativamente la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) de los ingredientes fibrosos (cascarilla de soya y maíz ensilado) a las 3 y 48 horas, mientras que a las 6, 12, 24, y 72 horas no existió diferencia significativa; la producción de leche que fue evaluada durante 120 días, presentó diferencia significativa durante las semanas 3, 4, 5, 8 y 16 a favor de las vacas suplementadas, sin embargo la producción promedio no fue estadísticamente diferente a pesar que la diferencia fue de un 5.7% a favor de las vacas suplementadas con enzimas fibrolíticas.

De la misma forma en México (Zinn y Salinas,1999) donde se utilizaron 96 novillos con un peso promedio inicial de  $223\pm 2$  kg los cuales fueron asignados aleatoriamente a dos tratamientos: a) 0 g de Fibrozyme® y b) 15 g/a/d de Fibrozyme®; los animales fueron alimentados con una dieta que contenía 78% de concentrado y 22% de forraje (5% heno de alfalfa y 17% heno de pasto sudan), durante un periodo de 64 d, se encontró efectos positivos en el segundo tratamiento, donde el peso final aumentó (3%), y el consumo de materia seca (4.5%), atribuyendo el incremento en consumo de materia seca a una mayor digestibilidad de la fibra detergente neutra (FDN) (23%).

Pereira y Zinn (2001), utilizaron fibrozyme® en 72 toretes; los cuales fueron divididos en 2 grupos; el primer grupo recibió 0 g de fibrozyme® (testigo) y el segundo 15 g/a/d. El periodo de alimentación fue de 121 días dividido en dos fases. La primera (crecimiento) que fue de los 0–84 d en la cual utilizaron una dieta que contenía 22% de forraje (5% heno de alfalfa y 17% heno de pasto sudan) y 78% de concentrado. La segunda fase (finalización) que fue de los 85–121 días, en donde la dieta utilizada estaba compuesta por 12% de forraje (heno de pasto sudan) y de 88% concentrado. El grupo que recibió fibrozyme® incrementó la ganancia diaria en 6% durante la primera fase y 20% durante la fase de finalización. Lo anterior fue atribuido a que adición de fibrozyme® complemento la baja actividad fibrolítica que se observa en el rumen cuando los rumiantes consumen dietas altas en granos. Cano *et al.*, (2003) que evaluaron enzimas fibrolíticas como alternativa para mejorar el uso de caña de azúcar, muestra resultados negativos al no encontrar diferencia significativa en la digestibilidad *in situ* de la materia seca (DISMS), no existio efecto sobre el consumo total de alimento y tampoco en la ganancia de peso

Flores *et al.* (2006), con el objetivo de evaluar el efecto de la adición de un complejo enzimático (Safizym®) en heno de alfalfa de diferente calidad en la alimentación de becerros lactantes, mostraron que en el periodo predestete la inclusión del complejo enzimático en el alimento mejoró la ganancia de peso (GP) y la eficiencia alimenticia (EA) sin afectar el consumo de alimento, mientras que en el periodo postdestete el consumo de alimento fue mayor en animales suplementados, la GP y EA no fueron afectadas en este periodo, no se observó ninguna interacción entre el contenido de fibra

de la alfalfa y la adición de enzimas fibrolíticas y no mostró efecto significativo sobre la viscosidad de la muestra digestiva.

Yescas *et al.* (2004), determinaron el efecto de la adición de un producto enzimático fibrolítico (Fibrozyme®) en la DISMS de dietas con esquilmos (rastrojo de maíz y paja de avena), no encontraron efecto de las enzimas en la digestibilidad de las dietas; concluyendo que la falta de respuesta puede deberse a características de la pared celular de los esquilmos evaluados, los cuales son altamente lignificados lo que pudo limitar la acción de la enzima comercial utilizada.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Lugar de ejecución**

El presente estudio se realizó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### **3.2 Descripción del material experimental**

##### **3.2.1 Animal**

Se utilizó una alpaca, macho adulto de la raza huacaya de seis años de edad con un peso aproximado de 60 kg fistulado a nivel del primer compartimiento. Este animal se mantuvo en un corral de 8 x 6 x 1.5 m de largo, ancho y alto, respectivamente. El bebedero y comedero fueron de cemento y la dieta fue a base de cogollo de caña de azúcar (parte más apical de la planta obtenida antes de la cosecha) y heno de alfalfa. El alimento se ofreció *ad libitum* dividido en dos comidas diarias, teniendo libre acceso a agua fresca.

### 3.2.2 Tratamientos

Los tratamientos fueron dos complejos enzimáticos comerciales: Allzyme Vegpro® y Rovabio Excel®. Ambos presentados en estado sólido, estos complejos enzimáticos contienen celulasas, xilanasas, pectinasas, proteasas, B-glucanasas. El sustrato fue una muestra de cogollo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) secada a 65 °C por 48 h y luego molida para pasar por un tamiz de 3 mm. Este sustrato a fue tratado por 30 min antes de la incubación con las enzimas mencionadas. En ambos tratamientos las enzimas representaron el 1% de peso respecto a la muestra, 10 veces la especificación de los fabricantes de cada enzima comercial cuando se usa en alimentos de aves y cerdos, El sustrato sin ser tratado con las enzimas fue considerado el Control (T0).

### 3.3 Diseño experimental

El diseño experimental del presente trabajo fue el de bloques al azar, con cuatro periodos, tres tratamientos (T0, T1 y T2) y dos repeticiones por periodo-tratamiento.

#### 3.3.1 Procedimiento para la prueba de digestibilidad *in situ* la materia seca

La digestibilidad *in situ* (DIS) se estimó de acuerdo al procedimiento descrito por San Martín *et al.* (1984); se confeccionaron bolsas de dacrón con doble costura de hilo nylon invisible y sin formación de ángulos en las esquinas. Las dimensiones fueron 8 cm de largo y 5.5 cm de ancho, antes de su uso, las bolsas fueron lavadas, identificadas y secadas en una estufa a una temperatura de 65 °C por 48 h, enfriadas en un desecador y pesadas.

Las muestras (cogollo de caña de azúcar tratada con cada enzima) fueron pesadas, el peso de muestra fue 1.8 g aproximadamente, se colocaron en las bolsas de dacrón, atadas en forma de bolsa de tabaco a un cordón de 80 cm de largo, guardando una distancia de 10 cm entre bolsa y bolsa, introducido al

Compartimiento 1, manteniendo una distancia de unos 20 cm entre la cánula y la primera bolsa, atándola a la cánula.

Una vez concluido el tiempo de digestión a las distintas horas, se extrajeron las muestras, procediendo al lavado de cada una con agua corriente, exprimiendo ligeramente, el lavado se detuvo cuando el agua del lavado dejó de presentar coloración. Las bolsas lavadas se secaron en estufa a 65 °C por 48 h para luego ser enfriadas en desecador y posteriormente pesadas.

Los tratamientos, periodos, tiempos de digestión, y números de bolsas se muestran a continuación:

Cuadro 1. Tratamientos, periodos, tiempos de digestión, y números de bolsas.

		<b>Tiempos (7): 0, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas</b>					
		<b>PERÍODOS (4)</b>					
		<b>Dos repeticiones</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>Muestras</b>
<b>Tratamientos</b>	T0		14	14	14	14	56
	T1		14	14	14	14	56
	T2		14	14	14	14	56
							<b>168</b>

Dónde:

Tiempos (7): 0, 6, 12, 24, 48, 72 y a las 96 h.

Períodos (4): I, II, III, IV.

Tratamientos (3): T0, T 1 y T 2.

Número de repeticiones: Dos por cada bloque-tratamiento.

Animal Laboratorio: Una Alpaca.

T0: Muestra control sin adicionar ningún tipo de enzima.

T1: Muestra con enzima Allzyme Vegpro®

T2: Muestra con enzima Rovabio Excel®

En cada periodo se procesaron 42 bolsas, 36 bolsas fueron introducidas en el compartimiento 1 de la alpaca, 12 correspondientes a cada tratamiento, cada tratamiento con dos repeticiones por período y cada repetición con siete tiempos y cada tiempo con una muestra.

Para la estimación de la digestibilidad de la materia seca para cada tiempo (0, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h de cada uno de los tratamientos), se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{DISMS} = 100 - \left[ \frac{(A-B) \times 100}{C} \right]$$

Dónde:

DISMS: Digestibilidad *in situ* de materia seca

A: peso de bolsa más residuo no digerido

B: peso de la bolsa

C: peso materia seca inicial

### 3.3.2 Cinética de digestión

Para describir la cinética de digestión de la materia seca se utilizó el modelo de Orskov y Mc Donald (1979). Los parámetros evaluados fueron: digestión inicial, fracción degradable, tasa de degradación, digestión potencial y tiempo medio.



$$Y = a + b (1 - e^{-ct})$$

Dónde:

Y: Digestibilidad de la materia seca en un tiempo t.

a: Intercepto de la degradación cuando t=0 (Degradabilidad inicial),  
%. Fracción soluble.

b: Fracción insoluble potencialmente digerible, %.

c: Tasa de degradación de b.

t: Tiempo de incubación, h

### 3.3.3 Parámetros a evaluados

#### 3.3.3.1 Digestibilidad inicial (a)

Representa el sustrato soluble y completamente digestible que sale rápidamente de la bolsa.

#### 3.3.3.2 Fracción degradable (b)

Es la fracción insoluble pero potencialmente degradable por acción fermentativa de los microorganismos del compartimiento I.

#### 3.3.3.3 Tasa de degradación (c)

Es la cantidad de sustrato que puede ser degradada por unidad de tiempo. Es estimada a partir del parámetro “c” del modelo anteriormente definido. Tasa de degradación de la fracción b.

### 3.3.3.4 Digestión potencial (a+b)

Es definida como la degradación máxima que sufre el alimento en el ecosistema del compartimento 1 si es que las condiciones presentes y el tiempo de retención en dicho ecosistema no son limitantes. Estimada a partir de la suma de los parámetros “a” y “b” del modelo  $Y = a + b(1 - e^{-ct})$ .

### 3.3.3.5 Tiempo medio, h(T1/2)

Es el tiempo necesario para que la mitad del alimento potencialmente degradable contenido en la bolsa se degrade. Este parámetro es derivado del modelo que describe la cinética de digestión y es el siguiente:

$$T1/2, h = \frac{0.693}{c}$$

Dónde:

c: es la tasa de degradación de b.

## 3.3.4 Análisis químico nutricional

Se estimó el contenido de materia seca, ceniza, extracto etéreo y proteína cruda de acuerdo a los procedimientos AOAC (1990). La fibra cruda será determinada mediante los procedimientos descritos por Van Soest *et al.*, (1991).

## 3.4 Análisis de la información

Las variables estimadas en los tratamientos: digestibilidad, digestibilidad inicial, fracción degradable, tasa de degradación, digestión potencial y tiempo medio fueron analizadas mediante análisis de varianza de dos vías. Para la diferencia múltiple de medias se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de significancia de  $P < 0.05$  mediante el apoyo del programa PROC NLIN de SAS/STAT<sup>®</sup> 9.2 (SAS Institute Inc. 2010)

El modelo del diseño fue:

$$Y_{ijk} = U + T_i + B_j + E_{ij} + Em_{ijk}$$

Dónde:

$Y_{ijk}$  = Observación

$U$  = Media general

$T_i$  = Efecto de tratamiento  $i = 1, 2, 3$

$B_j$  = Efecto de bloques  $j = 1, 2, 3, 4$

$E_{ij}$  = Efecto del error experimental

$Em_{ijk}$  = Efecto del error muestral

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La suplementación con enzimas fibrolíticas exógenas, se presenta como una de las alternativas tecnológicas capaces de contribuir a estimular los complejos mecanismos de degradación de la pared celular de los forrajes, razón por el cual se planteó el presente estudio con el objetivo de evaluar el efecto de dos complejos enzimáticos comerciales, sobre la digestibilidad *in situ* y la cinética de digestión del cogollo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).

### 4.1 Análisis proximal del cogollo de caña de azúcar

En el Cuadro 2 se muestra los resultados del análisis proximal del cogollo de caña utilizado en el experimento. Estos resultados son similares en proteína a los reportados por Suarez *et al.*, (2011) y López *et al.*, (2003) y similares en fibra cruda a lo reportado por López *et al.*, (2004).

Cuadro 2. Análisis proximal del cogollo de caña de azúcar utilizado en el experimento (% Base seca).

Forraje	MS*	Proteína	FC*	ELN*	EE*	Cenizas
<b>Cogollo de Caña</b>	34.9	4.48	29.1	58.2	1.78	6.44

\*MS: Materia Seca, FC: Fibra cruda, ELN: Extracto libre de nitrógeno, EE: Extracto etéreo

## 4.2 Digestibilidad *in situ* y cinética de digestión del cogollo de caña de azúcar

En el Cuadro 3 se muestra la digestibilidad *in situ* de la materia seca (DISMS) del cogollo de caña en función del tiempo. En él se observa la digestibilidad hasta las 96 horas, siendo estos resultados similares a los encontrados por López *et al.*, (2003) al caracterizar ocho variedades de caña de azúcar con potencial forrajero.

Cuadro 3. Digestibilidad *in situ* de la materia seca del cogollo de caña de azúcar en función al tiempo de incubación.

Tratamiento	Tiempo de incubación (h)					
	6	12	24	48	72	96
T0	22.41 <sup>a*</sup>	30.43 <sup>a</sup>	40.50 <sup>a</sup>	48.30 <sup>a</sup>	52.53 <sup>a</sup>	55.08 <sup>a</sup>
T1	20.59 <sup>b</sup>	28.14 <sup>b</sup>	39.75 <sup>a</sup>	47.69 <sup>ab</sup>	52.36 <sup>a</sup>	55.06 <sup>a</sup>
T2	22.05 <sup>a</sup>	29.07 <sup>ab</sup>	39.88 <sup>a</sup>	47.04 <sup>b</sup>	52.13 <sup>a</sup>	54.92 <sup>a</sup>

T0: Sin enzima; T1: Enzima Allzyme Vegpro®; T2: Enzima Rovabio Excel®

\*Letras diferentes en columnas indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )

Al evaluar el efecto de las enzimas fibrolíticas sobre el cogollo de caña se observa, en líneas generales, que la DISMS no mejora en las distintas horas, encontrándose solo pequeñas diferencias ( $p < 0.05$ ) a favor del tratamiento control (T0) a las 6, 12 y 48 horas de incubación, pero de poca significancia biológica.

En el Cuadro 4 se muestra los parámetros de la cinética de digestión. En él no se observaron diferencias entre tratamientos ( $p > 0.05$ ) para la digestibilidad inicial (a), tasa de degradación (c), la digestión potencial (a+b) y tiempo medio. Solo se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) para la fracción degradable (b) a favor de T1 versus T0 y T2, al igual que en la DISMS, esta diferencia no fue biológicamente importante.

Cuadro 4. Parámetros de la cinética de digestión de la materia seca del cogollo de caña de azúcar.

Parámetro	Tratamientos		
	T0	T1	T2
Digestibilidad inicial (a) (%)	12.84 <sup>a*</sup>	11.88 <sup>a</sup>	12.99 <sup>a</sup>
Fracción degradable (b) (%)	41.94 <sup>a</sup>	43.42 <sup>b</sup>	41.83 <sup>a</sup>
Tasa de degradación (c)	0.044 <sup>a</sup>	0.040 <sup>a</sup>	0.040 <sup>a</sup>
Digestión potencial (a+b) (%)	54.78 <sup>a</sup>	55.30 <sup>a</sup>	54.82 <sup>a</sup>
Tiempo medio, horas	15.94 <sup>a</sup>	17.46 <sup>a</sup>	17.38 <sup>a</sup>

T0: Sin enzima; T1: Enzima Allzyme Vegpro®; T2: Enzima Rovabio Excel®

\*Letras diferentes en columnas indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )

Yescas *et al.*, (2004), al evaluar el efecto de enzimas fibrolíticas sobre la DISMS a las 12, 48 y 72 horas, utilizando como sustratos el rastrojo de maíz y la paja de avena, encontraron resultados similares al presente trabajo. Asimismo, Cano *et al.*, (2003) quienes evaluaron la utilización de enzimas fibrolíticas sobre la DISMS de la caña de azúcar integral a las 48 horas, concluyeron que las enzimas no aumentaron la digestibilidad de la caña de azúcar.

Usando la técnica de digestibilidad *in vitro* (DIV), Pinos *et al.* (2005) quienes evaluaron el efecto de las enzimas fibrolíticas en el heno del alfalfa a edades de 7, 14, 21 y 28 días de rebrote, no encontraron efecto de las enzimas ( $p > 0.05$ ); así mismo, Avellaneda *et al.*, (2003) trabajando sobre el efecto de las enzimas fibrolíticas en el pasto guinea (*Panicum maximum*) no encontraron efecto alguno, y estos mismos autores trabajando en cinco ecotipos de *Brachiaria* (Avellaneda *et al.*, 2007) no encontraron efecto de las enzimas fibrolíticas. A estos estudios se suman los de Pollard *et al.* (2001) con heno de trigo, Tricarico *et al.* (1998) con festuca (*Festuca arundinacea*) y Titi *et al.* (1998) con heno de alfalfa (*Medicago sativa*) quienes tampoco hallaron efecto de las enzimas sobre la digestibilidad.

Por otro lado, Flores *et al.* (2006), al evaluar la DIV de las enzimas fibrolíticas en alfalfa baja y alta en fibra muestran que a las 48 horas las enzimas mejoraron la DIV ( $p < 0.05$ ) tanto en la muestra de bajo contenido en fibra, de 78.8 a 81.3% como la muestra de alto contenido en fibra, de 77.4 a 79.9%. Pollard *et al.* (2001), mencionan que las enzimas fibrolíticas mejoran ( $p < 0.05$ ) la DIV de la materia seca (DIVMS) del heno de alfalfa; así también Pinos *et al.* (2001), muestran que la DIVMS del heno de alfalfa se incrementó significativamente por acción de las enzimas fibrolíticas cuando estas fueron agregadas a dosis de 20 mg enzima por 100 mg sustrato.

Moreno *et al.* (2007), evaluaron la DIVMS de dietas para vacas lecheras encontrando que la enzima Fibrozyme, en dosis de 2g/kg, mejoró la DIVMS en las 12 primeras horas de incubación, no observándose ningún efecto después de este tiempo; quedando manifiesto la teoría que la viabilidad de la enzima dependerá del tiempo de exposición al medio ambiente ruminal; así, a tiempos mayores la actividad de la enzima disminuye o desaparece; de esta manera estos resultados apoyan la hipótesis que las enzimas incrementan en los alimentos la tasa de degradación pero no la extensión de la misma (Giraldo *et al.*, 2007; Colombatto *et al.*, 2003)

Los resultados divergentes en condiciones aparentemente similares de experimentación, evidencian la complejidad de la suplementación con enzimas fibrolíticas en rumiantes, sobre todo a la hora de interpretar los resultados ya que estos deben analizarse como producto de varios factores y sus interacciones. Todo ello debido a que existen múltiples factores que pueden intervenir en el desempeño de las enzimas fibrolíticas, que van desde la naturaleza del sustrato, el tipo o nivel de enzima, hasta la técnica utilizada para la estimación de la tasa de digestión y digestibilidad, llámese *in situ* o *in vitro*.

Se ha demostrado que no todas las enzimas resultan igualmente efectivas en la digestión de diferentes sustratos, por lo que la actividad de un mismo preparado parece variar significativamente cuando el sustrato cambia, evidenciándose la influencia determinante de este factor sobre la eficacia de las enzimas fibrolíticas exógenas (Zobell *et al.*, 2000)

La estructura de la pared celular es muy compleja y variable, tanto química como histológica, y es la que condiciona el modo de ataque a los polisacáridos estructurales y, en último término, el ritmo y extensión de degradación por las enzimas de los microorganismos. Como indican Forsberg *et al.* (2000), el mesófilo es rápidamente degradado por las bacterias ruminales sin precisar adhesión, mediante una acción enzimática extracelular, mientras que la epidermis y las vainas de los paquetes parenquimatosos precisan de una íntima adhesión de las principales especies fibrolíticas.

La epidermis está débilmente adherida al mesófilo en las hojas de leguminosas y de muchas gramíneas C3, pero firmemente fijada a los haces vasculares en las C4 (el forraje usado en el estudio es un C4, cogollo de caña), por lo que puede entorpecer el proceso de digestión (Cornu *et al.*, 1994). El xilema y el esclerénquima de las hojas de las gramíneas, por su densidad, suponen una barrera a la colonización y a la acción de las enzimas microbianas, tanto sobre estos tejidos como sobre otros que pueden quedar físicamente protegidos (Jones y Theodorou, 2000). La proporción de xilema y esclerénquima es similar en gramíneas C3 y C4. Sin embargo, una mayor proporción de epidermis y vainas de paquetes parenquimatosos en las C4, suponen una barrera adicional al ataque microbiano (Carpita y Gibeaut, 1998).

No solo las diferencias anatómicas e histológicas de las diferentes fracciones botánicas de las plantas y la fase de desarrollo de las mismas influyen en el proceso de degradación de la pared celular, la especie vegetal desempeña un papel preponderante en el ritmo y extensión de degradación de los forrajes por los microorganismos ruminales (Ramírez *et al.*, 2002). En este sentido Wilson y Hatfiel (1997), demostraron que las paredes celulares de las gramíneas y leguminosas presentan una composición muy similar, sin embargo, los enlaces intramoleculares fuertes que se establecen entre estos componentes y la lignina difieren en ambas especies; en las gramíneas se produce una esterificación de la lignina con los arabinosilanos, mientras que en las leguminosas ocurre solo con los residuos de arabinosa y galactosa y no con xilanos, lo que provoca una menor tasa y extensión de la degradación de las paredes celulares de las gramíneas.



La estructura química del cogollo de caña, insumo que se usó en este ensayo, posee una estructura y composición que determina propiedades mecánicas resistentes al ataque de microorganismos y enzimas y por lo tanto dificultad para degradar este forraje, por ello, la falta de respuesta en este estudio pudo deberse a las características de la pared celular, que limitó la acción de las enzimas fibrolíticas usadas.

Por otra parte, Pinos (1999), al evaluar seis niveles de enzimas fibrolíticas (0, 5, 10, 20, 40 y 80 mg enzima/100 mg sustrato) en la degradación *in vitro* de la fibra detergente neutro de heno de alfalfa, encontró que al aumentar la dosis de la enzima incremento linealmente la degradación, sin llegar al punto de saturación; Beauchemin *et al.*, (1995) hacen referencia que el nivel de enzimas depende del sustrato, lo cual recuerda la necesidad de determinar los ritmos de aplicación óptimos de cada preparado para sustratos o alimentos específicos; por ejemplo, con el heno de alfalfa suministrado a ganado en crecimiento las enzimas incrementaron la ganancia diaria de peso en un 30% con menores niveles de enzima, cuatro veces la dosis recomendada (4X), pero no con los más altos 16X; mientras que en el heno de fleo, las enzimas adicionadas al nivel más alto (16X) mejoraron la ganancia diaria de peso en un 36%; Treacher *et al.*(1997), propusieron que una adhesión excesiva de enzimas sobre el sustrato podría competir por los sitios activos con las enzimas bacterianas del rumen, y por lo tanto, reducir su actividad. En este sentido, en el presente estudio, donde se usó una dosis del 1% no se encontró respuesta alguna, por lo que se sugiere estudios donde se prueben distintas dosis de cada enzima.

Con respecto a las técnicas para la estimación de la digestibilidad, Flores *et al.* (2006) y Yescas *et al.* (2004), mencionan que la técnica para dicha estimación es factor muy importante, tal es así que en varios experimentos las enzimas fibrolíticas que resultaron positivas en la DIV; sin embargo no se encontró la misma respuesta a la DIS. El incremento en la digestibilidad con la técnica DIV puede ser debido al sinergismo existente entre las enzimas de microorganismos ruminales y las enzimas exógenas, favoreciendo el potencial hidrolítico (McAllister *et al.*, 2001). La ausencia de efecto a partir de la técnica DIS podría deberse a que esta técnica asegura una mezcla constante de las fases sólida y líquida de la digesta, dando lugar a que la muestra contenida en las

bolsas se encuentre expuesta al ataque continuo de bacterias enmascarando el posible efecto de las enzimas fibrolíticas exógenas.

También, hay tener en cuenta que el alimento ingerido desaparece del tracto digestivo por dos rutas: la de la digestión y el pasaje; en consecuencia, estos dos procesos compiten por el mismo sustrato, de tal manera que existe la probabilidad de que una parte del material potencialmente degradable escape de la digestión y pase a las heces. En el caso de la incubación de sustratos en bolsas de nylon en el rumen de un animal, una parte del material fino, el más soluble en el fluido, escapará del rumen sin digerirse, pero el material en frascos de incubación DIV, no puede escapar y, en consecuencia, estará expuesto a la acción microbial y a las enzimas fibrolíticas exógenas durante todo el período de incubación. De lo anterior se deduce que la desaparición de sustrato de las bolsas en el rumen debería ser mayor que la desaparición de sustrato en los frascos (Arreaza *et al.*, 2005).

## V. CONCLUSIONES

- Las enzimas fibrolíticas comerciales evaluadas en una dosis del 1% no mejoran la digestibilidad, ni la cinética de digestión de la materia seca del cogollo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).

## VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar dosis distintas de los complejos enzimáticos fibrolíticos comerciales al evaluado en el presente estudio (1%).
- Evaluar el efecto de las enzimas usando la técnica de DIV debido a su menor variabilidad.

## VII. LITERATURA CITADA

1. **Adesogan A, Givens D, Owen E. 2000.** Measuring chemical composition and nutritive value in forages. En: Field and Laboratory methods for Grassland and Animal production researchs. Eds. Nannetje, L. and Jones, R.M.
2. **Annison G. 1997.** The use of enzymes in ruminant diets. In: Biotechnology in the feed Industry, Proceedings of the 13 th Annual Symposium. Nottingham University Press, Nottingham, Leics., UK. pp 115.
3. **AOAC.1990.** Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Vol. 1.15th Ed. Asso. Offic. Anal. Chem. Washington, D.C. pp: 69-88.
4. **Arreaza L, Sánchez D, Abadía B. 2005.** Degradabilidad ruminal de fracciones de carbohidratos en forrajes tropicales determinada por métodos *in vitro* e *in situ*. Rev Corpoica. 2005 (6): 52-57.
5. **Avellaneda J, Gonzales S, Pinos J, Hernández A, Montañez O, Ayala J. 2003.** Enzimas fibrolíticas exogenas en la digestibilidad *in vitro* de cinco ecotipos de brachiaria. Agronomía Mesoamericana, año/vol.18, número 001 pp. 11-17
6. **Avellaneda J, Gonzales S, Pinos J, Hernández A, Cobos M, Hernández D, Montanez O. 2007.** Effect of exogenous fibrolytic enzymes (Fibrozyme) on dry

- matter and cell Wall in vitro digestibility of guinea grass (*Panicum maximum* var. Mombasa) hay. J. Animal Sci (Suppl. 1): 334.
7. **Barthes P. 1992.** Role, transformations et devenir des lignines en melieu ruminal. These Doctorat de l' Universitate Paul Sabatier.
  8. **Bedford R. 2000.** Exogenous enzymes in monogastric nutrition and their current value and future benefits. Anim. Feed. Sci. Tech. 86: 1
  9. **Beauchemin K, Rode L, Maekawa M, Morgavi D, Kampen R. 2000.** Evaluation of a non starch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. J. Dairy. Sci. 83: 543.
  10. **Beauchemin K, Rode L. 1996.** Use of feed enzymes in ruminant nutrition. Proc. of the Canadian Society of Animal Science Annual Meeting, Alberta. pp: 103-140.
  11. **Beauchemin A, Rode M, Karren D. 1999.** Use of feed enzymes in feedlot finishing diets. Can. J. Anim. Sci. 79:243-246.
  12. **Beauchemin K, Rode L, Sewalt V. 1995.** Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility of steers fed dry forages. Journal of Animal Science, 75:641-644
  13. **Beauchemin K, Jones S, Rode L, Sewalt V. 1997.** Effects of fibrolytic enzyme in corn or barley diets on performance of feedlot cattle. Can. J. Anim. Sci. 77:645-653.
  14. **Béguin P, Aubert J. 1994.** The biological degradation of cellulose. FEMS. Microbiol Rev. 13: 61-68
  15. **Burroughs W, Woods W, Ewing S, Greig J, Theurer B. 1960.** Enzyme additions to fattening cattle rations. J. Anim. Sci. 19:458-464.
  16. **Cano L, Aranda E, Mendosa G, Pérez J, Ramos J. 2003.** Comportamiento de toretes en pastos tropicales suplementados con caña de azúcar y enzimas fibrolíticas. Técnica Pecuaria México. 41: 153-164

17. **Carpita N, Gibeaut D. 1998.** Biosynthesis and secretion and plant cell wall polysaccharides. *Current topics in Plant Biochemistry and Physiology.* 7:12
18. **Chen H, Huber T, Simas J, Theurer B, Yu P, Chan C, Santos F, Wu Z, Swingle S. 1995.** Effects of enzyme treatment or steam-flaking of sorghum grain on lactation and digestion on dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78: 1721-1727
19. **Cherney. 2000.** Characterization of forages by chemical analysis. En: *Forage evaluation in Ruminant Nutrition.* R.E.F.(Eds.) CAB International
20. **Chesson A. 1994.** Manipulation of fibre degradation: An old theme revised. In: T.P. Lyons and K.A. Jacques (Ed.) *Biotechnology in the Feed Industry.* pp. 83-98
21. **Colombatto D, Hervás G, Yang W, Beauchemin K. 2003.** Effects of enzyme supplementation of a total mixed ration on microbial fermentation in continuous culture, maintained at high and low pH. *J. Anim. Sci.* 81: 2617-2627.
22. **Colombatto D, Hervás G, Yang W, Beauchemin K. 2003.** Effects of enzyme supplementation of a total mixed ration on microbial fermentation in continuous culture, maintained at high and low pH. *J. Anim. Sci.* 81: 2617-2627.
23. **Cornu A, Besle J, Mosoni P, Grenet E. 1994.** Lignin - carbohydrate complexes in forage: Structure and consequences in the ruminal degradation of cell wall carbohydrates. *Reprod. Nutr. Dev.* 34: 385
24. **Church D. 1993.** El rumiante. Fisiología digestiva y nutrición. Edit. Acribia. Zaragoza, España. 625 p.
25. **Delgado C, Rosegrant M, Steinfeld H, Ehui S, Courbois C. 1999.** The next food revolution. Food agriculture and environment discussion. International food policy research institute. Washington DC. 28 pp.

26. **Fernández M, Gómez C. 2010.** Utilización de forrajes no tradicionales: cogollo fresco de caña de azúcar en la alimentación de vacas lecheras. Sitio argentino de producción animal. 2p.
27. **Flores M, Ruiz F, Guerrero M, Romano J. 2006.** Respuesta productiva de becerros holstein alimentados con alfalfa de diferente calidad y enzimas fibrolíticas en la etapa pre y pos destete. Técnica Pecuaria Mexico. N° 44: 313-328
28. **Forsberg C, Forano E, Chesson A. 2000.** Microbial adherence to the plant cell wall and enzymatic hydrolysis. En: Ruminant Physiology: Digestion, metabolism, growth and Reproduction. Ed. Cronjé, P.B. CAB International.
29. **Frumholtz, P, Beauchemin k. 2000.** Las enzimas potencializan la eficiencia alimenticia. In: Memorias del curso nutrición y manejo de la alimentación en ganado bovino productor de carne. AMENA. Guadalajara, México. pp: 185-191.
30. **Gardner P, Wood T, Chesson A, Stuchbury T. 1999.** Effect of degradation on the porosity and surface area of forage cell walls differing lignin content. J. Sci. Food Agric.79: 11.
31. **Gashe A. 1992.** Cellulase production and activity by trichoderma spp. A-001. J. Applied Bacteriol. 73:79-82.
32. **Giraldo L, Tejido M, Ranilla M, Carro M. 2007.** Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage: concentrate ratios. *Anim. Feed Sci. Technol.* doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.06.13
33. **Hatfield R, Ralph J, Grabber H. 1999.** Cell wall structural foundations: Molecular basis for improving forage digestibility's. *Crop. Sci.* 39:27-37.
34. **Hatfield R 1993.** Cell wall polysaccharides interactions and degradability. En: Forage cell wall structure and digestibility. Jung, H.G.: Buxton, D.R.: Hatfield, R.D.: Ralph, J. (Eds.). ASACSSA-SSSA, Madison, WI. p. 266



35. **Hristov A, Broderick G. 1996.** Synthesis of microbial protein in ruminally cannulated cows fed alfalfa silage, alfalfa hay, or corn silage. *J. Dairy Sci.* 79: 1927-1637
36. **Huber R. 1985.** Ingeniería enzimática. In: *Biotecnología*. Scriban R. (ed). Ed. Manual Moderno. México, D.F. pp. 242-254.
37. **Jones D, Theodorou M. 2000.** Enzyme technique for estimating digestibility. En: *Forage evaluation in Ruminant Nutrition*. Eds. Given, D.J.; Owen, E.; Axford, R.F.E.; Omed, A.M. CAB International.
38. **Kirby J, Aurilio V, Mc Crae S, Martín J, Flint H. 1998.** Plant cell wall degrading enzyme complexes from the cellulolytic rumen bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *Biochemical Society Transactions* 26: 169.
39. **Kung L, Treacher J, Nauman A, Smagala M, Endres M, Cohen A.. 2000.** The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:115-122.
40. **Ladisch M, Lin K, Voloch M, Tsao G. 1983.** Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme Tech.* 15: 90-99
41. **Lam T, Iiyana K, Stone B. 1990.** Primary and secondary walls of grasses and other forage plants: taxonomic and structural considerations. In: *Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminants*. Elsevier Science Publisher. New York. USA. pp: 43-69.
42. **López I, Aranda E, Ramos J, Mendoza G. 2003.** Evaluación nutricional de ocho variedades de caña de azúcar con potencial forrajero. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 37, No. 4, 2003.
43. **López Y, Ramírez J, Nieves K, Fonseca F. 2004.** Valor nutritivo de variedades de caña de azúcar para forraje. *Pastos y Forrajes*, Vol. 27, No. 3, 273-278, 2004.

44. **Martín P. 1997.** Forraje de la caña de azúcar en la alimentación del ganado vacuno. *Rev. Cubana Cienc. agríc.* 31 (3):237
45. **McAllister A, Hristov A, Beauchemin K, Rode L, Cheng K. 2001.** Enzymes in Ruminants Diets En Bedford M. y G. Partridge. 2001. Enzymes in Fram Animal Nutrition. CAB International 2001.
46. **McAllister A, Oosting S, Popp J, Mir Z, Yanke L, Hristov A, Treacher R, Cheng K. 1999.** Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 79:353–360.
47. **MINAG. 2012.** Lima: Ministerio de Agricultura. [Internet], [09 julio 2012]. Disponible en: <http://www.minag.gob.pe/portal/sector-agrario/agricola/cultivos-de-importancia-nacional/az%C3%BAcar/generalidades-del-producto24?limitstart=0>
48. **Molina A. 1995.** Principios elementales para la utilización del forraje de caña de azúcar en la alimentación del ganado vacuno. Manual Agro-Red para la ganadería. p 59.
49. **Moore K, Jung H. 2001.** Lignin and fiber digestion. *Journal of Range Management.* 54: 420.
50. **Moreno R, Pinos J, Gonzales S, Álvarez G, García J, Mendoza G, Bárcena R. 2007.** Efecto de enzimas fibrolíticas exogenas en la degradación ruminal in vitro de dietas para vacas lecheras. *Interciencia.* Dec 2007, Vol. 32 N° 12
51. **Muirhead S. 1996.** Direct Fed Microbial, Enzyme and Forage Additive Compendium. 3a Ed. The Miller Publishing Company, Minnetonka, Minnesta. pp: 391-398.
52. **Ohara H, Karita S, Kimura T, Sakka K. Ohmiya K.1998.** Multicellulase complex of *Ruminococcus albus* F40. Proceedings of the MIE Bioforum. Genetics, Biochemistry and Ecology of cellulose degradation. Suzuka, Japan. Pag. 140.

53. **Orskov E, Mc Donald I. 1979.** The estimation of proteion degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 92: 499-246
54. **Pendleton B. 1998.** The regulatory environment. *In: Direct-fed microbial, Enzyme and Forage Additive Compendium.* Muirhead, S. (ed.) The Miller Publishing Company, Minnetonka, Minnesota. Volume 4. pp: 47-52.
55. **Pereira A, Zinn R. 2001.** Influence of fibrozyme on growth performance of yearling steers. *Proceeding Western Section American Society of Animal Sci.* Vol 52: 123-127
56. **Pinos J. 1999.** Caracterización de enzimas fibrolíticas exogenas en la fermentación ruminal y digestibilidad de alfalfa y bacillo. Tesis. Colegio de postgraduados. Montecillo, Mexico 97 pp.
57. **Pinos J, González S, Mendoza G, Bárcena R, Cobos M. 2001.** Efecto de enzimas fibrolíticas glucosiladas en la digestibilidad *in vitro* de MS y MO de alfalfa (*Medicago sativa*) y ballico (*Lolium perenne*). *Rev. Cient. FCV-LUZ 11:* 505-509.
58. **Pinos J, González S, Mendoza G, Garcia J, Miranda L, Adriana G, Lerma V. 2005.** Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación *in vitro* de ingredientes alimenticios, y en la producción de leche de vacas Holstein. *Interciencia.* 30: 752-757
59. **Pollard G, Wright W, Brambl T, Richardson C, Cobb C. 2001.** Effects of liquid feed supplementation and (or) Cellulolytic enzymes on dry matter disappearance of either legume or graa hay. *J. Dairy Sci.* 84 (Suppl. 1):37 (Abstr.).
60. **Ramírez R, Neira R, Ledezma R, Garibaldi C. 2000.** Ruminant digestion characteristics and effective degradability of cell wall of browse species from northeastern México. *Small Ruminant Research.* 36: 49

61. **Ramírez R, Ramírez G, López F. 2002.** Factores estructurales de la pared celular que afectan su digestibilidad. CIENCIA UANL.5:180
62. **Rovics J, Elly C. 1962.** Response of beef cattle to enzyme supplement. J. Anim. Sci. 21:1012.
63. **Rust W, Jacobsen L, McGilliard D, Hotchkiss K. 1965.** Supplementation of dairy calf diets with enzymes. Effect on nutrient utilization and on composition of rumen fluid. J. Anim. Sci. 24: 156-160
64. **Salisbury F, Roos W. 1992.** Plant physiology. Wadsworth. Belmont, California, USA. p. 682
65. **San Martin F. 1991.** Nutrición y alimentación en: Avances y perspectivas en el conocimiento de camélidos sudamericanos. Cap. VII. Ed. S. Fernández Baca. FAO.
66. **San Martin F, Rosales A, Valdivia R. 1984.** Tasas de digestión y digestibilidad del forraje en alpaca y vacuno. Investigación sobre pastos y forrajes de Texas Tech. University en el Perú. Art. Téc. T. 9-338.
67. **SAS Institute Inc. 2010.** SAS/STAT<sup>®</sup> 9.2 User's Guide. Cary, NC
68. **Sewalt V, Oliveira W, Glasser W, Fontenot J. 1996.** Lignin impact on fibre degradation. 2. A model study using cellulosic hydrogels. J. Sci. Food Agric. 71: 204.
69. **Shepphy C. 2001.** The corrent feed enzyme market and likely trends en Bedford M. y G partridge 2001. Enzymes in farm animal nutrition CAB Internacional 2001.
70. **Sudekum K, Oestmann A, Stangassinger M. 1995.** Role of lignin and phenolic monomers in feedstuffs for ruminants. II. Effects on digestion of plant cell wall components. UBERS. TIERERNAHRG. 23: 229.

71. **Stryer L. 1998.** Bioquímica. 4a (edición) Edit. Reverté, S. A. tomo II. México. 1010 p.
72. **Suárez R, Mejía J, González M, García D, Perdomo D. 2011.** Evaluación de ensilajes mixtos de *Saccharum officinarum* y *Gliricidia sepium* con la utilización de aditivos. Pastos y Forrajes, Vol. 34, No. 1. 69-86, 2011.
73. **Titi H, Richardson C, Cobb C. 1998.** Effects of fibrolytic enzyme treatment on forage dry matter and organic disappearance. J. Animal Sci. 76 (Suppl. 1):293
74. **Treacher R, McAllister T, Popp J, Mir Z, Mir P, Cheng K. 1997.** Effects of exogenous cellulases and xylanases on feed utilization and growth performance of feedlot steers. Can. J. Anim. Sci. 77: 541.
75. **Tricarico J, Dawson K, Newman K. 1998.** Effects of an exogenous microbial enzyme preparation (Fibrozyme) on ruminal digestion of fescue hay. J. Animal Sci. 76 (Suppl.1): 289.
76. **Van Soest P, Robertson J, Lewis B. 1991.** Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74:3583-3592.
77. **Vadiveloo J. 2000.** Cellulase degradation of whole rice straw. J. Animal and feed Sci. 9:157.
78. **Wilkins R. 2000.** Forages and their Role in Animal Systems. En: D.I. Givens, E. Owen, R.F.E. Axford y H.M. Omed (editors) Forage Evaluation in Ruminant Nutrition, CAB International, pp 1-14.
79. **Wilson J, Hatfield R. 1997.** Structural and chemical changes of cell wall types during stem development: Consequences for fibre degradation by rumen microflora. Aust. J. Agric. Res. 48:165

80. **Yang W, Beauchemin K, Rode L. 1999.** Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:391-403
81. **Yescas R, Bárcena R, Mendoza G, González S, Cobos M, Ortega M. 2004.** Digestibilidad *in situ* de dietas con rastrojo de maíz o paja de avena con enzimas fibrolíticas. *Agrociencia* 38: 23-31
82. **Zinn R, Salinas J. 1999.** Influence of Fibrozyme on digestive function and growth performance of feedlot steers fed a 78 % concentrate growing diet. *Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's 15th Annual Symposium.* pp:313-319.
83. **Zobell D, Weidmeier R, Olson K, Treacher R. 2000.** The effect of an exogenous enzymes treatment on production and carcass characteristics of growing and finishing steers. *Anim. Feed Sci. Tech.* 87:279-285.