

11674



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**RESPUESTA PRODUCTIVA DE BECERROS HOLSTEIN
ALIMENTADOS CON ALFALFA DE DIFERENTE CALIDAD Y ENZIMAS
FIBROLITICAS EN LA ETAPA PRE Y POS DESTETE**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA
MAURICIO JAVIER FLORES BERNAL**

**TUTOR
DR. JOSE LUIS ROMANO MUÑOZ**

**COMITE TUTORAL
DR. FELIPE DE JESUS RUIZ LOPEZ
DR. EVERARDO GONZALEZ PADILLA**

AJUCHITLAN, COLON, QRO.

2005

m340621



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a emitir en calidad de responsable el contrato al
centro de mi trabajo responsable.

NOMBRE: _____

FECHA: _____

FIRMA:  _____

DEDICATORIA.

A mis padres.

Porque siempre han sido un ejemplo a seguir.

A mis hermanos.

Que me han apoyado en todo momento.

A Betty.

Con todo mi amor.

**Gracias por tanta paciencia, ayuda y
comprensión.**

AGRADECIMIENTOS.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de formar parte de ella.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme el apoyo y la confianza para realizar los estudios de maestría.

Al Centro Nacional de Investigación en Fisiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, por todas las facilidades ofrecidas para realizar el trabajo de tesis.

Al personal del Laboratorio de Nutrición Animal del CENID-Microbiología, por su gran apoyo en la determinación de AGV.

A la M. C. María de Jesús Guerrero de la Escuela de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Querétaro, por la valiosa ayuda en la medición de papilas ruminales.

Al Dr. Carlos Regalado y la M. C. Blanca García del Posgrado de Química de Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro, por la ayuda que me dieron para analizar las muestras.

A SAFMEX, división Saf Agri, por facilitarme el material para realizar el trabajo de investigación.

A los miembros del H. Jurado: Dr. José Luis Romano Muñoz, Dr. Felipe de Jesús Ruiz López, Dr. Everardo González Padilla, Dra. María Ofelia Mora Izaguirre y Dr. Francisco Castrejón Pineda por todas sus recomendaciones para mejorar este trabajo.

A mis maestros, que compartieron conmigo sus conocimientos.

A mis compañeros y amigos.

RESUMEN.

Para evaluar el efecto de la adición de enzimas fibrolíticas (EF) y alfalfa de diferente calidad en el alimento de iniciación de becerros Holstein en el periodo pre y pos destete sobre el comportamiento productivo, la digestibilidad aparente de la ración y la evolución ruminal, se realizó un experimento utilizando 36 becerros de 7 días de edad. Los animales fueron alimentados diariamente con 4 L de leche (LE) y alimento sólido (Iniciador (IN) + heno de alfalfa) a libertad. Los tratamientos fueron: A) LE-IN + alfalfa de alta calidad; B) LE-IN + alfalfa de alta calidad + EF; C) LE-IN + alfalfa de mediana calidad; D) LE-IN + alfalfa de mediana calidad + EF; E) LE-IN + alfalfa de baja calidad y F) LE-IN + alfalfa de baja calidad + EF. El experimento duró 105 días y el destete se realizó al día 60. Las variables medidas fueron: consumo de materia seca (CMS), ganancia de peso (GP), eficiencia alimenticia (EA), digestibilidad aparente (DA), ácidos grasos volátiles (AGV), tamaño de papilas ruminales, viscosidad del contenido digestivo y digestibilidad *in vitro* de la alfalfa. Los resultados se analizaron con un diseño de bloques al azar, con arreglo factorial 2X3 (enzima X alfalfa) donde la semana de entrada al experimento fue el bloque, las variables DA y AGV se analizaron como parcelas divididas y la digestibilidad *in vitro* con un diseño completamente al azar. El peso inicial (38.7 kg) fue semejante ($p>0.10$) entre tratamientos. La inclusión de EF mejoró ($p<0.05$) la GP (36.60 vs. 24.26 kg) y la EA (0.55 vs. 0.41) antes del destete. El CMS final tendió ($p<0.06$) a ser mayor (1.99 vs. 1.65 kg al día) en animales consumiendo EF. La calidad de la alfalfa no afectó la GP, el CMS y la EA final ($p>0.05$). La DA de la ración fue similar entre tratamientos ($p>0.05$) para materia seca, proteína cruda y fibra detergente neutro (76.94, 76.23 y 51.27%, respectivamente). La concentración de AGV (55% acético, 37% propiónico y 8% butírico), la longitud de papilas ruminales (1.925 y 0.632 mm, del saco ventral y dorsal respectivamente) el grosor de las mismas (0.246 mm en el saco ventral y 0.298 mm en el dorsal), y la viscosidad del contenido del rumen, abomaso e intestino (5.03, 3.98 y 4.73 centipoises, respectivamente) no fueron afectadas

($p > 0.05$) por los tratamientos. La digestibilidad *in vitro* de la alfalfa mejoró ($P < 0.05$) al incluir EF. El comportamiento productivo de los becerros a cuya dieta se le adicionó EF mejoró en el periodo de predestete al incrementar el consumo de la porción sólida de la dieta.

Palabras claves: Enzimas fibrolíticas, becerros, digestibilidad, desarrollo ruminal.

CONTENIDO.

	Pag.
Resumen	i
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido.	v
Lista de cuadros	vii
Lista de gráficas	viii
I. Introducción	1
II. Revisión de literatura.	3
Desarrollo del sistema digestivo	3
Actividad enzimática	5
Microorganismos del rumen	6
Papilas ruminales	8
Producción de AGV.	9
Utilización de concentrado y forraje	10
Destete.	11
Enzimas celulasas y xylanases	11
Enzimas exógenas	13
III. Hipótesis	15
IV. Objetivo general	15
V. Material y métodos	16
Ubicación	16
Animales experimentales	16

Tratamientos	16
Duración	17
Manejo y alimentación	17
Composición del alimento	18
Enzimas fibrolíticas	19
Digestibilidad aparente	20
Determinaciones de AGV en el líquido ruminal	21
Tamaño de papilas ruminales.	22
Viscosidad del contenido digestivo.	22
Digestibilidad <i>in vitro</i>	22
Análisis estadístico	24
VI. Resultados y discusión	27
Comportamiento productivo	27
Digestibilidad aparente de los nutrimentos	29
Concentración y proporciones de AGV en el líquido ruminal	30
Desarrollo del estómago y tamaño de papilas ruminales.	32
Reología del contenido digestivo	34
Digestibilidad <i>in vitro</i>	35
VII. Conclusiones	38
VIII. Referencias	39
IX. Apéndices	47

LISTA DE CUADROS.

	Pag.
Cuadro 1. Composición y análisis de las dietas (% en base seca)	18
Cuadro 2. Análisis de las fracciones de fibra de la alfalfa (base seca)	19
Cuadro 3. Comportamiento productivo de becerros alimentados con enzimas fibrolíticas en el alimento iniciador	28
Cuadro 4. Comportamiento productivo final de becerros alimentados con heno de alfalfa de diferente calidad en el alimento iniciador	29
Cuadro 5. Coeficientes de digestibilidad aparente de la ración de becerros	30
Cuadro 6. Concentración de AGV totales (mmol / L) y proporciones molares (moles/100moles) en el líquido ruminal	31
Cuadro 7. Tamaño de las papilas ruminales (mm) de becerros Holstein alimentados con enzimas fibrolíticas.	33
Cuadro 8. Tamaño de las papilas ruminales (mm) de becerros Holstein alimentados con alfalfa de diferente calidad	33
Cuadro 9. Viscosidad (centipoises) en el tubo digestivo de becerros Holstein alimentados con enzimas fibrolíticas.	33

LISTA DE GRAFICAS.

	Pag.
Gráfica 1. Evolución en el consumo de alimento sin enzimas (NE) y con enzimas fibrolíticas (EF)	27
Gráfica 2. Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca de la alfalfa sin adicionar (NE) o con adición de enzimas fibrolíticas (EF)	35
Gráfica 3. Digestibilidad <i>in vitro</i> de la alfalfa de buena (AB) y mala calidad (AM) sin enzimas (NE) o con enzimas fibrolíticas (EF) .	36

I. INTRODUCCION.

En la primera etapa de vida del los rumiantes, el rumen, retículo y omaso son fisiológicamente poco activos y el abomaso del becerro funciona de manera muy semejante a un animal no rumiante. En esta etapa, se necesita principalmente de una dieta líquida altamente digestible, hasta progresar a un punto donde el animal se convierte en un rumiante funcional y utiliza el rumen, el retículo y el omaso para digerir el forraje y otros alimentos (Sydney y Huber, 1988).

El sistema enzimático en el rumiante recién nacido se encuentra pobremente desarrollado y debido a estas limitaciones digestivas, los ingredientes utilizados en la formulación son críticos para permitir una adecuada digestión y un apropiado crecimiento y rendimiento (Heinrichs et al., 1995).

El suministro de concentrados y forraje es importante desde los primeros días de edad con el propósito de estimular el desarrollo del rumen-retículo, además de inducir una mejor ingestión de alimento al momento del destete. El proceso de destete dependerá de la rapidez con la que se haya desarrollado el rumen y el retículo, además de la facilidad con que fermenten los alimentos ingeridos (Quigly III et al., 1985).

Los componentes fibrosos de la dieta son digeridos por enzimas celulasas y xylanasas producidas por bacterias y protozoarios ruminales. Se ha sugerido que algunos hidratos de carbono estructurales, como celulosa y hemicelulosa, cuando no son digeridos, crean un ambiente viscoso en el tubo intestinal (Bedford et al., 1991), el cual puede interferir con la interacción de sustratos y enzimas, y con la movilidad de productos digestivos, resultando en una disminución potencial de la digestión y absorción. En los becerros en crecimiento temprano el rumen aún se encuentra inmaduro, y existe poca digestión ruminal de celulosa y de hemicelulosa (Anderson et al., 1987b), lo que puede afectar negativamente la digestión de otros compuestos de la ración (Officer, 2000).

La adición de enzimas en el alimento es comúnmente usada para mejorar el valor nutritivo en dietas para no rumiantes (Li et al., 1996; Marquardt et al., 1996).

Cowan et al. (1996) encontraron que la adición de enzimas en ingredientes alimenticios resulta en una mejor disponibilidad de energía, y que también puede mejorar la retención de nitrógeno al suministrarlo en dietas para pollos y lechones.

La adición de enzimas en el alimento de becerros puede mejorar la digestibilidad de los componentes fibrosos de la dieta, complementar la producción de las enzimas propias del becerro y ayudar a disminuir los efectos negativos que se presentan sobre el comportamiento productivo en el periodo de destete, mejorando el crecimiento y la conversión alimenticia.

La literatura relacionada con la utilización de enzimas exógenas para becerros en el periodo pre y pos destete es prácticamente nula; sin embargo, considerando el potencial efecto positivo sobre la digestibilidad del alimento sólido, se podría esperar que al adicionar enzimas fibrolíticas en el iniciador se mejorará el comportamiento productivo de animales recién destetados.

II. REVISION DE LITERATURA

DESARROLLO DEL SISTEMA DIGESTIVO.

El sistema digestivo del becerro recién nacido, al igual que en el rumiante adulto, se encuentra formado por cuatro compartimentos. El tamaño de los cuatro compartimentos cambia con la edad; en el neonato el rumen y retículo juntos representan prácticamente la mitad del volumen del abomaso, pero permanecen poco funcionales y solo el abomaso presenta actividad digestiva (Habel, 1982). Un aspecto sobresaliente es el hecho de que el abomaso es aproximadamente del mismo tamaño que los otros tres compartimentos, y una vez que se alcanza la madurez anatómica, estos representan un volumen por lo menos 10 veces mayor que el abomaso (Orskov y Ryle, 1990); de la capacidad total del estómago, el rumen representa cerca de 80%, el retículo el 5%, el omaso el 7% y el abomaso el 8% (Habel, 1982).

El rumen funcionalmente maduro ha sido definido por el desarrollo físico del órgano en relación con el crecimiento en tamaño, desarrollo muscular y epitelial, con el crecimiento de las papilas ruminales, además del aumento en la concentración ruminal de ácidos grasos volátiles como productos de la fermentación (Quigly III et al., 1985; Baldwin y Jesse, 1992).

El aporte de nutrimentos deriva inicialmente de la digestión gástrica e intestinal de ingredientes de elevada calidad, que es sustituido gradualmente por la digestión microbiana de materias vegetales de menor calidad. La producción y diversificación de enzimas se incrementa durante los tres primeros meses de vida (Sidney y Huber, 1988). La leche materna, en cantidades adecuadas, es la mejor fuente de nutrimentos para el rumiante joven, además de sus propiedades nutritivas, el calostro es el vehículo por medio del cual se confiere al recién nacido resistencia contra ciertas enfermedades infecciosas.

El alimento líquido ingerido por el becerro pasa directamente al abomaso por medio del cierre de la canaladura esofágica (Orskov, 1988). El alimento sólido pasa al rumen, donde se establecen bacterias y otros microorganismos que

convierten los alimentos fibrosos y amiláceos en ácidos grasos volátiles (Van Soest, 1982) que constituyen una forma de energía directamente utilizable por el animal, sintetizan vitaminas del grupo B y forman proteínas partiendo de compuestos nitrogenados más simples (Stevens y Hume, 1998).

La edad en la que se produce el cambio de la digestión a la forma de rumiante maduro depende estrechamente de la dieta utilizada (Klein, 1987). La velocidad con la que el rumen-retículo aumenta de tamaño puede ser influenciada por la alimentación, y el ritmo de desarrollo del rumen se encuentra muy relacionado con la actividad de los microorganismos ruminales (Quigly III et al., 1985; Anderson et al., 1987b; Klein et al., 1987).

El rumen del recién nacido es pequeño y flácido con papilas rudimentarias que le confieren a la mucosa una textura similar a la de papel de lija fina, el retículo es un pequeño saco elástico con un tamaño correspondiente a la tercera parte del rumen, el omaso es una pequeña estructura bulbosa conteniendo un cierto número de laminas con papilas cónicas y rudimentarias, distribuidas sobre la superficie y el abomaso aparece bien desarrollado al nacer y es altamente funcional con la presencia de pliegues característicos del individuo adulto (Habel, 1982).

Cuando el rumiante recién nacido tiene acceso a pastos de buena calidad a las cuatro semanas de edad el rumen habrá crecido hasta alcanzar 4-8 veces su peso al nacer, aunque sigue apareciendo como un saco elástico (Phillipson, 1981). Las papilas del rumen son mayores y más definidas (McGavin y Morrill, 1976b) y el consumo de forraje facilita el desarrollo de espacios entre las láminas del omaso. El abomaso aumenta de tamaño, de peso tisular y anchura de los pliegues abomasales. A las ocho semanas se duplica el peso corporal de los terneros, y durante este periodo tiene lugar la máxima rapidez de crecimiento en el rumen (Sidney y Huber, 1988) y alcanza las proporciones del individuo adulto con respecto a los restantes órganos digestivos y al peso corporal. Retículo y omaso aumentan de peso, con crecimiento muscular del omaso, aunque los cambios son escasos en el abomaso (Phillipson, 1981). Conforme el rumiante se desarrolla, el

peso total del tejido gástrico experimenta un incremento proporcional al aumento de peso corporal (Habel, 1982).

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

El becerro en sus primeros días de vida depende solamente de sus enzimas digestivas en ausencia de bacterias y protozoarios del rumen que le ayuden a aprovechar los nutrimentos del alimento (Longenbach y Heinrichs, 1998). La primera enzima que actúa sobre la digesta es la esterasa pregástrica (Jenkins et al., 1981), una lipasa secretada en la saliva en cantidades elevadas, y que puede ser importante al nacimiento para equilibrar la escasa secreción de lipasa pancreática, sin embargo es dudosa la importancia global de esta enzima debido a la eficaz digestión de la grasa en intestino delgado (Sidney y Huber, 1988). El pH óptimo de esta lipasa está entre 4.5 y 6.0 y su actividad disminuye con la edad, pero decreciendo más rápido en animales que consumen dietas ricas en forrajes (Jenkins et al., 1981).

Las enzimas proteolíticas pepsina y renina, son secretadas por glándulas fúndicas de la mucosa gástrica en forma de precursores inactivos. La actividad de la renina aumenta desde el nacimiento, y va descendiendo de las 2 a las 4 semanas siguientes, aumentando la actividad de la pepsina con la edad y con el consumo de alimento sólido o proteínas diferentes a la caseína (Guilloteau et al., 1994). Tras el destete, la pepsina es la principal enzima abomasal secretada en los terneros.

La leche una vez ingerida se coagula dentro del abomaso entre 1 y 10 minutos por acción de la renina y durante las 3 a 4 primeras horas que siguen a la toma de alimentos, el suero se desprende del coágulo y pasa al duodeno, junto con caseína parcialmente digerida (Longenbach y Heinrichs, 1998).

La secreción de ácido clorhídrico por las células parietales del abomaso es reducida al nacimiento, evitando la degradación de inmunoglobulinas ingeridas en el calostro, el número de células parietales es escaso y aumenta

aproximadamente 10 veces durante los primeros tres días de vida, descendiendo el pH abomasal (Roy, 1972).

Las secreciones intestinales del prerumiante son cualitativamente semejantes a las del rumiante adulto, aunque el animal prerumiante no puede digerir el almidón o los productos de degradación, como la maltosa, ya que la maltasa, producida en el intestino se encuentra en concentraciones muy bajas, pero a las 6-9 semanas aumenta su producción (Roy, 1972; Longenbach y Heinrichs, 1998). Los únicos carbohidratos útiles para los terneros muy jóvenes son la glucosa y la lactosa, la actividad intestinal de la lactasa es alta al nacimiento y va en descenso con la edad (Orskov y Ryle, 1990), aunque se puede mantener durante más tiempo en animales alimentados con leche que en los destetados.

Las secreciones pancreáticas de tripsina, enzima proteolítica, se mantienen relativamente constantes entre la primera y décima semana de edad, semejante a la quimotripsina; la ribonucleasa es abundante en prerumiantes. La secreción de amilasa pancreática aumenta a partir de la sexta semana (Longenbach y Heinrichs, 1998), conforme aumenta el consumo de alimento sólido.

MICROORGANISMOS DEL RUMEN

El rumen tiene dos funciones básicas, liberar energía a partir de carbohidratos estructurales que de otra forma no serían disponibles al animal, y captar nitrógeno no proteico de tal modo que pueda ser utilizado por el animal (Owens y Goetsch, 1988). Estas funciones son realizadas por los microorganismos ruminales, que consisten en bacterias, hongos y protozoarios, ya que los animales rumiantes no pueden por si mismos digerir el principal carbohidrato estructural de las plantas, la celulosa (Stevens y Hume, 1998). La digestión de esta celulosa se lleva a cabo a través de asociaciones entre animales rumiantes y microorganismos contenidos en su tracto digestivo (Van Soest, 1982). La microflora produce gran cantidad de enzimas, las cuales procesan el alimento consumido. La colonización de microorganismos en el tubo digestivo comienza en las primeras horas de vida, con los primeros contactos que realiza el animal con el ambiente y el alimento no

estéril, como la saliva de la madre, el bolo alimenticio, el estiércol, la cama y flora ambiental, el contacto con otros animales, la ubre y la leche, y otras fuentes alimenticias (Yokoyama y Johnson, 1988).

Tras la ingestión de calostro y/o leche, los lactobacilos son las principales bacterias que colonizan el tracto intestinal durante los inicios de la vida (Roy, 1972), el rumen contiene inicialmente un elevado número de bacterias aerobias, que van descendiendo considerablemente con el consumo de alimento sólido, posteriormente a las dos o tres semanas, el rumen dispone de bacterias características del adulto (Sidney y Huber, 1988), aunque en distintas proporciones. La población bacteriana del rumen es muy variada y va desde aquellas que digieren carbohidratos primarios (celulosa, hemicelulosa, pectina, almidón y azúcares), hasta aquellas que pueden incluir celulodextrinas, pentosa, glucosa, lactato, succinato, formato e hidrógeno en su metabolismo (Yokoyama y Johnson, 1988). La producción microbial característica del rumen es importante en términos del aporte de proteína que es utilizada por el animal huésped.

La colonización de protozoarios requiere la inoculación directa o el contacto con rumiantes adultos. El retraso en su establecimiento se debe principalmente a las características fuertemente ácidas por formación de ácido láctico al escaparse leche de la gotera esofágica (Roy, 1972). Con el consumo de alimento con menor capacidad para fermentar, como forrajes, y el aumento en la producción de saliva, el pH del rumen se torna más alcalino y entonces pueden establecerse los protozoarios, responsables de gran parte de la producción de amoníaco en el rumen normal, y por lo tanto, ecológicamente juegan el papel de suministradores de amoníaco a los géneros de bacterias que la utilizan (Van Soest, 1982) e ingieren y metabolizan grandes cantidades de bacterias y nitrógeno dietético.

Las bacterias y protozoarios que pasan del rumen al intestino delgado representan la mayor fuente de nitrógeno para el rumiante (Reece, 1997), además los microorganismos del rumen contienen cantidades significativas de lípidos, carbohidratos de almacenamiento y minerales. De la misma manera que el

contenido celular del forraje, el contenido de la célula microbiana, es completamente disponible para el animal (Orskov y Ryle, 1990).

Gracias al sinergismo, competitividad y gran diversidad de los microorganismos del rumen, éstos pueden ser adaptados a diversos alimentos, convirtiéndolos en sustratos de energía y proteínas útiles para el animal (Stevens y Hume, 1998). Muchos de esos alimentos son indigestibles para animales no rumiantes, de esta manera, los rumiantes representan una oportunidad para transformar ese tipo de alimentos en productos útiles para el humano.

PAPILAS RUMINALES.

El desarrollo normal de las papilas ruminales además de ser influenciado por los productos de la fermentación microbiana, es afectado en menor medida por una estimulación física provocada por el consumo de alimento sólido (Nocek et al., 1984). El crecimiento de las papilas ruminales fue mínimo en becerros alimentados únicamente con leche (Beharka et al., 1998), pero materiales voluminosos no fermentables (cerdas de nylon, virutas de madera, esponjas de plástico, etc.) no inician el desarrollo del epitelio, aunque provocan la expansión y crecimiento muscular del rumen y retículo (Tamate et al., 1962).

Beharka et al. (1998) concluyeron que el mayor tamaño de la partícula de la ración (6.4 vs. 1 mm) de becerros hasta las 10 semanas, tiene un efecto en el pH y en la población microbiana del rumen, además de que la forma física de la dieta afecta el desarrollo del omaso y el desarrollo papilar. En otro estudio se encontró que al incluir un 40 % de heno en la ración se tenía un mejor desarrollo y un mayor número de papilas ruminales por área de superficie, que en becerros alimentados únicamente con concentrado (Nocek et al., 1984). Además, se presentaron anomalías morfológicas del epitelio ruminal con mayor frecuencia en estos últimos.

El inicio de consumo de alimento sólido influye en el desarrollo morfológico del rumen, pero no estimula su desarrollo metabólico, en cambio incrementos en la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), la exposición temprana o periodos

de exposición prolongados de AGV pueden ser requeridos para el desarrollo metabólico del rumen (Sakata y Tamate, 1978; Sakata y Tamate, 1979; Lane et al., 2000).

El ritmo al que las papilas ruminales aumentan de tamaño depende en buena medida de la producción de AGV (principalmente butirato y propionato), que son productos finales de la fermentación anaeróbica de los carbohidratos en el rumen (Orskov, 1988). El hecho de que el desarrollo de las papilas ruminales dependa de la producción de AGV significa igualmente que los alimentos que ocasionan un alto ritmo de fermentación y una eliminación rápida de las partículas alimenticias digeribles, serán aquellos que favorezcan un desarrollo más acelerado del rumen, por el contrario, los alimentos que causen acumulación de partículas indigeribles propiciarán un desarrollo más lento y pueden dar lugar a una reducción en el consumo de alimento (Orskov, 1988).

PRODUCCION DE AGV.

La digestión de los carbohidratos realizada por los microorganismos del rumen determina la producción de AGV, que a su vez, proporcionan del 70 al 80 % de las necesidades calóricas totales del rumiante adulto, sin embargo el desarrollo del rumen del becerro en etapa temprana no se encuentra completamente avanzado para proporcionar AGV suficientes para satisfacer las necesidades de energía del animal, y depende en mayor magnitud de la glucosa (Fahey y Berger, 1988).

En general ácidos acético y butírico son las principales fuentes de energía (para oxidación), mientras que el ácido propiónico es reservado para gluconeogénesis (Van Soest, 1982).

Las concentraciones de AGV en el rumen se incrementan con el paso del tiempo, con niveles de butirato correspondientes a los adultos a las cuatro semanas, de propionato a las tres semanas y de acetato a las seis a siete semanas (Yokoyama y Johnson, 1988). Animales consumiendo únicamente leche muestran niveles significativamente menores de AGV hasta que reciben alimento sólido (Lane et al., 2000).

Las concentraciones de AGV en el rumen representan el equilibrio entre la tasa de producción y de absorción de cada ácido así como sus interconversiones, además la eliminación continua de estos mediante absorción en el retículo-rumen es importante para el mantenimiento de un pH estable (Owens y Goetsch, 1988).

Con dietas basadas en forrajes, los AGV proporcionan del 50 al 85 % de la energía metabolizable utilizada por los rumiantes (Van Soest, 1982), el propionato es el único AGV que ejerce una contribución neta a la síntesis de glucosa y es cuantitativamente el precursor más importante. Las proporciones de AGV en el rumen se mantienen estables generalmente próximas a 65:25:10 (acetato: propionato: butirato) con dietas basadas en forraje y 50:40:10 cuando las dietas son ricas en concentrados .

UTILIZACION DE CONCENTRADO Y FORRAJE.

La disponibilidad de alimento sólido desde edad temprana permitirá la adaptación a un consumo de tal forma que tengan una adecuada ingestión de alimento al momento del destete, además la calidad del forraje es más importante que la cantidad para los rumiantes jóvenes debido a que el consumo de alimento sólido será limitado (Heinrichs et al., 1995). Según se va desarrollando el rumen, disminuye la fracción de nutrimentos procedentes de la leche y aumenta la derivada de los alimentos sólidos, además de que existe una respuesta de incremento en la población de bacterias por aumento en el consumo de alimento iniciador (Quigly III et al., 1985).

Terneros alimentados únicamente con leche pueden persistir en una situación de prerumiantes durante un largo periodo de tiempo, sin que se aprecien los cambios en el desarrollo del sistema digestivo observados en animales que están consumiendo alimento sólido (Sidney y Huber, 1988).

DESTETE.

La facilidad con la que se lleve a cabo el destete dependerá de la rapidez con la que se haya desarrollado el retículo-rumen y de la capacidad con que fermenten los alimentos ingeridos (Anderson et al., 1987a). Cuando los terneros son destetados bruscamente pasando de una dieta líquida a otra sólida transcurren varias semanas antes de que la digestión en el rumen alcance niveles óptimos (Sidney y Huber, 1988). Cuando el becerro depende de una dieta sólida para su alimentación, la producción de proteína microbiana en el rumen aumenta y es mayor la proteína de la dieta que es metabolizada en este.

El manejo en el periodo de destete, como el cambio en la dieta, cambios en el medio ambiente por traslado de animales a otras instalaciones, y algunas veces que el forraje utilizado en este periodo no es el de más alta calidad, provocan una situación de estrés que puede causar una baja en la actividad de enzimas pancreáticas (Lindemann et al., 1986; Inbarr et al., 1993). La reducción de enzimas digestivas en este periodo puede propiciar una depresión en el crecimiento o desórdenes digestivos debido a la mala digestión del alimento (Lindemann et al., 1986); durante el periodo posterior al destete, se puede observar una baja en el consumo de materia seca y un descenso en el comportamiento productivo. También el estado de estrés puede influir en la adaptación ruminal (Fluharty et al., 1994), pudiendo reducir levemente la digestión de la fibra al disminuir la concentración de bacterias celulolíticas ruminales y la concentración de protozoarios.

ENZIMAS CELULASAS Y XYLANASAS.

Las enzimas se definen como proteínas especializadas que catalizan reacciones biológicas, no modifican el sentido de los equilibrios químicos, sino que aceleran su velocidad sin consumirse en la reacción, ello hace posible que en condiciones fisiológicas tengan lugar reacciones que sin catalizador requerirían condiciones extremas de presión, temperatura o pH (Lehninger et al., 1993), y una

característica importante es su elevada especificidad, sobre el sustrato o un grupo muy reducido de ellos y sobre la reacción a catalizar.

Las celulasas y xilanasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos β -1,4 presentes en los polisacáridos celulosa y hemicelulosa, respectivamente (Frumholtz, 2001). Las celulasas incluyen tres actividades diferentes, que a su vez existen en una multiplicidad de formas para llevar a cabo la hidrólisis total de la celulosa: las endo- β -1,4-glucanasas (E.C. 3.2.1.4) rompen al azar los enlaces internos de la molécula en las regiones amorfas, producen un rápido decremento en la longitud de la cadena y un lento incremento de los grupos reductores libres; las exo- β -1,4-glucanasas (E.C. 3.2.1.91) remueven unidades de glucosa o celobiosa a partir del extremo libre no reductor de la cadena de celulosa, dando como resultado un incremento rápido en los azúcares o grupos reductores y poco cambio en el tamaño del polímero; y finalmente la β -glucosidasa (E.C. 3.2.1.21) hidroliza la celobiosa producida por las actividades anteriores, dando como producto final la glucosa (Fondevila, 1998). Las xilanas son heteropolisacáridos y su degradación total para producir xilosa y/o arabinosa es llevada a cabo por un grupo de enzimas que participan sinérgicamente. Las más conocidas son las endo- β -D-xilanasas (E.C. 3.2.1.8) que rompen al azar los enlaces glicosídicos de la cadena principal de la molécula; la arabinofuranosidasa (E.C. 3.2.1.55) hidroliza las cadenas laterales de arabinosa; las acetil xilan esterasas (E.C. 3.1.1.72) liberan grupos acetatos; la glucuronidasa (E.C. 3.2.1.139) remueve las cadenas laterales de ácido glucurónico a partir de unidades de xilosa; las β -xilosidasas (E.C. 3.2.1.37) son enzimas activas sobre oligosacáridos cortos, llevando a cabo la hidrólisis de los enlaces β -1,4-aril-xilopiranosido produciendo xilosa (Ponce-Noyola y Pérez-Avalos, 1996).

ENZIMAS EXOGENAS.

Algunas enzimas empezaron a usarse en las industrias de lavandería, textil y de la pulpa y papel. En la industria textil las celulasas juegan un papel muy importante en el desteñido de mezclilla. Enzimas como las xylanasa y las celulasas, también se usan en la industria alimentaria en la clarificación de jugos y vinos, licuefacción de mucílago de café; extracción de saborizantes y pigmentos, aceites de plantas y semillas; maceración de materia vegetal; acondicionamiento de piensos para aves y cerdos y en la industria de la panificación (Ponce-Noyola y Pérez-Avalos, 1996). En la industria de la panificación, las xilanasas, especialmente la endo-1,4- β -xilanasas, se adicionan a la masa para mejorar su calidad, obteniéndose productos de panadería con mejor textura y sabor (Fondevila., 1998).

La incorporación de enzimas en el alimento es comúnmente usada para mejorar el valor nutritivo del alimento para no rumiantes (Li et al., 1996; Marquardt et al., 1996) particularmente para dietas en pollos. Cowan et al. (1996) encontraron que la adición de enzimas en ingredientes alimenticios resulta en una mejor disponibilidad de energía, y que también puede mejorar la retención de nitrógeno al suministrarlas en dietas para pollos y lechones. Desde hace muchos años se han realizado algunos estudios para valorar la utilidad de enzimas en bovinos, pero con resultados inconstantes (Burroughs et al., 1960; Leatherwood et al., 1960; Wallegghem et al., 1964; Rust et al., 1965), posiblemente debido a varios factores incluyendo la composición de la dieta, el tipo de preparación enzimática, la cantidad de enzima, la estabilidad de la enzima, el método de aplicación y el estado fisiológico del animal (Yang et al., 1999; Hristov et al., 2000).

Recientemente se han realizado varios experimentos adicionando enzimas fibrolíticas en el alimento de bovinos lecheros (Beauchemin et al., 1999b; Lewis et al., 1999), encontrando que al incluir una preparación enzimática de celulasa y xilanasas, se puede mejorar la digestibilidad del alimento y la producción de leche en vacas en lactación temprana y media, sin tener cambios en el consumo de alimento.

Los componentes fibrosos de la dieta que pueden dificultar la digestión de proteína y de carbohidratos solubles, son digeridos por enzimas celulasas y xylanases producidas por bacterias y protozoarios ruminales. Bedford et al. (1991) han sugerido que algunos carbohidratos estructurales, tales como celulosa y hemicelulosa, que no son digeridos en el rumen, crean un ambiente viscoso en el tubo intestinal, el cual interfiere con la interacción de sustratos, enzimas, y productos digestivos, resultando en una disminución de la digestión. En los becerros al momento del destete, el rumen aún se encuentra inmaduro y existe poca digestión ruminal de celulosa y de hemicelulosa, lo que disminuye la digestión de otros compuestos.

Al incluir enzimas fibrolíticas en el alimento iniciador se puede ayudar a reducir la viscosidad en el tubo digestivo al incrementar la digestibilidad de los componentes fibrosos de la dieta, mejorando el comportamiento productivo de los becerros en etapas tempranas.

III. HIPOTESIS.

La adición de una mezcla de enzimas fibrolíticas que faciliten la digestión del forraje incluido en el alimento de animales rumiantes jóvenes, puede ayudar a mejorar la ganancia de peso, la eficiencia alimenticia y el desarrollo ruminal en el periodo pre y posdestete.

IV. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto de la adición de un complejo de enzimas fibrolíticas y la inclusión de alfalfa de diferente calidad en el alimento de iniciación de becerros Holstein en el periodo pre y posdestete.

Objetivos Específicos.

Evaluar el uso de enzimas fibrolíticas sobre el comportamiento productivo de becerros Holstein alimentados con una dieta a partir de granos y heno de alfalfa de diferente calidad.

Evaluar su efecto en la digestibilidad aparente de la ración, parámetros de evolución ruminal y en la viscosidad del contenido digestivo.

Evaluar el efecto de la adición de enzimas fibrolíticas sobre la digestibilidad *in vitro* de la alfalfa utilizada en el alimento iniciador.

V. MATERIAL Y METODOS.

UBICACION.

El trabajo se realizó en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación en Fisiología Animal del INIFAP (CENIFA), ubicado en Ajuchitlán, municipio de Colón, Gro., con clima semidesértico y lluvias en verano, temperatura media anual de 15 °C y una precipitación pluvial anual de 450 a 630 mm (Síntesis Geográfica, 1986). Las muestras recolectadas se analizaron en los laboratorios de Nutrición del CENIFA y CENID-Microbiología en Palo Alto, D. F., en el laboratorio de Histopatología de la Escuela de Veterinaria y en el Postgrado de Química de Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro.

ANIMALES EXPERIMENTALES.

Se utilizaron 36 becerros Holstein de aproximadamente 3 a 7 días de edad previamente alimentados con calostro y provenientes de un mismo establo. Los becerros se recibieron en grupos semanalmente, dependiendo del número de nacimientos en el establo y a su llegada fueron alojados en becerreras individuales con piso de cemento, con comedero y bebedero de cubeta. Los animales se distribuyeron al azar a los tratamientos experimentales

TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES.

- A. Leche entera de vaca + iniciador + heno de alfalfa baja en fibra (AB-NE).
- B. Leche entera de vaca + iniciador + heno de alfalfa baja en fibra + enzimas fibrolíticas (AB-EF).
- C. Leche entera de vaca + iniciador + heno de alfalfa regular en fibra (AR-NE).
- D. Leche entera de vaca + iniciador + heno de alfalfa regular en fibra + enzimas fibrolíticas (AR-EF).
- E. Leche entera de vaca + iniciador + heno de alfalfa alta en fibra (AM-NE).
- F. Leche entera de vaca + iniciador + heno de alfalfa alta en fibra + enzimas fibrolíticas (AM-EF).

DURACION.

El experimento tuvo una duración de 105 días.

MANEJO Y ALIMENTACION.

Los becerros fueron alimentados con 4 litros de leche al día dividida en dos tomas (0800 y 1800 h) y esta fue ofrecida en biberón de plástico. Se les proporcionó el alimento sólido (según el tratamiento) a libertad y diariamente se ofreció alimento nuevo y se midió la cantidad ofrecida y rechazada para evaluar el consumo. El destete se realizó a los 60 días y a partir de este se les proporcionó únicamente el alimento sólido, de acuerdo al tratamiento correspondiente durante 45 días. El pesaje de los animales se realizó al inicio del experimento y a partir de este cada 15 días (antes de ofrecer alimento).

Se realizaron dos periodos de muestreo para evaluar la digestibilidad aparente de los nutrimentos, uno anterior a la fecha de destete (del día 41 al 50) y otro posterior a la misma (del día 91 al 100). Para evaluar la concentración de AGV en el líquido ruminal se llevaron a cabo tres periodos de recolección de muestra, dos de ellos antes del destete (del día 25 al 26 y del 55 al 56) y el otro después del destete (del día 85 al 86), en los tres periodos el muestreo se realizó a las 0800, 1100 y 1400 h. El manejo alimenticio en los periodos de muestreo fue semejante al descrito anteriormente.

Al final del día 105 se seleccionaron al azar la mitad de los animales por tratamiento para ser sacrificados y obtener muestras de tejido ruminal y determinar tamaño de las papilas ruminales. Se registró el peso del rumen-retículo, omaso y abomaso juntos y con contenido digestivo, y posteriormente se determinó el peso de cada uno de los compartimientos vacíos. Se recolectaron muestras de contenido digestivo del rumen, abomaso e intestino delgado para medir viscosidad.

COMPOSICION DEL ALIMENTO.

Para la elaboración de las dietas se utilizó un alimento comercial (APIBECERRAS 18% ULTRA, api-aba®, presentado en forma de comprimidos y grano rolado), al cual se le añadió heno de alfalfa en una proporción de 15% del alimento sólido en base seca (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición y análisis de las dietas (% en base seca).

Ingrediente	Tratamiento					
	AB-NE	AB-EF	AR-NE	AR-EF	AM-NE	AM-EF
Alimento iniciador *	85	85	82.80	82.80	84.30	84.30
Alfalfa	15	15	15	15	15	15
Pasta de Soya	--	--	2.20	2.20	0.70	0.70
Análisis						
Materia seca	89.76	89.76	89.64	89.64	89.36	89.36
Proteína cruda	19.67	19.67	19.68	19.68	19.68	19.68
Cenizas	6.95	6.95	7.09	7.09	7.23	7.23
Fibra detergente neutro	17.75	17.75	18.39	18.39	19.44	19.44
Fibra detergente ácido	9.49	9.49	10.34	10.34	10.83	10.83

AB alimento con alfalfa de buena calidad; AR alimento con alfalfa de regular calidad; AM alimento con alfalfa de mala calidad; NE sin enzima; EF con enzima.

* Alimento iniciador comercial APIBECERRAS 18% ULTRA, api-aba®.

Elaborado con: Maíz rolado, Avena, Pasta de soya, Sorgo, Gluten de maíz, Cebada, Suero de leche, Salvado de trigo, Pasta de canola, Pasta de linaza, Melaza y Premezcla mineral.

Se agregó pasta de soya a la ración para obtener dietas similares en el contenido de proteína. Para la inclusión de la alfalfa en los tratamientos se consideró su calidad de acuerdo con su contenido de fibra (Cuadro 2), la alfalfa de buena calidad fue la de menor contenido de fibra, la alfalfa de intermedia calidad la de contenido medio y alfalfa de mala calidad la de mayor contenido de fibra. Contrario a lo esperado, el contenido de proteína de la alfalfa intermedia fue el menor, razón por la cual se le adicionó más pasta de soya.

Cuadro 2. Análisis de las fracciones de fibra de la alfalfa (% base seca).

	Alfalfa		
	Buena	Regular	Mala
Materia seca	93.79	92.96	91.13
Fibra detergente neutro	33.80	38.21	45.12
Fibra detergente ácido	25.45	30.62	34.28
Proteína Cruda	21.20	16.75	18.60

ENZIMAS FIBROLITICAS.

El complejo de enzimas se agregó diariamente en el alimento sólido, a razón de 13 gr/animal/día, mezclándolo en forma individual y aceptando un rechazo de alimento del 5%. Las enzimas utilizadas en el experimento fueron un compuesto enzimático con actividad celulolítica y hemicelulolítica (endocelulasa, celobiohidrolasa, y β -glucosidasa), producidas por cepas de *Trichoderma longibrachiatum* (SAFIZYM® FP 800, Saf Agri Lesaffre).

DIGESTIBILIDAD APARENTE.

Para estimar la digestibilidad aparente de los nutrimentos se utilizó óxido de cromo (Cr_2O_3) como marcador externo. Cada becerro recibió 2 g/día de Cr_2O_3 divididos en dos cápsulas de gelatina, las cuales fueron administradas a las 0730 y 1730 h durante 10 días de cada periodo. Los primeros 5 días se utilizaron para saturar de Cr_2O_3 el tracto gastrointestinal y durante los últimos 5 días se recolectaron tres muestras de heces diarias para determinar la digestibilidad aparente de los nutrimentos.

Las muestras de heces fueron secadas en el horno de aire forzado a 55 °C durante 72 h y todas las muestras de heces y alimento se molieron en un molino Willey con criba de 2 mm. Se realizaron muestras compuestas de heces de cada animal por periodo y se analizaron para la determinación de materia seca, proteína cruda (Tejada, 1992), fracciones de fibra (Goering y Van Soest, 1985) y Cr_2O_3 en heces (Fenton y Fenton, 1979) utilizando un espectrofotómetro (GBC UV / VIS 920) a 400 nm de longitud de onda. Los coeficientes de digestibilidad aparente de la materia seca (MS), proteína (PC) y fibra detergente neutro (FDN) se calcularon por medio de la formula propuesta por Merchen (1988):

$$\text{CDMS} = 100 - \left(100 \times \frac{\% \text{ m en la MS del A}}{\% \text{ m en la MS de H}} \right)$$

Donde:

CDMS= Coeficiente de digestibilidad de la materia seca

m = Marcador (Cr_2O_3)

A = Alimento

H = Heces

Para la digestibilidad de una fracción específica la fórmula es:

$$\text{CDN} = 100 - \left(100 \times \frac{\% \text{ m en A} \quad \% \text{ N en H}}{\% \text{ m en H} \quad \% \text{ N en A}} \right)$$

Donde:

CDN = Coeficiente de digestibilidad del nutrimento

N = Nutrimento

DETERMINACIONES DE AGV EN EL LIQUIDO RUMINAL.

El líquido ruminal se colectó los días 25-26, 55-56, y 85-86 del experimento a las 0800, 1100 y 1400 h por medio de una sonda esofágica (Raun y Burroughs, 1962). Inmediatamente a la extracción, las muestras se filtraron a través de 4 capas de gasa y se procedió a centrifugar por duplicado 5 ml de líquido ruminal más 0.5 ml de una solución 2:1 v/v de ácido ortofosfórico al 85% y ácido fórmico al 25% durante 45 minutos a 3400 g utilizando una centrífuga refrigerada. El sobrenadante se separó y se congeló a -15 °C para el posterior análisis.

Para la determinación de AGV en el líquido ruminal se tomó 1 ml de la muestra descongelada a la cual se le agregó un microlitro de acetona (como estándar interno) y se leyó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard mod. 5840-A con detector de flama, con una columna Free Faty Acid Phase de 6 pies y N₂ como acarreador (Tejada, 1992).

TAMAÑO DE PAPILAS RUMINALES.

Al final del experimento, se sacrificaron 3 animales por tratamiento mediante pistola de émbolo y se obtuvieron muestras de tejido ruminal por medio de disección (McGavin y Morrill, 1976a). Se realizaron cortes histológicos de aproximadamente 2 cm² de la pared ruminal de los sacos dorsal y ventral, y se colocaron en recipientes con formol al 10% para detener la autólisis *post mortem*. Posteriormente las muestras se deshidrataron y fueron embebidas en parafina para teñirlas por medio de hematoxilina-eosina (Apéndice 1) y fijarlas en laminillas. Los cortes fueron observados al microscopio (Obj. 10X) y se realizaron las mediciones de longitud y grosor de 10 papilas ruminales por muestra procesada.

VISCOSIDAD DEL CONTENIDO DIGESTIVO.

Para determinar la viscosidad del contenido digestivo, se recolectaron muestras del rumen, del abomaso y del intestino delgado al momento del sacrificio. Las muestras se colocaron en recipientes en donde se les agregó ácido clorhídrico 0.2N y fueron congeladas a -15 °C hasta su posterior análisis. Al momento de su análisis las muestras se descongelaron y se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos y se determinó la viscosidad del sobrenadante a 39 °C (Yang et al, 1999) utilizando un reómetro rotacional modelo Rotovisco (marca Haake, Alemania).

DIGESTIBILIDAD *IN VITRO*.

Para determinar la digestibilidad *in vitro* de la fuente de fibra se utilizó la alfalfa de buena calidad y la de mala calidad, con o sin la adición de enzimas fibrolíticas. Las muestras fueron colocadas en un incubador DaisyII^{200/220} *in vitro* (Ankom Technology, Fairport, N. Y.) y se incubaron a diferentes horas (0, 6, 12, 18, 24, 36 y 48 h) dentro de contenedores con 400 ml de líquido ruminal proveniente de 2 vacas Holstein con cánula ruminal y 1600 ml de solución amortiguadora previamente preparada (Apéndice 2). Al término del tiempo de incubación las muestras se congelaron a -4 °C y posteriormente se procesaron en un analizador de fibra Ankom^{200/220} siguiendo el procedimiento para determinar FDN (Goering y Van

Soest, 1985). Las formulas utilizadas para calcular la digestibilidad *in vitro* se muestran a continuación:

$$\% \text{IVTD} = 100 - \{ [W_3 - (W_1 \times C_1)] \times 100 / W_2 \}$$

$$\% \text{IVTD}_{\text{MS}} = 100 - \{ [W_3 - (W_1 \times C_1)] \times 100 / [W_2 \times \text{MS}] \}$$

Donde: IVTD = digestibilidad verdadera *in vitro*
W₁ = peso de la bolsa
W₂ = peso de la muestra
W₃ = peso de la muestra al final del proceso de FDN
C₁ = corrección de blanco (peso de bolsa blanco final / peso de la bolsa blanco inicial)
MS = % de materia seca

VARIABLES DE RESPUESTA.

- a. Consumo de materia seca (CMS).
- b. Ganancia de peso (GP).
- c. Eficiencia de utilización de alimento (EA).
- d. Concentración de AGV en el líquido ruminal.
- e. Digestibilidad aparente de los componentes del alimento (DA).
- f. Digestibilidad *in vitro* de la fuente de fibra.
- g. Pesaje del estómago completo y por compartimentos.
- h. Medición de longitud (LP) y grosor de papilas (GP) ruminales.
- i. Viscosidad del contenido del rumen, abomaso e intestino delgado.

ANALISIS ESTADISTICO.

Las variables de respuesta CMS, GP, EA, pesaje de los compartimentos digestivos, tamaño de papilas ruminales y viscosidad del contenido digestivo fueron sujetas a un análisis de varianza para un diseño de bloques al azar con arreglo factorial 2 X 3 (dos niveles de inclusión de enzimas fibrolíticas y tres calidades de heno de alfalfa), donde la semana de entrada de los becerros al experimento fue el bloque. Para dichos análisis se utilizó el paquete Statistical Analysis System (1988).

Modelo estadístico.

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + E_j + F_k + EF_{jk} + \varepsilon_{(ijk)l}$$

donde:

Y = respuesta a la variable para el l -ésimo animal con el j -ésimo nivel de enzima, con la k -ésima calidad de alfalfa dentro del i -ésimo bloque.

μ = media general.

B_i = efecto del i -ésimo bloque.

E_j = efecto del j -ésimo nivel de enzima.

F_k = efecto de la k -ésima calidad de alfalfa.

EF_{jk} = efecto de la interacción entre el j -ésimo nivel de enzima y la k -ésima calidad de alfalfa.

$\varepsilon_{(ijk)l}$ = error experimental.

Las medidas a través del tiempo de variables como AGV y DA fueron analizadas con un modelo para parcelas divididas, donde el error para la parcela grande fue animal (bloque X enzima X alfalfa) y el término error para la parcela chica fue el error experimental.

Modelo estadístico.

$$Y_{ijklmn} = \mu + B_i + E_j + F_k + EF_{jk} + A(BEF_{ijk})_l + P_m + EP_{jm} + FP_{km} + EFP_{jkm} + \varepsilon_{(ijkl)m}$$

donde:

Y = respuesta a la variable de la n -ésima observación, con el j -ésimo nivel de enzima, la k -ésima calidad de alfalfa, dentro del i -ésimo bloque, en el m -ésimo periodo.

μ = media general.

B_i = efecto del i -ésimo bloque.

E_j = efecto del j -ésimo nivel de enzima.

F_k = efecto de la k -ésima calidad de alfalfa.

EF_{jk} = efecto de la interacción entre el j -ésimo nivel de enzima y la k -ésima calidad de alfalfa.

$A(BEF_{ijk})_l$ = efecto del l -ésimo animal dentro del i -ésimo bloque, con el j -ésimo nivel de enzima y la k -ésima calidad de alfalfa.

P_m = efecto del m -ésimo periodo.

EP_{jm} = efecto de la interacción entre el j -ésimo nivel de enzima y el m -ésimo periodo.

FP_{km} = efecto de la interacción entre la k -ésima calidad de alfalfa y el m -ésimo periodo.

EFP_{jkm} = efecto de la interacción entre el j -ésimo nivel de enzima, la k -ésima calidad de alfalfa y el m -ésimo periodo.

$\varepsilon_{(ijkl)m}$ = error experimental.

Los resultados de digestibilidad *in vitro* se analizaron estadísticamente utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + E_i + F_j + EF_{ij} + H_k + EH_{ik} + \varepsilon_{(ijk)l}$$

donde:

Y = respuesta a la variable para el i -ésimo nivel de enzima, con la j -ésima calidad de alfalfa dentro de la k -ésima hora de muestreo.

μ = media general.

E_i = efecto del i -ésimo nivel de enzima.

F_j = efecto de la j -ésima calidad de alfalfa.

EF_{ij} = efecto de la interacción entre el i -ésimo nivel de enzima y la j -ésima calidad de alfalfa.

H_k = efecto de la k -ésima hora de muestreo.

EH_{ik} = efecto de la interacción entre el i -ésimo nivel de enzima y la k -ésima hora de muestreo.

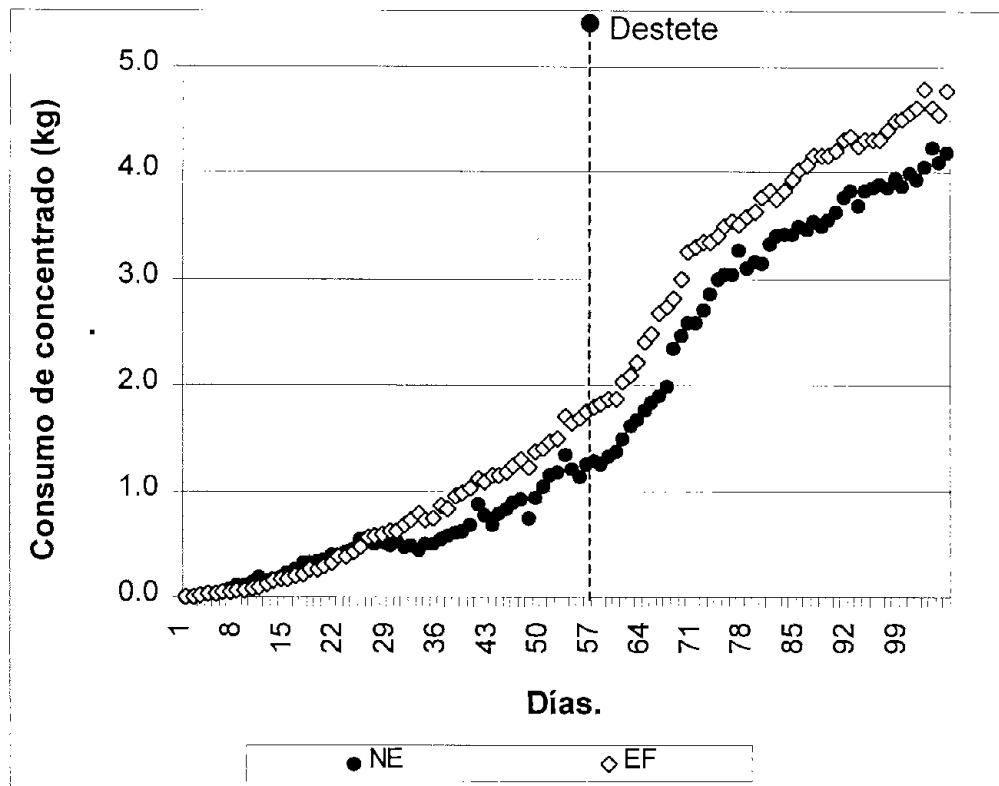
$\varepsilon_{(ijk)l}$ = error experimental.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION.

COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO.

El peso inicial de los becerros (38.69 kg) fue similar ($p>0.10$) entre los tratamientos. En el transcurso del experimento dos de los becerros fallecieron presentando signos de neumonía, estos animales estaban asignados a los tratamientos 3 y 6.

Los animales que recibieron alimento adicionado con enzimas fibrolíticas (EF) tendieron ($P = 0.0628$) a consumir mas alimento en promedio (1.994 vs. 1.651 kg) que los animales que no recibieron EF (Grafica 1). La GP y la EA finales fueron similares ($P>0.05$) entre los tratamientos (0.810 kg y 0.44, respectivamente).



Gráfica 1. Evolución en el consumo de alimento sin enzimas (NE) y con enzimas fibrolíticas (EF).

La inclusión del complejo enzimático en el alimento mejoró la GP y la EA en el periodo predestete ($P<0.05$) sin afectar estadísticamente el CMS; en contraste, en el periodo posdestete el CMS fue mayor en animales consumiendo EF y la GP y la EA no fueron afectadas por la adición de EF (Cuadro 3). Algunos autores han reportado incremento en el CMS al incluir EF en el alimento de ganado en crecimiento y engorda (Beauchemin et al., 1995; Feng et al., 1996), atribuido principalmente a una tasa de pasaje más rápida y a un tiempo de retención ruminal más corto; sin embargo, en otros trabajos el CMS no fue afectado por la adición de EF (Beauchemin et al., 1997; Beauchemin et al., 1999a; Lewis et al., 1996; Krause et al., 1998), pero se mejoró la GP y la conversión alimenticia, probablemente por un incremento en la rápida disponibilidad de carbohidratos fermentables y un estímulo en el crecimiento microbiano en el rumen. El aumento de CMS de becerros alimentados con EF en el periodo posdestete de este trabajo (142.66 vs. 117.26 kg) pudo ser ocasionado por una tasa de pasaje mayor, que estadísticamente no se reflejó en la GP, sin embargo, numéricamente la adición de EF mejoró la GP en 16.8% (58.99 vs. 49.06 kg).

Cuadro 3. Comportamiento productivo de becerros alimentados con enzimas fibrolíticas en el alimento iniciador.

		NE	EEM	EF	EEM
Predestete	Ganancia, kg	24.26 a	2.52	36.60 b	2.37
	Consumo, kg	56.10	3.96	66.75	3.73
	*Eficiencia	0.41 a	0.02	0.55 b	0.02
Posdestete	Ganancia kg	49.06	3.25	58.99	3.05
	Consumo kg	117.26 a	6.30	142.66 b	5.94
	*Eficiencia	0.42	0.02	0.42	0.02

NE sin enzima; EF con enzima; EEM error estándar de la media.

* Eficiencia = ganancia / consumo.

a, b: medias con distinta literal difieren ($P<0.05$).

La calidad de la alfalfa no afectó ($p>0.05$) el comportamiento productivo (GP, CMS, y EA) de los becerros en el experimento (Cuadro 4). Así mismo no se observó ninguna interacción entre la calidad de la alfalfa y la adición de enzimas fibrolíticas ($p>0.05$).

Cuadro 4. Comportamiento productivo final de becerros alimentados con heno de alfalfa de diferente calidad en el alimento iniciador.

	Buena	Regular	Mala	EEM
Ganancia, kg	88.62	78.79	85.96	5.83
Consumo, kg	198.76	180.10	193.29	11.03
*Eficiencia	0.45	0.44	0.43	0.01

Buena, alfalfa de buena calidad; Regular, alfalfa de regular calidad; Mala, alfalfa de mala calidad;

EEM error estándar de la media.

* Eficiencia = ganancia / consumo.

DIGESTIBILIDAD APARENTE DE LOS NUTRIMENTOS.

Los coeficientes de digestibilidad de los componentes de la ración se presentan en el Cuadro 5. La digestibilidad aparente de MS, PC y FDN fue similar ($P> 0.05$) entre los tratamientos. Lewis et al. (1999) reportaron resultados similares en ganado lechero donde la digestibilidad aparente no fue afectada por la inclusión de enzimas, pero observaron un consumo de alimento numéricamente mayor en animales consumiendo EF (22.4 vs. 20.5 kg), lo que favoreció un incremento en la tasa de pasaje, situación que puede ser semejante a la del presente experimento. Estos resultados también coinciden con otros trabajos (Hristov et al., 2000; McAllister et al., 1999) donde no se observan efectos sobre la digestibilidad del alimento en el tubo digestivo, sin embargo, algunos otros autores reportan un

incremento en la digestibilidad aparente de la ración de ganado lechero (Beauchemin et al., 1999b; Rode et al., 1999; Yang et al., 1999) y ganado de engorda (Feng et al., 1996; Krause et al., 1998). Beauchemin et al. (1999b) observaron una mejoría en la digestibilidad del alimento en el tubo digestivo total, indicando que el efecto de la adición de enzimas ocurrió a nivel intestinal, más que a nivel ruminal. Las enzimas exógenas adicionadas en el alimento son relativamente estables en el rumen y escapan a la digestión ruminal (Hristov et al., 1998b; Morgavi et al., 2001), por lo que pueden tener alguna actividad en el intestino delgado y alterar la digestión y absorción de nutrimentos.

Los coeficientes promedio de digestibilidad en animales que no consumieron EF fueron 77.31, 76.78 y 52.80% para MS, PC y FDN, respectivamente y para los becerros que recibieron EF fueron 76.34, 75.72 y 48.73%.

Cuadro 5. Coeficientes de digestibilidad aparente de la ración de becerros.

	AB-NE	AB-EF	AR-NE	AR-EF	AM-NE	AM-EF	EEM
MS	76.91	76.86	77.74	76.36	77.13	75.62	0.97
PC	75.47	77.00	77.10	73.62	77.63	76.50	1.28
FDN	48.38	45.85	53.80	49.44	55.83	50.64	2.82

AB alfalfa buena calidad; AR alfalfa regular calidad; AM alfalfa mala calidad; NE sin enzima; EF con enzima.

MS materia seca; PC proteína; FDN fibra detergente neutro.

CONCENTRACION Y PROPORCIONES DE AGV EN EL LIQUIDO RUMINAL.

La inclusión de EF y la calidad de la alfalfa en el alimento iniciador no afectaron ($P > 0.05$) la concentración de AGV en el líquido ruminal de los becerros (Cuadro 6), y tampoco se observó ninguna interacción entre ambas, encontrándose 78.8

mmol/L en promedio total de AGV, concentración ligeramente por debajo de 80-120 mmol/L reportado para rumiantes adultos (Fahey y Berger, 1988). Terneros de 6 a 8 semanas de edad alcanzan los niveles propios de un animal adulto (Owens y Goetsch, 1988), sin embargo, las concentraciones absolutas de AGV pueden variar según la región donde se tome la muestra, por ejemplo en las proximidades del cardias el agua y la saliva que penetran en el rumen diluyen los ácidos. Raun y Burroughs (1962) encontraron que los niveles de AGV tienden a ser menores cuando las muestras se obtienen por medio de una sonda esofágica (similar al método de muestreo utilizado en este experimento) comparado con las muestras obtenidas de animales con cánula ruminal.

Las proporciones molares de acético: propiónico: butírico fueron similares ($P > 0.05$) entre los tratamientos (55: 37: 8), encontrándose en el rango normal para animales alimentados con dietas altas en concentrado (Fahey y Berger, 1988; Vazquez-Anon et al., 1993). Trabajos realizados con enzimas fibrolíticas en ganado lechero (Beauchemin et al., 1999b; Kung et al., 2000) tampoco encontraron modificaciones en la concentración y proporciones de los AGV, contrario a resultados registrados en animales de engorda (Lewis et al., 1996) que muestran un aumento en la concentración de AGV por adición de enzimas en el alimento.

Cuadro 6. Concentración de AGV totales (mmol /L) y proporciones molares (moles/100 moles) en el líquido ruminal.

	AB-NE	AB-EF	AR-NE	AR-EF	AM-NE	AM-EF	EEM
Acético	53.96	53.55	54.94	54.83	54.58	56.28	0.49
Propiónico	37.62	39.05	36.92	37.08	37.31	34.99	0.51
Butírico	8.42	7.40	8.14	8.09	8.11	8.73	0.34
Totales	80.7	77.0	72.0	85.9	80.6	76.8	0.32

AB alfalfa buena calidad; AR alfalfa regular calidad; AM alfalfa mala calidad; NE sin enzima; EF con enzima.

DESARROLLO DEL ESTÓMAGO Y TAMAÑO DE PAPILAS RUMINALES.

El peso del estómago completo con contenido digestivo (26.54 kg), del rumen-retículo (4.06 kg), abomaso (0.717 kg) y omaso (0.848 kg) vacíos no fue afectado ($P>0.05$) por los tratamientos. Varios trabajos se han realizado sobre el desarrollo del estómago (Tamate et al., 1962; Klein et al., 1987; Beharka et al., 1998; Morisse et al., 2000.) y en ellos se señala que el peso del rumen-retículo y omaso incrementan rápidamente durante las primeras seis semanas de vida cuando una cantidad adecuada de materia seca es ingerida por el becerro.

Cuadro 7. Tamaño de las papilas ruminales (mm) de becerros Holstein alimentados con enzimas fibrolíticas.

	NE	EF	EEM
SV alto	1.86	1.70	0.19
SV ancho	0.21	0.28	0.03
SD alto	0.81	0.70	0.10
SD ancho	0.30	0.28	0.19

NE sin enzima; EF con enzima; EEM error estándar de la media.
SV saco ruminal ventral; SD saco ruminal dorsal.

Las medidas de longitud y grosor de las papilas ruminales se presentan en los Cuadros 7 y 8. El tamaño promedio de las papilas ruminales del saco ventral fue de 1.93 mm de longitud y 0.25 mm de grosor, en el saco dorsal la longitud fue de 0.63 mm y 0.30 mm de grosor. La calidad de la alfalfa y la inclusión de EF no mostraron efecto ($P>0.05$) en el tamaño de las papilas ruminales. Algunos estudios (Klein et al., 1987; Beharka et al., 1998) indican el efecto de la composición del alimento, el tamaño de la partícula y la edad sobre las medidas de las papilas ruminales, encontrando longitudes de 1.2 mm en el saco ventral de

animales consumiendo 10% de alfalfa a las seis semanas y hasta 3.2 mm en becerros de 10 semanas de edad con un 25% de alfalfa. El desarrollo de las papilas ruminales es estimulado por la presencia de productos finales de la fermentación (Tamate et al., 1962; Sakata y Tamate, 1979; Lane y Jesse, 1997) principalmente butirato y propionato, los cuales se encontraron en concentraciones similares en el líquido ruminal de los becerros en este experimento.

En animales que no consumieron EF el promedio en el tamaño fue 1.86 y 0.21 mm de longitud y grosor respectivamente vs. 1.69 y 0.29 mm en los animales que si recibieron EF en el alimento iniciador.

Cuadro 8. Tamaño de las papilas ruminales (mm) de becerros Holstein alimentados con alfalfa de diferente calidad.

	AB	AR	AM	EEM
SV alto	1.77	1.68	1.87	0.22
SV ancho	0.21	0.30	0.22	0.03
SD alto	0.60	0.90	0.73	0.11
SD ancho	0.30	0.29	0.29	0.02

AB alfalfa buena calidad; AR alfalfa regular calidad; AM alfalfa mala calidad; SV saco ruminal ventral; SD saco ruminal dorsal; EEM error estándar de la media.

REOLOGIA DEL CONTENIDO DIGESTIVO.

La viscosidad de la muestra digestiva fue similar ($P>0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 9). Los promedios de viscosidad del contenido digestivo fueron 5.03 en el rumen, 3.98 en el abomaso y 4.73 centipoises en el contenido del intestino delgado. Un incremento en la ganancia de peso y la conversión alimenticia se observa cuando se incluyen enzimas en la alimentación de pollos de engorda, debido a una reducción en la viscosidad del contenido del tubo digestivo (Bedford et al., 1991; Bedford y Classen, 1992; Marquardt et al., 1996). En rumiantes adultos se han realizado estudios (Mir et al., 1998; Hristov et al., 2000) adicionando EF en el alimento, donde se observa una reducción en la viscosidad de la digesta duodenal (de 1.42 a 2.01 centipoises), sin embargo, la viscosidad en el tubo digestivo se encuentra por debajo a lo reportado para pollos de engorda (de 25 hasta >200 centipoises) alimentados con dietas a partir de centeno y cebada (Bedford y Classen, 1992).

Diversos mecanismos de acción de las EF se han reportado en rumiantes, y pueden incluir desde hidrólisis directa, mejora de la adherencia microbiana, cambios en la viscosidad del tubo digestivo, complemento con la acción de las enzimas de microorganismos ruminales hasta cambios en el sitio de digestión (Kung et al., 2000; Morgavi et al., 2000).

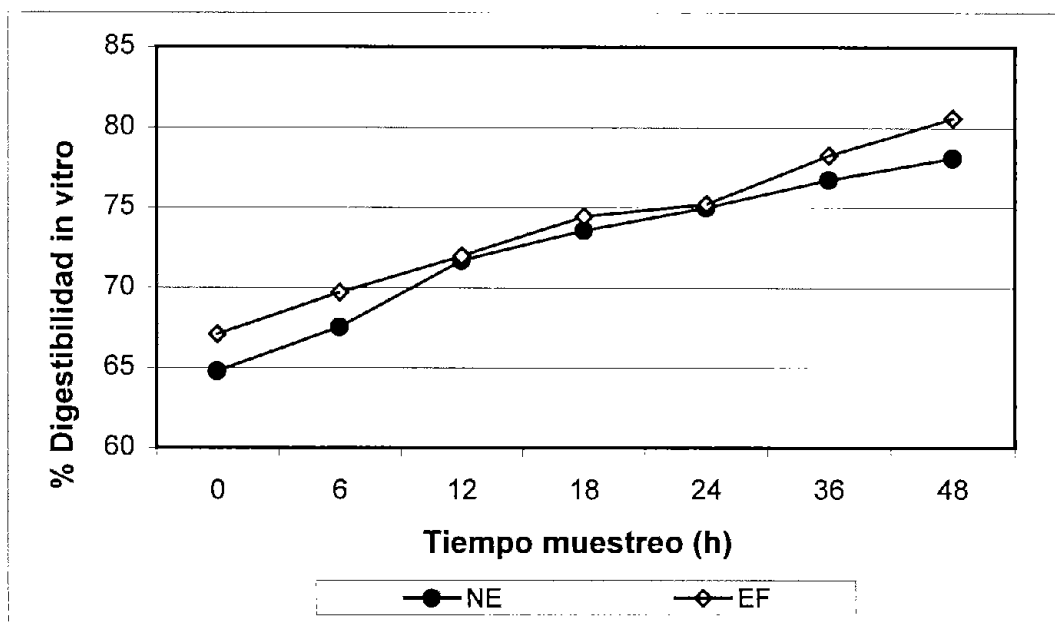
Cuadro 9. Viscosidad (centipoises) en el tubo digestivo de becerros Holstein alimentados con enzimas fibrolíticas.

Lugar de muestreo	AB-NE	AB-EF	AR-NE	AR-EF	AM-NE	AM-EF	EEM
Rumen	5.129	4.970	4.993	5.009	4.760	5.270	0.42
Abomaso	4.122	3.773	3.851	3.669	4.017	4.006	0.20
Intestino	4.906	4.388	4.906	4.653	5.339	4.688	0.49

AB alfalfa buena calidad; AR alfalfa regular calidad; AM alfalfa mala calidad; NE sin enzima; EF con enzima; SV saco ruminal ventral; SD saco ruminal dorsal; EEM error estándar de la media.

DIGESTIBILIDAD *IN VITRO*.

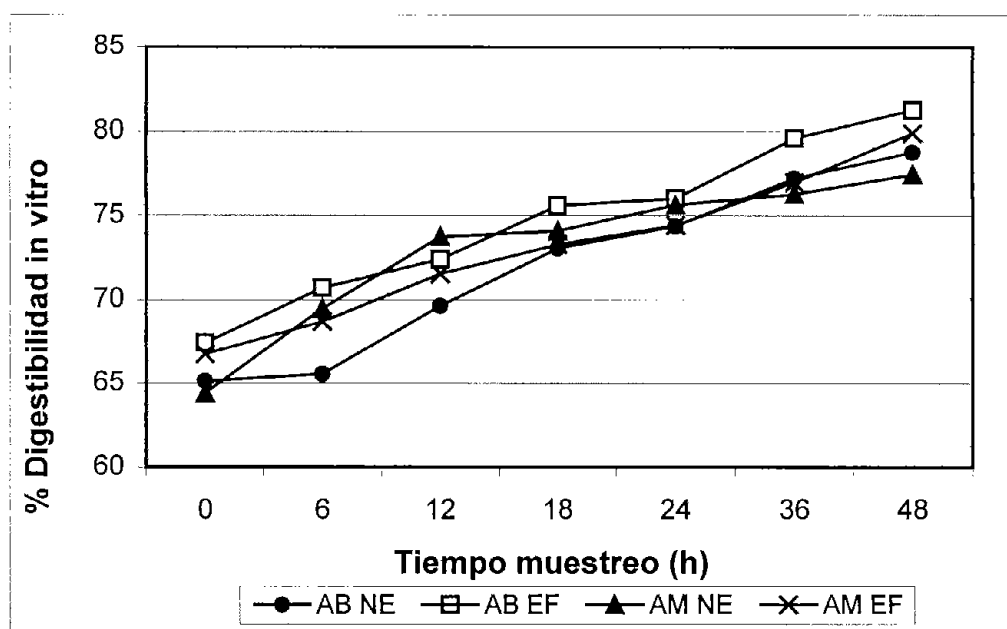
En las Gráficas 2 y 3 se presenta el efecto de la adición de EF en la digestibilidad *in vitro* de las alfalfas, dentro de las 48 h de incubación. La digestibilidad *in vitro* de la alfalfa adicionada con EF fue mayor ($P < 0.05$) que la alfalfa sin EF (80.58 vs. 78.10 a las 48 h). En varios experimentos se ha indicado un beneficio en la digestibilidad *in vitro* al incluir EF (Hristov et al., 1998a; Kung et al., 2000; Wallace et al., 2001), sin embargo algunos de estos trabajos no encuentran la misma respuesta de las EF al estudiarlas *in vivo*. Feng et al. (1996) observaron incremento en la digestibilidad *in vitro* e *in vivo*, cuando se incluyen EF en el alimento seco, inmediatamente antes de ofrecer el alimento.



Gráfica 2. Digestibilidad *in vitro* de la materia seca de la alfalfa sin adicionar (NE) o con adición de enzimas fibrolíticas (EF).

El tipo de enzima utilizado, el nivel de enzima añadido, la estabilidad de la enzima, el método de aplicación y la composición de la dieta pueden afectar la respuesta de las EF al realizar un experimento (Yang et al., 2000). El incremento en la digestibilidad *in vitro* de este estudio pudo ser debido al sinergismo existente entre las enzimas de microorganismos ruminales y las enzimas exógenas incluidas en la alfalfa (Morgavi et al., 2000), favoreciendo el potencial hidrolítico dentro del ambiente de incubación.

La calidad de la alfalfa no afectó la digestibilidad *in vitro* en el experimento ($P>0.05$) resultando en 80.02% en la alfalfa de buena calidad y 78.66 % en la de mala calidad a las 48 h de incubación (Gráfica 3).



Gráfica 3. Digestibilidad *in vitro* de la alfalfa de buena (AB) y mala calidad (AM) sin enzimas (NE) o con enzimas fibrolíticas (EF).

La presencia de las EF en el rumen puede aumentar la hidrólisis de carbohidratos estructurales, poniendo más energía a disposición de los microorganismos y favoreciendo la síntesis de proteína microbial. Las EF en este experimento beneficiaron el comportamiento productivo en el periodo de predestete, posiblemente porque las enzimas producidas por las bacterias ruminales no fueron suficiente para desdoblar el sustrato de la ración. El contenido de fibra en el alimento sólido utilizado fue el mismo a lo largo del experimento, y la población de microorganismos ruminales de los animales destetados tuvo la capacidad de aprovechar la fibra de la dieta, por lo que la inclusión de EF solo favoreció en el caso de animales antes del destete. El mecanismo de acción de las EF en rumiantes parece ser diferente a la manera en que actúa en animales no rumiantes, donde al reducir la viscosidad del contenido digestivo permite aprovechar de mejor manera los nutrimentos del alimento (Bedford y Classen, 1992). En este experimento la viscosidad del contenido digestivo no fue afectada por la adición de EF, no obstante, esta fue medida únicamente al finalizar el experimento, por lo que sería conveniente medirla en el periodo de predestete, cuando el becerro actúa de manera semejante a un animal no rumiante.

Las EF utilizadas en el trabajo mejoraron la digestibilidad *in vitro* de la alfalfa utilizada en las dietas, y se ha demostrado resistencia de algunas enzimas a la degradación en el rumen y actividad en el intestino delgado de rumiantes (Hristov et al., 1998b), sin embargo la digestibilidad aparente del alimento en el tracto completo no fue afectado por las EF, debido a que los animales que las recibieron tendieron a consumir más alimento.

La concentración de los AGV no fue afectada El peso del estómago y las papilas ruminales no fueron afectadas por los tratamientos, sin embargo al igual que la viscosidad del contenido digestivo, fueron medidos al final del experimento por lo cual es necesario seguir investigando.

VII. CONCLUSIONES.

La GP y la EA de los becerros alimentados con enzimas fibrolíticas mostraron una mejoría en el periodo de predestete, al incrementar la proporción de nutrimentos que provienen de la fracción sólida de la dieta.

En el periodo posterior al destete se incrementó el CMS, debido a la adición de EF pero no se refleja de manera significativa en la GP y la EA.

La inclusión de EF no afectó el desarrollo de los compartimentos gástricos y las papilas ruminales de los becerros.

La calidad de la alfalfa no afectó el comportamiento productivo, el desarrollo del estómago y la digestibilidad *in vitro* de la alfalfa añadida en las dietas.

La digestibilidad *in vitro* de la alfalfa utilizada en el experimento se incrementó al incluir EF.

La adición de enzimas en el alimento iniciador puede servir además de complementar la producción de las enzimas propias del becerro, para ayudar a disminuir los efectos negativos que se presentan sobre el comportamiento productivo en el periodo de predestete. Tomando en cuenta el efecto positivo de las enzimas fibrolíticas, estas pueden considerarse en la alimentación de becerras de reemplazo en la etapa de predestete, para mejorar el crecimiento y la conversión alimenticia.

VIII. REFERENCIAS.

- Anderson K. L., Nagaraja T. G. and Morrill J. L., 1987a. Ruminal metabolic development in calves weaned conventionally or early. *J. Dairy Sci.* 70:1000-1005.
- Anderson K. L., Nagaraja T. G., Morrill J. L., Avery T. B., Galitzer S. J. and Boyer J. E., 1987b. Ruminal microbial development in conventionally or early weaned calves. *J. Anim. Sci.* 64:1215-1226.
- Baldwin R. L. and Jesse B. W., 1992. Developmental changes in glucose and butyrate metabolism by isolated sheep ruminal cells. *J. Nutr.* 122:1149-1153.
- Beauchemin K. A., Jones S. D. M., Rode L. M. and Sewalt V. J. H., 1997. Effects of fibrolytic enzymes in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 77:645-653.
- Beauchemin K. A., Rode L. M. and Karen D., 1999a. Use of feed enzymes in feedlot finishing diets. *Can. J. Anim. Sci.* 79:243-246.
- Beauchemin K. A., Rode L. M. and Sewalt V. J. H., 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. *Can. J. Anim. Sci.* 75:641-644.
- Beauchemin K. A., Yang W. Z. and Rode L. M., 1999b. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:378-390.
- Bedford M. R. and Classen H. L., 1992. Reduction of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is effected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and food conversion efficiency of broiler chicks. *J. Nutr.* 122:560-569.
- Bedford M. R., Classen H. L. and Campbell G. L., 1991. The effect of pelleting, salt, and pentosanase on the viscosity of intestinal contents and performance of broilers fed rye. *Poultry Sci.* 70:1571-1577.

- Beharka A. A., Nagaraja T. G., Morrill J. L., Kennedy G. A. and Klemm R. D., 1998. Effects of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves. *J. Dairy Sci.* 81:1946-1955.
- Burroughs W., Woods W., Ewing S. A., Greing J. and Theurer B., 1960. Enzyme additions to fattening cattle rations. *J. Anim. Sci.* 19:458-464.
- Cowan W. D., Korsbak A., Hastrup T. and Rasmussen P. B., 1996. Influence of added microbial enzymes on energy and protein availability of selected feed ingredients. *Anim. Feed Sci. Technol.* 60:311-319.
- Fahey Jr. G. C. and Berger L. L., 1988. Los carbohidratos en la nutrición de los rumiantes. En: Church, D. C. *El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición. Editorial Acriba, España.* pp. 305-337.
- Feng P., Hunt C. W., Pritchard G. T. and Julien W. E., 1996. Effect of enzyme preparations on *in situ* and *in vitro* degradation and *in vivo* digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. *J. Anim. Sci.* 74:1349-1357.
- Fluharty F. L., Loerch S. C and Dehority B. A., 1994. Ruminal characteristics, microbial populations, and digestive capabilities of newly weaned, stressed calves. *J. Anim. Sci.* 72:2969-2979.
- Fondevila M., 1998. Procesos implicados en la digestión microbiana de los forrajes de baja calidad. *Rev. Fac. Agron.* 15:87-106.
- Frumholtz P., 2001. Enzimas para dietas de ganado lechero – de la investigación a la aplicación en el campo. En: *Biotechnología para la alimentación animal. 2º Seminario AMENA.* México D. F. pp.37-47.
- Guilloteau P., Huëron-Luron I. L., Remy-Serre M. and Toullec R., 1994. Gastric Secretion in the Prerumiant Calf: Changes with Age and Dietary Protein Source. In: Barej W. W., Zabielski R. and Ostaszewski P. (ed) *The Developing of Digestive and Metabolic Processes in New Born and Growing Ruminants. Proceedings of Satellite Symposium to VIII ISPR.* Warsaw, Poland. pp. 29-33.

- Habel R. E., 1982. Sistema digestivo de los rumiantes. En Getty R. Anatomía de los animales domésticos. 5ª ed. (tomo 1). Salvat (eds). Barcelona, Esp. pp. 957-1016.
- Heinrichs A. J., Wells S. J. and Losinger W. C., 1995. A study of the use of milk replacers for dairy calves in the United States. *J. Dairy Sci.* 78:2831-2837.
- Hristov A. N., McAllister T. A. and Cheng K.-J., 1998a. Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharide-degrading enzymes on rumen fermentation and nutrient digestibility. *J. Anim. Sci.* 76:3146-3156.
- Hristov A. N., McAllister T. A. and Cheng K.-J., 1998b. Stability of exogenous polysaccharide-degrading enzymes in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 76:161-168.
- Hristov A. N., McAllister T. A. and Cheng K.-J., 2000. Intraruminal supplementation with levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: Effects on nutrient digestion in cattle fed a barley grain diet. *J. Anim. Sci.* 78:477-487.
- Inbarr J., Schmitz M. and Ahrens F., 1993. Effect of adding fiber and starch degrading enzymes to a barley/wheat based diet on performance and nutrient digestibility in different segments of the small intestine of early weaned pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 44:113-127.
- Jenkins K. J., Kramer J. K. G. and Emmons D. B., 1981. Digestion of fat in calves fed milk replacers prepared by homogenization or low-pressure dispersion. *J. Dairy Sci.* 64:1965-1971.
- Klein R. D., Kincaid R. L., Hodgson A. S., Harrison J. H., Hillers J. K. and Cronrath J. D., 1987. Dietary fiber and early weaning on growth and rumen development of calves. *J. Dairy Sci.* 70:2095-2104.
- Krause M., Beauchemin K. A., Rode L. M. Farr B. I. and Norgaard P., 1998. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. *J. Anim. Sci.* 76:2912-2920.
- Kung L. Jr., Treacher R. J., Nauman G. A., Smagala A. M., Endres K. M. and Cohen M. A., 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its

- nutritive value and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:115-122.
- Lane M. A. and Jesse B. W., 1997. Effect of volatile fatty acid infusion on development of the rumen epithelium in neonatal sheep. *J. Dairy Sci.* 80:740-746.
- Lane M. A., Baldwin R. L. and Jesse B. W., 2000. Sheep rumen metabolic development in response to age and dietary treatments. *J. Anim. Sci.* 78:1990-1996.
- Leatherwood J. M., Mochrie R. D. and Thomas W. E., 1960. Some effects of a supplementary cellulase preparation on feed utilization by ruminants. *J. Dairy Sci.* 43:1460-1464.
- Lehninger A. L., 1980. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Traducción de Calvet P. F. y Bozal F. J. *Omega (ed)*. Barcelona, Esp.
- Lehninger A. L., Nelson and Cox., 1993. Principles of Biochemistry. Second Ed. Worth Publister (ed).
- Lewis G. E., Hunt C. W., Sanchez W. K., Treacher R., Pritchard G. T. and Feng P., 1996. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. *J. Anim. Sci.* 74:3020-3028.
- Lewis G. E., Sanchez W. E., Hunt C. W., Guy M. A., Pritchard G. T., Swanson B. I. and Treacher R. J., 1999. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:611-617.
- Li S., Sauer W. C., Mosenthin R. and Kerr B., 1996. Effect of β -glucanase supplementation of cereal-based diets for starter pigs on the apparent digestibilities of dry matter, crude protein and energy. *Anim. Feed Sci. Technol.* 59:223-231.
- Lindemann M. D., Cornelius S. G., Kandelgy S. M. El, Moser R. L. and Pettigrew J. E., 1986. Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme levels in the piglet. *J. Anim. Sci.* 62:1298-1307.

- Longenbach J. I. and Heinrichs A. J., 1998. A review of the importance and physiological role of curd formation in the abomasum of young calves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 73:85-97.
- Marquardt R. R., Brenes A., Zhang Z and Boros D., 1996. Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 60:321-330.
- McAllister T. A., Oosting S. J., Popp J. D., Yanke L. J., Hirstov A. N., Treacher R. J. and Cheng K.-J., 1999. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 79:353-360.
- McGavin M. D. and Morrill J. L., 1976a. Dissection technique for examination of the bovine ruminoreticulum. *J. Anim. Sci.* 42:535-538.
- McGavin M. D. and Morrill J. L., 1976b. Scanning electron microscopy of ruminal papillae in calves fed various amounts forms of roughage. *Am. J. Vet. Res.* 37:497-508.
- Merchen N. R., 1988. Digestión, Absorción y Excreción en los Rumiantes. En: Church, D. C. *El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición.* Ed. Acriba, España. pp. 191-223.
- Mir P. S., Mears G. J., Mir Z. and Morgan Jones S. D., 1998. Effects of increasing dietary grain on viscosity of duodenal digesta and plasma hormone and glucose concentrations in steers. *J. Anim. Sci.* 76 (Suppl.1):247(Abstr.).
- Morgavi D. P., Beauchemin K. A., Nsereko V. L., Rode L. M., Iwaasa A. D., Yang W. Z., McAllister T. A. and Wang Y., 2000. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Dairy Sci.* 83:1310-1321.
- Morgavi D. P., Beauchemin K. A., Nsereko V. L., Rode L. M., McAllister T. A., Iwaasa A. D., Wang Y. and Yang W. Z., 2001. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. *J. Anim. Sci.* 79:1621-1630.

- Morisse J. P., Huonnic D., Cotte J. P. and Martrenchar A., 2000. The effect of four fibrous feed supplementations on different welfare traits in veal calves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 84:129-136.
- Nocek, J. E., William H. C. and Polan C. E., 1984. Influence of ration physical form and availability on ruminal morphology of growing bull calves. *J. Dairy Sci.* 67:334-343.
- NRC., 1989. Nutrient requirements of domestic animals. Nutrient requirements of dairy cattle. Sixth revised Ed. National Academy of Sciences. National Research Council, Washington, D. C.
- Officer D. I., 2000. Feed Enzymes. In: Farm animal metabolism and nutrition. D'Mello J. P. F. (ed). *CABI Publishing*. London, U. K. pp. 405-426.
- Orskov E. R. and Ryle M., 1990. Energy Nutrition in Ruminants. Elsevier Applied Science, N. Y., U. S. A.
- Orskov E. R., 1988. Nutrición Proteica de los rumiantes. Traducido por Zorrilla R. *J. Editorial Acriba*, España. pp. 459-481.
- Owens F.N. and Goetsch A: L., 1988. Fermentación Ruminal. En: Church, D. C. El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición. *Ed. Acriba*, España. pp. 159-189.
- Phillipson A. T., 1981. Digestión en el rumiante. En: Dukes H. H. y Swenson M. J. Fisiología de los animales domésticos. Traducción de Castejon C. F. J. *Aguilar (ed)*, México, D. F. pp. 538-612.
- Ponce-Noyola T. y Pérez-Avalos O., 1996. Cellulase and xylanase in the factory industria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 405.
- Quigly III J. D., Schwab C. G. and Hylton W. E., 1985. Development of rumen function in calves: Nature of protein reaching the abomasum. *J. Dairy Sci.* 68:694-702.
- Raun N. S. and Burroughs W., 1962. Suction strainer technique in obtaining rumen fluid samples from intact lambs. *J. Anim. Sci.* 21:454-457.
- Reece W. O., 1997. Digestion and Absortion. In: Physiology of domestic animals. Second Ed. Williams Wilkins (ed). Baltimore, U. A. S. pp. 270-333.

- Roy J. H. B., 1972. El ternero: Vol II. Nutrición y patología. Traducción de Sanz S: B. *Acribia (ed)*. Zaragoza, Esp.
- Rust J. W., Jacobson N. L., McGilliard A. D. and Hotchkiss D. K., 1965. Supplementation of dairy calf diets with enzymes. II Efect on nutrient utilization and on composition of rumen fluid. *J. Anim. Sci.* 24:156-160.
- Sakata T. and Tamate H., 1978. Rumen epithelial cell proliferation accelerated by rapid increase in intraruminal butyrate. *J. Dairy Sci.* 61:1109-1113.
- Sakata T. and Tamate H., 1979. Rumen epithelium cell proliferation accelerated by propionate and acetate. *J. Dairy Sci.* 62:49-52.
- SAS, 1988. SAS/SAT. User's Guide. Release 6.03 Edition. *Statistical Analysis System*. Cary, NC, USA.
- Sidney J. L. Jr. and Huber J. T., 1988. Digestión, Metabolismo y Necesidades Nutritivas en Pre-Rumiantes. En: Church, D. C. El Rumiente: Fisiología Digestiva y Nutrición. *Ed. Acriba*, España. pp. 459-481.
- Síntesis Geográfica, 1986. Nomenclatura y anexo cartográfico del Estado de Querétaro. S.P.P. *Inst. Nac. De Geografía, Estadística e Informática*, Méx., D.F.
- Stevens C. E. and Hume I. D., 1998. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiol. Rev.* 78:393-427.
- Tamate H., McGilliard A. D., Jacobson N. L. and Getty R., 1962. Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the calf. *J. Dairy Sci.* 45:408-420.
- Tejada H. I., 1992. Control de calidad y análisis de alimentos para animales. Sistema de educación continua en producción animal A. C. México, D. F.
- Van Soest P. J., 1982. Nutritional ecology of the Ruminant. O & B Books, Inc., Corvallis, OR.
- Vazquez-Anon M., Heinrichs A. J., Aldrich J. M. and Varga G. A., 1993. Postweaning age effects on rumen fermentation end-products and digesta kinetics in calves weaned at 5 weeks of age. *J. Dairy Sci.* 76:2742-2748.

- Wallace R. J., Wallace S. J. A., Mckain N., Nsereko V. L. and Hartnell G. F., 2001. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms in vitro. *J. Anim. Sci.* 79:1905-1916.
- Wallegghem P. A. Van, Ammerman C. B., Chicco C. F., Moore J. E. and Arrington L. R., 1964. Enzyme supplements and digestibility of protein and energy in rations high in dried citrus pulp. *J. Anim. Sci.* 23:960-962.
- Yang W. Z., Beauchemin K. A. and Rode L. M., 1999. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:391-403.
- Yokoyama M. T. and Johnson K. A., 1988. Microbiología del Rumen e Intestino. En: Church, D. C. *El Rumiente: Fisiología Digestiva y Nutrición. Acriba (ed)*, España. pp. 137-157.

IX. APENDICES.

1. TÉCNICA DE TINCION HEMATOXILINA – EOSINA.

Fijación: Formol al 10%.

Muestra: Cortes en parafina a 6 micras.

Procedimiento:

1. Xilol	5 min	Desparafinar
2. Xilol	5 min	Desparafinar
3. ½ Xilol – ½ OH	3 min	Hidratar
4. Alcohol absoluto	3 min	Hidratar
5. Alcohol 80%	3 min	Hidratar
6. Agua	3 baños	Modificación del pH para entrar a hematoxilina
7. Hematoxilina	1 a 5 min	Teñir núcleos
8. Agua	3 baños	Quitar exceso de hematoxilina
9. Alcohol ácido	Baño rápido	Quitar el colorante del citoplasma y dejar teñidos los núcleos
10. Agua	3 baños	Lavar y quitar ácido del tejido
11. Agua amoniacal	3 min	Para virar la coloración del núcleo de morado a azul
12. Agua	3 baños	Lavar para quitar residuos
13. Alcohol al 96%	5 baños	Modificación del pH para teñir citoplasma
14. Eosina	3 baños	Tinción del citoplasma y contraste con los núcleos
15. Alcohol al 96%	3 baños	Quitar exceso de eosina y empezar a deshidratar
16. Alcohol absoluto	3 baños	Deshidratar
17. Alcohol absoluto	3 baños	Deshidratar
18. Xilol	5 min	Aclarar
19. Xilol	5 min	Aclarar
20. Montar resina.		

2. TECNICA PARA CALCULAR DIGESTIBILIDAD VERDADERA *IN VITRO*.

Soluciones.

1. Solución Amortiguadora A:	gr/L
KH_2PO_4	10.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
NaCl	0.5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
Urea	0.5
2. Solución Amortiguadora B:	
Na_2CO_3	15.0
$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	1.0

Preparación. Precalear ambas soluciones a 39 °C. En un recipiente colocar 266 ml de la solución B y añadir 1330 ml de la solución A (1:5). La cantidad exacta de solución A debe ser ajustada hasta obtener un pH final de 6.8 a 39 °C en la solución final A/B.

3. CUADROS DE ANALISIS DE VARIANZA.

Dependent Variable: Ganancia de Peso Predestete

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	1747.59212	218.44901	2.44	0.0423
Error	25	2241.38318	89.65533		
Corrected Total	33	3988.97529			
	R-Square	C.V.	Root MSE	GDPPRE Mean	
	0.438106	30.65455	9.46865	30.8882	

Source	DF	Type IV SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	492.98615	164.32872	1.83	0.1670
ALF	2	53.80889	26.90444	0.30	0.7434
ENZ	1	1160.78302	1160.78302	12.95	0.0014
ALF*ENZ	2	76.96556	38.48278	0.43	0.6557

Dependent Variable: Ganancia de Peso Posdestete

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	1257.12734	157.14092	1.05	0.4250
Error	25	3729.27530	149.17101		
Corrected Total	33	4986.40265			
	R-Square	C.V.	Root MSE	GDPPPOS Mean	
	0.252111	22.52813	12.2136	54.2147	

Source	DF	Type IV SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	372.859695	124.286565	0.83	0.4883
ALF	2	268.455821	134.227911	0.90	0.4194
ENZ	1	752.655071	752.655071	5.05	0.0338
ALF*ENZ	2	91.607594	45.803797	0.31	0.7383

Dependent Variable: Consumo de Materia Seca Predestete.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	2693.85523	336.73190	1.52	0.2011
Error	25	5546.01190	221.84048		
Corrected Total	33	8239.86713			
	R-Square	C.V.	Root MSE	CDAPRE Mean	
	0.326929	24.04874	14.8943	61.9339	

Source	DF	Type IV SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	1620.12230	540.04077	2.43	0.0885
ALF	2	55.21114	27.60557	0.12	0.8835
ENZ	1	863.48666	863.48666	3.89	0.0597
ALF*ENZ	2	204.73839	102.36920	0.46	0.6356

Dependent Variable: Consumo de Materia Seca Posdestete.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	10996.7163	1374.5895	2.44	0.0418
Error	25	14066.3647	562.6546		
Corrected Total	33	25063.0810			
	R-Square	C.V.	Root MSE	CDAPOS Mean	
	0.438762	18.17286	23.7203	130.526	

Source	DF	Type IV SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	3750.45396	1250.15132	2.22	0.1105
ALF	2	1896.54365	948.27183	1.69	0.2058
ENZ	1	4921.71367	4921.71367	8.75	0.0067
ALF*ENZ	2	674.70107	337.35053	0.60	0.5568

 Dependent Variable: Eficiencia Alimenticia Predestete.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	0.18404095	0.02300512	3.59	0.0066
Error	25	0.16022704	0.00640908		
Corrected Total	33	0.34426800			
	R-Square	C.V.	Root MSE	EAPRE Mean	
	0.534586	16.48079	0.08006	0.48576	

Source	DF	Type IV SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	0.00900352	0.00300117	0.47	0.7071
ALF	2	0.01949268	0.00974634	1.52	0.2381
ENZ	1	0.15277647	0.15277647	23.84	0.0001
ALF*ENZ	2	0.00634360	0.00317180	0.49	0.6155

 Dependent Variable: Eficiencia Alimenticia Posdestete.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	0.03179570	0.00397446	0.62	0.7513
Error	25	0.15971364	0.00638855		
Corrected Total	33	0.19150934			
	R-Square	C.V.	Root MSE	EAPOS Mean	
	0.166027	19.11482	0.07993	0.41815	

Source	DF	Type IV SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	0.01641985	0.00547328	0.86	0.4763
ALF	2	0.00126651	0.00063326	0.10	0.9060
ENZ	1	0.00042568	0.00042568	0.07	0.7984
ALF*ENZ	2	0.00990343	0.00495171	0.78	0.4714

Dependent Variable: Ganancia de Peso Final.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	0.46390258	0.05798782	1.79	0.1279
Error	25	0.81211826	0.03248473		
Corrected Total	33	1.27602084			
	R-Square	C.V.	Root MSE	GDPF Mean	
	0.363554	22.23742	0.18024	0.81050	

Source	DF	Type IV SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	0.12210000	0.04070000	1.25	0.3118
ALF	2	0.05097742	0.02548871	0.78	0.4672
ENZ	1	0.34311506	0.34311506	10.56	0.0033
ALF*ENZ	2	0.00523966	0.00261983	0.08	0.9228

 Dependent Variable: Consumo de Materia Seca Final.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	2.04556068	0.25569508	2.20	0.0628
Error	25	2.90260026	0.11610401		
Corrected Total	33	4.94816094			
	R-Square	C.V.	Root MSE	CDAF Mean	
	0.413398	18.58970	0.34074	1.83295	

Source	DF	Type IV SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	0.91732747	0.30577582	2.63	0.0720
ALF	2	0.19384627	0.09692313	0.83	0.4457
ENZ	1	0.89870526	0.89870526	7.74	0.0101
ALF*ENZ	2	0.08785147	0.04392573	0.38	0.6889

 Dependent Variable: Eficiencia Alimenticia Final.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	0.02137135	0.00267142	0.71	0.6840
Error	25	0.09466292	0.00378652		
Corrected Total	33	0.11603427			
	R-Square	C.V.	Root MSE	EAF Mean	
	0.184181	13.96943	0.06153		0.44050

Source	DF	Type IV SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	0.00479210	0.00159737	0.42	0.7389
ALF	2	0.00163636	0.00081818	0.22	0.8072
ENZ	1	0.01065776	0.01065776	2.81	0.1059
ALF*ENZ	2	0.00338400	0.00169200	0.45	0.6447

Dependent Variable: Acido Acético.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	37	2387.24258	64.52007	7.54	0.0001
Error	178	1523.33380	8.55806		
Corrected Total	215	3910.57638			
	R-Square	C.V.	Root MSE		ACE Mean
	0.610458	5.348987	2.92542		54.6910

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	2	304.03388	152.01694	17.76	0.0001
ALF	2	129.85145	64.92573	7.59	0.0007
ENZ	1	3.54329	3.54329	0.41	0.5208
ALF*ENZ	2	59.85972	29.92986	3.50	0.0324
ANIM(BLQ*ALF*ENZ)	16	1010.07091	63.12943	7.38	0.0001
PER	2	76.56091	38.28046	4.47	0.0127
ALF*PER	4	31.75757	7.93939	0.93	0.4491
ENZ*PER	2	3.36811	1.68406	0.20	0.8215
ALF*ENZ*PER	4	205.36235	51.34059	6.00	0.0001
HORA	2	596.92748	298.46374	34.88	0.0001

Tests of Hypotheses using the Type III MS for ANIM(BLQ*ALF*ENZ) as an error term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ALF	2	129.851454	64.925727	1.03	0.3800
ENZ	1	3.543293	3.543293	0.06	0.8157
ALF*ENZ	2	59.859720	29.929860	0.47	0.6309

 Dependent Variable: Acido Propiónico.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	37	2127.99561	57.51339	6.09	0.0001
Error	178	1680.92334	9.44339		
Corrected Total	215	3808.91894			
	R-Square	C.V.	Root MSE		PRO Mean
	0.558688	8.269002	3.07301		37.1630

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	2	385.808871	192.904436	20.43	0.0001
ALF	2	219.040868	109.520434	11.60	0.0001
ENZ	1	0.197887	0.197887	0.02	0.8851
ALF*ENZ	2	165.685519	82.842759	8.77	0.0002
ANIM(BLQ*ALF*ENZ)	16	763.151554	47.696972	5.05	0.0001
PER	2	30.870318	15.435159	1.63	0.1980
ALF*PER	4	76.917552	19.229388	2.04	0.0913
ENZ*PER	2	19.737103	9.868551	1.05	0.3538
ALF*ENZ*PER	4	202.664511	50.666128	5.37	0.0004
HORA	2	340.218848	170.109424	18.01	0.0001

Tests of Hypotheses using the Type III MS for ANIM(BLQ*ALF*ENZ) as an error term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ALF	2	219.040868	109.520434	2.30	0.1328
ENZ	1	0.197887	0.197887	0.00	0.9494
ALF*ENZ	2	165.685519	82.842759	1.74	0.2077

Dependent Variable: Acido Butirico.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	37	452.489073	12.229434	2.98	0.0001
Error	178	729.328871	4.097353		
Corrected Total	215	1181.817944			
	R-Square	C.V.	Root MSE	BUT Mean	
	0.382875	24.85040	2.02419	8.14551	

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	2	9.576325	4.788162	1.17	0.3132
ALF	2	12.171618	6.085809	1.49	0.2292
ENZ	1	2.062822	2.062822	0.50	0.4789
ALF*ENZ	2	28.895839	14.447920	3.53	0.0315
ANIM(BLQ*ALF*ENZ)	16	168.026139	10.501634	2.56	0.0014
PER	2	54.449090	27.224545	6.64	0.0016
ALF*PER	4	74.910046	18.727512	4.57	0.0015
ENZ*PER	2	33.230836	16.615418	4.06	0.0190
ALF*ENZ*PER	4	17.435378	4.358844	1.06	0.3759
HORA	2	59.394756	29.697378	7.25	0.0009

Tests of Hypotheses using the Type III MS for ANIM(BLQ*ALF*ENZ) as an error term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ALF	2	12.1716179	6.0858089	0.58	0.5715
ENZ	1	2.0628219	2.0628219	0.20	0.6636
ALF*ENZ	2	28.8958390	14.4479195	1.38	0.2810

Dependent Variable: Acidos Grasos Totales.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	37	494.204291	13.356873	3.54	0.0001
Error	178	672.070931	3.775679		
Corrected Total	215	1166.275222			
	R-Square	C.V.	Root MSE	TOTAL Mean	
	0.423746	24.64841	1.94311	7.88331	

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	2	63.633450	31.816725	8.43	0.0003
ALF	2	0.167113	0.083556	0.02	0.9781
ENZ	1	3.301577	3.301577	0.87	0.3510
ALF*ENZ	2	35.282909	17.641454	4.67	0.0105
ANIM(BLQ*ALF*ENZ)	16	125.458701	7.841169	2.08	0.0111
PER	2	0.641984	0.320992	0.09	0.9185
ALF*PER	4	3.368763	0.842191	0.22	0.9253
ENZ*PER	2	6.771751	3.385875	0.90	0.4097
ALF*ENZ*PER	4	38.967015	9.741754	2.58	0.0390
HORA	2	215.436222	107.718111	28.53	0.0001

Tests of Hypotheses using the Type III MS for ANIM(BLQ*ALF*ENZ) as an error term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ALF	2	0.1671126	0.0835563	0.01	0.9894
ENZ	1	3.3015774	3.3015774	0.42	0.5256
ALF*ENZ	2	35.2829089	17.6414545	2.25	0.1377

Dependent Variable: Coeficiente de Digestibilidad de Materia Seca.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	37	1630.85203	44.07708	6.04	0.0001
Error	26	189.88419	7.30324		
Corrected Total	63	1820.73621			
	R-Square	C.V.	Root MSE		CDMS Mean
	0.895710	3.512263	2.70245		76.9433

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	11.63395	3.87798	0.53	0.6650
ALF	2	4.80757	2.40379	0.33	0.7225
ENZ	1	13.49506	13.49506	1.85	0.1857
ALF*ENZ	2	6.74924	3.37462	0.46	0.6351
ANIMAL (BLQ*ALF*ENZ)	23	277.80887	12.07865	1.65	0.1078
PER	1	1257.80510	1257.80510	172.23	0.0001
ALF*PER	2	10.24669	5.12335	0.70	0.5050
ENZ*PER	1	0.62313	0.62313	0.09	0.7725
ALF*ENZ*PER	2	12.25302	6.12651	0.84	0.4436

Tests of Hypotheses using the Type III MS for ANIMAL(BLQ*ALF*ENZ) as an error term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ALF	2	4.8075733	2.4037866	0.20	0.8209
ENZ	1	13.4950565	13.4950565	1.12	0.3015
ALF*ENZ	2	6.7492444	3.3746222	0.28	0.7588

Dependent Variable: Coeficiente de Digestibilidad de Proteína.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	37	2714.46383	73.36389	7.37	0.0001
Error	26	258.89711	9.95758		
Corrected Total	63	2973.36094			
	R-Square	C.V.	Root MSE		CDPC Mean
	0.912928	4.139207	3.15556		76.2359

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	6.43924	2.14641	0.22	0.8847
ALF	2	29.70818	14.85409	1.49	0.2436
ENZ	1	14.98826	14.98826	1.51	0.2309
ALF*ENZ	2	59.77172	29.88586	3.00	0.0672
ANIMAL (BLQ*ALF*ENZ)	23	546.20348	23.74798	2.38	0.0170
PER	1	1919.08570	1919.08570	192.73	0.0001
ALF*PER	2	32.82964	16.41482	1.65	0.2118
ENZ*PER	1	0.20570	0.20570	0.02	0.8868
ALF*ENZ*PER	2	14.12961	7.06481	0.71	0.5012

Tests of Hypotheses using the Type III MS for ANIMAL(BLQ*ALF*ENZ) as an error term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ALF	2	29.7081763	14.8540882	0.63	0.5439
ENZ	1	14.9882600	14.9882600	0.63	0.4351
ALF*ENZ	2	59.7717163	29.8858581	1.26	0.3029

Dependent Variable: Coeficiente de Digestibilidad de FDN.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	37	10257.1298	277.2197	3.67	0.0005
Error	26	1964.3722	75.5528		
Corrected Total	63	12221.5019			
	R-Square	C.V.	Root MSE		CDFDN Mean
	0.839269	16.95303	8.69211		51.2717

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	395.78629	131.92876	1.75	0.1822
ALF	2	428.37250	214.18625	2.83	0.0770
ENZ	1	227.43056	227.43056	3.01	0.0946
ALF*ENZ	2	19.77821	9.88911	0.13	0.8779
ANIMAL (BLQ*ALF*ENZ)	23	1628.19765	70.79120	0.94	0.5599
PER	1	7160.29324	7160.29324	94.77	0.0001
ALF*PER	2	233.72249	116.86125	1.55	0.2319
ENZ*PER	1	41.03532	41.03532	0.54	0.4677
ALF*ENZ*PER	2	236.42890	118.21445	1.56	0.2282

Tests of Hypotheses using the Type III MS for ANIMAL(BLQ*ALF*ENZ) as an error term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ALF	2	428.372501	214.186250	3.03	0.0682
ENZ	1	227.430563	227.430563	3.21	0.0862
ALF*ENZ	2	19.778214	9.889107	0.14	0.8704

Dependent Variable: Longitud De Papilas Ruminales En Saco Ventral (mm)

		Sum of	Mean		
Source	DF	Squares	Square	F Value	Pr > F
Model	8	1402095.15	175261.89	0.90	0.5593
Error	8	1563254.37	195406.80		
Corrected Total	16	2965349.52			
	R-Square	C.V.	Root MSE		AV Mean
	0.472826	22.95843	442.048		1925.43

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	1131944.75	377314.92	1.93	0.2032
ALF	2	106240.77	53120.38	0.27	0.7687
ENZ	1	101962.83	101962.83	0.52	0.4906
ALF*ENZ	2	61946.80	30973.40	0.16	0.8560

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	799601.524	266533.841	1.36	0.3215
ALF	2	91263.769	45631.885	0.23	0.7970
ENZ	1	92676.177	92676.177	0.47	0.5105
ALF*ENZ	2	61946.804	30973.402	0.16	0.8560

 Dependent Variable: Grosor De Papilas Ruminales En Saco Ventral (mm)

		Sum of	Mean		
Source	DF	Squares	Square	F Value	Pr > F
Model	8	59239.4853	7404.9357	1.43	0.3138
Error	8	41542.1317	5192.7665		
Corrected Total	16	100781.6170			
	R-Square	C.V.	Root MSE		ANV Mean
	0.587801	28.82956	72.0609		249.955

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	15752.8244	5250.9415	1.01	0.4367
ALF	2	15881.6796	7940.8398	1.53	0.2739
ENZ	1	19711.6853	19711.6853	3.80	0.0872
ALF*ENZ	2	7893.2960	3946.6480	0.76	0.4987

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	12673.2502	4224.4167	0.81	0.5214
ALF	2	16000.4192	8000.2096	1.54	0.2716
ENZ	1	18032.6188	18032.6188	3.47	0.0994
ALF*ENZ	2	7893.2960	3946.6480	0.76	0.4987

Dependent Variable: Longitud De Papilas Ruminales En Saco Dorsal (mm)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	676482.017	84560.252	1.60	0.2755
Error	7	370654.025	52950.575		
Corrected Total	15	1047136.042			
	R-Square	C.V.	Root MSE		AD Mean
	0.646031	36.41423	230.110		631.923

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	360033.513	120011.171	2.27	0.1680
ALF	2	212697.519	106348.760	2.01	0.2045
ENZ	1	34622.546	34622.546	0.65	0.4453
ALF*ENZ	2	69128.439	34564.220	0.65	0.5496

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	441677.295	147225.765	2.78	0.1198
ALF	2	184944.695	92472.347	1.75	0.2425
ENZ	1	45162.276	45162.276	0.85	0.3865
ALF*ENZ	2	69128.439	34564.220	0.65	0.5496

 Dependent Variable: Grosor De Papilas Ruminales En Saco Ventral (mm)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	20095.6002	2511.9500	1.50	0.3033
Error	7	11723.9248	1674.8464		
Corrected Total	15	31819.5250			
	R-Square	C.V.	Root MSE		AND Mean
	0.631549	13.70312	40.9249		298.654

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	17523.2733	5841.0911	3.49	0.0787
ALF	2	539.3859	269.6929	0.16	0.8543
ENZ	1	1947.5561	1947.5561	1.16	0.3166
ALF*ENZ	2	85.3850	42.6925	0.03	0.9749

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	7038.99336	2346.33112	1.40	0.3201
ALF	2	542.46666	271.23333	0.16	0.8536
ENZ	1	2011.95263	2011.95263	1.20	0.3093
ALF*ENZ	2	85.38497	42.69248	0.03	0.9749

Dependent Variable: Peso Del Estomago Lleno

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	103.165989	12.895749	0.74	0.6588
Error	9	156.778455	17.419828		
Corrected Total	17	259.944444			
	R-Square	C.V.	Root MSE		EST Mean
	0.396877	15.72347	4.17371		26.5444

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	51.3680556	17.1226852	0.98	0.4431
ALF	2	16.3296078	8.1648039	0.47	0.6403
ENZ	1	0.0335650	0.0335650	0.00	0.9659
ALF*ENZ	2	35.4347609	17.7173804	1.02	0.3997

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	42.0548780	14.0182927	0.80	0.5222
ALF	2	11.5131790	5.7565895	0.33	0.7270
ENZ	1	0.3509307	0.3509307	0.02	0.8903
ALF*ENZ	2	35.4347609	17.7173804	1.02	0.3997

 Dependent Variable: Peso Del Rumén-Reticulo Vacío

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	1.79297392	0.22412174	0.59	0.7668
Error	9	3.42945386	0.38105043		
Corrected Total	17	5.22242778			
	R-Square	C.V.	Root MSE		RURE Mean
	0.343322	15.21883	0.61729		4.05611

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	0.55354722	0.18451574	0.48	0.7015
ALF	2	0.00861503	0.00430752	0.01	0.9888
ENZ	1	0.37400354	0.37400354	0.98	0.3477
ALF*ENZ	2	0.85680812	0.42840406	1.12	0.3666

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	0.21147947	0.07049316	0.18	0.9039
ALF	2	0.01159412	0.00579706	0.02	0.9849
ENZ	1	0.26569482	0.26569482	0.70	0.4253
ALF*ENZ	2	0.85680812	0.42840406	1.12	0.3666

Dependent Variable: Peso Del Abomaso Vacío

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	0.05524695	0.00690587	0.59	0.7663
Error	9	0.10555305	0.01172812		
Corrected Total	17	0.16080000			
	R-Square	C.V.	Root MSE		ABO Mean
	0.343576	15.11113	0.10830		0.71667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	0.01616944	0.00538981	0.46	0.7173
ALF	2	0.00013470	0.00006735	0.01	0.9943
ENZ	1	0.01148804	0.01148804	0.98	0.3482
ALF*ENZ	2	0.02745476	0.01372738	1.17	0.3533

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	0.00598028	0.00199343	0.17	0.9140
ALF	2	0.00020554	0.00010277	0.01	0.9913
ENZ	1	0.00811844	0.00811844	0.69	0.4269
ALF*ENZ	2	0.02745476	0.01372738	1.17	0.3533

 Dependent Variable: Peso Del Omaso Vacío

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	0.06148327	0.00768541	0.18	0.9883
Error	9	0.38842785	0.04315865		
Corrected Total	17	0.44991111			
	R-Square	C.V.	Root MSE		OMA Mean
	0.136656	24.50484	0.20775		0.84778

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	0.01468889	0.00489630	0.11	0.9500
ALF	2	0.00222451	0.00111226	0.03	0.9746
ENZ	1	0.02303313	0.02303313	0.53	0.4836
ALF*ENZ	2	0.02153674	0.01076837	0.25	0.7844

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	0.00323882	0.00107961	0.03	0.9943
ALF	2	0.00269550	0.00134775	0.03	0.9694
ENZ	1	0.01818751	0.01818751	0.42	0.5324
ALF*ENZ	2	0.02153674	0.01076837	0.25	0.7844

Dependent Variable: Viscosidad En Rumen (centipoises)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	0.42764228	0.05345528	0.12	0.9966
Error	9	3.95235772	0.43915086		
Corrected Total	17	4.38000000			
	R-Square	C.V.	Root MSE		RUM Mean
	0.097635	13.16592	0.66268		5.03333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	0.06611111	0.02203704	0.05	0.9842
ALF	2	0.00135670	0.00067835	0.00	0.9985
ENZ	1	0.02546188	0.02546188	0.06	0.8151
ALF*ENZ	2	0.33471259	0.16735629	0.38	0.6936

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	0.05430894	0.01810298	0.04	0.9881
ALF	2	0.00597432	0.00298716	0.01	0.9932
ENZ	1	0.04878263	0.04878263	0.11	0.7465
ALF*ENZ	2	0.33471259	0.16735629	0.38	0.6936

 Dependent Variable: Viscosidad En Abomaso (centipoises)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	0.87522358	0.10940295	1.04	0.4742
Error	9	0.94977642	0.10553071		
Corrected Total	17	1.82500000			
	R-Square	C.V.	Root MSE		ABO Mean
	0.479575	8.155353	0.32485		3.98333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	0.45833333	0.15277778	1.45	0.2926
ALF	2	0.21293276	0.10646638	1.01	0.4024
ENZ	1	0.12373391	0.12373391	1.17	0.3070
ALF*ENZ	2	0.08022358	0.04011179	0.38	0.6943

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	0.28355691	0.09451897	0.90	0.4801
ALF	2	0.17626395	0.08813197	0.84	0.4648
ENZ	1	0.10544288	0.10544288	1.00	0.3436
ALF*ENZ	2	0.08022358	0.04011179	0.38	0.6943

Dependent Variable: Viscosidad En Intestino (centipoises)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	1.98030488	0.24753811	0.42	0.8846
Error	9	5.35969512	0.59552168		
Corrected Total	17	7.34000000			
	R-Square	C.V.	Root MSE	INTES Mean	
	0.269796	16.30353	0.77170	4.73333	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	0.80583333	0.26861111	0.45	0.7228
ALF	2	0.39373748	0.19686874	0.33	0.7269
ENZ	1	0.66940054	0.66940054	1.12	0.3167
ALF*ENZ	2	0.11133352	0.05566676	0.09	0.9116

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLQ	3	1.37363821	0.45787940	0.77	0.5398
ALF	2	0.39860586	0.19930293	0.33	0.7241
ENZ	1	0.72719084	0.72719084	1.22	0.2978
ALF*ENZ	2	0.11133352	0.05566676	0.09	0.9116
