

## DETERMINACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* EN HENO DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.) ADICIONANDO ENZIMAS EXÓGENAS XILANASAS

### Determination of *in vitro* digestibility in alfalfa hay (*Medicago sativa* L.) by adding exogenous xylanase enzymes

David Napoleón Vera Bravo<sup>1</sup>, Kleber Fernando Mejía Chanaluiza<sup>2</sup>, Félix Reinaldo Pastrán Calles<sup>3</sup>,  
Jorge Luis Mendoza Mejía<sup>4</sup>

#### RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar la Composición química (CQ), Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) del heno de alfalfa (*Medicago sativa* L.) simultáneamente la producción de gas *in vitro* (PGIV). La formulación del problema plantea que: ¿Con la aplicación de las enzimas fibrolíticas exógenas (xilanasas) al sustrato y el licor ruminal, mejorará la digestibilidad *in vitro* en heno de alfalfa? Se justifica por mejorar la digestibilidad en heno de alfalfa, adicionando enzimas en la alimentación. El método *in vitro* consistió en una incubación del alimento con fluido ruminal durante 48 h a 39°C, donde se evaluó simultáneamente la (DIVMS) 24 y 48 h y la producción de gas *in vitro* (PGIV) a las 3, 6, 12, 24 y 48 h de incubación al azar, con cuatro tratamientos y tres repeticiones, mediante la aplicación de enzimas exógenas en tres niveles comparado con un testigo, las siguientes dosis: 0 (control), 2000 UI (T1), 4000 UI (T2) y (T3) 8000 UI kg<sup>-1</sup> MS. Se obtuvo el porcentaje de DIVMS a las 24 y 48 horas utilizando xilanasas, se notó una mayor DIVMS a las 24 h en el T2: 38.87 % y relación en tiempo de digestibilidad hasta las 48 h con el 44.06 % con diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05). La PG post fermentación de los frascos, registraron valores en los diferentes tiempos evaluados donde presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Se concluye que la adición de enzima fibrolíticas mejoró la calidad de la fermentación forrajera gramínea con bajo valor nutricional y la aplicación de xilanasas resultó un heno de alta calidad, con el mejor efecto sobre la DGIV con una dosis de 4000 UI kg<sup>-1</sup> MS (T2). El mejor tiempo de incubación sobre la producción de gas *in vitro* alcanzó un mayor volumen a 48 h con 208.00 ml g<sup>-1</sup> MS (T2).

**Palabras clave:** *Medicago sativa*, nutrición de rumiantes, xilanasas, digestibilidad *in vitro*, producción de gas *in vitro*.

#### ABSTRACT

The objective of the work was to evaluate the Chemical Composition (CQ), Digestibility *in vitro* of the dry matter (DIVMS) of the alfalfa hay (*Medicago sativa* L.) simultaneously with the Production of gas *in vitro* (PGIV). The formulation of the problem states that: With the application of exogenous fibrolytic enzymes (xylanases) to the substrate and ruminal liquor, will the *in vitro* digestibility in alfalfa hay improve? It is justified by improving the digestibility in alfalfa hay, adding enzymes in the feed. The *in vitro* method consisted of an incubation of the food with ruminal fluid for 48h at 39°C, where the (DIVMS) 24 and 48h and the *in vitro* gas production (PGIV) were simultaneously evaluated at 3, 6, 12, 24 and 48 hours of incubation at random, with four treatments and three repetitions, through the application of exogenous enzymes at three levels compared to a control, the following doses: 0 (control), 2000IU (T1), 4000IU (T2) and (T3) 8000 IU kg<sup>-1</sup> MS. The percentage of DIVMS was obtained at 24 and 48 hours using xylanases, a greater DIVMS was noted at 24 hours in T2: 38.87 % and a relationship in digestibility time up to 48 hours with 44.06 % with significant differences between treatments (P <0.05). The PG post-fermentation of the flasks, registered values in the different evaluated times where significant differences appear between the treatments. It is concluded that the addition of fibrolytic enzyme improved the quality of grass forage fermentation with low nutritional value and the application of xylanases resulted in a high quality hay, with the best effect on DGIV with a dose of 4000 IU kg<sup>-1</sup> MS (T2). The best incubation time on *in vitro* gas production reached a volume greater than 48h with 208.00 ml g<sup>-1</sup> MS (T2).

**Keywords:** *Medicago sativa*, ruminant nutrition, xylanases, *in vitro* digestibility, *in vitro*, gas production.

<sup>1</sup> Docente, Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Extensión El Carmen, Ecuador. [david.vera@uleam.edu.ec](mailto:david.vera@uleam.edu.ec)

<sup>2</sup> Docente, Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Extensión El Carmen, Ecuador. [kleber.mejia@uleam.edu.ec](mailto:kleber.mejia@uleam.edu.ec)

<sup>3</sup> ✉ Presidente de la Comisión de Investigación, Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Extensión Pedernales, Ecuador. [felix.pastran@uleam.edu.ec](mailto:felix.pastran@uleam.edu.ec)

<sup>4</sup> Presidente de la Comisión Académica, Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Ecuador. [Jorgelm.mendoza@uleam.edu.ec](mailto:Jorgelm.mendoza@uleam.edu.ec)

## INTRODUCCIÓN

La principal limitante para la producción bovina lo constituye el desconocimiento de la composición química de los forrajes, originando una baja disponibilidad de buena calidad para la alimentación de los rebaños, sobre todo cuando los forrajes provienen de suelos de baja productividad (Guevara y Espinoza, 2012). Por ello, la digestibilidad de los alimentos puede ser estimada mediante métodos biológicos conocidos como técnicas *in vitro* que son realizados fuera del animal, pero simula el proceso de digestión; estas técnicas están basadas en la medición de residuos o productos de la fermentación y la medición de los residuos no fermentados que quedan posterior a la incubación de un alimento con líquido ruminal (Getachew et al., 2004).

Según Amagu (2015) la técnica de producción de gas ayuda a cuantificar mejor el uso de nutrientes y su precisión en la descripción de la digestibilidad en animales, mientras que la fermentación anaeróbica es un proceso que utiliza un grupo de microorganismos anaeróbicos para la estabilización de residuos y generación de gases. La eficiencia de la estabilización de residuos en el proceso está medida por la demanda de oxígeno o la reducción de los sólidos volátiles. Entre otros parámetros como temperatura, pH, etc, esta eficiencia depende de la tasa en la cual el microorganismo es generado en el sistema que a su vez depende de la velocidad en la que se utiliza el sustrato.

Es importante destacar que el estómago de los rumiantes está constituido por cuatro cavidades, el retículo (red o redcilla), el rumen (panza), el omaso (librillo) y el abomaso (cuajar) o estomago verdadero. El estómago puede llegar a ocupar hasta el 75 % de la cavidad abdominal y junto con su contenido representa alrededor del 30 % del peso vivo del animal (Wattiaux y Terry, 2015). Por lo que el uso de enzimas fibrolíticas exógenas promete un incremento en la utilización de los forrajes y mejoras en la eficacia productiva de los rumiantes (Beauchemin et al., 2003a).

Tomando en cuenta que el valor nutritivo de los alimentos destinados a la alimentación de los rumiantes depende del grado y extensión de su degradación a nivel ruminal. La degradabilidad constituye un parámetro altamente indicativo de las características fermentativas de los alimentos y sus nutrientes, por lo que los alimentos que ingieren los rumiantes se acumulan en el rumen, donde se

fraccionan por mecanismos físicos como la remasticación, degradados por microorganismos que existen en el rumen y luego de un periodo de residencia salen del rumen a través del orificio retículo omasal. Entender la dinámica de la cinética de la digestión ruminal y del paso de los alimentos a través del rumen puede ayudar a establecer estrategias de manejo de la alimentación de tal modo que se pueda mejorar la producción de los rumiantes (Rosero y Rendon, 2014).

Para comparar el valor nutritivo de los alimentos de acuerdo a las necesidades, en este caso de rumiantes, se analizó la manera de cubrir sus requerimientos por medio de la planificación de suplementos en momentos necesarios, ya que no todo el alimento que consume un animal es asimilado por su organismo; parte de él es eliminado por otros mecanismos, principalmente por heces (San Miguel, 2006), representando ésta la mayor pérdida nutricional en el proceso de utilización energética (digestión incompleta); (Rodríguez et al., 2007). La digestibilidad es la capacidad de un determinado principio inmediato (nutriente) de ser asimilado por un animal (San Miguel, 2006).

La técnica *in vitro* en la evaluación de alimentos para rumiantes ha ganado mayor aceptación debido a su fácil adopción, repetitividad, sobre esta técnica donde minimiza el uso de animales y se disminuye la evaluación *in vivo* de alimentos. A pesar de que estas técnicas son más rápidas y precisas, requieren menos sustrato que los procedimientos *in situ*, aún requieren un inóculo para crear el ambiente fermentativo (Aderinboye et al., 2016). Con todos estos antecedentes mencionados surgió la necesidad de realizar la siguiente investigación para mejorar la digestibilidad en heno de alfalfa, adicionando enzimas fibrolíticas exógenas (xilanasas) en la alimentación de bovinos. Ante ello, en la formulación del problema se plantea lo siguiente: ¿Con la aplicación de las enzimas fibrolíticas exógenas (xilanasas) al sustrato y el licor ruminal, mejorará la digestibilidad *in vitro* en heno de alfalfa?

El objetivo consistió en evaluar la digestibilidad *in vitro* en heno de alfalfa utilizando enzimas exógenas xilanasas para la alimentación de bovinos, así como se plantea determinar mediante análisis bromatológicos la composición química en el heno de alfalfa; determinar la digestibilidad *in vitro* en 24 y 48 horas aplicando enzimas fibrolíticas; y medir la producción de gas por la fermentación *in vitro* a las 3, 6, 12, 24, y 48 horas. El uso de enzimas fibrolíticas exógenas promete un incremento en la utilización de los forrajes y mejoras en

la eficacia productiva de los rumiantes (Beauchemin et al., 2003b). De acuerdo a los resultados de digestibilidad obtenidos por Yescas et al. (2004) la celulosa que contiene los pastos y gramíneas se digieren en mayor grado que otras fuentes de hemicelulosa, de enlazamiento entre la celulosa y la lignina.

Los rumiantes se caracterizan por degradar los carbohidratos estructurales del forraje, como celulosa, hemicelulosa y pectina, muy poco digestibles para las especies de estómago simple o no rumiantes. La degradación del alimento se realizó por la digestión fermentativa microbiana y no por acción de enzimas digestivas del animal; dicho proceso fermentativo lo realiza distintos tipos de microorganismos que el animal aloja en el retículo y rumen, donde hay un medio adecuado para el desarrollo de estos, los cuales realizan una simbiosis con el animal (Relling y Mattioli, 2003). Encontrándose principalmente bacterias, protozoarios, hongos y levaduras, los cuales se ubican en tres sitios diferentes en el rumen: concretamente adheridos a la pared celular, estos hidrolizan a la urea y consumen el poco oxígeno que llega con el alimento, asociados a partículas alimenticias y libres, flotando en el líquido ruminal (Van y Regueiro, 2008).

En el rumen el animal crea y mantiene las condiciones ideales para el desarrollo de los microorganismos, tales como, anaerobiosis, aporte de nutrientes, pH de 5.5 a 6.9, presión osmótica y temperatura de entre 38 y 42°C. Si el organismo no mantiene este pH favorece el desarrollo de otros microorganismos que pueden alterar el metabolismo del rumen y permitir el desarrollo equilibrado en el sistema del animal (Relling y Mattioli, 2003). Según Torres (2009) expone que el nombre xilanasas proviene de un polisacárido la cual ayuda al sustrato a la ruptura y digestibilidad de los enlaces xilosídicos, tanto en forrajes y pastos. El heteroxilano son las endoxilanasas quienes participan en el desdoblamiento de oligosacáridos y las  $\beta$ -xilosidasas, que degradan estos oligosacáridos a moléculas de xilosa existente en el forraje. El mismo autor manifiesta que la estructura química del xilano presente en la pared celular de plantas difiere grandemente dependiendo de su origen, pero todas ellas contienen un esqueleto de D-xilosa unidos entre sí por enlaces  $\beta$ -1.4, otras moléculas unidas a este esqueleto, dependiendo de la especie vegetal son arabinosa, galactosa, ácido ferúlico y ácido glucurónico.

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

El rumen degrada y fermenta los polisacáridos estructurales mediante la acción enzimática producida por los microorganismos, este proceso empieza con los más simples sustratos amorfos hemicelulosas y termina con los más complejos como es el caso de celulosa cristalina hasta obtener los azúcares reductores necesarios para la fuente de energía de las bacterias (glucosa, celobiosa, xilosa), por lo que es un complejo de cooperación entre los microorganismos y sus enzimas (Caja et al., 2003). Según Chesson y Forsberg (1997) 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 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  $\beta$ -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  $\beta$ -glucosidasas hidrolizan las cadenas cortas de celulosa y la celobiosa hasta glucosa (Beauchemin et al., 2003b).

Las principales enzimas involucradas en la degradación de los polímeros de xilanos, compuestos estos que son mayoritarios en la estructura de la hemicelulosa, hasta azúcares solubles, son las xilanasas y la  $\beta$ -1.4 xilosidasa. Las xilanasas incluyen endoxilanasas, las cuales las cuales degradan los xilanos hasta polímeros más cortos y la  $\beta$ -1.4-xilosidasas que degradan estos últimos polímeros hasta xilosa. Otras hemicelulasas involucradas en la digestión de las cadenas laterales de la hemicelulosa incluyen  $\beta$ -manosidasa,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\alpha$ -D-glucuronidasa,  $\alpha$ -D-galactosidasa, acetil xilano esterasas y ácido ferulico

esterasas (Bhat y Hazlewood, 2001). Sin embargo, las celulasas y hemicelulasas presentes en las enzimas comerciales difieren sustancialmente en su capacidad hidrolítica, y son estas diferencias en las concentraciones relativas y en las actividades individuales de estas enzimas las que determinan la eficacia de estos productos para degradar la pared celular (Beauchemin et al., 2003a).

Algunos de estos factores aumentan la capacidad hidrolítica del rumen, lo cual reduce indirectamente el llenado del rumen y aumentan el consumo voluntario (Adesogan, 2005). Las enzimas fibrolíticas exógenas pueden interactuar no solo con la digesta sino también con los microorganismos ruminales (Morgavi et al., 2000). Se ha demostrado que estos productos mejoran la colonización de las partículas del alimento por parte de los microorganismos ruminales, incrementando la tasa de degradación ruminal (Yang et al., 1999).

Según Morgavi et al. (2000) observaron que un producto enzimático derivado de *Trichoderma longibrachiatum* actuó sinérgicamente con las enzimas ruminales para liberar azúcares de la celulosa y de los xilanos contenidos en silajes de maíz, aumentando de esta forma la actividad hidrolítica en el rumen, pero Nsereko et al. (2000) exponen que en las vacas lactantes con niveles crecientes de una enzima comercial, observaron que al incrementar la dosis del producto aumento el número de bacterias viables en el rumen, principalmente de poblaciones fermentadoras de xilanos y de celobiosa. Estos últimos datos sugieren que las enzimas exógenas pueden mejorar la digestión, al menos en parte, por el incremento en el número de bacterias que utilizan hemicelulosa y productos secundarios de la digestión de la celulosa.

La determinación de la producción de gas *in vitro* es de valor para el nutricionista, ya que proporciona información sobre la cinética de fermentación del forraje consumido por los rumiantes, que depende de la velocidad de paso y la tasa de degradación (Mould et al., 2005). La tasa y el alcance de la fermentación del MS en el rumen son determinantes cruciales de los nutrientes utilizados por los rumiantes (Jancík et al., 2010). La relevancia de evaluar el valor nutricional del forraje contribuye de forma importante a la ingesta de proteínas y energía de los animales de pastoreo (Cline et al., 2010). Tradicionalmente, el valor energético del forraje consumido por el ganado de pastoreo se estima a partir de la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica o degradabilidad *in situ* de la materia orgánica obtenida después de 48 h de incubación en el rumen

(Waterman et al., 2007). Por ello, el método de producción *in vitro* de gas tiene numerosas ventajas sobre los métodos *in vitro*. Este método es menos dependiente de los animales, es más apropiado para caracterizar los alimentos en partículas solubles (France et al., 2005).

Esta técnica simula los procesos digestivos generados por la actividad microbiana ayudan a entender la fermentación y la degradabilidad del alimento en función de la calidad nutricional y la disponibilidad de nutrientes para las bacterias. La producción *in vitro* de gas ha sido ampliamente utilizada para estimar la calidad nutritiva de las pajas de cereales (Valizadeh et al., 2010) y se justifica en la comprensión de la cinética de la digestión para mejorar la digestibilidad en heno de alfalfa, adicionando enzimas fibrolíticas exógenas (xilanasas) en la alimentación de bovinos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del área en estudio

Se realizó en el laboratorio de Bromatología de la Universidad Técnica de Manabí ubicada en la Parroquia Lodana, Cantón Santa Ana, Provincia de Manabí Ecuador. El tiempo que duró la presente investigación fue alrededor de 1 mes.

### Metodología

La investigación es de tipo experimental aplicada; puesto que se registró, cuantificó, interpretó y se analizó la información recolectada de los tratamientos realizados. Los equipos utilizados fueron: equipo de Baño de María, bomba de vacío. Así como el de digestión de fibra, termómetro, tanque de CO<sub>2</sub>, estufa, desecador, horno de incineración (mufla), cocina de digestión, molino IKA MF 10 basic, balanza analítica, digestor de fibra (ANKOM 200), transductor de presión (PSI), vaso de precipitación, matraz, bolsas de nylon ANKOM (F57), crisol, pipeta, balones de digestión Kjendahl, aparato de destilación de Micro Kjendahl, bureta, Erlenmeyer, sellador de bolsa, matraces Erlenmeyer, frascos ambar de vidrio, matraz, matraces kitasato, tapones y tubos, mangueras, equipo de venoclasia, pinzas, pipeta y gasa.

La enzima fibrolíticas exógena utilizada fue la xilanasas (EC 3.2.1.4) del laboratorio comercial Dyadic Internacional Inc. (Jupiter, FL-USA). La actividad enzimática de la xilanasas se determinó usando xilano de madera (1 %) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO);

como sustrato puro, con 10 mg mL<sup>-1</sup> diluido en buffer fosfato-citrato 0.1 M con pH 6.6 a 39°C. Los resultados de la actividad enzimática para la xilanasas fueron 566 UI mL<sup>-1</sup>. Los niveles aplicados de enzimas fibrolíticas exógenas xilanasas fueron: 2000 UI kg<sup>-1</sup> MS, 4000 UI kg<sup>-1</sup> MS y 8000 UI kg<sup>-1</sup> MS. Comparado con un control (sin enzima), con UI = Unidades Internacionales =  $\mu\text{mol}$  de azúcares y reductores/min/ml. kgMS = kilogramo de materia seca de Heno de alfalfa. La enzima se diluyó 1:100, para ser aplicadas con una micropipeta en volúmenes que se describen a continuación, de acuerdo a las dosis evaluadas:

Cantidad aplicada por cada g MS<sup>-1</sup> del heno de alfalfa:

- Xilanasas (EC 3.2.1.4)
- Para tratamiento 1 = 2000 UI kg<sup>-1</sup> MS, se adiciona de enzima 0.5 ml de enzima + 1.5 ml de agua destilada en 0.5 g MS (por frasco).
- Para tratamiento 2 = 4000 UI kg<sup>-1</sup> MS, se adiciona de enzima 1 ml de enzima + 1 ml de agua destilada en 0.5 g MS (por frasco).
- Para tratamiento 3 = 8000 UI kg<sup>-1</sup> MS, se adiciona de enzima 2 ml de enzima + 0 ml de agua destilada en 0.5 g MS (por Frasco).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el efecto de la aplicación sobre la digestibilidad *in vitro* de materia seca (DIVMS) y producción de *gas in vitro* (PGIV), se evaluó mediante el diseño completamente al azar (DCA), donde el efecto de 04 tratamientos y 03 repeticiones, con diferentes dosis de enzimas exógenas (Xilanasas), en diferentes tiempos (24 y 48 horas). Para las comparaciones de media se utilizó la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). El análisis se realizó mediante el uso del PROC GLM (SAS Institute, 2001).

Obtenida la muestra del heno de alfalfa (HA) se realizó un muestreo manualmente para determinar las características organolépticas de olor, color, textura y grado de humedad del sustrato a utilizar, luego se procedió a pesar para poder llevar a cabo el desecado y molienda respectivamente. El HA se deshidrató durante 72 h a 60°C en una máquina deshidratadora casera, una vez terminado el proceso de desecado se retiraron las bandejas para proceder a pesar las muestras y poder determinar la humedad, luego a realizar la molienda usando un tamiz de 2 mm de diámetro con un molino de cuchillas de acero marca

Willy IKA MF 10 basic perteneciente al Departamento de Producción de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

El proceso de secado se manejó con cuidado debido que la temperatura fue de 60°C, caso contrario pudo producir efecto o reacción de Maillard. La muestra molida se colocó en frascos plásticos debidamente rotulados con fecha y característica de la misma, para ser llevado al laboratorio y realizar los análisis correspondientes.

Posteriormente se realizó el análisis bromatológico del heno de alfalfa para determinar el contenido de materia seca (MS), proteína cruda (PC), cenizas (Cz), extracto libre de nitrógeno (ELN), según la metodología de la AOAC (2005); Se determinó el contenido de Fibra Detergente Neutra (FDN %), Fibra Detergente Ácida (FDA %) en las instalaciones del laboratorio de la Universidad Técnica de Manabí - en la ciudad de Portoviejo. Cabe destacar que todas las técnicas utilizadas son acreditadas por AOAC (2005).

La proteína cruda se determinó mediante la técnica de micro-Kjeldahl que es un proceso de análisis químico para determinar el contenido en nitrógeno de una sustancia química y se engloba en la categoría de medios por digestión húmeda. El principal inconveniente de este método consiste en la posible valoración de nitrógeno no proteico (NNP), e incluso de sustancias tóxicas y sin ningún valor nutritivo.

La determinación de fibra detergente neutra o fibra total se obtuvo mediante la digestión de la pared celular vegetal con una solución detergente neutra durante 1 h a 100°C, para luego filtrarla y someterla al secado durante 12 h a 105°C, mientras que la fibra detergente ácida se determinó mediante la digestión de esta con una solución detergente ácida durante 1 h a 100°C, luego filtrada y secada a 12 h en una estufa a 105°C.

La determinación de la Energía Neta de lactancia se estimó usando ecuaciones de predicción con los valores de fibra detergente ácida (Robinson, 2005) y se realizó lo siguiente: se prepararon los tubos rotulándolos 0; 1; 2; 3; y 4 del mismo modo, se agregó 0; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; mg mL<sup>-1</sup> de solución Madre, en cada uno de los tubos respectivamente. Menos en el tubo 0 (Blanco), se agregó 2.0; 1.8; 1.6; 1.4; 1.2 mg mL<sup>-1</sup> de agua destilada a cada uno de los tubos y 3.0 de Dinitrilo Salicilico 3.5 (DNS) a cada uno de los tubos respectivamente. Luego de dejar reposar por tiempo de 5 minutos y se midió la observancia a una longitud de

onda de 440 nm en el espectrofotómetro.

Se preparó un Blanco Enzima con tubos, rotulándolos 1; 2; 3; se agregaron 1.0 ml de agua destilada a los tres tubos respectivamente, 0.9 ml de Buffer a los tres tubos, y se llevaron a incubación 39°C en baño maría por 10 minutos, se agregó 1 ml de enzima xilanasas para cronometrar el tiempo en intervalo de 10 segundos durante la aplicación de la enzima por repetición, luego se agitó sin retirarlos del baño maría a 39°C por 5 minutos y se aplicó 3ml (DNS) en intervalo de 10 segundos por repetición durante la aplicación. En ese sentido, a continuación, se presenta la Tabla 1 para observar el blanco enzima.

Tabla 1. Blanco Enzima.

Componentes	Tubos		
	1	2	3
Agua destilada (ml)	1.0	1.0	1.0
Buffer (ml)	0.9	0.9	0.9
Incubar a 39°C; tiempo (min)	10	10	10
Enzima xilanasas (ml)	0.1	0.1	0.1
Cronometrar cada 5 minuto la adición de enzimas y DNS (min)	5	5	5
Aplicación de ml DNS (ml)	3	3	3

La preparación del Blanco Sustrato, en tubos rotulándolos 1; 2; 3; del mismo modo posteriormente se agregó 1.0 ml Sustrato de xilano a los tres tubos respectivamente. Luego se agregó 0.9 ml de Buffer a los tres tubos y se llevaron incubación 39°C en baño María por 10 minutos. Se agregó 0.1 ml de agua destilada para cronometrar tiempo en intervalo de 10 segundos durante la aplicación de la enzima por repetición, luego se agitó sin retirarlos del baño María a 39°C por 5 minutos y se aplicaron 3 ml (DNS) en intervalo de 10 segundos por repetición durante la aplicación (Tabla 2).

Tabla 2. Blanco Sustrato.

Componentes	Tubos		
	1	2	3
Sustrato de xilano (10 mg ml <sup>-1</sup> ) (ml)	1.0	1.0	1.0
Buffer (ml)	0.9	0.9	0.9
Incubar a 39°C (min)	10	10	10
Agua destilada (en vez de enzima) (ml)	0.1	0.1	0.1
Cronometrar cada 5 minuto la adición de enzimas y DNS (min)	5	5	5
Aplicación de ml DNS (ml)	3	3	3

Seguidamente se prepararon los siguientes: (Sustrato + Enzima) y se procedió a preparar los tubos rotulándolos 1; 2; 3; del mismo modo posteriormente, agregar 1.0 ml Sustrato de xilano a los tres tubos

respectivamente. Se agregó 0.9 ml de Buffer a los tres tubos, fue trasladado a incubación 39°C en baño María por 10 minutos. Se agregó 0.1 ml de agua destilada, se cronometró tiempo en intervalo de 10 segundos durante la aplicación de la enzima (por repetición) luego se agitó sin retirarlos del baño María a 39°C por 5 minutos. Aplicación de 3ml (DNS) en intervalo de 10 segundo por repetición durante la aplicación (Tabla 3).

Tabla 3. Sustrato + Enzima.

Componentes	Tubos		
	1	2	3
Sustrato de xilano (10 mg ml <sup>-1</sup> ) (ml)	1.0	1.0	1.0
Buffer (ml)	0.9	0.9	0.9
Incubar a 39°C (min)	10	10	10
Enzima xilanasas (ml)	0.1	0.1	0.1
Cronometrar cada 5 minuto la adición de enzimas y DNS (Control de reacción) (min)	5	5	5
Aplicación de DNS (ml)	3	3	3

Una vez pesada la muestra (0.5 g) en viales de vidrio transparente rotulado, se aplicó la respectiva dosis de xilanasas con sus respectivos tratamientos enzimas diluidas directamente con una micropipeta una hora antes del proceso de llenado del medio de cultivo para el inicio de la fermentación microbiana anaeróbica. Los viales fueron colocados en una incubadora a 39°C para mantener una temperatura adecuada al momento del llenado. De otro lado, el licor ruminal se obtuvo de 2 bovinos fistulados que fueron mezclados y filtrados para eliminar los residuos presentes usando lienzo y gaza. El licor ruminal filtrado fue mezclado con saliva artificial (SA) en una proporción de 1/4 (100 mL de licor ruminal con 400 de SA), y a esta mezcla se la denomina "fluido ruminal".

Después se procedió a gasear con C<sub>0</sub>2 durante 10 a 20 minutos a una temperatura a 39°C. Concluido el gaseado, fue transferida al fluido ruminal a los viales de vidrio que contienen el sustrato (0.5 g de heno de alfalfa) más las enzimas aplicadas por tratamientos (xilanasas) en un volumen de 50 ml con un dosificador manual. Terminado el llenado nuevamente se procedió a gasear con C<sub>0</sub>2 por 10 segundos y a sellar los viales herméticamente. Se registró el tiempo de inicio del proceso de la fermentación, también se estableció la presión existente como el nivel cero con un transductor de presión para así calcular la producción de gas *in vitro* a los diferentes tiempos (3, 6, 12, 24 y 48 h).

La digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), se midió a las 24 y 48 horas de incubación y simultáneamente cuando se ejecutaba la digestibilidad

*in vitro* se midió la producción de gas a diferentes tiempos (3, 6, 12, 24 y 48 h) utilizando un transductor de presión (PSI) adaptado a una aguja n°23 (0.6 mm), modelo T443A y conectado a un dispositivo visual, los gases acumulados en la parte superior se retiraron con el uso de la jeringa hasta el momento en que la presión registrada en el lector alcanzó a ser cero. Los valores reportados fueron en mL g<sup>-1</sup> MS del sustrato, estimándose mediante la ecuación cuadrática (Mauricio et al., 1999). Este proceso se repitió en todos los frascos de cada caja y después de las lecturas fueron manualmente agitados y reubicados en la estufa. El volumen de gas = 0.18 + 3.697 x presión de gas (PSI) + 0.0824 (presión de gas) y los resultados se analizaron con la ayuda del programa estadístico Sas (2012). Donde se utilizó la prueba de significación de medias Tukey al 5 %.

En cuanto a la alfalfa fue manejada como forraje para el ganado debido a su alto contenido de nutrientes como es la fibra y proteína, pero su bajo porcentaje de digestibilidad de la pared celular y su alto contenido de lignina, pectina y proteínas (Hatfield et al., 2007). Los análisis bromatológicos evaluados fueron los siguientes valores, como son proteína cruda en base a mataría seca (PC), fibra detergente neutra en base a mataría seca (FDN), fibra detergente acida en base a mataría seca (FDA), ceniza (C).

En la evaluación bromatológica realizada al heno de alfalfa (*Medicago sativa* L.) obtuvo promedio de proteína cruda en base a la materia seca de 10.41 % con una desviación estándar de ± 1.90 y un coeficiente de variación de 0.20 %; Los valores promedio obtenidos de FDN y FDA en la presente investigación, fueron de 48.36 % ± 0.14 CV: 0.28 y 19.70 % ± 0.43 CV: 2.19 respectivamente y en cuanto a la ceniza se obtuvo 9.10 %; en investigaciones realizadas por (Arias et al., 2014) los resultados obtenidos de estos investigadores fueron superiores en PC 13.7 % ; FDN 58.87 %, FDA 44.03 %; Cenizas 8.1 % en la alimentación con heno de alfalfa y distintos niveles de suplementación con grano de maíz.

En lo que respecta a los parámetros obtenidos por el análisis de varianza en la digestibilidad *in vitro* en porcentaje de MS, se obtuvo diferencias significativas (p<0.05) entre los tratamientos, respecto a los resultados de la DIVMS durante las 24 h el mayor porcentaje obtenido fue el T2 38.87 a ± 4.01 notándose

una relación en tiempo de digestibilidad hasta las 48 horas con el 44.06 a ± 6.12 %, tanto el error estándar, como el coeficiente de variación y los rangos máximos y mínimos, así como el rango óptimo donde se pueden observar en la en lo que se refiere a la efectividad de DIVMS en el heno de alfalfa fue el T2 aplicando una dosis de 4000 UI kg<sup>-1</sup> MS, de acuerdo con García et al. (1987), en investigaciones similares reportaron mayor DGIV de 54.36 y 58.35 %.

En investigaciones reportadas por Lynn (2018) indican porcentajes superiores de digestibilidad *in vivo* a las 30 horas en el heno de alfalfa entre 70 a 80 % en la cual simula la digestión del rumen en ensayos *in vitro* en laboratorio bajo una fermentación anaeróbica. En alfalfa los rangos mayores DGIV en porcentaje en verde fueron de 79.5, en heno 71.7 y en ensilado 74.1 %. Ese mismo instituto reportó valores de digestibilidad en alfalfas de variedades normales en cuanto a calidad nutritiva de 79.6 y variedades de alta calidad nutritiva de 82.8 %, resultados por encima a la de esta investigación. En investigaciones similares por Shewmaker et al. (2009), reportaron que los datos obtenidos en heno de alfalfa reportaron rangos DG entre 70-80 % a las 30 horas y de 75-83 % a las 48 horas, datos muy similares a los encontrados en este trabajo.

En investigaciones realizadas por Bani et al. (2007), reportaron rangos de digestibilidad en cinco cultivares de alfalfa de 77.60 a 79.18 %. En otro estudio realizado por Tremblay et al. (2002), documentaron digestibilidades promedio de toda la prueba en tallos y hojas de alfalfa, (tallos) 45- 67 % y en hojas de 67-86 % de digestibilidad. En la Tabla 4 se muestra la producción de gas *in vitro* (PGIV) del heno de alfalfa en los tratamientos experimentales, registraron valores diferentes en los tiempos evaluados hasta las 48 horas (PGiv48), dando a conocer los resultados a las 3, 6, 12 y 24 horas, presentaron diferencias significativas entre los tratamientos estudiados en las distintas horas de incubación (P<0.05), con excepción a la hora 48 donde no hubo diferencia significativa entre tratamientos. La máxima producción de gas (total) en los tratamientos evaluados se registró en T2 208.00 a ± 10.64 y la más baja en T0 199.97 a ± 11.18. Los valores de la tasa fraccional de producción de gas fueron diferentes en T1 204.45 a ± 14.53 y T3 203.09 a ± 27.15 (P<0.05).

Tabla 4. PGIV % en heno de alfalfa.

Tratamientos	Hora 3	Hora 6	Hora 12	Hora 24	Hora 48
T0	17.31 ab ± 0.90	32.67 b ± 1.54	61.33 b ± 3.04	123.99 a ± 2.37	199.97 a ± 11.18
T1	15.17 b ± 0.97	32.47 b ± 2.38	63.03 b ± 2.98	123.05 a ± 9.28	204.45 a ± 14.53
T2	16.38 b ± 0.92	33.68 b ± 3.85	66.54 ab ± 2.46	133.85 a ± 4.66	208.00 a ± 10.64
T3	18.91 a ± 0.99	41.03 a ± 1.59	74.68 a ± 5.42	140.44 a ± 8.49	203.09 a ± 27.15
CV %	8.68	12.22	9.35	7.29	7.35
SEM	0.43	1.23	1.79	2.75	4.32

abc = promedio con letras distintas en la columna, difieren significativamente según la prueba de tukey ( $P < 0.05$ ); CV = coeficiente de variación; SEM = media Error estándar; T0 = UI kg<sup>-1</sup> MS; T1 = 2000 UI kg<sup>-1</sup> MS; T2 = 4000 UI kg<sup>-1</sup> MS; T3 = 8000 UI kg<sup>-1</sup> MS.

Según Beauchemin et al. (1995) observaron una efectiva respuesta a la cantidad de enzima utilizada para tratar HA en cubos en un estudio *in vivo* y mostró que un bajo nivel de enzima era más efectivo. Por otra parte, Nsereko et al. (2002) en investigaciones similares informaron que los niveles relativamente bajos de suplementos de enzimas aumentaron el número de ambos fibrolíticos y bacterias no fibrolíticas en el rumen y concluyeron que este efecto puede deberse a la liberación de polisacáridos que son utilizados por estas bacterias, sin embargo, el aumento de bacterias no fue evidente cuando se usaron altos niveles de suplementos de enzimas. El nivel de enzima no afectó la producción la PG a las (48 h) indicando el

nivel de enzima no incrementó el material fermentable total. Similares criterios se expresan en lo planteado por Colombatto et al. (2003) niveles de dos productos enzimáticos en producción de gas *in vitro* de AH (tallos y hojas) y concluyeron que los valores de PG finales no aumentaron por la adición de enzimas. En contraste, la adición de enzimas parece afectar adversamente la tasa de fermentación, como la fermentación fraccionada disminuyeron en las primeras horas notándose producción de gas menor, al transcurrir las horas evaluadas hubo un aumento de gas metano con los niveles más altos de enzima adicionada. Por tales motivos, a continuación, se presenta el PGIV mL g<sup>-1</sup> MS aplicando xilanasas en la Figura 1.

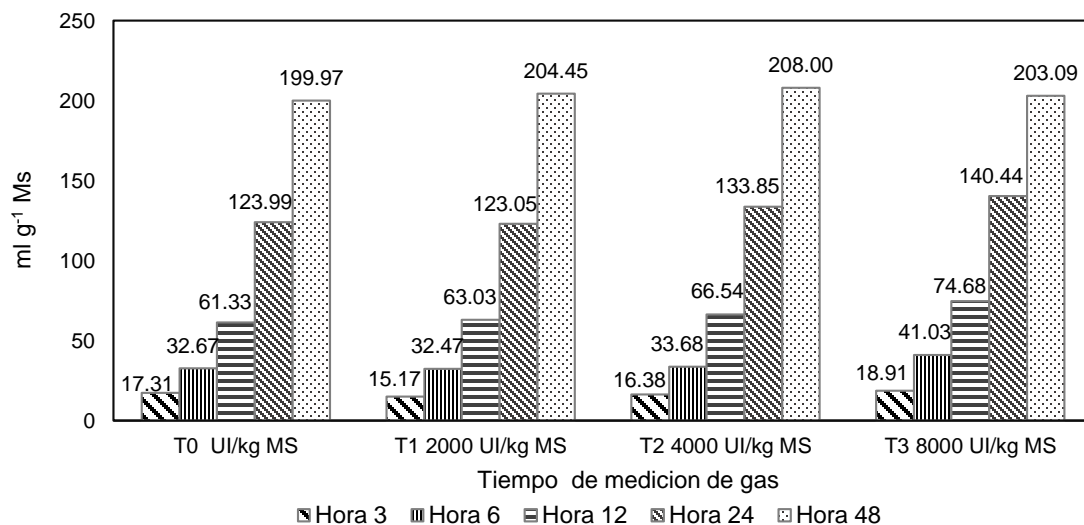


Figura 1. PGIV mL g<sup>-1</sup> MS aplicando xilanasas.

## CONCLUSIONES

La adición de enzima fibrolíticas, fue eficaz en mejorar la calidad de la fermentación forrajera gramínea con bajo valor nutricional, cuando se consideraron la calidad de la fermentación, composición química y las características propias del forraje en el rumen (*in vitro*), la aplicación de xilanasas dio como resultado un heno de alta calidad, con el mejor efecto sobre la DGIV con una dosis de 4000 UI kg<sup>-1</sup> MS (T2).

El mejor tiempo de incubación sobre la Producción de gas *in vitro* alcanzó un mayor volumen de gas a las 48 horas con 208.00 mL g<sup>-1</sup> MS (T2). Otro factor importante que determinó la eficacia del tratamiento enzimático de los forrajes fue el nivel de aplicación de enzimas donde se observó que los niveles altos de adición pueden ser menos efectivo que los niveles bajos. Así como, al aplicar una dosis de 4000 UI kg<sup>-1</sup> xilanasas mejoró la función microbiana del rumen ayudando a la digestión de la fibra con una mayor producción de gas *in vitro*



obteniendo un pasto de alta valor nutritivo para el animal.

Para determinar la digestibilidad *in vitro* adicionando enzimas exógenas que puedan ayudar a acelerar la digestibilidad de forraje, pastos y tener un mayor aprovechamiento de nutrientes a menor tiempo durante el periodo de digestibilidad. Asimismo, es necesario realizar investigaciones *in vivo* en la alimentación de rumiantes que conlleven a una mayor eficiencia en la utilización de forrajes con alto valor nutritivo que aporte los requerimientos necesarios de tal forma que contribuyan a cumplir los requerimientos esenciales en la alimentación bovina.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aderinboye, RY; Akinlolu, AO; Adeleke, MA; Najeem, GO; Ojo, VOA; Isah, OA; Babayemi, OJ. 2016. *In vitro* gas production and dry matter degradation of four browse leaves using cattle, sheep and goat inocula (en línea). Slovak Journal of Animal Science 1(49):32- 43. Consultado 11 feb. 2021. Disponible en <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=SK2016014250>
- Adesogan, A. 2005. Improving forage quality and animal performance with fibrolytic enzymes (en línea). University of Florida, 91-109. Consultado 21 mar. 2021. Disponible en <https://portal.nifa.usda.gov/web/crisprojectpage/s/0200918-improving-forage-quality-and-livestock-productivity-with-exogenous-fibrolytic-enzymes.html>
- Amagu, E. 2015. Kinetic Models for Anaerobic Fermentation Process-A Review (en línea). American Journal of Biochemistry and Biotechnology 3(11):132-148. Consultado 30 dic. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2015.132.148>
- Arias, R; Muro, C; Cordiviola, M; Cattáneo, A; Trigo, M; Lacchini, R. 2014. Efecto de la suplementación con grano de maíz sobre la digestibilidad *in vivo* de heno de alfalfa en caprinos. Rev. Fac. Agron 114 (1):44-48.
- Association of official agriculture chemist AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. Washington D.C.
- Bani, P; Minuti, A; Luraschi, A; Ligabue, M; Ruoizzi, F. 2007. Genetic and environmental influences on *in vitro* digestibility of alfalfa. Italian Journal of Animal Science, 251-253.
- Beauchemin, KA; Colombatto, DMD; Yang, WZ. 2003a. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. J Anim Sci (81):E37-E47.
- Beauchemin, KA; Colombatto, D; Morgavi, DP; Yang, WZ. 2003b. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. J Anim Sci (81):E37-E47.
- Beauchemin, KA; Rode, LM; Sewalt, VJH. 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. Can J Anim Sc (75):641-644.
- Bhat, MK; Hazlewood, GP. 2001. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. En G. P. MM Bedford (Ed.), Enzymes in Farm Animal Nutrition. pp. 11-35.
- Caja, G; Gonzales, E; Flores, C; Carro, MD; Albanell, E. 2003. Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: prebióticos, enzimas y asidos orgánicos. Madrid- España: XIX Curso de especialización FEDNA.
- Chesson, A; Forsberg, CW. 1997. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. En P. Hobson (Ed.). Chapman y Hall Ltd, Andover, UK.
- Cline, HJ; Neville, BW; Lardy, GP; Caton, JS. 2010. Influence of advancing season on dietary composition, intake, site of digestion and microbial efficiency in beef steers grazing a native range in western North Dakota. J. Anim. Sci 88(8):2812-2824.
- Colombatto, D; Hervás, G; Yang, WZ; Beauchemin, KA. 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.
- France, J; Lopez, S; Kebread, E; Bannink, A; Dhanoa, MS; Dijkstra, J. 2005. A general compartmental model for interpreting gas production profiles. Anim. Feed Sci. Technol. (123-124):473-485.
- García, B; García, A; Rico, M; García, S. 1987. Composición química y digestibilidad de alfalfa deshidratada destinada al comercio exterior (en línea). Consultado 12 feb. 2021. Disponible en <https://digital.csic.es/bitstream/10261/76158/1/Composici%C3%B3n%20qu%C3%ADmica%20y%20digestibilidad%20de%20alfalfa%20deshidratada%20destinada%20al%20comercio%20exterior.pdf>
- Getachew, G; DePeter, EJ; Robinson, PH. 2004. *In vitro* gas production provides effective method for assessing ruminant feeds. California Agriculture 1(58):54-58.
- Guevara, E; Espinoza, F. 2012. Nuevos materiales forrajeros para la producción de leche y carne en las sabanas de Venezuela. Instituto Nacional de

- Investigaciones Agrícolas (INIA) Anzoátegui - Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), 57-144.
- Hatfield, J; Broderick, A; Jenkins, D. 2007. Nutritional Chemistry of Forages. In Forages. (e. B. R.F. Barnes et al., Ed.) the Science of Grassland Agriculture.
- Jancík, F; Koukolova, V; Homolka, P. 2010. Ruminant degradability of dry matter and neutral detergent fibre of grass. *J. Anim. Sci* 359-371.
- Lynn, J. 2018. Understanding your forage analysis; Value ranges and definitions. Forage Production. Progressive Forage. Obtenido de Hay-Silage- Pasture.
- Mauricio, RM; Mould, FL; Dhanoa, MS; Owen, E; Channa, KS; Theodorou, MK. 1999. Asemi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol* (79):321-330.
- Morgavi, DP; Nsereko, VL; Rode, LM; Beauchemin, KA; McAllister, TA; Wang, Y. 2000. Effect of *Trichoderma* feed enzyme on growth and substrate degradation by *Fibrobacter succinogens* F85. *Reprod Nutr Dev*, 40:219.
- Mould, FL; Morgan, R; Kliem, KE; Krysstallidou, E. 2005. A review and simplification of the in vitro incubation medium. *Anim Feed Sci Technol*, 123-124 155-172.
- Nsereko, VL; Morgavi, DP; Beauchemin, KA; Rode, LM; Furtado, AF; McAllister, TA. 2000. Effects of feeding fungal feed enzyme preparation on the rumen microbial population. *Reprod Nutr Dev* (40):219-225.
- Nsereko, VL; Beauchemin, KA; Morgavi, DP; Rode, LM; Furtado, AF; McAllister, TA; Iwaasa, AD; Yang WZ; Wang, Y. 2002. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. *Can. J. Microbiol* (48):14-20.
- Relling, G; Mattioli, H. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias, Argentina.
- Robinson, PH. 2005. Estimating Alfalfa Hay and Corn Silage Energy Levels. Department of Animal Science, University of California, Davis, CA, USA, 1-6 (en línea). Consultado 11 mar. 2021. Disponible en <https://animalscience.ucdavis.edu/sites/g/files/dgvnsk446/files/inline-files/Web200601.pdf>
- Rodriguez, N; Simoes, E; Guimares, R. 2007. Uso de Indicadores para estimar consumo y digestibilidad de pasto (en línea). *Rev. Col. Cienc. Pec.* 2007 20(4). Consultado 12 mar. 2021. Disponible en <https://www.studocu.com/es-mx/document/instituto-tecnologico-de-ursulogalvan/fisiologia-animal/dialnet-uso-de-indicadores-para-estimar-consumo-y-digestibilidad-d-2544486/8196734>
- Rosero, R; Rendon, M. 2014. Cinética de degradación ruminal. *CES*, 21.
- San Miguel, AA. 2006. Fundamentos de alimentación y nutrición del ganado (en línea). Consultado 28 abr. 2019. Disponible en [http://www2.montes.upm.es/dptos/dsrn/sanmiguel/APUNTES\\_PRESENTACIONES/PASCICULTURA%20Y%20SAF/Nutrici%C3%B3n%20animal%20texto%202012.pdf](http://www2.montes.upm.es/dptos/dsrn/sanmiguel/APUNTES_PRESENTACIONES/PASCICULTURA%20Y%20SAF/Nutrici%C3%B3n%20animal%20texto%202012.pdf)
- Shewmaker, G; Chahine, M; Wilson, R. 2009. Parameters for good quality alfalfa. *EEUU*. pp. 6-10.
- Torres, A. 2009. Obtención de enzimas hidrolíticas a partir de una cepa del hongo *Aspergillus ficuum* mediante fermentación en medio sólido (en línea). Tesis Licenciatura, Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. Consultado 26 de may. 2020. Disponible en <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2009/fct693o/doc/fct693o.pdf>
- Tremblay, CF; Bélanger, G; McRae, KB; Michaud, R. 2002. Leaf and stem dry matter digestibility and ruminal undegradable proteins of alfalfa cultivars (en línea). *Can. J. Plant Sci* (82):383-393. Consultado 13 abr. 2020. Disponible en <https://cdnsiencepub.com/doi/10.4141/P01-122>
- Valizadeh, R; Sobhanirad, S; Mojtahedi, M. 2010. Chemical composition, ruminal degradability and in vitro gas production of wheat straw inoculated by *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *J. Anim. Vet. Adv.* 7(11):1506-1510.
- Van, L; Regueiro, M. 2008. Digestión en retículo-rumen. Facultad de Agronomía. Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay.
- Waterman, RC; Grings, EE; Geary, TW; Roberts, AJ; Alexander, LJ; MacNeil, MD. 2007. Influence of seasonal forage quality on glucose kinetics of young beef cows. *J. Anim. Sci.* (85):2582-2595.
- Wattiaux, MA; Terry, HW. 2015. Digestión en la vaca lechera. Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera. Universidad de Wisconsin-Madison.

Yang, WZ; Beauchemin, KA; Rode, LM. 1999. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* (82):391-403.

Yescas, R; Bárcena, R; Mendoza, G; González, S; Cobos, M; Ortega, M. 2004. In situ digestibility of corn stover or oat straw diets with fibrolytic enzymes. *Agrociencia* (38):23-31.

Artículo recibido en: 23 de julio 2021

Aceptado en: 19 de noviembre 2021