



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA EL USO DEL
RONOZYME PROACT EN LA PRODUCCIÓN PORCINA**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

CINTYA LUJÁN OROZCO

**TUTOR: GERARDO MARISCAL LANDÍN
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**COMITÉ TUTOR:
MARCO ANTONIO HERRADORA LOZANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
CÉSAR AUGUSTO MEJÍA GUADARRAMA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

MÉXICO, D. F.; OCTUBRE 2014.



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.

Dedicatorias.

Quiero dedicar este trabajo a las personas más importantes que llenan mi vida...

A mis padres, Ignacio [†] y Dalila por todo lo que soy y todo lo que tengo.

A mis hermanos, Joel y Yessi [†] por su motivación incondicional.

A mis sobrinos, Michelle y Sebastian por alegrar mis días.

A Román, por acompañar mis pasos.

Los amo.

A Dios.

*Lo hago porque puedo,
puedo porque quiero,
y quiero porque me dijeron que no podía.*

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

Al Dr. Gerardo Mariscal, por su paciencia hacia mi persona, su confianza como tutor y el tiempo dedicado a este trabajo.

Al comité tutor, Dr. Gerardo Mariscal, Dr. Marco Herradora y Dr. César Mejía, por la orientación académica.

A mis profesores del posgrado.

A DSM Nutritional Products México.

A Lety Jiménez por su amistad.

A Víctor, por su excelencia como compañero y su invaluable apoyo en el desarrollo de este experimento.

Al personal del Laboratorio de Nutrición: los químicos Ericka, Gaby y Alan. A Jesenia, Don José, Felipe y Toño por enseñarme todas las técnicas.

Al personal de la Granja y Planta de Alimentos: Arturo, Arnulfo[†] y Toño. A Mario, Vicente, Miguel, Fredy y Emiliano por facilitar mi trabajo con los cerdos.

A mi familia y amigos, por tolerar incondicionalmente mi ausencia y locura durante todo el tiempo que llevó este proyecto.

A Román, por todo.

Resumen.

La gama de aplicaciones de las enzimas les permite ser una alternativa para mejorar la eficiencia de las raciones alimenticias. Existen en el mercado proteasas exógenas utilizadas en la alimentación del cerdo sin información suficiente sobre su impacto en el valor nutritivo de un ingrediente. El objetivo del presente trabajo fue medir el efecto de una proteasa sobre la digestibilidad ileal aparente (DIA) y digestibilidad verdadera (DIV) y estandarizada (DIE) de aminoácidos en maíz, sorgo, trigo, pasta de soya y pasta de canola, y determinar el efecto de esta proteasa en presencia de una carbohidrasa y fitasa en dietas sorgo-canola. En el primer experimento con cada ingrediente se elaboraron dos dietas con y sin proteasa, el diseño cross-over permitió asignar tres cerdos canulados a nivel del íleon distal por tratamiento y contar con seis repeticiones en total. En el segundo experimento se utilizó un total de 20 cerdos en dos bloques, asignados a cinco tratamientos para medir el efecto aditivo de las enzimas mediante un balance de nitrógeno. Los resultados indican un efecto positivo al uso de la proteasa ($P < 0.05$) sobre la DIA y DIE de Gly en maíz, PC, Lys y Phe en pasta de soya y Ser, Ala y Tyr en pasta de canola, pero un efecto negativo en Met en maíz, PC y Leu en sorgo, Cys en pasta de soya y Val en pasta de canola. La enzima mejoró ($P < 0.05$) la digestibilidad fecal aparente (DFA) de PC en pasta de soya y MS, PC y Energía en pasta de canola. No hubo resultado que mostrara la aditividad o sinergia de utilizar enzimas conjuntas en el segundo experimento. La actividad de una enzima puede ser diferente en cada ingrediente debido al arreglo espacial específico que poseen los nutrientes dentro de este. Los datos sugieren que esta proteasa puede tener un valor de oportunidad al adicionarse a la pasta de soya porque mejora la digestibilidad de Lys, primer aminoácido limitante en la síntesis de proteína muscular.

Palabras clave: cerdos, proteasa, digestibilidad, aminoácidos, pasta de soya, enzima.

Abstract.

The range of applications of enzymes allows them to be an alternative to improve the efficiency of feed rations. There are commercially exogenous proteases used in pig nutrition without sufficient information on their impact on the nutritional value of an ingredient. The aim of this study was to measure the effect of a protease on the apparent, true and standardized ileal digestibility (AID, TID, SID) of amino acids in corn, sorghum, wheat, soybean meal and canola meal. And determine the effect of this protease in the presence of a carbohydrase and phytase in sorghum –canola diets. In the first experiment with each ingredient were prepared two diets with and without protease, cross-over design allowed us to assign three cannulated pigs in distal ileum for each treatment and have six repetitions in total. In the second experiment, we used a total of 20 pigs in two blocks assigned to five treatments to measure the additive effect of the enzymes using a nitrogen balance. The results indicate a positive effect of protease ($P < 0.05$) on the AID and SID in Gly corn, CP, Lys and Phe in soybean meal and Ser, Ala and Tyr in canola meal, but negative effect on Met corn, CP and Leu sorghum, Cys in soybean meal and Val canola meal. The enzyme improved ($P < 0.05$) in the Apparent Fecal Digestibility of CP soybean and DM, CP and Energy in canola meal. Results showed no additivity or synergy of using enzymes together in the second experiment. The activity of an enzyme could be different because each ingredient has a specific spatial arrangement of nutrients. The data suggest that this protease can have an opportunity value to be added to the soybean meal because it improves Lys digestibility, first limiting amino acid in muscle protein synthesis.

Keywords: swine, protease, digestibility, amino acids, soybean meal, enzyme.

INDICE GENERAL

Resumen	1
Abstract.....	2
INDICE GENERAL	3
Indice de cuadros	5
Indice de figuras.....	7
I. INTRODUCCIÓN.....	8
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	10
2.1 USO DE ENZIMAS.....	10
2.1.1 HISTORIA DE LA ENZIMOLOGÍA INDUSTRIAL.....	10
2.1.2 ENZIMAS.....	11
2.1.3 PROTEASAS Y CLASIFICACIÓN.....	12
2.1.4 ENZIMAS EN LA ALIMENTACIÓN DEL CERDO.....	13
2.1.5 RONOZYME PROACT®.....	14
2. 2 LAS MATERIAS PRIMAS.....	17
2.2.1 LOS CEREALES.....	19
2.2.1.1 Maíz.....	20
2.2.1.2 Sorgo.....	22
2.2.1.3 Trigo.....	23
2.2.2 LAS PASTAS DE OLEAGINOSAS.....	25
2.2.2.1 Pasta de soya.....	25
2.2.2.2 Pasta de canola.....	28
2.3 DIGESTIBILIDAD.....	31
2.3.1 PÉRDIDAS DE NITRÓGENO ENDÓGENO.....	32
2.3.2 CONCEPTO DE DIGESTIBILIDAD.....	36
2.3.2.1 Medición de la digestibilidad.....	36
2.3.3 MÉTODOS PARA DETERMINAR DIGESTIBILIDAD.....	37
2.3.3.1 Digestibilidad Aparente de Aminoácidos.....	37
2.3.3.2 Digestibilidad Verdadera de Aminoácidos.....	39
2.3.3.3 Digestibilidad Estandarizada de Aminoácidos.....	40
III. OBJETIVOS.....	43
IV. HIPÓTESIS.....	44
V. MATERIALES Y METODOS.....	45
5.1. EXPERIMENTO: DETERMINACIÓN DE DIGESTIBILIDAD ILEAL Y FECAL.....	45
5.1.1 TRATAMIENTOS.....	45

5.1.2 DIETAS.....	45
5.1.3 ANIMALES.	48
5.1.4 PERIODO EXPERIMENTAL Y RECOLECCIÓN DE LA MUESTRAS.	48
5.2. EXPERIMENTO: BALANCE DE NITRÓGENO.	49
5.2.1 TRATAMIENTOS.	49
5.2.2 DIETAS.....	50
5.2.3 ANIMALES.	51
5.2.4 PERIODO EXPERIMENTAL Y RECOLECCIÓN DE LA MUESTRAS.	52
5.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS QUÍMICOS.	52
5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	53
5.4.1 EXPERIMENTO: DETERMINACIÓN DE DIGESTIBILIDAD ÍLEAL Y FECAL.	53
5.4.1.1 Coeficientes de digestibilidad.	53
5.4.2 EXPERIMENTO: BALANCE DE NITRÓGENO.	54
<u>VI. RESULTADOS.....</u>	<u>57</u>
6.1 EXPERIMENTO: DETERMINACIÓN DE DIGESTIBILIDAD ÍLEAL Y FECAL.	57
6.1.1 MAÍZ.....	58
6.1.2 SORGO.	60
6.1.3 TRIGO.	61
6.1.4 PASTA DE SOYA.....	63
6.1.5 PASTA DE CANOLA.	65
6.1.6 DIGESTIBILIDAD FECAL APARENTE DE LOS INGREDIENTES.....	67
6.2. EXPERIMENTO: BALANCE DE NITRÓGENO.	68
<u>VII. DISCUSIÓN.</u>	<u>70</u>
7.1. EXPERIMENTO: DETERMINACIÓN DE DIGESTIBILIDAD ÍLEAL Y FECAL.	70
7.2 EXPERIMENTO: BALANCE DE NITRÓGENO.	77
<u>VIII. CONCLUSIONES.....</u>	<u>80</u>
<u>IX. LITERATURA CITADA.....</u>	<u>81</u>

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química de los ingredientes utilizados para elaborar las dietas experimentales.	46
Cuadro 2. Composición porcentual de las dietas experimentales y de la dieta control Caseína y análisis químico para las dietas con y sin la inclusión de Ronozyme ProAct en las dietas de Maíz, Sorgo, Trigo, Pasta de Soya y Pasta de Canola.....	47
Cuadro 3. Nivel de inclusión en partes por millón (ppm) de las enzimas a evaluar por tratamiento para el experimento Balance de Nitrógeno.....	50
Cuadro 4. Composición porcentual y análisis químico de las dietas mixtas sorgo-pasta de canola del Experimento Balance de Nitrógeno.....	51
Cuadro 5. Perfil de Proteína Cruda y Aminoácidos de las materias primas utilizadas Caseína, Maíz, Sorgo, Trigo, Pasta de soya y Pasta de canola.....	57
Cuadro 6. Coeficientes de digestibilidad ileal aparente con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Maíz.	58
Cuadro 7. Coeficientes de digestibilidad ileal verdadera con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Maíz.	59
Cuadro 8. Coeficientes de digestibilidad ileal aparente con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Sorgo.....	60
Cuadro 9. Coeficientes de digestibilidad ileal verdadera con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Sorgo.....	61
Cuadro 10. Coeficientes de digestibilidad ileal aparente con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Trigo.	62
Cuadro 11. Coeficientes de digestibilidad ileal verdadera con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Trigo.	63
Cuadro 12. Coeficientes de digestibilidad ileal aparente con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Pasta de Soya.	64
Cuadro 13. Coeficientes de digestibilidad ileal estandarizada con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Pasta de Soya.	65
Cuadro 14. Coeficientes de digestibilidad ileal aparente con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Pasta de Canola.....	66
Cuadro 15. Coeficientes de digestibilidad ileal estandarizada con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Pasta de Canola.....	67

Cuadro 16. Coeficientes de digestibilidad fecal aparente de la Materia Seca, Proteína y Energía con y sin la inclusión de Ronozyme ProAct® para los ingredientes Maíz, Pasta de Soya, Sorgo, Pasta de Canola y Trigo. 68

Cuadro 17. Resultados del Balance de Nitrógeno y Digestibilidad de la Energía para las dietas con diferente inclusión de las enzimas proteasa, fitasa y glucanasa. 69

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación tridimensional de una partícula de Ronozyme ProAct®.	15
Figura 2. Representación esquemática de un corte longitudinal de a) maíz, b) sorgo y c) trigo..	19
Figura 3. Micrografía (a) y Representación esquemática (b) del patrón de desarrollo de los cuerpos proteicos del endospermo del maíz	21
Figura 4. Micrografía electrónica de las células del endospermo del maíz.....	22
Figura 5. (a) Micrografía electrónica de barrido de la porción del endospermo vítreo del sorgo. (b) Micrografía electrónica de transmisión de los cuerpos proteicos de un genotipo normal.....	23
Figura 6. Micrografía electrónica de los componentes aislados del endospermo de trigo	24
Figura 7. Micrografías electrónicas de secciones de las células de los cotiledones de una semilla de soya de Nigeria (a) y una semilla estadounidense (b).	27
Figura 8. (a) Representación esquemática de una pared celular (Tipo II). (b) Micrografía electrónica de las microfibrillas de celulosa de una pared celular	30
Figura 9. Origen de los aminoácidos presentes en la digesta ileal.....	35
Figura 10. Influencia del contenido de aminoácidos dietarios sobre el valor de la digestibilidad aparente, estandarizada y verdadera	42
Figura 11. Cronograma del periodo quirúrgico y fase de recuperación post-quirúrgica, así como periodos experimentales (Experimento: Determinación de Digestibilidad Ileal y Fecal).....	49

DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA EL USO DEL RONOZYME PROACT EN LA PRODUCCIÓN PORCINA.

I. INTRODUCCIÓN.

Desde los años noventa se aprecia un aumento consistente en el empleo de productos resultantes de la biotecnología, como aditivos en la alimentación animal. De entre todos estos aditivos, las enzimas pueden considerarse como uno en los que más progresos se han realizado, junto al masivo empleo de aminoácidos cristalinos.

Hay que recordar el amplio número de aplicaciones que las enzimas exógenas pueden tener: mejoran la digestibilidad de polisacáridos no amiláceos (Campbell y Bedford, 1992), mejoran la digestibilidad de nutrientes del alimento como energía metabolizable y proteína (Friesen *et al.*, 1991), complementan las enzimas propias del animal como en el caso de lechones recién destetados donde la producción de enzimas pancreáticas resulta limitada (Lindemman *et al.*, 1986), inactivan, destruyen y/o degradan factores antinutricionales; un ejemplo son los fitatos, que no sólo tienen baja disponibilidad, sino también pueden afectar otros eventos durante la digestión, debido a la precipitación de otros nutrientes como calcio (Nelson y Kirby, 1987), zinc (Keith y Bell, 1987) y proteína (Lathia *et al.*, 1987).

Hoy en día, los precios internacionales alcanzados por los granos forrajeros y las pastas de oleaginosas podrían mostrar fluctuaciones con tendencia a la alza; sin embargo, se estima que en el futuro próximo sus valores seguirán siendo altos. Esta situación genera un aumento significativo en los costos de alimentación de las especies productivas y obliga a los nutriólogos a buscar diversas alternativas que permitan mejorar la eficiencia en el uso de las raciones alimenticias.

En este sentido, el uso de algunas enzimas exógenas puede mejorar la digestibilidad de las dietas y también reducir los efectos dañinos de algunos de los factores antinutricionales presentes en las fuentes de proteínas vegetales. La mayoría de los esfuerzos de las investigaciones en el campo de las enzimas se han orientado a mejorar la digestibilidad de los cereales que podrían reemplazar al maíz en las raciones alimenticias de los animales; sin embargo, existe un gran potencial en mejorar la digestibilidad de las pastas de oleaginosas, en particular de la pasta de soya.

Algunas áreas específicas de producción han aportado mejoras en relación con el manejo de los animales como la genética, reproducción, programas de prevención y salud, por mencionar algunos. Sin embargo, existen áreas donde la introducción de la tecnología resulta un poco más complicada. Esto obedece principalmente a los costos que esto genera. Aun así, los avances en ingeniería genética han permitido introducir las cualidades deseadas en las enzimas para la alimentación animal (Campbell y Bedford, 1992). Además, con adecuadas investigaciones las enzimas podrían combinarse para examinar las potenciales interacciones que existen entre ellas.

La utilización de enzimas en la nutrición de cerdos, puede ser una buena alternativa como aditivo en raciones formuladas con materias primas tradicionales con el fin de mejorar la digestibilidad de los nutrientes, incrementar la absorción de los mismos y de esta manera aumentar la productividad de los animales dentro de las unidades de producción porcina.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 Uso de enzimas.

Los altos precios de los ingredientes para consumo animal afectan la rentabilidad de las unidades de producción porcina, por lo que la parte de la rentabilidad dependerá del abaratamiento de los costos de las raciones nutricionales sin afectar el perfil nutricional de estas, además de mejorar los parámetros productivos. El empleo de enzimas en las dietas de monogástricos parece ser una excelente opción.

Los nutricionistas no pueden influir en los costos de los ingredientes ni en el precio a mercado del cerdo, pero sí en la productividad del animal aplicando adecuadamente la tecnología, ya que el cerdo es incapaz de digerir el cien por ciento de la ración, por la deficiente o nula producción de algunas enzimas necesarias para la degradación de factores antinutricionales (Bedford y Schulze, 1998), por ejemplo, los β -glucanos de la cebada y los xilanos del trigo, o los compuestos fibrosos; ya que carece de las enzimas necesarias para digerir esos enlaces.

2.1.1 Historia de la enzimología industrial.

La industrialización de enzimas comenzó hace más de 2000 años, con el uso de enzimas en procesos de fermentación como la fabricación de quesos, alcohol, vino y cerveza. En 1833, Anselme Payen y Jean François Persoz informaron sobre un factor reutilizable al que llamaron diastasa (actualmente amilasa), obtenido a partir de extractos de malta que convertía el almidón en azúcar (Bennett y Armstrong, 1982).

En los años siguientes, Theodor Schwann consiguió la extracción de la pepsina a partir del jugo gástrico, más tarde se identificó la tripsina. En 1837, Jons Berzelius reconoció que en animales y plantas ocurren miles de procesos catalíticos. Aunque fue hasta 1876 que Wilhelm Kühne propuso el nombre de enzima para un catalizador biológico (Bennett y Armstrong, 1982).

A partir de este descubrimiento y de diversos substratos se empezaron a extraer enzimas muy diversas y con destinos diferentes que hicieron que su empleo se extendiera a diversas ramas de la industria, tales como detergentes, fabricación del papel, fabricación textil, tratamiento de cueros, farmacia, destilería, aceites y grasas, almidones y azúcares, etc. (Mitra *et al.*, 1996).

En 1882 se introdujo el concepto enzima-sustrato, como intermediario del proceso de catálisis enzimática. Emil Fisher desarrolló el concepto de especificidad de las enzimas por sus sustratos en 1894, mediante el modelo analógico “llave y cerradura” para la interacción de una enzima y sustrato.

Más recientemente, Daniel Koshland propuso una modificación al modelo llave-cerradura, sugiriendo el modelo de encaje inducido, donde no considera el sitio de fijación de la enzima como una estructura rígida sino como una estructura que cambia su conformación como consecuencia de la fijación del sustrato produciendo un encaje preciso enzima-sustrato (Bennett y Armstrong, 1982).

En 1913, Leonor Michaelis y Maud Menton desarrollaron esta teoría y propusieron una ecuación de velocidad que explica el comportamiento cinético de los enzimas. Además plantearon la expresión matemática que describe cuantitativamente el comportamiento cinético del complejo enzima sustrato (Gentry *et al.*, 2002.).

No fue hasta 1926, con la cristalización de la ureasa por Sumner que se reconoció la naturaleza proteica de las enzimas (Bennett y Armstrong, 1982).

Uno de los mayores impactos en la nutrición animal durante las últimas dos décadas ha sido el uso de enzimas exógenas. El propósito de usar enzimas es reducir el efecto de compuestos antinutricionales presentes en los ingredientes. Estos compuestos no son modificados mayormente en el tracto de los monogástricos y por lo tanto afectan la viscosidad de la digesta y la microflora intestinal. El uso de enzimas induce una mayor digestibilidad de los nutrientes y por lo tanto eficientiza la conversión alimenticia y la tasa de crecimiento (Bedford, 1993).

2.1.2 Enzimas.

Las enzimas son compuestos orgánicos, de naturaleza proteica, que actúan como catalizadores biológicos de los procesos digestivos y metabólicos. Estos incluyen todas las reacciones de síntesis y digestión – degradación que ocurren en el animal, convirtiendo a las enzimas en el motor que mueve la actividad de todas las células del organismo; controlando así, todas las funciones de mantenimiento, crecimiento y

reproducción de los animales. Se caracterizan por su marcada especificidad debido a que existe una forma de enzima particular para cada tipo de sustrato.

Las enzimas son biocatalizadores que incrementan la reacción hasta un millón de veces a la velocidad que ocurriría espontáneamente, producidas por células vivas y ocasionan reacciones bioquímicas específicas, formando parte del proceso metabólico de las células. Poseen un pH y temperatura óptimos para su actividad (Bedford, 2000).

Esto ayuda para ejercer efectos específicos sobre la digestibilidad de algún nutriente en particular (proteínas, péptidos, carbohidratos, lípidos), sin afectar al resto. Al facilitarle al animal la digestión del alimento mediante el efecto hidrolítico que tienen; las enzimas, mejoran la biodisponibilidad y la absorción de los nutrientes en el tracto digestivo, resultando en un ahorro de energía que se refleja en una mejor conversión y ganancia de peso; con el consiguiente impacto favorable en los costos.

2.1.3 Proteasas y Clasificación.

Las proteasas efectúan la hidrólisis de proteínas y se dividen en endopeptidasas y exopeptidasas.

Las endopeptidasas (proteasas naturales: tripsina, quimiotripsina y elastasa) rompen los enlaces internos de las moléculas de proteínas produciendo fragmentos de proteína (péptidos). Este grupo de enzimas posee especificidad por residuos de aminoácidos, rompiendo los enlaces covalentes en los sitios donde se encuentran sus aminoácidos preferidos (Gardner, 1984).

Las exopeptidasas liberan uno a uno los aminoácidos de los fragmentos de proteínas resultantes de la acción de las endopeptidasas. Así, la digestión de las proteínas en el intestino delgado del animal se efectúa en forma secuencial y simultánea.

2.1.4 Enzimas en la alimentación del cerdo.

La utilización de enzimas en la nutrición de cerdos, puede ser una buena alternativa como aditivo en raciones formuladas con materias primas tradicionales con el fin de mejorar la digestibilidad de los alimentos e incrementar la productividad. Los principales factores que pueden influir en la respuesta potencial de las enzimas en cerdos son la anatomía gastrointestinal, capacidad digestiva y características de la digesta; así como el tipo de enzima y dosis aplicada (Ravindran, 2010).

Algunas de las respuestas positivas al uso de enzimas exógenas sobre el consumo voluntario de alimento podrían deberse a la influencia sobre la tasa de flujo de la digesta, así como a la mejora en digestibilidad y disponibilidad de nutrientes en el intestino delgado (Bedford y Partridge, 2001). Además el tratamiento de la dieta o de los ingredientes individuales con enzimas puede incrementar la digestibilidad total de la dieta y reducir la variabilidad de los ingredientes, al permitir un mejor acceso de las enzimas a los nutrientes encapsulados (Bedford, 1996).

Al principio se emplearon enzimas provenientes de vísceras de animales (pepsinas, tripsinas, amilasas pancreáticas), la ficina del árbol de higo (proteasa) y la papaína proveniente de la papaya (proteasa) (Ovchinnikov y Kalashnikova, 2001). El desarrollo de nuevas técnicas analíticas y la disponibilidad comercial de nuevos sustratos, han conducido a la purificación y caracterización de un gran número de enzimas. Además, la introducción de la tecnología del ADN recombinante ha dado como resultado la selección de enzimas específicas que son más adecuados para aplicaciones industriales.

Esta gama de aplicaciones de las enzimas en la alimentación pueden ampliarse al mejorar la comprensión de los factores necesarios para optimizar la respuesta hacia sustratos específicos (Campbell y Bedford, 1992). Con el avance de la ingeniería genética, se han producido enzimas provenientes de bacterias (*Bacillus subtilis*) y algunas especies de hongos (*Aspergillus oryzae*), o levaduras (Sunna y Antranikian, 1997).

La información disponible relacionada con este concepto es muy limitada. En un estudio realizado por Cervantes *et al.* (2000), la adición de una proteasa fungal a

dietas sorgo – pasta de soya, bajas en proteína no tuvo efectos significativos. La falta de respuesta se atribuyó al hecho de que todas las dietas fueron formuladas para contener el 100% de lisina primer aminoácido limitante, con una suplementación de lisina sintética.

Es poco probable que la actividad de una enzima sea igual de eficaz en todos los ingredientes (Campbell y Bedford, 1992).

Actualmente existen en el mercado proteasas exógenas que pueden ser utilizadas en la alimentación de cerdos; sin embargo, no existe información suficiente sobre su impacto real en el valor nutritivo de una materia prima, por lo que es necesario generar esa información y así obtener el máximo beneficio de ellas.

Una consideración importante para seleccionar el tipo de enzima y emplearla en las dietas de los animales es la naturaleza de los sustratos donde está efectuará la hidrólisis, ya que los principales nutrientes de los ingredientes son almidón, proteínas, grasas y polisacáridos no amiláceos.

2.1.5 Ronozyme ProAct®.

Ronozyme ProAct® es una serina-proteasa expresada en el *Bacillus licheniformis*. Se trata de una proteasa purificada, granulada y recubierta con grasa vegetal para obtener una forma libre de polvo y un producto termoestable (Brugger *et al.*, 2009) (Figura 1).

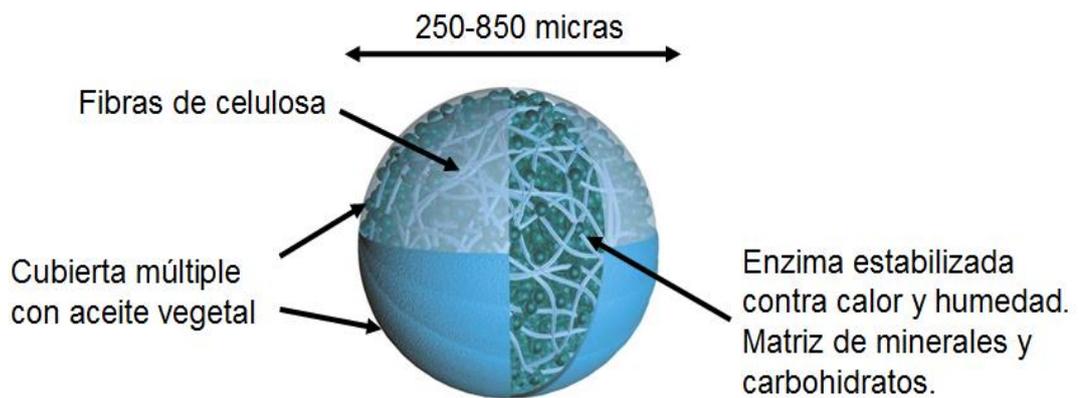


Figura 1. Representación tridimensional de una partícula de Ronozyme ProAct®. (Adaptada de Ronozyme ProAct® DSM, 2009). El 95% de las partículas tienen un diámetro de 250 a 850 micrómetros por lo que se considera una forma libre de polvo, la enzima se encuentra soportada por fibras de celulosa y posee una multicubierta de grasa vegetal.

Las serina-proteasas están clasificadas dentro de la familia de las endopeptidasas; son nombradas así por la reactividad del residuo de serina (Ser) localizado en el sitio activo, esencial para la función de la enzima. Este sitio activo de las serina-proteasas contiene tres aminoácidos críticos: serina, histidina y aspartato. De las serina-proteasas naturales presentes en el tracto gastrointestinal la quimiotripsina hidroliza los residuos aromáticos como fenilalanina, tirosina o triptófano; la tripsina en residuos básicos como lisina o arginina y la elastasa discrimina en menor grado pero tiene preferencia por los residuos hidrofóbicos como alanina.

La estabilidad de esta proteasa, fue originalmente seleccionada para mejorar la digestibilidad de los aminoácidos; además existe compatibilidad de esta proteasa con otras enzimas para la alimentación animal como la fitasa, amilasa, xilanasas y glucanasas. Campbell y Bedford (1992) señalan que la actividad de un complejo enzimático en una matriz compleja de ingredientes es probable que sea más eficaz que una sola enzima en un solo ingrediente; debido a que en su estado natural, los nutrientes no son entidades aisladas dentro de la materia prima sino que, existen como complejos con numerosos enlaces entre proteínas, grasas, fibra y otros carbohidratos.

Características de Ronozyme ProAct:

- Es estable en las premezclas y en el alimento, incluso tras los procesos de peletización. Aun cuando en condiciones secas, las enzimas son suficientemente estables, la estabilidad de las enzimas se pierde con la hidratación y pocas son las enzimas que soportan el proceso de peletización (Campbell y Bedford, 1992). Una forma de superar este problema es desarrollando enzimas estables al calor.
- Ha sido sometido a pruebas de estabilidad a temperatura ambiente, los resultados mostraron recuperaciones de la proteasa en dos premezclas después de 1 mes (99%), 3 meses (93%) y 6 meses (87%). En alimento peletizado a 70-80-90°C, se recuperó el 99%, 99% y 94%, de la enzima original respectivamente. El almacenamiento posterior a las pruebas de estabilidad después de los 3 meses a temperatura ambiente mostró pérdidas limitadas de menos de 10% de la actividad de la enzima (Brugger *et al.*, 2009).
- Esta enzima cataliza la hidrólisis de las proteínas alimenticias en péptidos y aminoácidos, complementando la acción de las enzimas digestivas; facilitando así la absorción y utilización de nutrientes. En un experimento realizado por Carvalho *et al.* (2009a), en aves de 14 a 21 días alimentadas con harina de carne y hueso como fuente proteínica se encontró que la digestibilidad aumentó con el uso de la enzima para los aminoácidos Aspartato (Asp), Glutamato (Glu), Serina (Ser), Histidina (His), Arginina (Arg), Treonina (Thr), Alanina (Ala), Prolina (Pro), Valina (Val), Metionina (Met), Cisteína (Cys), Fenilalanina (Phe) y Lisina (Lys) ($P < 0.05$), por lo que se llegó a la recomendación de usar 200 ppm del producto para incrementar la digestibilidad de estos aminoácidos.

En otro estudio (Carvalho *et al.*, 2009b) se midió la disponibilidad de la proteasa para aumentar la digestibilidad de aminoácidos en aves de 14 a 21 días de edad alimentadas con maíz, la suplementación con la proteasa aumento la digestibilidad de serina (Ser), glicina (Gly), treonina (Thr), prolina (Pro), cisteína (Cys), isoleucina (Ile) y aminoácidos totales.

- Al ser una proteasa no específica, aumenta la solubilización y degradación de una amplia gama de fuentes proteicas de los alimentos aumentando la flexibilidad en la formulación del alimento.
- Es estable a nivel intestinal. Las enzimas en la alimentación animal deben sobrevivir al pH bajo del tracto gastrointestinal, a las propias enzimas del tracto digestivo así como al calor y humedad derivado del procesamiento de los alimentos (Campbell y Bedford, 1992).

2.2 Las materias primas.

Hoy día, existe una lista considerablemente extensa de ingredientes que pueden ser incluidos en la formulación de raciones para animales, estos ingredientes bien sea los utilizados en forma tradicional o los que se han posicionado como ingredientes alternativos, debido a su precio de oportunidad o al aporte nutricional que ofrecen; es necesario someterlos a un proceso de control de calidad nutricional en la producción de alimentos, para que los nutrientes contenidos en ellos se expresen en el potencial productivo de los animales.

Además, las dietas formuladas con estas materias primas deberán ser económicamente competitivas; haciendo que la formulación de raciones se vuelva exigente no sólo en costos sino aportando los nutrientes de forma tan precisa que la síntesis de productos pecuarios sea maximizada, de tal forma que el impacto de la producción animal sobre el medio ambiente se minimice.

Adicionalmente, es particularmente favorable el hecho de combinar cereales con leguminosas en las raciones de alimentos, porque de esta forma la composición nutricional de la dieta se complementa, principalmente en aminoácidos esenciales, ya que los cereales tienden a ser ricos en aminoácidos azufrados y bajos en lisina, y lo contrario sucede con las semillas de leguminosas.

Sin embargo, de los cereales y pastas de oleaginosas utilizados tradicionalmente en la fabricación de alimentos para cerdos, es bien sabido que contienen factores antinutricionales que afectan de forma considerable la disponibilidad de los diferentes nutrimentos al paso por el tracto gastrointestinal; de tal manera que la digestibilidad de las materias primas será diferente debido a la presencia de tales factores o bien a la

cantidad y/o arreglo espacial que tengan los nutrientes dentro del ingrediente. Al respecto Rooney y Pflugfelder (1986) explican por ejemplo que la digestibilidad del almidón se ve afectada por la interacción almidón-proteína, la forma física de los gránulos, inhibidores como taninos e incluso el tipo de almidón.

La mayoría de los ingredientes usados en la alimentación de monogástricos contienen uno o varios factores antinutricionales (FAN) que afectan la biodisponibilidad de nutrientes. Los cereales y la pasta de soya contienen fitatos (principal almacén de fósforo en los ingredientes vegetales) que hacen indisponible al fósforo, calcio, zinc y hierro (Reddy y Sathé, 1992; Bell, 1993; Bedford, 1996). Existe una cantidad enorme de literatura que avala el uso de fitasas exógenas para aumentar significativamente la digestibilidad del fósforo, pero también la digestibilidad de otros minerales y proteínas (Bedford, 1996).

Además los granos contienen polisacáridos no amiláceos (PNA) como la celulosa y pentosas; el trigo y cebada contienen cantidades importantes de arabinosilanos y β -glucanos (Reddy y Sathé, 1992); los cuales tienen una alta resistencia a la acción de las enzimas. Por otra parte, algunas variedades de sorgo contienen niveles considerables de taninos.

En un estudio realizado en el 2001 por Jondreville *et al.*, observaron que el sorgo provocó una mayor excreción de proteína endógena respecto al maíz, trigo, centeno, cebada y triticale; además el contenido de FDN también puede incrementar la excreción de nitrógeno endógeno (Mariscal-Landín *et al.*, 1995); lo cual cambia la digestibilidad de los nutrientes, principalmente aminoácidos. En este sentido, también se encuentran los taninos que incrementan la excreción del nitrógeno endógeno debido al aumento en la secreción de saliva, dado que ésta contiene una proteína rica en prolina (PRP) (Jansman, 1993) que sirve como primer barrera de defensa a la presencia de taninos en la dieta (Mehansho *et al.*, 1985).

La adición de enzimas permite eliminar o reducir los factores antinutricionales de los ingredientes e incrementar su valor nutricional en las dietas. Sin embargo la escala de respuesta que puede ser esperada al uso de enzimas exógenas es dependiente de la calidad inicial del ingrediente (Bedford, 1996).

2.2.1 Los cereales.

A pesar de que el número de especies de cereales ha crecido, solamente tres (maíz, trigo y arroz) siguen cubriendo cerca del 70% de la producción total (Shewry y Halford, 2001).

Los cereales son los frutos en forma de grano que crecen en las plantas de la familia de las gramíneas. Se caracterizan porque la semilla y el fruto son prácticamente una misma cosa: los granos. Son considerados un alimento básico para el hombre y los animales (Wilson *et al.*, 2004) por sus características nutritivas y su costo; de hecho constituye la base de la subsistencia de gran parte de las poblaciones mundiales y de los animales domésticos, porque estos comprenden del 55 al 75% de la ingesta diaria de alimento en ambas poblaciones (Wilson *et al.*, 2004). La semilla está rodeada por una cariósipide o pericarpio y constituida a su vez; por el embrión o germen y el endospermo.

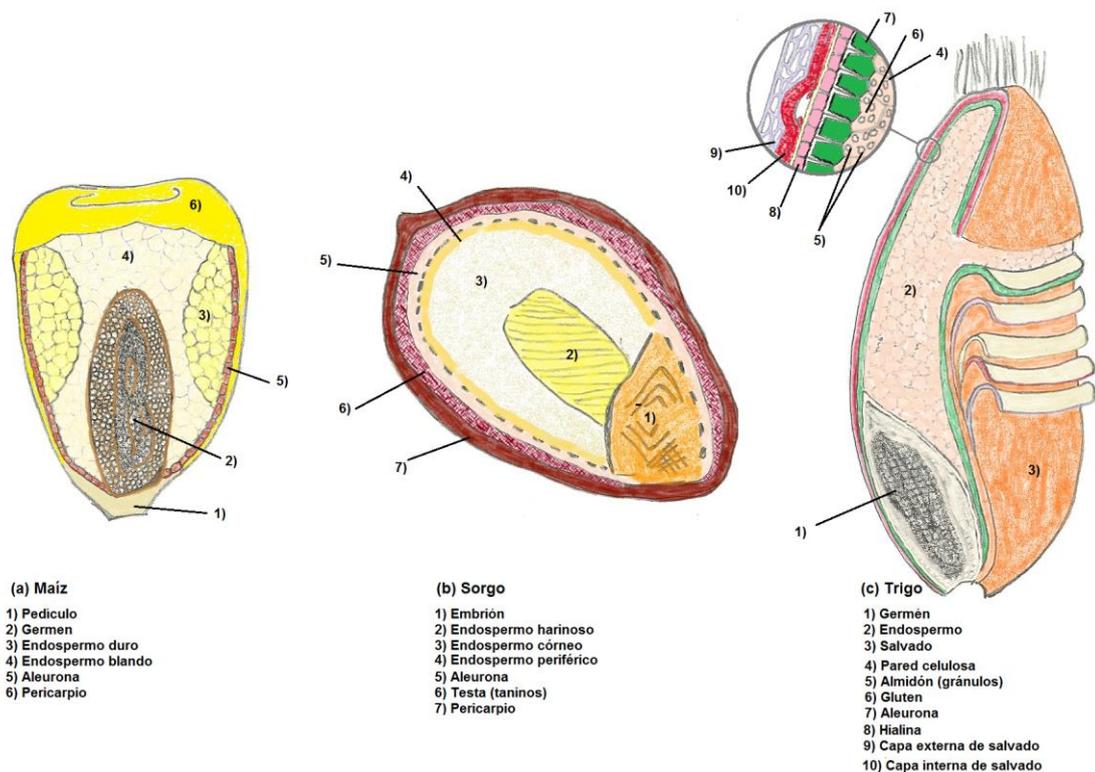


Figura 2. Representación esquemática de un corte longitudinal de a) maíz, b) sorgo y c) trigo, donde se aprecian las partes que componen los granos de cereal. Adaptadas de a) Gibbon y Larkins, 2005; b) Rooney y Miller, 1982; c) Fardet, A., 2010.

En los cereales el almidón representa un 70-80% del total del grano. La ganadería particularmente, depende fuertemente del maíz, sorgo y cebada como fuente principal de energía y proteína. Es por esto que la estructura y composición del almidón y su interacción con otros componentes del grano juegan un papel importante en la digestibilidad de estos (Rooney y Pflugfelder, 1986).

El almidón de los cereales se encuentra almacenado en el endospermo de éstos; dentro de una matriz proteica que es particularmente fuerte en el sorgo y el maíz (Rooney y Pflugfelder, 1986), por lo que la digestibilidad de este nutriente se verá afectada por los factores ya mencionados; además las proteínas de los cereales tienen un valor nutricional pobre en las dietas de monogástricos porque tienen un contenido reducido de aminoácidos esenciales como lisina, triptófano y treonina (Prassana *et al.*, 2001; Shewry y Halford, 2001).

La interacción almidón-proteína reduce la hidrólisis enzimática, la dureza de estos ingredientes, está relacionada con el contenido proteico y la continuidad de la matriz proteica (Rooney y Miller, 1982); dicha matriz puede ser continua o incompleta y se compone de glutelinas en las cuales los gránulos de almidón y las proteínas ricas en prolaminas están inmersos.

2.2.1.1 Maíz.

El maíz es la planta más domesticada y evolucionada del reino vegetal. Es actualmente cultivado en la mayoría de los países del mundo y se cultivan muchos tipos de maíz (*Zea mays* spp.). Es la tercera cosecha en importancia después del trigo y del arroz (FAO, 2006).

El contenido de proteína del grano de maíz puede variar de 6 a 18%, sin embargo, desde 1907, el contenido de proteína del grano comercial ha variado solamente entre el 9.1 y 11.9% (Earle, 1977). Clasificadas por el grado de solubilidad, las proteínas de maíz se distinguen en albúminas, globulinas, prolaminas o zeínas y glutelinas (Osborne y Mendel, 1914).

El 70% de los carbohidratos contenidos en el grano de maíz es almidón, el cual está constituido básicamente por dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina (Gear

et al., 2006), los gránulos de almidón tienen forma poliédrica y se encuentran embebidos en una matriz proteica (Wolf *et al.*, 1967); localizados exclusivamente dentro de los cuerpos subcelulares conocidos como cuerpos de proteína (Khoo y Wolf, 1970; Prassana *et al.*, 2001), los cuales son compuestos por un complejo de proteínas llamadas: α , β , γ y δ zeínas (Duvick, 1961; Burr y Burr, 1975; Prassana *et al.*, 2001) (Figura 3 y 4).

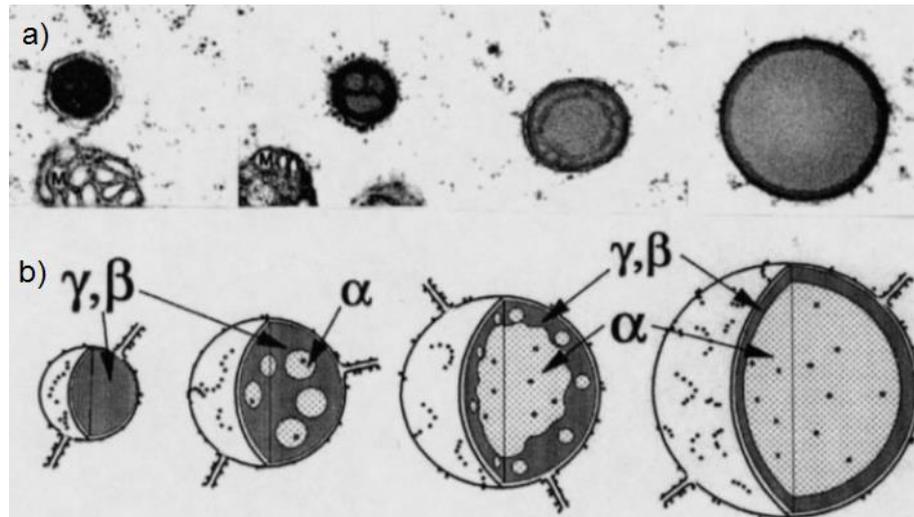


Figura 3. Micrografía (a) y Representación esquemática (b) del patrón de desarrollo de los cuerpos proteicos del endospermo del maíz. El desarrollo se muestra de izquierda a derecha en cada una de las imágenes. Las letras griegas de la imagen inferior indican la localización de las distintas clases de zeínas (Adaptado de Shewry y Halford, 2002).

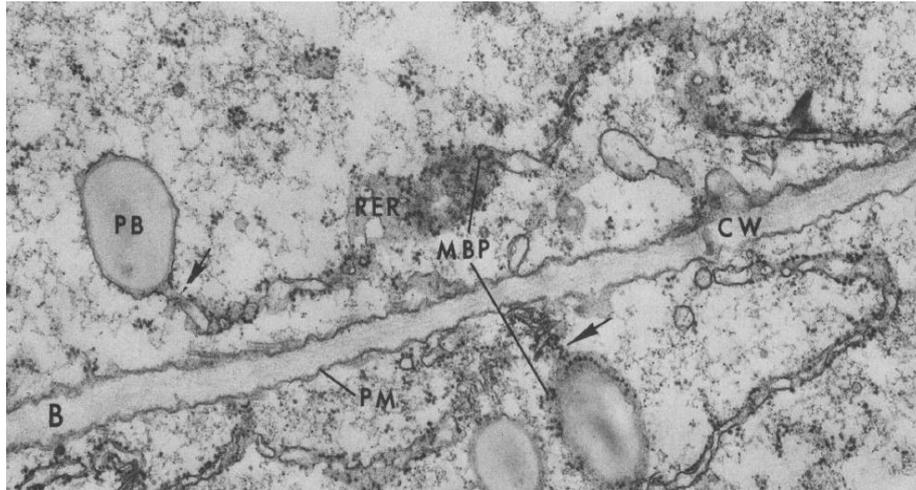


Figura 4. Micrografía electrónica de las células del endospermo del maíz (19 días). La imagen muestra la relación de un cuerpo proteico con otras estructuras celulares. Por su abreviación en inglés (PB) cuerpo proteico, (RER) retículo endoplásmico rugoso, (MBP) poliribosomas unidos a membrana, (PM) membrana plasmática, (CW) pared celular (Tomado de Larkins y Hurkman, 1978).

2.2.1.2 Sorgo.

El sorgo (*Sorghum bicolor*) es uno de los principales cultivos de alimentos en las zonas semiáridas de África y Asia y uno de los principales ingredientes en la alimentación de animales en América y Europa (Hamaker *et al.*, 1987).

Las proteínas del sorgo, según lo propuesto por Osborne y Mendel (1914); son divididas en albúminas, globulinas, kafirinas y glutelinas.

El 80% de la proteína del endospermo del sorgo está contenida dentro de los cuerpos proteicos (Figura 5) y la rigidez de estos cuerpos está dada por los enlaces disulfuro de las prolaminas de la periferia. Esta composición proteica del endospermo del sorgo es diferente de la del maíz porque posee enlaces cruzados intermoleculares (Hamaker *et al.*, 1987; Hamaker y Bugusu, 2003) de las γ y β prolaminas, o kafirinas, las cuales disminuyen la digestibilidad de las proteínas y los gránulos de almidón inmersos en ellas. Además el almidón y la proteína del endospermo del sorgo parecen estar adheridos con mayor fuerza (Rooney y Pflugfelder, 1986).

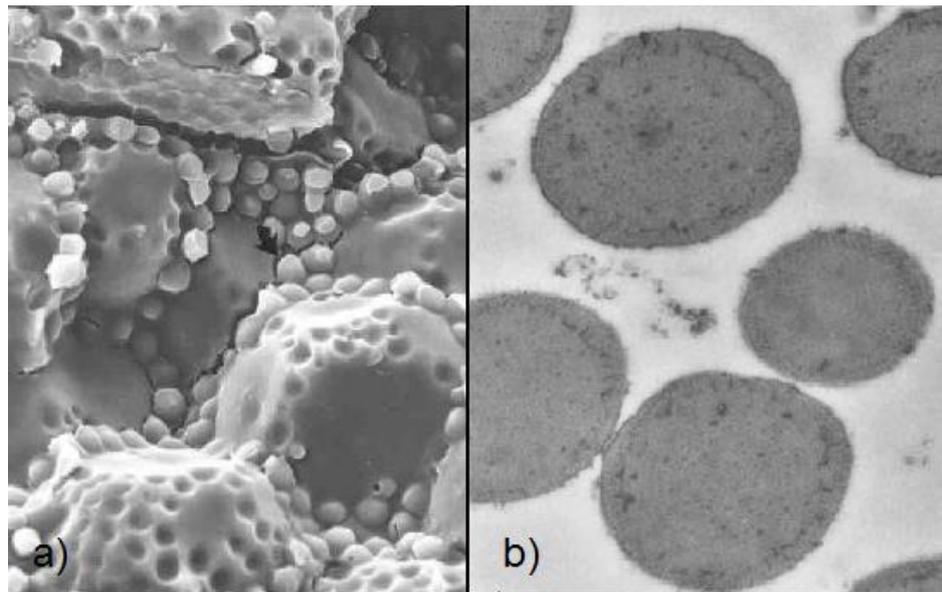


Figura 5. (a) Micrografía electrónica de barrido de la porción del endospermo vítreo del sorgo. Los cuerpos proteicos están indicados mediante flecha. (b) Micrografía electrónica de transmisión de los cuerpos proteicos de un genotipo normal (Tomado de Hamaker y Bugusu, 2003).

2.2.1.3 Trigo.

El trigo (*Triticum aestivum*, *Triticum durum*) es fuente primaria de alimentación (Mathias, 2004), es el cultivo de cereal más importante en términos de superficie cultivada y cantidad de grano producido y es uno de los tres principales cultivos en el mundo junto con el maíz y el arroz (Shewry *et al.*, 2002). Es utilizado en la alimentación humana, animal y con propósitos industriales.

La calidad del grano de trigo está determinada por la composición y cantidad de proteínas del gluten que comprende hasta el 75% de las proteínas (Shewry *et al.*, 2002), embebidos en el gluten además, se encuentran los granos de almidón (Mathias, 2004) y lípidos (Shewry *et al.*, 2002). Los depósitos proteicos del gluten del trigo se almacenan en cuerpos proteicos dentro de vacuolas con una membrana lipoproteica distintiva (Buttrose, 1962, Graham *et al.*, 1962 y 1963; Rubin *et al.*, 1992). Hay evidencia de dos tipos diferentes de cuerpos proteicos: de alta y baja densidad (Rubin *et al.*, 1992). Estos cuerpos proteínicos contienen principalmente proteínas de almacenaje, además de hasta un 4% de ácido fítico (Graham *et al.*, 1962) (Figura 6).

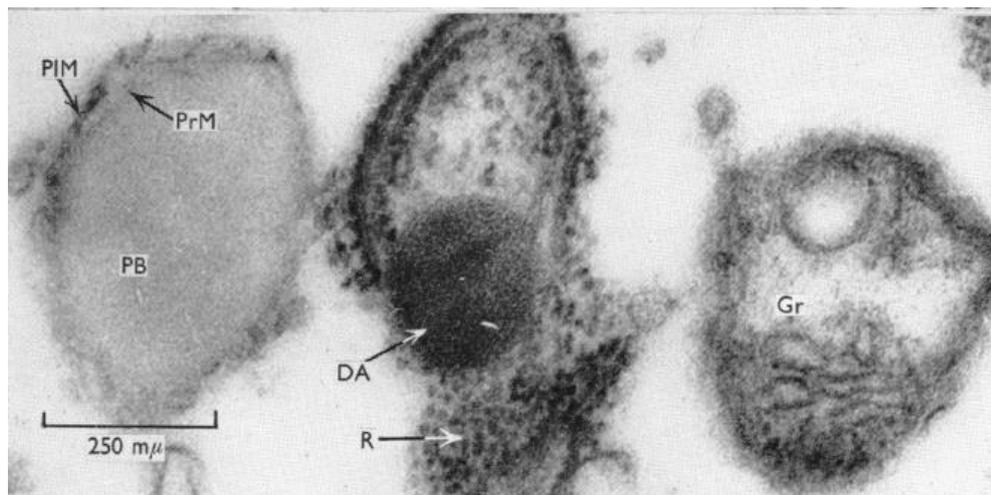


Figura 6. Micrografía electrónica de los componentes aislados del endospermo de trigo (*T. durum*, día 19 después de floración). Área obtenida a partir del endospermo desintegrado por vibración ultrasónica, por su abreviación en inglés (PB) cuerpo proteico, (PRM) membrana del cuerpo proteico, (PIM) membrana exterior de plástidos, (R) partículas electrodensas, (DA) zona esférica de uniforme densidad dentro del cuerpo proteico, (Gr) gránulo (Tomada de Morton *et al.*, 1964).

Actualmente se consideran los siguientes grupos de proteínas en el endospermo del trigo: albúminas, globulinas, prolaminas o gliadinas y glutelinas o gluteninas en el trigo, específicamente (García y Carbonero, 1983; Rubin *et al.*, 1992; Wallace *et al.*, 2003). Estas proteínas difieren notablemente en su estructura y propiedades, de forma que; las glutelinas se asocian con la elasticidad del gluten y las gliadinas con su plasticidad (Shewry *et al.*, 1999).

La fracción mayoritaria (entre 40 y 50%) está representada por la familia de gliadinas cuya función es de proteína de reserva, éstas se almacenan durante el desarrollo del endospermo en orgánulos especializados llamados cuerpos proteicos. Como su función es de reserva tienen mayor contenido del aminoácido glutamina (mayor al 30%) (García y Carbonero, 1983).

Tradicionalmente se distinguen por su movilidad electroforética ácida de mayor a menor en α , β , γ y ω - gliadinas (García y Carbonero, 1983; Rubin *et al.*, 1992; Shewry *et al.*, 1999; Wallace *et al.*, 2003; Yada, 2004).

2.2.2 Las pastas de oleaginosas.

Las plantas oleaginosas son muy valiosas para el ser humano y se distinguen del resto de las plantas comestibles, como los cereales y los tubérculos, porque sus frutos y semillas contienen un alto porcentaje de ácidos grasos o aceites comestibles, indispensables para la nutrición del ser humano, así como proteínas de alta calidad con la que se fabrican pastas que se utilizan en la alimentación animal.

De los factores antinutricionales presentes en las pastas de oleaginosas, los de mayor interés son los factores inhibidores de tripsina y las lectinas prevalentes en la pasta de soya. Las dietas que contienen cantidades apreciables de estos antinutrientes han mostrado que afectan el comportamiento productivo y disminuyen la digestibilidad de nutrientes en aves y cerdos (Jansman *et al.*, 1994).

Particularmente la soya contiene una serie de compuestos antinutricionales y/o alergénicos, como inhibidores de tripsina, glicinina, β -conglucina, oligosacáridos, lectinas y saponinas. En comparación con los cereales, las semillas de leguminosas contienen en general una mayor proporción de azúcares de bajo peso molecular (principalmente α -galactósidos) estos disminuyen la energía metabolizable y aceleran el tránsito del contenido intestinal (Ríos, 2009).

2.2.2.1 Pasta de soya.

Las prácticas de formulación actual de alimentos balanceados para cerdos e incluso aves, eligen a la pasta de soya como el suplemento proteico ideal para complementar a los granos de cereales en las raciones.

Entre las fuentes proteicas, la pasta de soya (*Glycine max*) tiene una excelente reputación por la alta calidad de aminoácidos pero todavía existen grandes variaciones en el valor nutritivo de los productos de la pasta de soya.

La respuesta en crecimiento, resultado de alimentar con pasta de soya es influenciada por la concentración de factores antinutricionales presentes después del procesamiento, como los oligosacáridos (Liener, 1981; Anderson y Wolf, 1995). Los oligosacáridos: rafinosa y estaquiosa no son eliminados por el procesamiento (Leske

et al., 1993) incluso representan el 4-6% aproximadamente de la materia seca e induce un incremento en la incidencia de diarreas en ratas (Kuriyama y Mendel, 1917).

Los oligosacáridos son comúnmente responsables por aumentar la viscosidad de la digesta lo cual interfiere con la digestión de nutrientes al disminuir su interacción con las enzimas digestivas en el intestino (Smits y Annison, 1996). La hidrólisis de oligosacáridos en el intestino delgado es menor porque los mamíferos no producen α -galactosidasa necesaria para hidrolizar las uniones α -1,6 presentes en los oligosacáridos (Slominski, 1994).

El procesamiento térmico de la soya desnaturaliza parcialmente algunos inhibidores de tripsina. La mayoría de los inhibidores de tripsina son proteínas localizadas como proteínas de almacenaje dentro de los cuerpos proteicos de los cotiledones (Anderson y Wolf, 1995) (Figura 8). En una evaluación realizada a 108 cultivos de soya Kakade *et al.* (1972) consideraron que la soya tenía un contenido de proteína de 40% (inferior a lo que se reporta hoy en día) y que el contenido de inhibidor de tripsina oscilaba entre 35 y 123 mg/g de proteína.

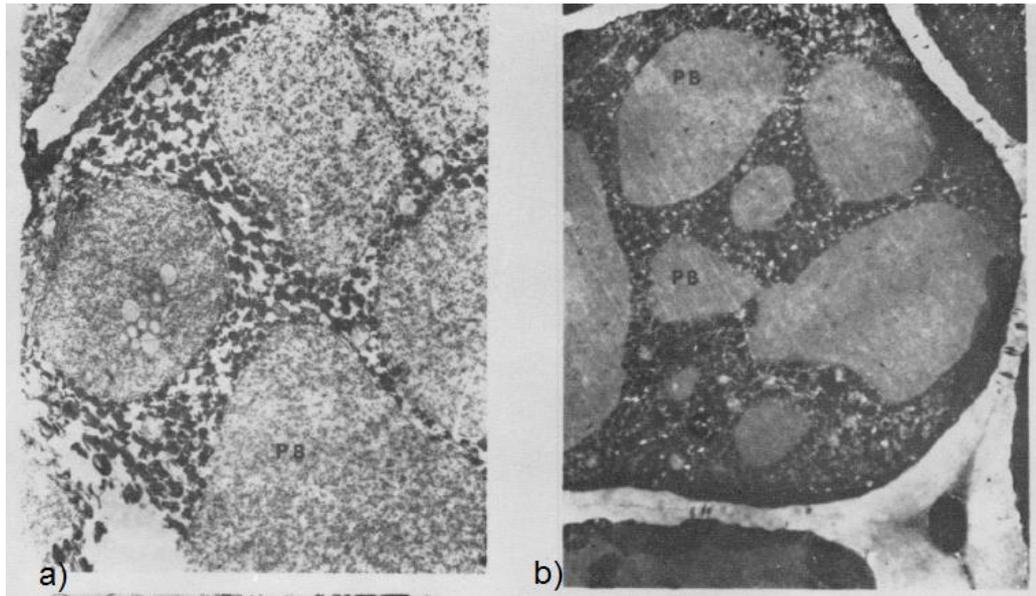


Figura 7. Micrografías electrónicas de secciones de las células de los cotiledones de una semilla de soya de Nigeria (a) y una semilla estadounidense (b), respectivamente. La membrana que rodea a los cuerpos proteicos (PB) se puede ver claramente en a); también son visibles las inclusiones de lípidos (Tomado de Tombs, 1967).

Cuando la soya es procesada, ninguno de estos inhibidores es removido, al convertirla en harina o pasta los niveles varían de 28-32 mg/g de harina, lo cual equivale a 58mg/g de proteína. Sin embargo, dado que los inhibidores de tripsina son también proteínas, están sujetas a desnaturalización e inactivación por procesamiento térmico. Por ejemplo un tostado completo de la harina de soya puede reducir los niveles de inhibidor de 8-9mg/g de harina o 16mg/g de proteína de soya. Si consideramos esto, cuando la soya es tratada con soluciones de etanol o agua acidificada, los oligosacáridos y otros constituyentes pueden ser removidos pero las proteínas no.

Otro factor localizado en la soya es el ácido fítico, éste puede variar considerablemente en un rango de 1.0 a 2.3% en cultivos comerciales. El ácido fítico se localiza también dentro de los cuerpos proteicos de los cotiledones y está distribuido entre la proteína soluble-sales de fitato e inclusiones globoides insolubles (Prattley y Stanley, 1982).

Las saponinas son complejos componentes de alcohol tritenoide no polar unido a uno o más oligosacáridos, resultando en moléculas con propiedades anfifílicas similares a los detergentes. Han sido consideradas tóxicas. El contenido de saponinas

varía de 0.1 a 0.5%. Además, las saponinas son estables al procesamiento térmico y se encuentran aparentemente formando complejos con las proteínas (Anderson y Wolf, 1995).

Durante mucho tiempo las isoflavonas han sido consideradas un factor antinutricional en las dietas de animales por sus propiedades estrogénicas, sin embargo hoy día, las isoflavonas de soya han cobrado un nuevo interés en la salud humana debido a sus recién descubiertas propiedades anticancerígenas (Messina y Barnes, 1991; Coward *et al.*, 1993). La soya contiene principalmente a las isoflavonas: genisteína, daidzeína y con menor importancia gliceteína.

En la semilla, las isoflavonas están presentes como β -glucósidos o agliconas, los cuales representan el 2% de la semilla. El contenido de estos factores varía en un rango de 1200 a 4200 $\mu\text{g/g}$ según lo reportado por Wang y Murphy (1994). Los aislados proteicos de soya contienen un nivel menor de isoflavonas comparado con el frijol de soya o las harinas de soya debido a que durante la fabricación se hace un procesamiento adicional con alcohol y éstas son solubles en alcohol, dando como resultado un producto con muy bajo contenido de isoflavonas (73 $\mu\text{g/g}$)(Anderson y Wolf, 1995).

2.2.2.2 Pasta de canola.

La canola es descendiente de la colza (*Brassica napus* y *Brassica campestris/napa*) que se desarrolló mediante las técnicas estándar de mejoramiento de semillas, con el fin de obtener niveles menores de ácido eúrucico (<2%) en la porción aceitosa y bajos niveles de glucosinolatos (<30 $\mu\text{mol/g}$) en la porción de la pasta, esto porque son tóxicos y de mal sabor para la mayoría de los animales (Bell, 1993). Se utiliza comúnmente en los alimentos balanceados para animales en todo el mundo ya que tiene un buen perfil de aminoácidos aunque un alto contenido de fibra.

Las investigaciones de Newkirk *et al.* (1999) han mostrado que las temperaturas durante el procesamiento son la principal razón para una menor bio-disponibilidad de los aminoácidos.

La matriz de carbohidratos de esta pasta es muy compleja (Figura 9); contiene almidón, azúcares libres y polisacáridos solubles sin almidón; los cuales están

protegidos por paredes celulares (Bell, 1993) (Figura 9). Este nivel de fibra cruda (12%) es más elevado en la pasta de canola, a diferencia de la pasta de soya; porque la cascarilla se queda en la pasta y es una proporción relativamente alta de la semilla y estas pueden afectar la digestibilidad de los nutrientes particularmente en los cerdos (Bell, 1993).

Hay otros componentes menores de la pasta de canola que pueden tener efectos antinutritivos (Bell, 1993). Los taninos están presentes en un rango de 1.5-3.0%, sin tener los mismos efectos negativos en sabor y digestibilidad de proteínas que los que tienen otras plantas. Además contiene ácido fítico que reduce la absorción de otros minerales en el animal como lo son Mg, Ca, Mn, Zn y Cu. La pasta de canola contiene 1.22% de fósforo, del cual 0.53 está unido a fitatos (Bell, 1993).

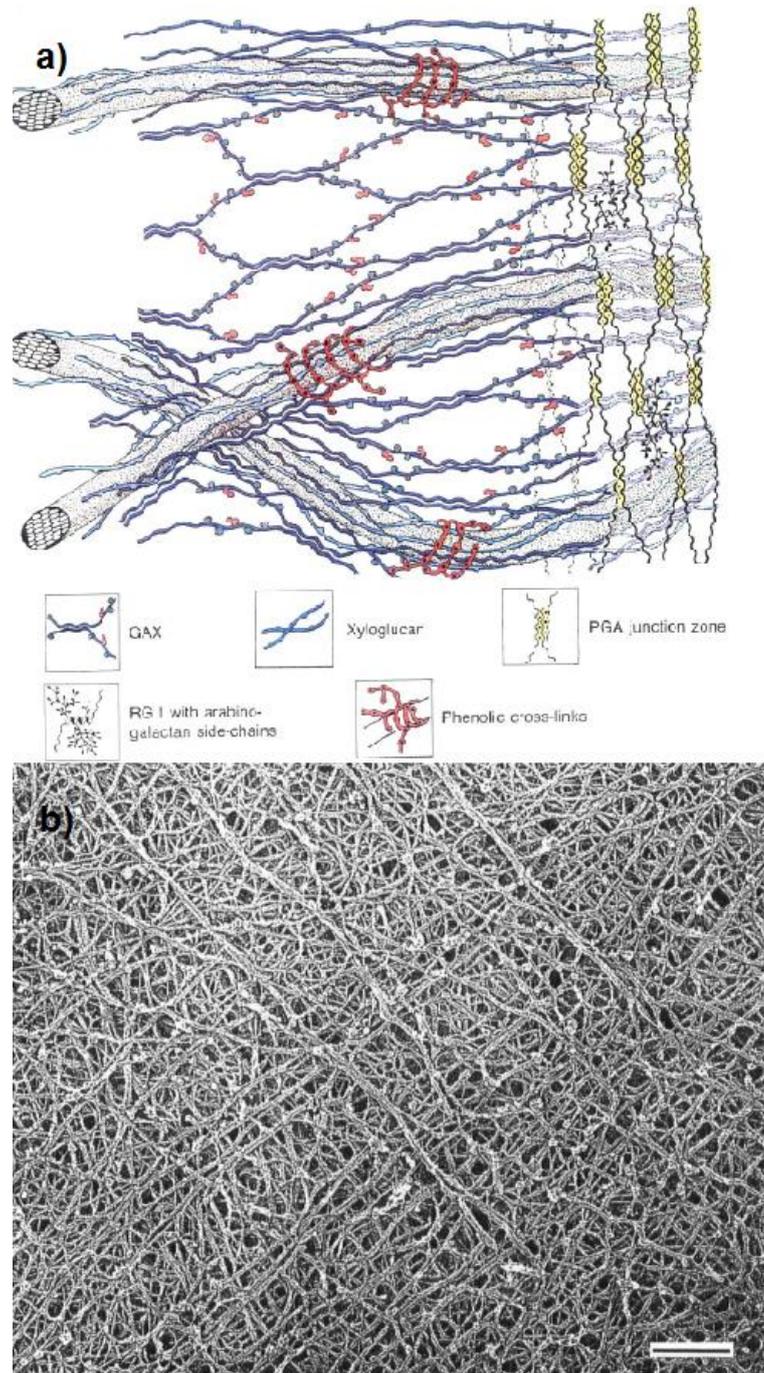


Figura 8. (a) Representación esquemática de una pared celular de vegetales Tipo II. La imagen muestra la complejidad de las paredes celulares porque las microfibrillas son enlazadas por glucuronarabinoxilanos (GAX) en lugar de xiloglucanos (Xyloglucan). Podemos observar también los enlaces cruzados de los compuestos fenólicos, las zonas de unión del ácido poligalacturónico (PGA) y los ramnogalacturonanos I con cadenas laterales de arabinogalactanos (RG). (b) Micrografía electrónica de las microfibrillas de celulosa de una pared celular de vegetales Tipo II (Tomado de Carpita y Gibeaut, 1993).

2.3 Digestibilidad.

El proceso de formulación de raciones para cerdos ha sufrido una evolución significativa en las últimas décadas, pasando de un proceso sencillo que buscaba cubrir los requerimientos nutritivos de proteína cruda y energía digestible, a un aporte de proteína (nitrógeno) y de aminoácidos esenciales (Reis de Souza *et al.*, 2000).

Gracias al empleo de técnicas quirúrgicas como la anastomosis íleo rectal y la canulación ileal, fue posible un mayor acercamiento al aprovechamiento real de los nutrimentos por los animales (Reis de Souza y Mariscal, 1997). El uso de estas técnicas permitió hacer estimaciones sobre la digestibilidad de los nutrientes aportados por los ingredientes de la dieta, siendo particularmente importante para el caso de la digestibilidad de los aminoácidos, por lo cual en los años noventa se transformó el concepto de “proteína ideal” a “proteína ideal digestible” (Fuller y Wang, 1990) y por ende el proceso para formular raciones.

La implantación de una cánula T simple ha sido considerada la técnica de canulación de elección para medir digestibilidad ileal ya que, al ser menos invasiva, se mantiene el complejo mioeléctrico migratorio responsable de la motilidad intestinal. Esta cánula es fácil de implantar mediante técnica quirúrgica y es muy tolerada por el animal, el flujo intestinal es dividido en una porción que continúa a lo largo del intestino y el resto se desplaza a través de la cánula (Fuller, 1991). Sin embargo, la cánula T no permite la completa colección ya que solamente se puede recuperar entre 60 y 95% de la digesta, sí ésta es recolectada continuamente a través de dicha cánula, por lo que se hace necesario el uso de un marcador indigestible en la dieta.

Un inconveniente es la dificultad de obtener muestras que sean siempre representativas, ya que en algunos casos la composición de la muestra obtenida puede variar debido al diámetro interno de la cánula, a la frecuencia y duración del muestreo, y a la viscosidad o contenido de fibra de la dieta, ya que la cánula puede presentar bloqueos cuando se ofrecen dietas altas en fibra.

De cualquier manera, esta técnica tiene la ventaja de ser una cirugía relativamente simple, que permite realizar colectas por largos períodos de tiempo. Además, también

permite recuperar las muestras fecales que pueden ser tomadas para análisis y los animales pueden ser utilizados para varias colectas (Parra y Gómez, 2009)

Diversos marcadores externos como el óxido de cromo, óxido de titanio y elementos tierras raras; e internos como la fibra ácido detergente indigestible, lignina indigestible y ceniza ácido insoluble han sido evaluados. En la práctica suelen utilizarse en los experimentos de digestibilidad con cerdos, el óxido crómico, como el más común (Fenton y Fenton, 1979; Nieves *et al.*, 2008), sin embargo el óxido de titanio es considerado también de uso común (Mroz *et al.*, 1996).

2.3.1 Pérdidas de Nitrógeno endógeno.

El estudio de la calidad nutricional de los ingredientes utilizados en la alimentación de cerdos incluye la digestibilidad ileal de los aminoácidos, para lo cual se mide la cantidad de aminoácidos que fluye hacia intestino grueso y, por diferencia con respecto a lo consumido, se calcula la cantidad de aminoácidos absorbidos en el intestino delgado. Sin embargo, en la mayoría de los estudios de digestibilidad no es posible separar los aminoácidos no digeridos de la dieta de aquéllos de origen endógeno (Nyachoti *et al.*, 1996).

Las heces al igual que la digesta ileal son una mezcla de proporciones variables de proteína exógena (proveniente de la dieta), endógena (producida por el propio animal) y bacteriana (flora saprófita que vive en el tracto digestivo); entonces para una correcta evaluación de la digestibilidad de la dieta, estas fracciones deben ser medidas (Laplace *et al.*, 1985).

La determinación de las pérdidas de proteína endógena son necesarias para obtener los coeficientes de digestibilidad ileal estandarizada o digestibilidad ileal verdadera de los ingredientes, ya que la composición de la proteína es alterada en el intestino grueso, entonces estas pérdidas deberán ser determinadas a nivel del ileon distal (Stein *et al.*, 1999).

Los aminoácidos de origen endógeno se definen como aquéllos encontrados en el quimo intestinal, al final del íleon, o en las heces de cerdos alimentados con dietas libres de nitrógeno (Mitchell, 1924). Estos aminoácidos provienen principalmente de enzimas digestivas, albúminas séricas, mucoproteínas, células descamadas, amidas,

péptidos y aminoácidos secretados en el lumen intestinal, además de microorganismos intestinales y pelo consumido del mismo animal (Moughan *et al.*, 1992). Aunque estrictamente no es proteína endógena, la proteína bacteriana también se incluye en la medición de proteína endógena ileal.

La contribución de los aminoácidos endógenos es variable y depende de varios factores, entre los que destacan el consumo de alimento y el peso corporal, la calidad y cantidad de proteína y fibra en la dieta y la presencia de factores antinutricionales (Nyachoti *et al.*, 1996). Además se ha estimado que cierta proporción de la proteína endógena (entre el 70 y 80%) puede ser digerida y reabsorbida por el animal (Low, 1982; Nyachoti *et al.*, 1996)

Es por esto que, las pérdidas de nitrógeno endógeno representan sólo una fracción del nitrógeno endógeno total secretado; la principal parte de la proteína endógena que escapa a la digestión y reabsorción son sales biliares conjugadas y la glicoproteína de la mucina, ya que son muy resistentes a la proteólisis (Taverner *et al.*, 1981; Fuller y Cadenhead, 1991; Moughan y Schuttert, 1991). El aumento de este nitrógeno está asociado a elevadas tasas de síntesis de proteína intestinal, aumentando de esta forma, el requerimiento de energía de mantenimiento y aminoácidos (Nyachoti *et al.*, 1996).

Las pérdidas de aminoácidos endógenos ileales pueden dividirse en dos componentes principales, las pérdidas basales y las pérdidas específicas (Sève y Henry, 1996; Nyachoti *et al.*, 1997; Jansman *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2007).

La pérdida basal, anteriormente referida como pérdida no específica o pérdidas independientes de la dieta, representa las cantidades mínimas de aminoácidos que son relacionadas con la ingesta de materia seca por el animal y no por la influencia del tipo de dieta o ingrediente (Stein *et al.*, 2001). Estas pérdidas de nitrógeno son naturales e inevitables ya que, se atribuyen al funcionamiento normal del tracto gastrointestinal (Stein *et al.*, 2006).

Las pérdidas basales se expresan en proporción de la materia seca ingerida y son en promedio 1.69 ± 0.49 g de N*Kg⁻¹ de materia seca consumida (Jansman *et al.*, 2002) y disminuyen conforme la ingesta de materia seca aumenta (Stein *et al.*, 2007). Estas

pérdidas no específicas pueden medirse después de alimentar a los animales con una dieta libre de proteína, una dieta basada en caseína o una dieta basal de caseína hidrolizada (Stein *et al.*, 2001).

Las pérdidas endógenas específicas antes referidas como pérdidas dependientes de la dieta o “pérdidas extra” (Stein *et al.*, 2007); son una respuesta a los factores alimenticios que modifican las secreciones digestivas, su reabsorción o la descamación celular del tracto gastrointestinal (Montagne *et al.*, 2001), están influenciadas por la composición de los ingredientes en la dieta, como proteína del alimento, contenido y tipo de fibra y factores antinutricionales (Schulze *et al.*, 1995; Stein *et al.*, 2007).

Cuando se alimenta con proteínas purificadas (caseína o albúmina), las cuales son altamente digestibles, las pérdidas endógenas específicas son mínimas (Stein *et al.*, 2007); en contraste, si se alimenta con ingredientes con fibra o factores antinutricionales, las pérdidas específicas pueden contribuir con más del 50% del total de las pérdidas de aminoácidos endógenos a nivel ileal (Souffrant, 1991; Moughan, 2003).

El nivel de inclusión de la proteína de la dieta puede modular la secreción de enzimas al ser más o menos digestible, ya que se ha observado que esta secreción responde a la cantidad y tipo de sustrato (Valette *et al.*, 1992) y por lo tanto, afectar las pérdidas de nitrógeno endógeno y los coeficientes de digestibilidad (Donkoh y Moughan, 1993).

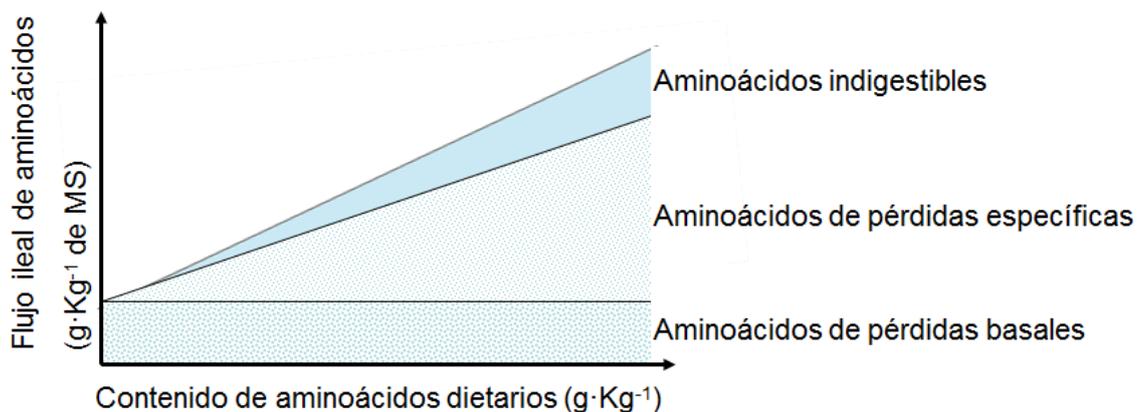


Figura 9. Origen de los aminoácidos presentes en la digesta ileal. Las pérdidas basales de aminoácidos endógenos están representadas por la fracción constante, las pérdidas específicas se encuentran asociadas al consumo de alimento y el efecto que este tiene sobre las secreciones digestivas y una fracción indigestible de aminoácidos del alimento (Adaptada de Stein *et al.*, 2007).

Los métodos convencionales para cuantificar las pérdidas de aminoácidos endógenos basales incluyen: a) alimentación con una dieta libre de proteína; b) alimentación con una proteína purificada altamente digestible; c) la técnica de alimentación peptídica y d) la técnica de regresión (Nyachoti *et al.*, 1997). No hay procedimientos de rutina disponibles para determinar las pérdidas específicas en cerdos; sin embargo, es posible calcularlas estimando el total de pérdidas endógenas de aminoácidos (pérdidas específicas más basales) y después restar las pérdidas basales. Los procedimientos usados para estimar el total de pérdidas endógenas de animales incluyen la técnica de homoarginina (Hagemeister y Ebersdobler, 1985; Rutherford y Moughan, 1990) y la técnica de dilución isotópica (de Lange *et al.*, 1990).

Las estimaciones de pérdidas de nitrógeno endógeno son importantes para poder determinar la digestibilidad ileal verdadera y estandarizada de aminoácidos y para identificar los medios que permitan mejorar la eficiencia en la utilización de nitrógeno y energía de las raciones para los cerdos (Nyachoti *et al.*, 1996).

2.3.2 Concepto de Digestibilidad.

Cuando se realiza un análisis químico a un alimento o ingrediente se evalúa el valor nutricional del mismo por la capacidad potencial que este tiene para aportar sus nutrientes; en particular aminoácidos y los que proporcionan energía (Nyachoti *et al.*, 1996); sin embargo, cuando es ingerido por un animal, como resultado de las funciones digestivas relacionadas a su absorción, se producen pérdidas. Por lo que existe una porción de los nutrientes que no están disponibles en su totalidad para ser utilizados por los animales (Buraczewska *et al.*, 1999) y una porción de nutrientes son ingeridos y absorbidos por el tracto digestivo de tal forma que se encuentran disponibles para el metabolismo animal (Sauer y Ozimek, 1986).

La digestibilidad es una estimación indirecta de los nutrientes absorbidos, luego de las funciones digestivas del tracto gastrointestinal; es decir, es la medición de la diferencia existente entre la cantidad del nutriente ingerido en el alimento y la cantidad excretada. La digestibilidad puede ser medida en heces o en el contenido ileal, obteniendo los coeficientes de digestibilidad fecal y coeficientes de digestibilidad ileal, respectivamente.

2.3.2.1 Medición de la digestibilidad.

Para estimar el valor nutritivo de la fracción nitrogenada de un alimento, la digestibilidad ileal es la más apropiada, ya que el proceso digestivo de las proteínas y aminoácidos se completa cuando la digesta alcanza la parte distal del íleon (Mariscal *et al.*, 2009), es el método preferido para la determinación de digestibilidad de aminoácidos en los ingredientes para alimentar cerdos (de Lange *et al.*, 1990). Se determina mediante la colecta de la digesta ileal antes de atravesar la válvula íleo-cecal. La digestibilidad ileal puede ser expresada como digestibilidad ileal aparente (DIA), digestibilidad ileal estandarizada (DIE) o digestibilidad ileal verdadera (DIV). Estos términos son usados para especificar cómo las pérdidas ileales de aminoácidos endógenos se reflejan en los valores de digestibilidad (Stein *et al.*, 2007).

La digestibilidad fecal (DF) es una técnica simple de realizar, ya que se obtiene al estimar la diferencia entre lo ingerido en la ración alimenticia y lo excretado en heces. Sin embargo, la proporción digestible de un nutrimento es modificada por las bacterias

del intestino grueso, por lo que se observa un cambio en el perfil de aminoácidos del contenido ileal con respecto al perfil en las heces, en los cerdos convencionalmente la proteína fecal es principalmente de origen bacteriano (Laplace *et al.*, 1985). La microflora en el intestino grueso de los cerdos, tiene la capacidad de degradar fuentes de nitrógeno exógeno y endógeno, a través de procesos de deaminación y descarboxilación de todos los aminoácidos, hidrólisis de urea y síntesis de proteína microbial (Low y Zebrowska, 1989).

Todas las mediciones de digestibilidad de aminoácidos son basadas sobre la desaparición de aminoácidos del tracto gastrointestinal, sin embargo estas mediciones no reflejan la síntesis o degradación neta de aminoácidos del lumen o la forma en que los aminoácidos son absorbidos (Stein *et al.*, 2007)

Es decir, se considera que los coeficientes de digestibilidad fecal, sobrestiman los valores de digestibilidad debido a que la flora bacteriana presente en el intestino grueso utiliza los aminoácidos que no fueron digeridos a nivel del íleon para la síntesis de proteína bacteriana o como fuente de energía (Furuya y Kaji., 1989; Stein *et al.*, 2007).

2.3.3 Métodos para determinar digestibilidad.

Independientemente del lugar y de la técnica empleada para la obtención de la muestra, se pueden determinar varios tipos de digestibilidad (Low, 1982).

2.3.3.1 Digestibilidad Aparente de Aminoácidos.

La digestibilidad aparente es evaluada a partir de la digesta ileal y/o heces, es definida simplemente como la desaparición de los nutrientes a su paso por el tracto digestivo (Low, 1982; Stein *et al.*, 2007). Con este método no se conoce la proporción de la proteína que proviene de la dieta o de la secreción de nitrógeno endógeno, es decir, están confundidas (de Lange *et al.*, 1990); debido a que no se ha realizado corrección alguna por las pérdidas de nitrógeno endógeno y sólo permite asumir que cantidad del alimento fue asimilado por el animal. Los valores de digestibilidad aparente son afectados por el nivel de proteína cruda en la dieta.

Con una dieta baja en Proteína Cruda, los aminoácidos de fuentes endógenas conforman una alta proporción del total de los aminoácidos que alcanzan el íleon terminal comparado con dietas con mayor concentración de proteína cruda (Fan *et al.*, 1994). A medida que el nivel de proteína cruda en la dieta se incrementa, la proporción de aminoácidos de fuentes endógenas disminuye y la digestibilidad aparente de la proteína cruda de la dieta aumenta.

La digestibilidad aparente puede ser calculada como se muestra en la ecuación 1:

$$DA, \% = [(aminoácidos consumidos - aminoácidos excretados) / aminoácidos consumidos] * 100$$

La digestibilidad ileal aparente (DIA) de aminoácidos se obtiene midiendo el flujo de aminoácidos totales a nivel ileal en relación a los aminoácidos ingeridos (Stein *et al.*, 2007). En teoría la DIA de aminoácidos depende del nivel de contenido de aminoácidos en la dieta ensayo (Fan *et al.*, 1994).

Los valores para DIA se calculan de acuerdo con la ecuación 2:

$$DIA, \% = [(aminoácidos consumidos - aminoácidos excretados a nivel ileal) / aminoácidos consumidos] * 100$$

Cuando se utilizan marcadores externos para calcular valores de digestibilidad, las concentraciones del marcador en el alimento y la digesta son usados para calcular la DIA de acuerdo con la ecuación 3:

$$DIA, \% = [(aminoácidos digesta / aminoácidos dieta) * (marcador dieta / marcador digesta)] * 100$$

Donde; los aminoácidos digesta y aminoácidos dieta representan la concentración de aminoácidos en g/kg de materia seca (MS) en la digesta y la dieta, respectivamente, y marcador dieta y marcador digesta representa las concentraciones del marcador en g/kg de MS en la dieta y la digesta, respectivamente.

La DIA carece de aditividad en la formulación de dietas con mezcla de ingredientes (Jansman *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2005 y 2007). Esto se atribuye en gran parte, al efecto del nivel de aminoácidos dietarios en los valores de DIA (Furuya y Kaji, 1991; Donkoh y Moughan, 1993; Fan *et al.*, 1994) y a la relativa contribución de los aminoácidos endógenos al total de aminoácidos en la excreción ileal.

2.3.3.2 Digestibilidad Verdadera de Aminoácidos.

La digestibilidad verdadera es evaluada a nivel ileal y/o fecal, este método contempla la excreción de nitrógeno endógeno en sus cálculos, por lo cual ofrece un valor más exacto de la digestión de algún alimento. Como consecuencia, los valores de digestibilidad verdadera no son afectados por el contenido de proteína cruda de la dieta. Este método permite elaborar dietas en las cuales los requerimientos del alimento sean aportados de manera apropiada. Además, para el caso de la proteína, ayudará a suplir a los animales de manera adecuada (Low, 1990). La digestibilidad verdadera puede ser calculada como se muestra en la ecuación 4.

DV, %=[(aminoácidos consumidos – aminoácidos excretados + aminoácidos endógenos)/aminoácidos consumidos] * 100

La digestibilidad ileal verdadera de aminoácidos (DIV) refleja la proporción aminoácidos dietarios no digeridos (Stein *et al.*, 2006), y no las pérdidas de aminoácidos endógenos ileales (Low, 1982), son relacionados con los aminoácidos consumidos. La DIV se calcula de la misma forma que la DIA con la excepción de que el total de pérdidas de aminoácidos endógenos ileales se resta de la excreción ileal total de aminoácidos, de acuerdo con la ecuación 5:

DIV, % = {[aminoácidos consumidos – (excreción ileal de aminoácidos - total de pérdidas de aminoácidos endógenos ileales)]/aminoácidos consumidos} * 100

Si la DIA de aminoácidos ya se ha calculado, la DIV se puede estimar corrigiendo con las pérdidas basales y específicas de aminoácidos endógenos (Stein *et al.*, 2007), más fácilmente de acuerdo con la ecuación 6:

DIV, % = DIA + [(total de pérdidas de aminoácidos endógenos ileales/aminoácidos en la dieta) * 100]

Con el método usado para calcular la DIV de los aminoácidos, se asume que la cantidad de proteína endógena y la composición de aminoácidos que está tiene, no se ve afectada por la cantidad de proteína u otros componentes de la dieta (Carlson y Bayley, 1970).

Existen varios métodos para estimar la DIV, entre ellos se encuentran:

El método directo. Es un método en donde la dieta ensayo es formulada de tal manera que el alimento a ensayar, es la única fuente de proteína cruda y aminoácidos. Este método se utiliza principalmente para determinar el coeficiente de digestibilidad de la proteína cruda y aminoácidos en aquellos alimentos que contienen altos niveles de proteína cruda.

El método de la diferencia. Este método consiste en la formulación de una dieta basal, como de una dieta a evaluar. La dieta basal contiene la fuente de proteína cruda que se proporciona a los animales como única fuente de nitrógeno y aminoácidos, mientras que la dieta a evaluar está constituida de una mezcla de la dieta basal y del ingrediente a evaluar. Si no hay interacción entre el valor de la digestibilidad de los aminoácidos de la dieta basal y del ingrediente a evaluar, la digestibilidad del ingrediente a evaluar puede ser obtenida por diferencia empleando la fórmula propuesta por Fan y Sauer (1995) en la ecuación 7:

$$D_{dif}, \% = (Digestibilidad \text{ de un nutrimento en la dieta ensayo } \% - Digestibilidad \text{ de un nutrimento en la dieta basal } \% * \text{ Nivel de contribución de un nutrimento de la dieta basal en la dieta ensayo}) / \text{ Nivel de contribución de un nutrimento a evaluar en la dieta ensayo.}$$

2.3.3.3 Digestibilidad Estandarizada de Aminoácidos.

La digestibilidad estandarizada de aminoácidos es calculada mediante la corrección de la digestibilidad aparente por las pérdidas endógenas basales o no específicas de aminoácidos (Stein *et al.*, 2007) usando un flujo promedio de aminoácidos endógenos (Rademacher *et al.*, 1999).

Stein *et al.* (2006) definieron la digestibilidad ileal estandarizada de los aminoácidos (DIS) como el cálculo en el que se eliminan las pérdidas de nitrógeno endógeno empleando un endógeno de referencia o “estándar”.

Como una alternativa a la DIV, puede calcularse la digestibilidad DIS (Jondreville *et al.*, 1995; Mosenthin *et al.*, 2000; Jansman *et al.*, 2002), usando las pérdidas de aminoácidos endógenos basales, que se restan a la excreción ileal de aminoácidos, de acuerdo con la ecuación 8:

$$\text{DIE, \%} = \{[\text{aminoácidos consumidos} - (\text{excreción ileal de aminoácidos} - \text{las pérdidas de aminoácidos endógenos basales})] / \text{aminoácidos consumidos}\} * 100$$

Si los valores de DIA ya se han calculado, entonces la DIS puede estimarse de acuerdo con la ecuación 9:

$$\text{DIE, \%} = \text{DIA} + [(\text{pérdidas de aminoácidos endógenos basales} / \text{aminoácidos en la dieta}) * 100]$$

Los valores de digestibilidad ileal estandarizada son intermedios a la digestibilidad ileal aparente y digestibilidad ileal verdadera e independientes del nivel de aminoácidos dietarios. La DIE refleja la DIV y los efectos de ingrediente sobre las pérdidas específicas de aminoácidos endógenos (Stein *et al.*, 2007). Dado que no está relacionada con el nivel de proteína cruda o aminoácidos de la dieta, puede tener aditividad en dietas mixtas (Stein *et al.*, 2001 y 2005).

Las diferencias encontradas entre los diversos métodos para obtener la digestibilidad se muestran en la figura 3, donde puede apreciarse claramente que los coeficientes de digestibilidad se comportan de manera diferente ya que la digestibilidad aparente está fuertemente influenciada por el nivel de proteína contenido en la dieta, no así los coeficientes de digestibilidad estandarizada y verdadera. Además la DIE permite la ventaja sobre DIA y DIV, en proporcionar un efecto de aditividad en dietas mixtas (Furuya y Kaji, 1991; Stein *et al.*, 2005).

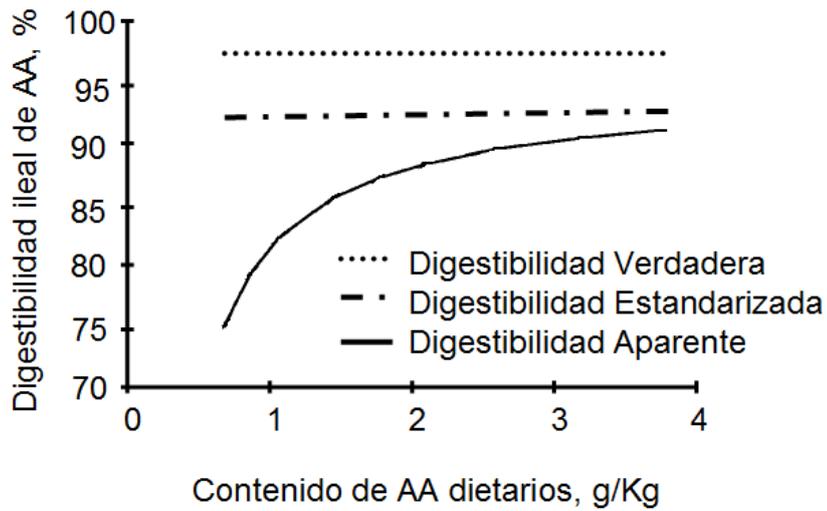


Figura 10. Influencia del contenido de aminoácidos dietarios sobre el valor de la digestibilidad aparente, estandarizada y verdadera (Adaptado de Stein *et al.*, 2007). Los cambios en el contenido de aminoácidos de la dieta son el resultado de una variación en el contenido de proteína cruda de cada ingrediente, esto influye de manera directa en la pérdida de aminoácidos endógenos por lo cual, los valores de DIA, DIS y DIV no son los mismos.

III. OBJETIVOS.

1. Determinar la digestibilidad fecal aparente e ileal aparente, verdadera y estandarizada de la proteína, aminoácidos y energía, en los granos de maíz, sorgo y trigo; y en las pastas de oleaginosas pasta de soya y pasta de canola, con y sin la inclusión de la proteasa Ronozyme ProAct.
2. Determinar el efecto de la actividad de la proteasa Ronozyme ProAct en presencia de la enzima fibrolítica Ronozyme VP y de la fitasa Ronozyme P-(CT), en dietas elaboradas con grano de sorgo y pasta de canola, sobre la digestibilidad fecal del nitrógeno y energía; así como el balance de nitrógeno.

IV. HIPÓTESIS.

La enzima Ronozyme ProAct mejora la digestibilidad fecal aparente e ileal aparente, verdadera y estandarizada de la proteína y los aminoácidos de manera diferencial para cada ingrediente.

El uso simultáneo de las enzimas, fibrolítica Ronozyme VP, fitasa Ronozyme P-(CT) y proteasa Ronozyme ProAct tienen efecto sinérgico en dietas mixtas de grano de sorgo y pasta de canola.

V. MATERIALES Y METODOS.

Los experimentos se realizaron dentro de la Unidad Metabólica de la granja experimental del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal (CENIDFyMA) perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP); que se localiza en el kilómetro 1 de la carretera Ajuchitlán-Colón, del municipio de Colón, Querétaro, México. Ubicado a 20° 41' 44" latitud norte, 100° 00' 55" longitud oeste y a una altitud de 1970 msnm (Google Earth, 2013).

El manejo empleado en los animales experimentales respetó en todo momento los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana de Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (Diario Oficial de la Federación, 2001).

5.1. Experimento I: Determinación de Digestibilidad Ileal y Fecal.

5.1.1 Tratamientos.

Los ingredientes propuestos en los que se determinó la digestibilidad ileal aparente y digestibilidad ileal verdadera y estandarizada fueron los granos de cereales maíz, sorgo y trigo; y las pastas de oleaginosas, pasta de soya y pasta de canola. Se plantearon dos tratamientos, con y sin la inclusión de la enzima proteasa Ronozyme ProAct para cada ingrediente; el diseño experimental consistió en un arreglo de cross-over 2x2 (Anderson y McLean, 1974), de esta forma cada unidad experimental fue su propio control negativo dando un total de seis replicas por dieta. La asignación del tratamiento a la unidad experimental para el primer periodo de cada ingrediente fue completamente al azar.

5.1.2 Dietas.

Los ingredientes para elaborar todas las dietas experimentales se adquirieron en el mercado local y fueron analizados en su composición química proximal (Cuadro 1) para formular las dietas que se elaboraron en la planta de alimentos del CENID Fisiología.

Cuadro 1. Composición química de los ingredientes utilizados para elaborar las dietas experimentales.

	Caseína	Maíz	Sorgo	Trigo	Pasta de Soya	Pasta de Canola
MS, g/Kg MS	903.70	884.63	884.68	895.19	909.03	925.53
PC, g/Kg MS	847.86	70.64	79.45	136.77	430.60	378.40
EB, cal/g MS		4253.37	4078.27	3905.75	4318.32	4359.68
FDN, g/Kg MS		69.50	76.36	100.43	92.10	226.86
FDA, g/Kg MS		17.63	31.68	26.59	76.94	172.63

Se evaluaron dos dietas, con y sin la inclusión de la enzima Ronozyme ProAct para cada ingrediente. La inclusión de ProAct en el alimento fue de 200 ppm. También se utilizó una dieta a base de caseína como dieta control, la cual sirvió como proteína de referencia para determinar las pérdidas basales de nitrógeno endógeno en los ingredientes maíz, sorgo y trigo. Las dietas se formularon para proporcionar 170 g/kg de proteína cruda (PC), con el ajuste apropiado de las proporciones de caseína y almidón de maíz, vitaminas y minerales de acuerdo a las recomendaciones del NRC (1998), así como óxido de cromo (0.25%) como marcador externo de digestibilidad. Se adicionaron 10g·kg⁻¹ de grasa animal para disminuir el polvo del alimento; cuando el contenido de FDN fue inferior a 8% en el ingrediente, éste se ajustó con una fuente de celulosa indigestible y se les agregó sacarosa a las dietas, a razón de 50 g·kg⁻¹ para incrementar la palatabilidad de las mismas (Cuadro 2).

El consumo diario por animal durante el periodo experimental se fijó a 2.5 veces el requerimiento mínimo de Energía Digestible de Mantenimiento el cual se estimó en 460 KJ de ED/kg de PV^{0.75} (INRA, 1984).

Cuadro 2. Composición porcentual y análisis químico de la dieta control Caseína y de las dietas experimentales Maíz, Sorgo, Trigo, Pasta de Soya y Pasta de Canola con y sin la inclusión de Ronozyme ProAct.

Ingrediente	Caseína	Maíz		Sorgo		Trigo		Pasta de Soya		Pasta de Canola	
		Con ProAct	Sin ProAct	Con ProAct	Sin ProAct						
Caseína	19.00	12.83	12.83	11.90	11.90	5.85	5.85				
Maíz		77.83	77.83								
Pasta de Soya								38.64	38.64		
Sorgo				79.32	79.32						
Pasta de Canola										45.00	45.00
Trigo						85.37	85.37				
Almidón de Maíz	63.24	0.02		0.02		0.02		47.59	47.57	46.17	46.15
Sacarosa	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Arbocel ® ¹	9.00	0.56	0.56					4.94	4.94		
Sebo	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Carbonato de Calcio	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.98	0.98	0.70	0.70	0.70	0.70
Fosfato dicálcico	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.80	0.80	1.15	1.15	1.15	1.15
Sal	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Ronozyme ProAct ®			0.02		0.02		0.02		0.02		0.02
Premezcla de Vitaminas ¹	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
Premezcla de Minerales ¹	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
Óxido de Cromo	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Total	100.00	100.00									
MS, g/Kg MS	903.07	891.70	891.70	900.60	901.70	896.01	897.16	911.80	911.60	916.90	916.30
PC, g/Kg MS	164.41	192.35	191.95	191.18	185.77	160.32	168.83	158.54	187.71	185.28	174.96
EB, cal/g MS	4024.11	4568.48	4572.64	4434.38	4525.64	3926.91	3956.11	4504.98	4272.20	4552.97	4301.63
FDN, g/Kg MS	72.00	61.49	63.18	53.82	50.00	77.10	82.30	85.25	85.18	110.21	110.42
FDA, g/Kg MS	46.45	16.45	17.47	32.62	33.73	22.63	26.18	56.40	54.48	85.98	83.05

¹Arbocel ® Celulosa de madera utilizada como fuente de fibra.

²Premezcla que aporta por kilogramo de dieta: vitamina A 6400 UI, vitamina D 1280 UI, vitamina E 30 UI, vitamina K 0.8mg, Colina 375 mg, Niacina 24mg, Ácido Pantoténico 11.0 mg, Riboflavina 4.8 mg, vitamina B₁₂ 30 mg.

³Premezcla que aporta por kilogramo de dieta: Cu 8.4 mg, I 0.56 mg, Fe 70.0 mg, Mn 21.0 mg, Se 0.18 mg, Zn 84.0 mg.

5.1.3 Animales.

Durante el desarrollo del primer experimento se utilizaron seis cerdos en crecimiento para la evaluación de cada ingrediente, provenientes de un cruzamiento de las líneas genéticas Fertilis 20 (Hembra) x G Performance (Macho) (Genetiporc®), la selección de los cerdos y la asignación de los tratamientos se realizó completamente al azar.

Las unidades experimentales fueron cerdos machos castrados con peso vivo de 35 ± 2.8 Kg. provistos con una cánula simple en "T" a nivel del íleon distal, la cual se fijó quirúrgicamente de acuerdo a la metodología descrita por Reis de Souza *et al.* (2000).

Los animales tuvieron un periodo de 21 días para la adaptación al manejo experimental y de recuperación post-operatoria con dos comidas al día (0800 y 1600 horas), consistentes en una dieta comercial de crecimiento con 170 g/kg de PC. La cantidad ofrecida se incrementó diariamente hasta alcanzar el consumo previo al inicio de experimento.

Cada cerdo se alojó en una jaula metabólica elevada e individual, provista de un comedero y un bebedero de chupón, con ventilación natural y control de la temperatura a 19 ± 2 °C. El agua fresca para beber se mantuvo a voluntad durante todo el experimento.

5.1.4 Periodo experimental y recolección de la muestras.

El periodo experimental, estuvo constituido por un periodo de adaptación a la dieta de cinco días, un periodo de cinco días para colecta de heces y dos días para la colecta de contenido ileal, totalizando 12 días por dieta.

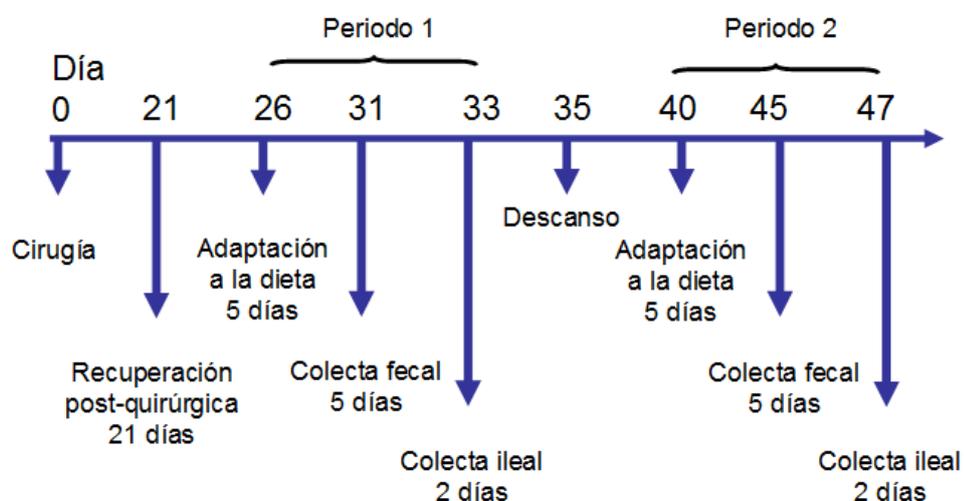


Figura 11. Cronograma del periodo quirúrgico y fase de recuperación post-quirúrgica, así como periodos experimentales (Experimento: Determinación de digestibilidad ileal y fecal).

El periodo de colecta ileal consistió en 12 horas continuas por día, iniciando a las 0700 horas y terminando a las 1900 horas. La digesta que se empleó para determinar la digestibilidad ileal se recibió en bolsas de plástico (10x15 cm) conteniendo 10 ml de HCl 0.2N, con el fin de detener la actividad enzimática. La bolsa de plástico se fijó a la cánula ileal por medio de una liga y fue cambiada periódicamente conforme se llenaba de contenido ileal, en seguida se transfirió a un contenedor de plástico. La digesta ileal recolectada por animal se congeló a -20°C y se mantuvo así hasta ser liofilizada, mientras que las heces se recolectaron dos veces al día para luego formar una muestra compuesta y homogénea de los cinco días de colecta que después fue sometida a un proceso de secado con aire forzado durante 48 horas a 55°C .

5.2. Experimento II: Balance de Nitrógeno.

5.2.1 Tratamientos.

Los resultados obtenidos en el primer experimento permitieron seleccionar a los ingredientes sorgo y pasta de canola para elaborar una dieta mixta en el segundo experimento, en el cual; se plantearon cinco tratamientos (Cuadro 3) con la inclusión de la enzimas proteasa Ronozyme ProAct, carbohidrasa Ronozyme VP y fitasa Ronozyme P-(CT) para medir el efecto aditivo que pudieran presentar al ser adicionadas de forma conjunta.

Cuadro 3. Nivel de inclusión en partes por millón (ppm) de las enzimas a evaluar por tratamiento para el experimento Balance de Nitrógeno.

Enzimas Tratamiento	Ronozyme VP (Carbohidrasa)	Ronozyme ProAct (Proteasa)	Ronozyme P-CT (Fitasa)
1			200
2	300		200
3		200	200
4	300	200	200
5	300	200	

Las enzimas que se utilizaron en el segundo experimento fueron la fitasa proveniente de *Peniophora lycii* y producida por fermentación de un *Aspergillus oryzae* (Ronozyme P-(CT), DSM Nutritional Products México), diseñada para actuar en un rango de pH de 3 a 6 y contiene una actividad de 2500 FYT/g Unidades de Fitasa por gramo de producto. El complejo multienzimático Ronozyme VP (DSM Nutricional Products México) que actúa en un rango de pH de 3 a 6 y contiene principalmente una actividad de endo-1:3(4)- β glucanasa (50 FBG/g) de origen fúngico proveniente de *Aspergillus aculeatus* y de pentosanasa, hemicelulasa y pectinasa.

5.2.2 Dietas.

Para el segundo experimento se formuló una dieta basal con grano de sorgo y pasta de canola (Cuadro 4) ajustada a 170 g/Kg. de proteína cruda, adecuada en los requerimientos de vitaminas y minerales según las recomendaciones del NRC (1998) pero naturalmente deficiente en el aminoácido Lisina. A esta dieta basal se le adicionaron las enzimas, para constituir los 5 tratamientos y se les incluyó óxido férrico (Fe_2O_3) como marcador de las heces y óxido de titanio como marcador (Mroz *et al.*, 1996) de digestibilidad.

Cuadro 4. Composición porcentual y análisis químico de las dietas mixtas sorgo-pasta de canola del Experimento Balance de Nitrógeno.

Ingredientes	Tratamientos				
	1	2	3	4	5
Sorgo, taninos<0.5	68.834	68.834	68.834	68.834	68.834
Canola, pasta	28.430	28.430	28.430	28.430	28.430
Maíz, aceite	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Sal común	0.313	0.313	0.313	0.313	0.313
Carbonato de Calcio	0.669	0.669	0.669	0.669	0.669
Almidón de Maíz	0.054	0.024	0.034	0.004	0.024
Fosfato Bicálcico	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
Ronozyme VP	0.000	0.030	0.000	0.030	0.030
Ronozyme ProAct	0.000	0.000	0.020	0.020	0.020
Ronozyme P-CT	0.020	0.020	0.020	0.020	0.000
Óxido de Titanio	0.300	0.300	0.300	0.300	0.300
Premezcla de Vitaminas¹	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
Premezcla de Minerales²	0.080	0.080	0.080	0.080	0.080
Total	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
Análisis Químico					
MS, g/Kg	870.91	869.83	866.34	864.40	867.98
Energía, Mcal/Kg	4.09	4.10	4.09	4.10	4.07
Nitrógeno, g/Kg	26.90	26.69	26.46	26.93	27.03

¹Premezcla que aporta por kilogramo de dieta: vitamina A 6400 UI, vitamina D 1280 UI, vitamina E 30 UI, vitamina K 0.8mg, Colina 375 mg, Niacina 24mg, Ácido Pantoténico 11.0 mg, Riboflavina 4.8 mg, vitamina B₁₂ 30 mg.

²Premezcla que aporta por kilogramo de dieta: Cu 8.4 mg, I 0.56 mg, Fe 70.0 mg, Mn 21.0 mg, Se 0.18 mg, Zn 84.0 mg.

Durante el periodo de adaptación el alimento se ofreció a libertad en dos comidas diarias (0800 y 1600 horas), registrando el consumo máximo observado por animal para que durante el periodo de colecta se les ofreciera solamente el 90% de ese consumo máximo con el fin evitar el rechazo del alimento.

5.2.3 Animales.

Se utilizaron en total 20 cerdos machos castrados con peso vivo entre 40-45 Kg; donde la unidad experimental fue el cerdo, los cuales se distribuyeron en dos bloques completos al azar. En este caso, los animales tuvieron un periodo de adaptación a la

jaula y al manejo experimental de 15 días, con dos comidas al día (0800 y 1600 horas) consistentes en una dieta de crecimiento formulada con 170 g/Kg. de PC.

Cada cerdo se alojó en una jaula metabólica elevada e individual, provista de un comedero y un bebedero de chupón, con ventilación natural y control de la temperatura a $19 \pm 2^\circ\text{C}$. El agua fresca para beber se mantuvo a voluntad durante todo el experimento.

5.2.4 Periodo experimental y recolección de la muestras.

Los animales dentro de cada bloque experimental tuvieron un periodo de adaptación a la dieta de siete días. Se recolectó la orina durante un periodo de cinco días, de igual forma las heces se recolectaron en su totalidad durante un periodo de cinco días a partir de que se observó la coloración rojiza del marcador (óxido férrico) en ellas, dando un total de alrededor de 14 días por bloque. La orina individual se colectó en lapsos de 12 hrs en recipientes plásticos de 20L a los que se les agregó 40mL de HCl 6N cada 12 hrs para detener la actividad enzimática y evitar la descomposición. En seguida se midió y tomó una alícuota del 10% y se congeló a -20°C ; al concluir el periodo de colecta se homogeneizó para su análisis posterior. Las heces se recolectaron dos veces al día, se pesaron y se congelaron a -20°C ; al final se formó una muestra compuesta y homogénea de los cinco días de colecta para después secarse en una estufa de aire forzado a 55°C por 48 horas, de la que posteriormente se tomó una alícuota del 5% para su análisis.

5.3 Preparación de las muestras y análisis químicos.

Las digestas liofilizadas y las heces deshidratadas se molieron a través de una malla de 0.5 mm en un molino de laboratorio (Arthur H. Thomas Co. Philadelphia, PA).

Los análisis realizados en todos los ingredientes y dietas experimentales fueron Materia Seca (MS), Proteína Cruda (PC) (de acuerdo a los métodos 934.01 y 976.05 del AOAC 2000), Energía Bruta (EB) (siguiendo el método calorimétrico en una Bomba Parr 1266, Illinois), Fibra Detergente Neutra (FDN) y Fibra Detergente Ácida (FDA) según Van Soest *et al.* (1970).

En las muestras de digesta ileal y en las heces del primer experimento se determinó: MS y PC de acuerdo a los métodos 934.01 y 976.05 del AOAC (2000), óxido de cromo según Fenton y Fenton, (1979) y EB solamente para las heces por el método calorimétrico (Bomba Parr 1266, Illinois).

Las muestras de orina y heces recolectadas del segundo experimento se analizaron para MS, Nitrógeno (N) y EB.

La preparación de las muestras para la determinación de aminoácidos en las materias primas, dietas y digesta ileal se realizaron según el método 994.12 del AOAC, (2000), el cual consiste en hidrolizar las muestras a 110 °C durante 24 h en HCl 6M; en el caso de los aminoácidos azufrados: metionina y cisteína, se realizó una oxidación previa con ácido per fórmico. Los análisis de aminoácidos se realizaron por medio de cromatografía en fase reversa según el método descrito por Henderson *et al.* (2000) en un HPLC de marca Hewlett Packard, modelo 1100; no fue determinado el aminoácido Triptófano.

5.4. Análisis estadístico.

5.4.1 Experimento I: Determinación de Digestibilidad Ileal y Fecal.

Las variables de respuesta analizadas fueron los coeficientes de digestibilidad fecal aparente de MS, PC y EB; la digestibilidad ileal de la PC y aminoácidos de Maíz, Sorgo y Trigo (por el método de diferencia); y de la Pasta de Soya y Pasta de Canola (por el método directo), esto de acuerdo al contenido de proteína en la dieta.

5.4.1.1 Coeficientes de digestibilidad.

El coeficiente de digestibilidad ileal y fecal aparente (DIA o DFA) de un nutrimento en la dieta, es decir; para MS, PC y EB se calculó de acuerdo con la ecuación propuesta por Mariscal-Landín y Reis de Souza (2006):

$$\text{DIA o DFA} = 1 - \left[\frac{\text{ID} \cdot \text{AF}}{\text{AD} / \text{IF}} \right]$$

Donde:

DIA, es el coeficiente de digestibilidad ileal aparente de un nutrimento y

DFA, es el coeficiente de digestibilidad fecal aparente de un nutrimento.

ID es la concentración del marcador en la dieta en mg/Kg^{-1} MS;
AF es la concentración del nutriente en la dieta en mg/Kg^{-1} MS;
AD es la concentración del nutriente en la digesta ileal o heces en mg/Kg^{-1} MS;
IF es la concentración del marcador en la digesta ileal en mg/Kg^{-1} MS

Los coeficientes de digestibilidad ileal aparente (DIA) de la proteína y aminoácidos del maíz, sorgo y trigo se calcularon por el método de diferencia utilizando la caseína como ingrediente basal, según el método propuesto por Fan y Sauer, (1995)

$$\text{CDIANA} = [\text{CDIADA} - (\text{CDIADB} \times \text{LNB})] / \text{LNA}$$

Donde:

CDIANA, es el coeficiente de digestibilidad ileal aparente de un nutrimento en el ingrediente ensayo.

CDIADA, es el coeficiente de digestibilidad ileal aparente de la dieta ensayo.

CDIADB, es el coeficiente de digestibilidad ileal aparente de la dieta basal.

LNB es el nivel de contribución de un nutrimento del ingrediente basal a la dieta ensayo (en proporción decimal).

LNA es el nivel de contribución de un nutrimento del ingrediente ensayo a la dieta ensayo (en proporción decimal) (Mariscal-Landín y Reis de Souza, 2006).

La digestibilidad ileal estandarizada de PC y aminoácidos de la Pasta de Soya y Pasta de Canola se realizaron empleando la fórmula propuesta por Mariscal-Landín, (1992); y utilizando el endógeno reportado por Mariscal-Landín y Reis de Souza (2006) y se calculó con la ecuación:

$$\text{DIS} = \text{DIA} + [(\text{pérdida de PC endógena basal} / \text{PC en la dieta})]$$

Donde:

DIS es el coeficiente de digestibilidad ileal estandarizada;

DIA es el coeficiente de digestibilidad ileal aparente.

El efecto inducido por Ronozyme ProAct se estimó empleando un diseño Cross-over 2x2 (Federer, 1955), es decir 2 tratamientos y 2 periodos; al azar tres de los seis animales para cada ingrediente recibieron el tratamiento con enzima Ronozyme

ProAct y tres recibieron el tratamiento sin enzima, al término del primer periodo la asignación de los tratamientos se invirtió, dando un total de seis replicas para cada tratamiento; con dos grupos experimentales completamente diferenciados en la secuencia de la asignación de tratamientos, este diseño permitió constatar la no presencia de un efecto residual que se arrastre al segundo periodo para cada tratamiento (Federer, 1955).

El modelo lineal aditivo es el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_{j(i)} + \gamma_k + \delta_l + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijkl} = Variable de respuesta de la i -ésima secuencia en el j -ésimo animal, en el k -ésimo periodo y el l -ésimo tratamiento.

μ : Efecto de la media general.

α_i : Efecto del i -ésima secuencia.

$\beta_{j(i)}$: Efecto del j -ésimo animal anidado en la i -ésima secuencia.

γ_k : Efecto del k -ésimo período.

δ_l : Efecto l -ésimo tratamiento.

ε_{ijkl} : Es el efecto del error experimental asociado con la observación de la i -ésima secuencia en el j -ésimo animal, en el k -ésimo periodo y el l -ésimo tratamiento.

Los datos se analizaron empleando el Procedimiento "Mixed" del paquete estadístico SAS (SAS, 2008).

5.4.2 Experimento: Balance de Nitrógeno.

Para el segundo experimento las variables de respuesta analizadas fueron consumo de MS, N y E, digestibilidad del nitrógeno y energía, retención de nitrógeno.

El diseño empleado para este experimento fue un Diseño de Bloques Completos al azar con un arreglo factorial de $2 \times 2 + 1$, es decir; dos enzimas: Ronozyme ProAct y Ronozyme VP, cada una con dos niveles de inclusión (no inclusión y dosis comercial) y un control con las dos enzimas incluidas a nivel comercial más la adición de la fitasa Ronozyme P-(CT) a dosis comercial.

El modelo aditivo lineal propuesto fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ijkl} = Variable de respuesta de la i -ésimo bloque, en el k -ésimo tratamiento y l -ésima repetición

μ : Efecto de la media general.

α_i : Efecto del i -ésimo bloque; $i: 1,2$

β_j : Efecto del j -ésimo tratamiento; $j:1,5$

ε_{ij} : Efecto del error experimental asociado con la observación de la i -ésimo bloque en el j -ésimo tratamiento.

El análisis estadístico empleado fue el procedimiento "Modelos Lineales Generales" (GLM) del paquete estadístico SAS (SAS, 2008).

VI. RESULTADOS.

Los animales de ambos experimentos permanecieron en óptimas condiciones de salud durante el desarrollo de los mismos.

6.1 Experimento I: Determinación de Digestibilidad Ileal y Fecal.

Se analizó el perfil de aminoácidos de las materias primas utilizadas tal como lo muestra el Cuadro 5 para conocer la composición de aminoácidos totales por ingrediente y de esta forma determinar los coeficientes de digestibilidad con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct.

Cuadro 5. Perfil de Proteína Cruda y Aminoácidos de las materias primas utilizadas Caseína, Maíz, Sorgo, Trigo, Pasta de soya y Pasta de canola.

	Caseína	Maíz	Sorgo	Trigo	Pasta de Soya	Pasta de Canola
Materia Seca	90.37	88.40	88.47	89.52	90.90	92.59
Proteína	84.78	7.06	7.95	13.68	43.06	37.84
Lisina	7.76	0.37	0.17	0.40	2.63	1.90
Arginina	5.32	0.35	0.29	0.50	3.62	3.44
Histidina	3.53	0.19	0.16	0.22	1.08	1.32
Leucina	7.65	0.78	1.09	0.64	3.13	2.85
Isoleucina	3.72	0.24	0.33	0.33	1.67	1.31
Valina	4.13	0.35	0.45	0.44	1.63	1.49
Fenilalanina	4.20	0.31	0.37	0.43	2.01	1.43
Metionina	2.74	2.71	0.18	0.23	0.68	0.76
Treonina	2.96	0.23	0.28	0.25	1.48	1.83
Ácido Aspártico	3.13	0.40	0.47	0.40	2.72	1.20
Ácido Glutámico	15.49	1.29	1.80	2.89	6.54	5.82
Serina	5.33	0.32	0.32	0.40	2.12	1.67
Glicina	2.72	0.27	0.28	0.33	1.90	3.26
Alanina	2.74	0.48	0.72	0.33	1.77	1.64
Tirosina	4.84	0.26	0.23	0.25	1.43	1.11
Cisteína	0.65	0.64	0.16	0.25	0.72	0.90
Prolina	6.15	0.72	1.35	1.32	1.58	6.81

6.1.1 Maíz.

La digestibilidad ileal aparente (DIA) del maíz muestra una diferencia en el aminoácido Glicina ($P < 0.05$) y una tendencia ($P < 0.10$) para los aminoácidos Arginina y Treonina, en las dietas adicionadas con la enzima Ronozyme ProAct® (Cuadro 6). Aun cuando no hubo diferencia estadística para el resto de los aminoácidos, ($P > 0.05$) estos fueron más digestibles numéricamente en la dieta que recibió la proteasa, con excepción de la Fenilalanina que incrementó su digestibilidad numéricamente en la dieta sin la enzima tal como se aprecia en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Coeficientes de digestibilidad ileal aparente con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Maíz.

	Digestibilidad Ileal Aparente			
	Con ProAct	Sin ProAct	EEM	Prob.
Materia Seca	0.849	0.842	0.014	0.73
Proteína	0.869	0.840	0.019	0.22
Lisina	0.923	0.904	0.016	0.38
Arginina	0.913	0.873	0.017	0.09
Histidina	0.921	0.887	0.017	0.17
Leucina	0.935	0.916	0.012	0.19
Isoleucina	0.910	0.902	0.013	0.39
Valina	0.916	0.901	0.014	0.47
Fenilalanina	0.932	0.937	0.009	0.71
Metionina	0.921	0.914	0.031	0.88
Treonina	0.856	0.792	0.025	0.10
Ácido Aspártico	0.868	0.861	0.019	0.78
Ácido Glutámico	0.928	0.918	0.010	0.38
Serina	0.895	0.875	0.016	0.31
Glicina	0.745a	0.583b	0.035	0.01
Alanina	0.860	0.827	0.029	0.51
Tirosina	0.930	0.892	0.020	0.20
Cisteína	0.890	0.876	0.031	0.72
Prolina	0.920	0.904	0.011	0.30

EEM: Error Estándar de la Media

Prob.: Nivel de Probabilidad

a, b Promedios con letras distintas difieren estadísticamente.

Al aplicar el método de diferencia propuesto por Fan y Sauer (1995) para estimar la digestibilidad ileal verdadera de los nutrientes del maíz, se encontró un incremento en la digestibilidad de Glicina y Metionina ($P < 0.05$), sin embargo para el caso de este último el efecto fue negativo al uso de la proteasa tal como se observa en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Coeficientes de digestibilidad ileal verdadera con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Maíz.

	Digestibilidad Ileal Verdadera (por el método de la diferencia)			
	Con ProAct	Sin ProAct	EEM	Prob.
Proteína	0.781	0.757	0.040	0.69
Lisina	0.960	0.880	0.028	0.17
Arginina	0.835	0.792	0.030	0.30
Histidina	0.825	0.795	0.040	0.63
Leucina	0.911	0.897	0.022	0.67
Isoleucina	0.868	0.894	0.038	0.41
Valina	0.919	0.927	0.033	0.87
Fenilalanina	0.851	0.851	0.021	0.96
Metionina	0.879b	0.965a	0.021	0.03
Treonina	0.687	0.545	0.073	0.23
Ácido Aspártico	0.841	0.784	0.026	0.09
Ácido Glutámico	0.922	0.922	0.026	0.99
Serina	0.902	0.849	0.028	0.25
Glicina	0.695a	0.425b	0.049	0.01
Alanina	0.787	0.771	0.045	0.82
Tirosina	0.856	0.768	0.075	0.44
Cisteína	0.868	0.896	0.030	0.52
Prolina	0.923	0.903	0.033	0.68

EEM: Error Estándar de la Media

Prob.: Nivel de Probabilidad

a, b Promedios con letras distintas difieren estadísticamente.

6.1.2 Sorgo.

La digestibilidad ileal aparente (Cuadro 8) y la digestibilidad ileal verdadera calculada por el método de diferencia (Cuadro 9) para la Proteína en el sorgo fue mayor en el tratamiento al cual no se le adicionó la enzima ($P < 0.05$), al igual que para el aminoácido Leucina; los demás aminoácidos no mostraron diferencia estadísticamente significativas.

Cuadro 8. Coeficientes de digestibilidad ileal aparente con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Sorgo.

	Digestibilidad Ileal Aparente			
	Con ProAct	Sin ProAct	EEM	Prob.
Materia Seca	0.817	0.844	0.008	0.09
Proteína	0.815b	0.842a	0.006	0.01
Lisina	0.895	0.884	0.028	0.70
Arginina	0.835	0.835	0.017	0.98
Histidina	0.801	0.841	0.033	0.42
Leucina	0.889b	0.918a	0.007	0.03
Isoleucina	0.888	0.911	0.018	0.40
Valina	0.844	0.877	0.017	0.21
Fenilalanina	0.881	0.881	0.010	0.94
Metionina	0.878	0.894	0.015	0.49
Treonina	0.824	0.846	0.038	0.71
Ácido Aspártico	0.856	0.908	0.033	0.20
Ácido Glutámico	0.902	0.917	0.009	0.22
Serina	0.825	0.845	0.012	0.29
Glicina	0.693	0.671	0.092	0.85
Alanina	0.777	0.811	0.017	0.20
Tirosina	0.767	0.783	0.046	0.73
Cisteína	0.679	0.720	0.031	0.38
Prolina	0.923	0.923	0.012	0.99

EEM: Error Estándar de la Media

Prob.: Nivel de Probabilidad

a, b Promedios con letras distintas difieren estadísticamente.

Cuadro 9. Coeficientes de digestibilidad ileal verdadera con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Sorgo.

	Digestibilidad ileal verdadera (por el método de la diferencia)			
	Con ProAct	Sin ProAct	EEM	Prob.
Proteína	0.656b	0.733a	0.015	0.02
Lisina	0.656	0.774	0.153	0.61
Arginina	0.517	0.506	0.050	0.89
Histidina	0.410	0.459	0.186	0.85
Leucina	0.834b	0.888a	0.014	0.04
Isoleucina	0.838	0.901	0.051	0.41
Valina	0.738	0.821	0.042	0.21
Fenilalanina	0.719	0.762	0.028	0.34
Metionina	0.733	0.784	0.050	0.49
Treonina	0.680	0.746	0.108	0.68
Ácido Aspártico	0.780	0.895	0.076	0.20
Ácido Glutámico	0.867	0.901	0.021	0.23
Serina	0.636	0.701	0.040	0.29
Glicina	0.614	0.576	0.142	0.85
Alanina	0.737	0.785	0.023	0.20
Tirosina	0.569	0.489	0.156	0.70
Cisteína	0.534	0.598	0.048	0.38
Prolina	0.990	0.993	0.023	0.94

EEM: Error Estándar de la Media

Prob.: Nivel de Probabilidad

a, b Promedios con letras distintas difieren estadísticamente.

6.1.3 Trigo.

Ronozyme ProAct® mejoró la digestibilidad ileal aparente ($P < 0.05$) del Ácido Aspártico en el Trigo, tal como se presenta en el Cuadro 10; sin embargo, al corregir por las pérdidas de nitrógeno endógeno con el método de la diferencia para obtener los coeficientes de digestibilidad ileal verdadera, esta diferencia estadística desapareció ($P < 0.10$) (Cuadro 11).

Cuadro 10. Coeficientes de digestibilidad ileal aparente con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Trigo.

	Digestibilidad ileal aparente			
	Con ProAct	Sin ProAct	EEM	Prob.
Materia Seca	0.839	0.849	0.006	0.10
Proteína	0.853	0.880	0.017	0.21
Lisina	0.904	0.890	0.013	0.45
Arginina	0.891	0.917	0.013	0.22
Histidina	0.908	0.929	0.014	0.37
Leucina	0.903	0.920	0.012	0.29
Isoleucina	0.904	0.899	0.011	0.45
Valina	0.874	0.877	0.012	0.73
Fenilalanina	0.912	0.921	0.008	0.33
Metionina	0.846	0.850	0.003	0.45
Treonina	0.802	0.824	0.014	0.25
Ácido Aspártico	0.850a	0.803b	0.028	0.04
Ácido Glutámico	0.938	0.944	0.006	0.18
Serina	0.893	0.901	0.011	0.67
Glicina	0.843	0.807	0.024	0.32
Alanina	0.827	0.828	0.008	0.95
Tirosina	0.889	0.921	0.011	0.08
Cisteína	0.834	0.836	0.003	0.62
Prolina	0.931	0.930	0.002	0.16

EEM: Error Estándar de la Media

Prob.: Nivel de Probabilidad

a, b Promedios con letras distintas difieren estadísticamente.

Cuadro 11. Coeficientes de digestibilidad ileal verdadera con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Trigo.

	Digestibilidad ileal verdadera (por el método de la diferencia)			
	Con ProAct	Sin ProAct	EEM	Prob.
Proteína	0.852	0.864	0.008	0.22
Lisina	0.896	0.877	0.017	0.47
Arginina	0.782	0.857	0.036	0.22
Histidina	0.864	0.876	0.034	0.82
Leucina	0.886	0.891	0.010	0.66
Isoleucina	0.902	0.887	0.016	0.19
Valina	0.852	0.856	0.018	0.75
Fenilalanina	0.890	0.892	0.011	0.82
Metionina	0.762	0.768	0.006	0.45
Treonina	0.699	0.742	0.028	0.25
Ácido Aspártico	0.827	0.774	0.038	0.10
Ácido Glutámico	0.940	0.949	0.008	0.16
Serina	0.908	0.891	0.008	0.17
Glicina	0.845	0.743	0.067	0.32
Alanina	0.776	0.778	0.014	0.96
Tirosina	0.892	0.840	0.020	0.14
Cisteína	0.923	0.826	0.004	0.63
Prolina	0.982	0.981	0.002	0.16

EEM: Error Estándar de la Media

Prob.: Nivel de Probabilidad

a, b Promedios con letras distintas difieren estadísticamente.

6.1.4 Pasta de Soya.

Para las dietas elaboradas con Pasta de Soya, el cálculo de digestibilidad ileal aparente mostró una mayor digestibilidad para la proteína y los aminoácidos Lisina, Isoleucina, Valina, Fenilalanina, Acido Aspártico, Acido Glutámico y Serina ($P < 0.05$) y una tendencia ($P < 0.10$) para Leucina y Alanina en las dietas que recibieron el Ronozyme ProAct®. Sin embargo; Cisteína fue más digestible ($P < 0.05$) en la dieta control sin ProAct® (Cuadro 12).

Cuadro 12. Coeficientes de digestibilidad ileal aparente con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Pasta de Soya.

	Digestibilidad Ileal Aparente			
	Con ProAct	Sin ProAct	EEM	Prob.
Materia Seca	0.797	0.784	0.005	0.11
Proteína	0.848a	0.803b	0.010	0.03
Lisina	0.925a	0.868b	0.005	<0.001
Arginina	0.911a	0.886b	0.024	0.05
Histidina	0.861	0.832	0.011	0.12
Leucina	0.880	0.826	0.014	0.06
Isoleucina	0.889a	0.852b	0.009	0.03
Valina	0.878a	0.824b	0.010	0.03
Fenilalanina	0.900a	0.857b	0.008	0.01
Metionina	0.895	0.919	0.010	0.15
Treonina	0.807	0.778	0.019	0.31
Ácido Aspártico	0.900a	0.863b	0.010	0.04
Ácido Glutámico	0.902a	0.861b	0.009	0.02
Serina	0.861a	0.817b	0.012	0.04
Glicina	0.735	0.728	0.038	0.91
Alanina	0.818	0.757	0.018	0.08
Tirosina	0.819	0.817	0.024	0.95
Cisteína	0.890b	0.914a	0.006	0.03
Prolina	0.806	0.734	0.046	0.22

EM: Error Estándar de la Media

Prob.: Nivel de Probabilidad

a, b Promedios con letras distintas difieren estadísticamente.

La digestibilidad ileal estandarizada de la Pasta de Soya en la Proteína y los aminoácidos Lisina, Fenilalanina y Acido Glutámico fue mayor ($P<0.05$) cuando se utiliza la enzima Ronozyme ProAct®. Al igual que en la digestibilidad ileal aparente de la pasta de soya, los aminoácidos azufrados mostraron una mayor digestibilidad ($P<0.05$) para la Cisteína y una tendencia para la Metionina ($P<0.07$) en la dieta que no recibió la enzima (Cuadro 13). La digestibilidad de la proteína se mejoró en 5.2% con el uso de la enzima, mientras que la de los aminoácidos en general en un 1.6%.

Cuadro 13. Coeficientes de digestibilidad ileal estandarizada con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Pasta de Soya.

	Digestibilidad Ileal Estandarizada			
	Con ProAct	Sin ProAct	EEM	Prob.
Proteína	0.863a	0.820b	0.010	0.03
Lisina	0.947a	0.903b	0.005	0.001
Arginina	0.959	0.948	0.024	0.74
Histidina	0.895	0.874	0.011	0.24
Leucina	0.933	0.894	0.014	0.11
Isoleucina	0.965	0.949	0.009	0.27
Valina	0.968	0.942	0.010	0.13
Fenilalanina	0.946a	0.914b	0.009	0.04
Metionina	0.954	0.987	0.010	0.07
Treonina	0.930	0.935	0.019	0.85
Ácido Aspártico	0.955	0.931	0.010	0.13
Ácido Glutámico	0.959a	0.932b	0.009	0.05
Serina	0.970	0.948	0.012	0.18
Glicina	0.849	0.869	0.038	0.73
Alanina	0.921	0.886	0.018	0.22
Tirosina	0.874	0.886	0.024	0.74
Cisteína	0.929b	0.951a	0.006	0.04
Prolina	0.937	0.884	0.046	0.33

EM: Error Estándar de la Media

Prob.: Nivel de Probabilidad

a, b Promedios con letras distintas difieren estadísticamente.

6.1.5 Pasta de Canola.

Por su parte, la digestibilidad ileal aparente y estandarizada de la pasta de canola para el aminoácido Valina tuvo un efecto negativo al uso de la proteasa Ronozyme ProAct® al mostrar una menor digestibilidad; sin embargo, los aminoácidos Serina, Alanina y Tirosina mostraron una diferencia ($P < 0.05$) positiva a la inclusión de la enzima (Cuadros 14 y 15).

Cuadro 14. Coeficientes de digestibilidad ileal aparente con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Pasta de Canola.

	Digestibilidad ileal Aparente			
	Con ProAct	Sin ProAct	EEM	Prob.
Materia Seca	0.714	0.699	0.008	0.20
Proteína	0.693	0.681	0.010	0.34
Lisina	0.707	0.705	0.074	0.99
Arginina	0.776	0.654	0.044	0.10
Histidina	0.739	0.581	0.086	0.24
Leucina	0.815	0.783	0.012	0.12
Isoleucina	0.815	0.805	0.037	0.85
Valina	0.700b	0.728a	0.016	0.002
Fenilalanina	0.781	0.780	0.027	0.99
Metionina	0.758	0.743	0.022	0.64
Treonina	0.744	0.798	0.053	0.53
Ácido Aspártico	0.567	0.646	0.090	0.56
Ácido Glutámico	0.858	0.838	0.016	0.43
Serina	0.704a	0.627b	0.013	0.02
Glicina	0.570	0.662	0.146	0.71
Alanina	0.700a	0.644b	0.021	0.02
Tirosina	0.648a	0.558b	0.036	0.03
Cisteína	0.725	0.710	0.040	0.79
Prolina	0.776	0.749	0.045	0.64

EEM: Error Estándar de la Media

Prob.: Nivel de Probabilidad

a, b Promedios con letras distintas difieren estadísticamente.

Cuadro 15. Coeficientes de digestibilidad ileal estandarizada con y sin la inclusión del Ronozyme ProAct® para el ingrediente Pasta de Canola.

	Digestibilidad Ileal Estandarizada			
	Con ProAct	Sin ProAct	EEM	Prob.
Proteína	0.709	0.696	0.010	0.31
Lisina	0.745	0.745	0.073	0.99
Arginina	0.835	0.724	0.043	0.13
Histidina	0.775	0.622	0.086	0.26
Leucina	0.873	0.846	0.012	0.17
Isoleucina	0.919	0.909	0.036	0.85
Valina	0.809b	0.824a	0.016	0.01
Fenilalanina	0.838	0.830	0.045	0.91
Metionina	0.767	0.751	0.022	0.63
Treonina	0.842	0.896	0.053	0.53
Ácido Aspártico	0.753	0.833	0.091	0.56
Ácido Glutámico	0.918	0.902	0.017	0.52
Serina	0.838a	0.782b	0.013	0.05
Glicina	0.656	0.744	0.015	0.71
Alanina	0.812a	0.763b	0.020	0.03
Tirosina	0.700a	0.638b	0.035	0.03
Cisteína	0.750	0.735	0.040	0.79
Prolina	0.815	0.789	0.045	0.64

EM: Error Estándar de la Media

Prob.: Nivel de Probabilidad

a, b Promedios con letras distintas difieren estadísticamente.

La mejora porcentual promedio de los aminoácidos al uso de la enzima fue de 3.1% utilizando los coeficientes de digestibilidad ileal aparente y 2.3% con los de digestibilidad ileal estandarizada para la pasta de canola.

6.1.6 Digestibilidad Fecal Aparente de los ingredientes.

Los resultados de digestibilidad fecal de la materia seca, proteína y energía se muestran en el Cuadro 16, donde puede apreciarse un aumento en la digestibilidad fecal de la proteína de la pasta de soya con el uso de la enzima, así como una mejora en la digestibilidad fecal de estos tres nutrientes en la pasta de canola ($P < 0.05$) y una tendencia en el caso de la digestibilidad fecal de la energía del maíz ($P < 0.12$).

Cuadro 16. Coeficientes de digestibilidad fecal aparente de la Materia Seca, Proteína y Energía con y sin la inclusión de Ronozyme ProAct® para los ingredientes Maíz, Pasta de Soya, Sorgo, Pasta de Canola y Trigo.

Ingrediente		Materia Seca	Proteína	Energía
Maíz	Con ProAct	0.897	0.927	0.896
	Sin ProAct	0.894	0.922	0.887
	E.E.M.	0.006	0.009	0.007
	Prob.	0.50	0.38	0.12
Sorgo	Con ProAct	0.915	0.890	0.908
	Sin ProAct	0.915	0.891	0.905
	E.E.M.	0.003	0.004	0.002
	Prob.	0.80	0.88	0.39
Trigo	Con ProAct	0.919	0.950	0.920
	Sin ProAct	0.918	0.950	0.919
	E.E.M.	0.001	0.003	0.001
	Prob.	0.43	0.95	0.63
Pasta de Soya	Con ProAct	0.916	0.931a	0.903
	Sin ProAct	0.912	0.912b	0.901
	E.E.M.	0.003	0.005	0.004
	Prob.	0.45	0.01	0.80
Pasta de Canola	Con ProAct	0.871a	0.860a	0.880a
	Sin ProAct	0.859b	0.852b	0.868b
	E.E.M.	0.002	0.001	0.003
	Prob.	0.02	0.01	0.05

EEM: Error Estándar de la Media

Prob.: Nivel de Probabilidad

a, b Promedios con letras distintas difieren estadísticamente.

6.2. Experimento II: Balance de Nitrógeno.

Los resultados obtenidos durante el curso del segundo experimento se muestran en el Cuadro 17, ninguna de las variables de respuesta medidas mostraron diferencias a la inclusión de las enzimas; el consumo de materia seca, nitrógeno y energía fue el mismo para los cinco tratamientos. La excreción de nitrógeno y energía en heces y orina tampoco mostró una diferencia por lo que al hacer los cálculos de digestibilidad del nitrógeno, retención del nitrógeno y digestibilidad de la energía no existieron diferencias. Con el consumo de materia seca y energía en gramos por día se pudo estimar la energía bruta de cada una de las dietas, con este valor y el coeficiente de

digestibilidad de la energía, se calculó la energía digestible de las dietas. La energía metabolizable de los cinco tratamientos, fue calculada por la diferencia de la energía digestible menos la energía excretada en orina.

Cuadro 17. Resultados del Balance de Nitrógeno y Digestibilidad de la Energía para las dietas con diferente inclusión de las enzimas proteasa, fitasa y glucanasa.

Tratamiento	1	2	3	4	5	EEM	Prob
	P-CT	VP+ P-CT	PA+ P-CT	VP+PA +P-CT	VP+PA		
Consumo MS, g/d	1599.76	1597.78	1637.38	1510.54	1509.74	182.47	0.80
Consumo N, g/d	49.42	49.04	50.08	47.07	47.03	5.64	0.91
N Heces, g/d	13.18	13.58	13.61	12.07	13.42	2.87	0.58
N Orina, g/d	14.23	14.04	14.28	14.66	14.35	2.17	0.99
Dig N, %	71.97	71.92	67.59	72.01	67.15	4.37	0.31
Retención N, g/d	22.01	21.41	20.32	20.34	19.26	2.65	0.63
N retenido, % consumo	44.56	43.97	40.81	43.81	40.95	4.49	0.64
N retenido, % digerido	60.72	60.43	59.06	58.36	57.66	4.08	0.79
Consumo E, Mcal/d	7.54	7.54	7.72	7.16	7.09	0.85	0.80
E Heces, Mcal/d	1.48	1.48	1.53	1.53	1.45	0.33	0.65
E Orina, Mcal/d	0.46	0.49	0.44	0.47	0.47	0.06	0.86
Dig E, %	80.48	80.52	77.71	80.94	79.31	2.99	0.59
EB dieta Mcal/Kg	4.71	4.72	4.72	4.74	4.69	.	.
ED dieta Mcal/Kg	3.79	3.80	3.67	3.84	3.72	0.17	0.96
EM dieta Mcal/kg	3.33	3.31	3.22	3.37	3.25	0.1587	0.68

EEM: Error Estándar de la Media

Prob.: Nivel de Probabilidad

a, b Promedios con letras distintas difieren estadísticamente.

VP: Ronozyme VP (Carbohidrasa)

PA: Ronozyme ProAct (Proteasa)

P-CT: Ronozyme P-CT (Fitasa)

Consumo MS, g/d= Consumo de materia seca expresado en gramos promedio por día.

Consumo N, g/d= Consumo de nitrógeno expresado en gramos promedio por día.

N Heces, g/d= Nitrógeno excretado en heces expresado en gramos promedio por día.

N Orina, g/d= Nitrógeno excretado en orina expresado en gramos promedio por día.

Dig N, %= Digestibilidad fecal del nitrógeno expresado en porcentaje.

Retención N, g/d= Retención del nitrógeno expresado en gramos promedio por día.

N retenido, % consumo= Nitrógeno retenido expresado como porcentaje del consumo.

N retenido, % digerido= Nitrógeno retenido expresado como porcentaje de lo digerido.

Consumo E, Mcal/d= Consumo de energía, expresado en Mcal promedio por día.

E heces, Mcal/d= Energía excretada en heces, expresado en Mcal promedio por día.

E orina, Mcal/d= Energía excretada en orina, expresado en Mcal promedio por día.

Dig E, %= Digestibilidad fecal de la energía expresado en porcentaje.

EB dieta Mcal/Kg= Energía bruta de la dieta en Mcal por kilogramo de materia seca.

ED dieta Mcal/Kg= Energía digestible de la dieta en Mcal por kilogramo de energía bruta consumida.

EM dieta Mcal/Kg= Energía metabolizable de la dieta en Mcal por kilogramo de energía bruta consumida.

VII. DISCUSIÓN.

El contenido de PC, MS, Energía y aminoácidos de los cinco ingredientes que fueron utilizados para estos experimentos coinciden con los valores encontrados por Fan *et al.*, 1996; NRC, 1998; Kim *et al.*, 1999; Rojo *et al.*, 2001; Morales-Maldonado *et al.*, 2002; Pedersen *et al.*, 2007).

7.1. Experimento I: Determinación de Digestibilidad Ileal y Fecal.

El conocimiento de la composición de la materia prima resulta elemental para la formulación de raciones basadas en el principio de “proteína ideal” o “proteína ideal digestible”, además se puede hacer uso de una enzima exógena y/o de los complejos enzimáticos, sí se presta atención a la susceptibilidad del sustrato a ser hidrolizado.

La calidad de una proteína específica en la dieta es determinada por su contenido de aminoácidos, pero más importante su digestibilidad y disponibilidad.

Los valores de DIA de la proteína cruda y aminoácidos que fueron estimados en este experimento para los cereales maíz, sorgo y trigo; y para las pastas de oleaginosas pasta de soya y pasta de canola, se acercan a los reportados por Sauer *et al.*, 1977a y 1977b; Taverner *et al.*, 1981; de Lange *et al.*, 1990; Fan *et al.*, 1996; Nyachoti *et al.*, 1997; Bellaver y Easter, 1998; Grala *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999; Pedersen *et al.*, 2007.

Si bien algunos valores de digestibilidad pueden ser mayores o menores para ciertos aminoácidos, todos se encuentran en el rango reportado por Pedersen y Boisen (2002). Sin embargo, los valores de digestibilidad reportados para el ingrediente trigo difieren a los encontrados por Morales-Maldonado *et al.* (2002) donde se evaluó al ingrediente adicionado con una proteasa fungal, siendo superiores los calculados en este experimento aún sin la adición de la proteasa.

De igual forma los valores de DIV o DIE de la proteína cruda y aminoácidos que fueron estimados en este experimento para los cereales maíz, sorgo y trigo; y para las pastas de oleaginosas pasta de soya y pasta de canola, respectivamente; se acercan a los

reportados por Taverner *et al.*, 1981; de Lange *et al.*, 1900; Nyachoti *et al.*, 1997; Bellaver y Easter, 1998; Pedersen *et al.*, 2007.

Los coeficientes de digestibilidad ileal aparente reportados por Pedersen y Boisen (2002) permiten suponer que sí se emplean los valores más altos o más bajos del rango, al estimar los coeficientes de digestibilidad ileal estandarizada se podrían obtener valores similares a los encontrados en el presente trabajo.

La inclusión de la enzima en los ingredientes maíz, sorgo, trigo y pasta de canola no supone un cambio en la digestibilidad de aminoácidos que sea significativo para el metabolismo animal, porque aun cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas en algunos aminoácidos se trató de aminoácidos no esenciales, los cuales es sabido pueden ser sintetizados por el propio organismo (Wang y Fuller, 1989).

No fue así el caso de la pasta de soya, donde la mejora en digestibilidad de algunos aminoácidos esenciales; principalmente lisina, podría afectar positivamente el metabolismo animal, ya que se trata del primer aminoácido limitante en la síntesis de proteína muscular (Wang y Fuller, 1989; Marotta *et al.*, 2009).

Los resultados sugieren que la actividad de la proteasa se encuentra fuera de los intervalos de temperatura y pH del lumen intestinal, o bien; otros componentes propios del grano no permiten la interacción de la proteasa con las proteínas del ingrediente. La segunda proposición parece más acertada, dado que cada uno de los ingredientes posee factores antinutricionales específicos.

La explicación más frecuente para grandes diferencias en digestibilidad de aminoácidos dentro del mismo grano, es la desigual distribución de los mismos dentro del grano. Además, es posible que factores como la presencia de uniones resistentes a enzimas reduzcan la posibilidad de los aminoácidos para ser digeridos (Taverner *et al.*, 1981).

La digestibilidad relativa de la proteína del maíz oscila entre 82 y 88%, sin embargo es inferior a la de las proteínas animales (carne, leche, huevo), que es en promedio de 95%. Ese valor se toma como referencia (100%) para expresar la digestibilidad de

otras proteínas o de dietas mixtas como digestibilidad relativa. Esto debido a la presencia de fibra y otros componentes (Gear *et al.*, 2006).

Si bien la digestibilidad de los cereales no fue menor a lo ya reportado por otros autores; el nulo efecto de la enzima sobre la digestibilidad de los cereales puede ser explicada porque las proteínas se encuentran secuestradas en el endospermo por otros componentes, sin permitir la interacción entre proteasas y proteínas (Cervantes *et al.*, 2000). Los arabinosilanos del grano forman coloides en el contenido intestinal impidiendo la interacción de las proteínas de la dieta con las proteasas (Bedford, 1996). Es sabido que los cerdos no producen enzimas que degraden los arabinosilanos; por lo cual la DIA de aminoácidos del ingrediente se afectará negativamente cuando los granos tengan elevadas concentraciones (Yin *et al.*, 2000).

Al respecto, Bedford (1996) propuso dos mecanismos que explican la actividad antinutritiva de los cereales debido al componente arabinosilano. El primer mecanismo propuesto es que el arabinosilano es impermeable al ataque enzimático en el intestino delgado. El segundo mecanismo es que una proporción de los arabinosilanos presentes se disuelven en el intestino y causan el incremento en la viscosidad de la solución, lo cual reduce la difusión del nutriente por la formación del gel.

La concentración de polisacáridos no amiláceos en el maíz es baja y en su mayoría se trata de arabinosilanos insolubles, por lo que no ocasionan problemas de viscosidad; sin embargo pueden tener un efecto indirecto si encapsulan nutrientes como proteínas y almidón.

La digestibilidad de los aminoácidos del trigo fue en promedio mayor que los aminoácidos del maíz y sorgo. Esto coincide con lo publicado por Taverner *et al.* (1981) quienes reportaron que trigo y triticale se mostraron más digestibles que cebada, maíz y sorgo. Explicándolo por la baja solubilidad de las proteínas que tienen estos granos (43, 58 y 68% respectivamente).

La baja digestibilidad ileal de la proteína del sorgo puede afectar la digestibilidad ileal del almidón, ya que la proteína funciona como una barrera que evita la gelatinización del almidón (Chandrasekar y Kirleis, 1988), esto se debe a que dentro del endospermo los gránulos de almidón y los cuerpos proteicos se encuentran ampliamente

relacionados, formando una matriz que rodea los gránulos de almidón impidiendo la gelatinización de estos y por consecuencia, su digestión.

Por su parte, los polímeros presentes en el sorgo parecen ser menos susceptibles a la digestión, comparados con las proteínas de más bajo peso molecular. Por lo que las kafirinas, incluso como monómeros; son más resistentes a la degradación enzimática debido a su naturaleza hidrofóbica. Esta baja digestibilidad puede ser causada por la inaccesibilidad de las enzimas a los cuerpos proteicos. Mediante microscopía electrónica se ha demostrado que los cuerpos proteicos del endospermo que contienen las kafirinas permanecen intactos después de una digestión con pepsina e incluso después de la cocción (Hamaker *et al.*, 1987).

Rooney y Pflugfelder (1986) también sugieren que la digestibilidad de la proteína del sorgo es más baja que la de otros ingredientes (maíz, trigo y cebada) debido al tipo y distribución de la proteína alrededor del almidón del endospermo. El sorgo posee una mayor proporción de endospermo periférico que el maíz, el cual es extremadamente duro, denso y resistente, estas células del endospermo tienen alto contenido de proteína que es resistente a la degradación física y enzimática.

Las observaciones del presente trabajo concuerdan con lo encontrado por otros autores en que la digestibilidad de la proteína del sorgo es consistentemente más baja que en el maíz (Hale, 1973; Spicer *et al.*, 1982 y 1983); si bien la digestibilidad de la proteína en ambos ingredientes fue similar, la digestibilidad de los aminoácidos en forma individual fueron superiores en el maíz que el sorgo.

La digestibilidad del grano de trigo se ve afectada principalmente por las gliadinas que forman junto con las prolaminas y las gluteninas, agregados de alto peso molecular mediante puentes disulfuro intermoleculares. Además, las gluteninas forman largas cadenas de polipéptidos; formando grandes complejos debido a sus uniones disulfuro y enlaces no covalentes (Rubin *et al.*, 1992).

Existen otras proteínas de menor importancia en el grano de trigo, de las que se encuentran unidas a lípidos y se han caracterizado a partir de la harina. Se localizan en la capa de la aleurona del endospermo y son relacionadas con la dureza del grano,

se encuentran en el trigo blando pero no en el trigo duro. Se les ha llamado puroindolinas a y b, o friabilinas.

Es importante señalar también que en los trigos blandos las células se rompen fácilmente en la molienda y se liberan los gránulos de almidón, existe además poca adhesión entre los cuerpos proteicos, gránulos de almidón y restos de paredes celulares. En cambio, en los trigos duros estos elementos se encuentran en una masa más compacta (García y Carbonero, 1983) impidiendo la acción enzimática.

Un factor adicional que disminuye la digestibilidad de este ingrediente son los inhibidores de enzimas digestivas como proteasas y amilasas presentes en el endospermo (García y Carbonero, 1983).

Se ha reportado que la adición de fibra dietaria puede ocasionar una disminución de la digestibilidad ileal aparente no sólo de la proteína, sino también de almidón, grasa y minerales (Graham *et al.*, 1986). Entonces se puede explicar que las dietas con alto contenido de fibra como fue el caso de las elaboradas con pasta de canola, presentaron una menor digestibilidad porque las enzimas digestivas endógenas y exógenas tuvieron un limitado acceso a los componentes celulares, acelerando el tránsito de la digesta y afectando la digestión de todos los nutrientes; esto se debe a que grandes cantidades de la cascarilla del grano permanecen después de la extracción del aceite sin poder ser removidas de la pasta.

La cascarilla de este ingrediente, está compuesta por carbohidratos como pectinas, celulosa, hemicelulosa y betaglucanos y son importantes porque no son digeridos por las enzimas intestinales de monogástricos (Bell, 1984); por el contrario, estos componentes interactúan con los aminoácidos liberados durante la proteólisis e impiden su absorción, adicionalmente incrementa la excreción de nitrógeno endógeno y la viscosidad de la digesta, disminuyendo la DIA y DIV de la proteína y aminoácidos. Pero también porque disminuye el mezclado del contenido intestinal, bloquea la interacción de enzima-sustrato y forma una capa impermeable a manera de barrera física a la absorción de nutrientes.

Los ingredientes con alto contenido de fitatos, tales como pasta de canola y trigo de este experimento presentaron una menor digestibilidad puesto que este compuesto,

posee una habilidad para formar complejos proteína-proteasas digestivas dando un efecto negativo sobre la digestión proteica. Bell (1984) aclara que de los factores antinutricionales presentes en la pasta de canola, los fitatos son los más importantes porque los taninos y sinapinas tienen una significancia menor. Además el pH del estómago de los cerdos facilita la formación de complejos proteína-ácido fítico, afectando la digestión enzimática (Adeola y Sands, 2003).

Ahora bien una respuesta importante de la enzima se presentó sobre la proteína y algunos aminoácidos esenciales de la pasta de soya a pesar de también existir factores antinutricionales en este ingrediente. Los resultados parecen revelar que el procesamiento del ingrediente fue el adecuado, de tal forma que permitió a las enzimas digestivas y a la proteasa exógena ejercer su actividad sobre el sustrato.

La diferencia encontrada pudo deberse a un menor contenido de proteína dietaria en la dieta sin ProAct, la cual fue 2.5% inferior del nivel objetivo formulado de proteína cruda (17%), no obstante el nivel alcanzado de 14.5% en la dieta sólo se encuentra en 0.9% por debajo del nivel recomendado por Fan *et al.* (1994) para alcanzar el umbral a partir del cual no se modifica la digestibilidad, es por esto que, podemos postular que las diferencias observadas son debidas a la acción de la enzima.

Además el método de cálculo empleado en la digestibilidad estandarizada permite corregir el sesgo que pudiera estar presente en los valores de digestibilidad aparente, ya que se utiliza en el denominador la cantidad de aminoácido consumido por Kg de materia seca (Stein *et al.*, 2007), por lo que la corrección para la dieta sin enzima fue mayor dado que la cantidad consumida fue menor (divisor). Por otra parte, las prácticas actuales de formulación de raciones balanceadas en cerdos; cada vez más estandarizadas, exigen utilizar los coeficientes de digestibilidad real, verdadera o estandarizada porque los coeficientes de digestibilidad aparente carecen de aditividad en dietas mixtas.

No existe evidencia documentada por otros investigadores respecto al efecto negativo de la proteasa sobre algunos aminoácidos; Metionina en maíz, Leucina en sorgo, Cisteína en pasta de soya, Valina en pasta de canola y Tirosina en el caso de trigo, aunque este último fue corregido al calcular la digestibilidad verdadera. Una explicación posible es que pequeños péptidos (formados por estos aminoácidos) se

fijen al sitio activo de la enzima, impidiendo la hidrólisis no sólo de éstos sino del resto de los aminoácidos.

La medición de la digestibilidad a nivel ileal de los nutrientes es una aproximación más aceptable que el método de digestibilidad fecal, esto porque en el tracto digestivo se secretan proteínas (aminoácidos) endógenas hacia el lumen intestinal y se mezclan con las proteínas dietarias. Además factores antinutricionales y compuestos fibrosos pueden influir en la secreción y excreción de proteína endógena.

El flujo endógeno de proteína y aminoácidos al íleon distal de los cerdos en crecimiento y alimentados a libertad es influido por el peso corporal de los animales. Al respecto, Hans y Stein (1998) explican que cerdos con peso vivo de 36 Kg tienen una pérdida de proteína y aminoácidos endógenos más alta expresada en g/Kg de MS, que animales más pesados (entre 61-95 Kg). Esto puede ser explicado de dos formas: 1) Existe un verdadero mecanismo fisiológico en los cerdos más pesados que les permite secretar menos proteína endógena por Kg de MS respecto a los cerdos más jóvenes; o 2) Reabsorben cantidades más grandes de estas secreciones endógenas antes de llegar al íleon distal haciendo más eficiente el sistema digestivo.

En un experimento Grala (1997) demostró que al alimentar con pasta de chícharo y pasta de canola, resultó en una alta pérdida de nitrógeno endógeno y se asoció a una alta pérdida de nitrógeno urinario y menor retención del nitrógeno dietario comparado con el gluten de trigo que tuvo una baja pérdida de nitrógeno endógeno. De cualquier manera la síntesis de nitrógeno endógeno impacta en todos los casos en el metabolismo de nitrógeno del animal porque aminoácidos que deberían ser utilizados para la deposición de proteína corporal se desvían para producir proteína lábil (Fan *et al.*, 2006).

Los valores de digestibilidad fecal generalmente son más altos a los valores de digestibilidad ileal. La digestibilidad fecal aparente de la proteína y materia seca de los ingredientes concuerda con lo reportado por Sauer *et al.* (1977a y 1977b); Marty y Chavez (1994); Kim *et al.* (1999); Li *et al.* (2006). La digestibilidad fecal de la materia seca, proteína y energía de la pasta de canola mostró diferencias estadísticas ($P < 0.05$) debido a la acción fermentativa de las bacterias del intestino grueso. Esto se

debe a que grandes cantidades de nutrientes no digeridos de la dieta llegan al tracto digestivo posterior donde las bacterias degradan proteína y liberan amoníaco.

La mejora provocada por la enzima sobre la digestibilidad fecal de la proteína de la pasta de soya, confirma de forma indirecta la mayor digestibilidad de la proteína a nivel ileal de la dieta adicionada con ProAct.

7.2 Experimento II: Balance de Nitrógeno.

Se puede considerar que el perfil ideal de aminoácidos dietarios es aquél en cuya ingesta de Nitrógeno resulta en la más alta retención de Nitrógeno (Wang y Fuller, 1989).

Es decir, del total de proteína (nitrógeno) ingerida; una parte se quedará sin digerir y se excretará en las heces. Al respecto, Grala *et al.* (1998) explica que a menor pérdida de nitrógeno en heces, los aminoácidos pueden ser utilizados para retención, entonces; se tiene que la otra parte se absorberá a través del epitelio intestinal y podrán ocurrir tres situaciones simultáneas: 1) los aminoácidos se depositarán en forma de proteína muscular porque se cubren los requerimientos del metabolismo animal; 2) los aminoácidos se oxidarán debido a un desbalance del perfil de proteína muscular y 3) los aminoácidos ya depositados podrán oxidarse como parte del recambio natural de las proteínas corporales o debido a una ingesta limitada de energía. Al ocurrir la oxidación; principalmente debido a un desbalance, el nitrógeno será excretado en orina, resultando en una pérdida adicional de nitrógeno y energía; o bien puede ser utilizado para la síntesis de nuevos aminoácidos.

El complejo multienzimático utilizado en este experimento presume efectos como β -glucanasa, aunque también como pectinasa y hemicelulasa; por lo que su mecanismo de acción estaba dirigido sobre las unidades de β -glucanos o sobre celulosa, además de galacturonanos y arabiloxilanos.

Además con la inclusión de la proteasa y/o la fitasa se esperaba que los ingredientes respondieran positivamente a la adición de estas enzimas exógenas; mejorando la digestibilidad de la energía y la proteína, en la dieta basal sorgo-pasta de canola, sin embargo no hubo diferencias estadísticas, esto concuerda con los resultados encontrados en un experimento realizado por Ávalos *et al.* (2011), donde se elaboró

una dieta basal que contenía sorgo- pasta de soya- pasta de canola- fitasa más un complejo enzimático, no se encontró efecto por la adición de tales enzimas sobre la digestibilidad ileal y fecal de los nutrientes.

De la misma manera experimentos conducidos en aves de engorda en los que se utilizó una dieta basal de sorgo-pasta de soya, se encontró que la adición de un complejo enzimático no tuvo efecto sobre la digestibilidad de la proteína (Méndez *et al.*, 2009).

Sin embargo, en el experimento realizado por Soria *et al.* (2009), con una dieta sorgo-pasta de soya-pasta de canola, se evaluó la respuesta a la adición del mismo complejo enzimático utilizado en este trabajo y una fitasa en cerdos de la misma etapa productiva; se encontró que la adición de fitasa, complejo enzimático o la combinación de estos mejoraba significativamente la digestibilidad de la energía; lo cual es diferente a lo encontrado en este experimento.

Por otra parte, los valores de digestibilidad fecal de la energía aun cuando no se encontraron diferencias estadísticas, no son muy diferentes a los publicados por estos investigadores. De la misma manera encontraron un efecto al uso de las enzimas por separado o combinadas sobre la digestibilidad del nitrógeno, y los valores de digestibilidad fecal del nitrógeno reportados por ellos, son superiores a lo validado en este ensayo; sin que la retención del nitrógeno fuera diferente para ambos casos.

Sobre esto Wang y Fuller (1989) explican que la retención del nitrógeno es afectada no sólo por la calidad de la proteína de la dieta sino por el nivel de ingesta de proteína. En esta investigación se logró un consumo más alto de nitrógeno en promedio comparado con Soria *et al.* (2009) (48.53 contra 33.42 g/día), observándose una digestibilidad fecal promedio inferior (70.13 contra 85.78 %) y sin embargo el nitrógeno retenido como porcentaje del nitrógeno digerido no fue muy diferente (59.25 contra 61.28 %).

Es decir, una mayor ingesta de nitrógeno (g/día) en una dieta que fue naturalmente diseñada para ser deficiente en lisina (NRC, 1998) primer aminoácido limitante en la síntesis de proteína muscular, permite demostrar que al no haber un efecto de las enzimas exógenas y/o endógenas, la absorción y síntesis de proteína es inadecuada

porque requiere que todos los aminoácidos necesarios estén disponibles al mismo tiempo, aun cuando se alcanzaron los requerimientos de energía digestible y metabolizable de acuerdo al NRC (1998). Lo cual se refleja en la excreción más alta de nitrógeno urinario.

Por lo que se hace necesario un completo entendimiento de la interacción de los nutrientes dentro del ingrediente, en este caso la pasta de canola es un ingrediente con un alto contenido de carbohidratos estructurales o paredes celulares (Bell, 1993, Vries y Visser, 2001) y un nivel considerable de ácido fítico (70% o más) (Bell, 1993; Wilhem, 1997), por su parte la proteína del sorgo se encuentra protegida por las prolaminas periféricas y también posee un contenido importante de fibra (Mariscal *et al.*, 2005) por lo que la digestibilidad del ingrediente en sí se ve disminuida. Es probable que el principal efecto de estos antinutrientes se refleje en una menor digestibilidad de la energía y proteína, tal como se observa en los resultados del presente experimento.

Adeola y Sands (2003) concluyen que los fitatos están presentes en todos los cereales y semillas de oleaginosas, además los resultados de la actividad de fitasa sobre digestibilidad de la proteína y aminoácidos son controversiales todavía; por lo que la respuesta a fitasas no es simplemente confiar en la concentración del sustrato sino en la disponibilidad del fitato y se ha visto que es más baja en oleaginosas que en cereales (Bedford, 1996). Es decir, la actividad de la fitasa será siempre diferente para cada ingrediente.

Adicionalmente la digestibilidad de la proteína y los aminoácidos en la pasta de canola y el sorgo puede verse afectada por la presencia de taninos, los cuales no fueron determinados para este experimento. Estos compuestos forman puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas de sus grupos hidroxilos con los grupos carbonilos de las proteínas, disminuyen la actividad de pepsina, tripsina y quimiotripsina; cambian la morfología de la mucosa intestinal disminuyendo la toma de nutrientes transmembranal e incrementando la secreción de proteína endógena (Fan *et al.*, 1996).

VIII. CONCLUSIONES.

El hecho de contar hoy en día con una amplia gama de enzimas en el mercado no garantiza que todos los efectos serán benéficos para el metabolismo animal, es imprescindible conocer la fisiología digestiva de los cerdos y entender adecuadamente el comportamiento de los nutrientes dentro de ésta, para elegir acertadamente la o las enzimas a emplear, porque como se ha demostrado en este estudio su acción puede estar limitada.

Es de considerable importancia la mejora que provocó la enzima sobre la digestibilidad de Lisina en la pasta de soya, por lo que el valor de oportunidad de este ingrediente se incrementa cuando se utiliza ProAct; sin embargo sería inapropiado asignar un valor nutritivo a la enzima, como se hace rutinariamente en la industria de la nutrición; es preferible agregar como un nuevo ingrediente en la matriz de formulación.

Los resultados de este trabajo no muestran un efecto positivo sobre la mejora general de los coeficientes de digestibilidad de los nutrientes al adicionar la proteasa como única enzima en la ración, ni al adicionar un complejo enzimático compuesto por proteasa, fitasa y glucanasas en las dietas evaluadas.

El crecimiento óptimo de los animales dependerá de la digestibilidad de los nutrientes contenidos en los alimentos y del grado en que estos nutrientes pueden ser absorbidos y utilizados posteriormente.

Para un mejor aprovechamiento de la tecnología en cuestión de enzimas es necesario entender los efectos que tienen los nutrientes y antinutrientes sobre la fisiología digestiva, de esta forma se obtiene ventaja del uso de estas enzimas sobre la formulación de raciones.

IX. LITERATURA CITADA.

- Adeola, O. y Sands, J. R. 2003. Does supplemental dietary microbial phytase improve aminoacid utilization? A perspective that it does not. *J. Anim. Sci.* 81: 78-85.
- Anderson, R. L. y Wolf, W. J. 1995. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J. Nutr.* 125: 581S-588S
- Anderson, V. L. y McLean, R. A. 1974. Design of experiments. A realistic approach. Marcel Dekker, Inc. US. Pp 218-219.
- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA.
- Ávalos, C. M. A., Gómez, R. S., Ángeles, M. L., Braña, V. D., Mariscal, L. G., y Cuarón, I. J. A. 2011. Fitasa y enzimas fibrolíticas en dietas para cerdos con diferentes sustratos. *Rev. Méx. Cienc. Pecu.* 2: 117-135.
- Bedford, M.R. 1993. Mode of Action of Feed Enzymes. *Poultry Res.* 2:85-92.
- Bedford, M. R. 1996. The effect of enzymes on digestion. *Appl. Poultry Res.* 5:370-378.
- Bedford, M. R. 2000. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. *Anim. Feed Sic. Tech.* 86:1-13.
- Bedford, M. R. y Schulze, H. 1998. Exogenous enzymes for pigs and poultry. *Nutrition Research Reviews.* 11:91-114.
- Bedford, M. R. y Partridge, G. G. 2001. Enzymes in farm animal nutrition. CABI Publishing. UK. Pp. 161-197.
- Bell, J. M. 1993. Factors affecting the nutritional value of canola meal: a review. *Can. J. Anim.* 73:679-697.
- Bell, J. M. 1994. Nutrients and toxicants in rapeseed meal. A review. *J. Anim. Sci.* 58: 996-1010.
- Bellaver, C. y Easter, R. A. 1998. Estimates of true ileal digestibility of corn, soybean meal and alternative feed ingredients for swines. *Pesq. Agropec. Bras. Brasilia.* 5:737-744.
- Bennett, T. P. y Armstrong, F. B. 1982. *Biochemistry.* Ed. Reverté, S. A. Barcelona. Pp. 123-131.
- Brugger, R., Gadiant, M., Vogel, D., Jensen, P. E. y Sorbara, J. O. B. 2009. Stability of a novel serine protease in premixes and broiler feed applications. *Poul. Sci. Ass. Annual meeting (Abstract).* Pp: 68.
- Buraczewska, L., Wasilewko, J., Fandrejewski, H., Zebrowska, T., y Han, I. K. 1999. Formulation of pigs diets according to ideal digestible aminoacid content. *Livest. Prod. Sci.* 59:13-24.

- Burr, B. y Burr, F. A. 1975. Zein synthesis in maize endosperm by polyribosomes attached to protein bodies. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73:515-519.
- Buttrose, M. S. 1963. Ultrastructure of the developing wheat endosperm. *Aust. J. Biol. Sci.* 16:305-317.
- Campbell, G. L. y Bedford, M. R. 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: A review. *Can. J. Anim. Sci.* 72: 449-466.
- Carlson, K. H y Bayley, H. S. 1970. Nitrogen and amino acids in the feces of young pigs reviving protein free diet and diets containing graded levels of soybean meal or casein. *J. Nutr.* 100:1353-1362.
- Carpita, C. N. y Gibeaut, M. D. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal.* 3:1-30.
- Carvalho, J. C. C., Bertechini, A. G., Mesquita, F. R., Rios, R. L., Lima, E. M. C. y Sorbara, J. O. B. 2009a. Use of a protease to enhance the utilization of meat and bone meal amino acids by broilers. *Poul. Sci. Ass. Annual meeting (Abstract).* Pp. 69.
- Carvalho, J. C. C., Bertechini, A. G., Mesquita, F. R., Rios, R. L., Lima, E. M. C. y Sorbara, J. O. B. 2009b. Use of protease to enhance the utilization of corn amino acids by broilers. *Poultry Science Association. Annual meeting. (Abstract).* Pp. 69.
- Cervantes, R. M., Gonzáles, J., Torrentera, N., González, V. y Cuca, M. 2000. Effect of dietary protein level and the addition of a fungal protease on the performance of growing pigs. *Proc. W. S. Amer. Soc. Anim. Sci.* 51: 233-235.
- Coward, L., Barnes, N. C., Setchell, K. D. R. y Barnes, S. 1993. Genistein, daidzein and their b-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *Agric. Food. Chem.* 41:1961-1967.
- De Lange, C.M.F., Souffrant, W. B. y Sauer, W. C. 1990. Real ileal protein and amino acid digestibilities in feedstuffs for growing pigs as determined with the 15 N-Isotope dilution technique. *J. Anim. Sci.* 68: 409-418.
- Diario Oficial de la Federación, 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Diario Oficial de la Federación. México, D. F.
- Donkoh, A. y Moughan, P. J. 1993. The effect of dietary crude protein content on apparent and true ileal nitrogen and AA digestibilities. *Br. J. Nutr.* 72: 59-68.
- Duvick, D. N. 1961. Protein granules of maize endosperm cells. *Cereal Chem.* 38:374-385.
- Earle, F. R. 1977. Protein and oil in corn. Variation by crop years from 1907 to 1972. *Cereal Chem.* 54:70-79.
- Fan, M. Z., y Sauer, W. C. 1995. Estimation by regression analysis of endogenous amino acid levels in digesta collected from the distal ileum of pigs. *J. Anim. Sci.* 73:2319-2328.

Fan, M. Z., Sauer, W. C. y Gabert, V. M. 1996. Variability of apparent ileal amino acids digestibility in canola meal for growing-finishing pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 76: 563-569.

Fan, M. Z., Sauer, W. C., Hardin, R. T. y Lien, K. A. 1994. Determination of apparent ileal AA digestibility in pigs: Effect of dietary AA level. *J. Anim. Sci.* 72: 2851–2859.

FAO, 2006. Disponible en: www.fao.org/agriculture/crops.

Fardet, A. 2010. New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole grain cereals: what is beyond fibre? *Nut. Res. Rev.* 23:65-134.

Federer, W. T. 1955. *Experimental design. Theory and application.* Oxford y IBH Publishing Co. Indian.

Fenton, T.W. y Fenton, M., 1979. An improved procedure for determination of chromic oxide in feed and feces. *Can. J. Anim. Sci.* 59, 631-634.

Friesen, O. D., Guenter, W., Rotter, B. A. y Marquardt, R. R. 1991. The effects of enzyme supplementation on the nutritive value of rye grain (*Secale cereale*) for the young broiler chick. *Poult. Sci.* 70: 2501-2508.

Fuller, M. F. 1991. Methodologies for the measurement of digestion. *Proc. of the 5th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs.* Pp. 273-288.

Fuller, M. F. y Cadenhead, A. 1991. Effect of the amount and composition of the diet on galactosamine flow from the small intestine. In: *Digestive Physiology in Pigs* by M. W. A. Verstegen, J. Huisman and L. A. den Hartog. EAAP. Publ. No. 54. Pp: 330-333. Pudoc, Wageningen, The Netherlands.

Fuller, M. F. y Wang T. C. 1990. Digestible ideal protein a measure of dietary protein value. *Pigs News and Information.* 11:353-357.

Furuya, S. y Kaji, Y. 1989. Estimation of the true ileal digestibility of amino acids and nitrogen from their apparent values for growing pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 26:271-285.

Furuya, S. y Kaji, Y. 1991. Additivity of the apparent and true digestible amino acid supply in barley, maize, wheat or soybean based diets for growing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 32:321-331.

García, O. F., y Carbonero, Z. P. 1983. Control genético de las proteínas del trigo. *Investigación y ciencia. Scientific American.* 81:96-104.

Gardner, M. L. G. 1984. Intestinal assimilation of intact peptides and proteins from the diet – a neglected field? *Cambridge Philosophical Society. Biol. Rev.* 59:289-331.

Gear, J. R. E., Horacio, A. A., Depetris, G. J., Cortamira, N. O, Martin, M. L. P., Vartorell, F., Olivera, M. C., Melgarejo, M., Godoy, H. M., Eyherabide, G. H., Santini, F. J., Levitus, G., Chulxe, S., Gagliostro, G. y Morales, L. 2006. *Maíz y nutrición. Informe sobre los usos y propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal. Recopilación de ILSI, Argentina. Vol.II.*

Gentry, J. G., Mcglone, J. J., Miller, M. F. y Blanton, J. R. 2002. Diverse birth and rearing environment effects on pig growth and meat quality. *J. Anim. Sci.* 80 (70): 1707-1715.

Gibbon, B. C. y Larkins, B. A. 2005. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. *Trends in Genetics.* 21:227-233.

Google Earth. 2013. Google Inc. Disponible en: www.google.com.mx

Graham, J. S. D., Morton, R. K. y Raison, J. K. 1963. Isolation and characterization of protein bodies from developing wheat endosperm. *Aust. J. Biol. Sci.* 16:375-383.

Graham, H., Hesselman, K. y Aman, P. 1986. The influence of wheat bran and sugar beet pulp on the digestibility of dietary components in a cereal- based pig diet. *J. Nutr.* 116: 242.

Graham, J. S. D., Morton, R. K. y Simmonds, D. H. 1962. Studies of proteins of developing wheat endosperm: fractionation by ion-exchanged chromatography. *Aust. J. Biol. Sci.* 16:350-356.

Grala, W., Verstegen, M. W., Van Leeuwen, P., Huisman, J., Jansman, A. J. y Tamminga, S. 1997. Nitrogen balance of pigs as affected by feedstuffs causing different endogenous nitrogen flow at the terminal ileum. *Livest. Prod. Sci.* 48: 143-155.

Grala, W., Verstegen M. W., Jansman, A. J., Huisman, J. y Wasilewko, J. 1998. Ileal apparent protein and amino acid digestibilities and endogenous nitrogen losses in pig fed soybean and rapeseed products. *J. Anim. Sci.* 76: 557-568.

Hagemeister, H. y Ebersdobler, H. 1985. Chemical labeling of dietary protein by transformation of lysine to homoarginine: A new technique to follow intestinal digestion and absorption. *Proc. Nutr. Soc.*44: 133-138.

Hamaker, B. R. y Bugusu, B. A. 2003. Overview: sorghum proteins and food quality. Department of food science, Purdue University and INTSORMIL CRSP. West Lafayette, Indiana, USA.

Hamaker, B. R., Kirleis, A. W., Butler, L. G., Axtell, J. D. y Mertz, E. T. 1987. Improving the in vitro protein digestibility of sorghum with reducing agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:626-628.

Henderson, J. H., Ricker, R. D., Bidlingmeyer B. A. y Woodward, C. 2000. Rapid, accurate and reproducible HPLC analysis of amino acids. Amino acid analysis using Zorbac Eclipse AAA columns and the Agilent 1100 HPLC. Agilent Technologies. Part no. 5980-1193 E. P 10.

INRA, 1984. L'alimentation des animaux monogastriques: porc, lapin, volailles. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.

Jansman, A. J. M. 1993. Tannins in feedstuffs for simple-stomached animals. *Nutr. Research Reviews.* 6:209-236.

Jansman, A. J. M., Frohlich, A. A. y Maquardt, R. 1994. Production of proline rich proteins by parotid glands of rats in enhanced by feeding diets containing tannins from Faba beans (*Vicia Faba L.*). J. Nutr. 124:249-258.

Jansman, A. J. M., Smink, W., Van Leeuwen, P. y Rademacher, M. 2002. Evaluation through literature data of the amount and amino acid composition of basal endogenous crude protein at the terminal ileum of pigs. Anim. Feed Sci. Tech. 98: 49-60.

Jondreville, C., van den Broecke; J., Gatel, F. y Van Cauwenberghe, S. 1995. Ileal digestibility of AA in feedstuffs for pigs. Eurolysine/ITFC publication, Paris, France.

Jondreville, C., van den Broecke J., Gale, F., Grosjean, F., van Cauwenberghe, S. y Séve, B. 2001. Ileal digestibility of amino acids and estimates of endogenous amino acid losses in pig fed wheat, triticale, rye, barley, maize and sorghum. Anim. Res. 50: 119-134.

Kakade, M. L., Simons, N. R., Liener, I. E., y Lambert, J. W. 1972. Biochemical and nutritional assessment of different varieties of soybean. J. Agric. Food. Chem. 20:87-90.

Keith, M. O., y Bell, J. M. 1987. Effects of canola meal on absorption and tissue levels of trace minerals in rats. Can. J. Anim. Sci. 67: 141-149.

Kim, I. H., Hancock, J. D. y Hines, R. H. 2000. Influence of processing method on ileal digestibility of nutrients from soybeans in growing and finishing pigs. J. Anim. Sci. 2: 192-199.

Khoo, U. y Wolf M. J. 1970. Origin and development of protein granules in maize endosperm. Amer. J. Bot. 57:1042-1050.

Kuriyama, S. y Mendel, L. B. 1917. The physiological behavior of raffinose. J. Biol. Chem. 31:125-147.

Laplace, J. P., Darcy-Vrillon, B y Duval- Iflah, V. 1985. Proteins in the digesta of the pig: amino acid composition of endogenous, bacterial and fecal fractions. Reprod. Nutr. Dévelop. 25 (6):1083-1099.

Larkins, A. B. y Hurkman, W. J. 1978. Synthesis and deposition of zein in protein bodies of maize endosperm. Plant Physiol. 62:256-263.

Lathia, D., Hoch, G. y Kievernagel, Y. 1987. Influence of phytate on in vitro digestibility of casein under physiological conditions. Plant Foods Hum. Nutr. 37: 229-235.

Leske, K. L., Jevne, C. J. y Coon, N. C. 1993. Effect of oligosaccharide additions on nitrogen-corrected true metabolizable energy of soy protein concentrate. Poultry. Sci. 72:664-668.

Li, X. L., Yuan, S. L., Piao, X. S., Lai, C. H., Zang, J. J., Ding, Y. H., Han, L. J. y Han, I. K. 2006. The nutritional value of brown rice and maize for growing pigs. Asian Aust. J. Anim. Sci. 6: 892-897.

Liener, I. E. 1981. Factors affecting the nutritional quality of soy products. J. Am. Oil Chem. Soc. 58:406-415.

- Lindemann, M. D., Cornelius, S. G., El Kandelgy, S. M., Moser R. L. y Pettigrew, J. E. 1986. Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme levels in the piglet. *J. Anim. Sci.* 62: 1298-1307.
- Low, A. G. 1982. Digestibility and availability of amino acids from feedstuffs for pigs. *Lives Prod. Sci.* 9:511-520.
- Low, A. G. 1990. Protein evaluation in pigs and poultry. En: *Physiology Digestive Feedstuffs Evaluation*. Butterworth, London.
- Low, A. G. y Zebrowska, T. 1989. Digestion in pigs. En: *Protein Metabolism in Farm Animals. Evaluation, Digestion, Absorption and Meatbolism* (eds. Bock H-D, BO Eggum, AG Low, O Simon, and T Zebrowska). Oxford, UK; Ed Oxford University Press.
- Mariscal, L. G., Reis, T. C. S. y Aguilera, B. A. 2005. Efecto de diferentes cereales en dietas de iniciación para lechones sobre la digestibilidad de los nutrimentos y la preferencia alimentaria. *Vet. Méx.* 36:11-24.
- Mariscal L.G., Reis de Souza, T. C., Hernández A. y Escobar, G. K. 2009. Pérdidas endógenas de nitrógeno y aminoácidos en cerdos y su aplicación en la estimación de los coeficientes de digestibilidad ileal de la proteína y aminoácidos de las materias primas. *Téc. Pecu. Méx.* 47:371-388.
- Mariscal- Landín, G. y Resis de Souza, T. 2006. Endogenous ileal losses of nitrogen and amino acids in pigs and piglets fed graded levels of casein. *Arch. Anim. Nutr.* 60:454-466.
- Mariscal-Landín, G. 1992. Factuer de variation de l'utilisation digestive des acides amines chez le porc. PhD. Thesis. Rennes University, Rennes, France.
- Mariscal-Landín, G., Seve, B., Colleaux, Y. y Lebreton, Y. 1995. Endogenous amino nitrogen collected from pigs with end-to-end ileorectal anastomosis is affected by the method of estimation and altered by dietary fiber. *J. Nutr.* 125:136-146.
- Marotta, E., Lagreca, L. y Tamburini, V. 2009. Requerimientos alimenticios adaptados al porcino moderno y calidad de la carne. V Curso de Producción de la carne porcina y Alimentación Humana. *Rev. Vet. Cuyana.* 4:16-24.
- Marty, J. B. y Chavez, R. E. 1994. Apparent digestibility of protein and amino acids at the distal ileum and of protein and energy over the whole tract in several extruded soybean cultivars for pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 74: 675-678.
- Mathias, R. M. L. 2004. Detección de mutaciones asociadas a la dureza del grano a 113 genotipos de trigo (*Triticum aestivum* L.) por medio de herramientas biotecnológicas. Tesis. Universidad Austral de Chile.
- Mehanso, H., Clements, S., Sheares, B. T., Smith, S. y Carlson, D. M. 1985. Induction of proline rich glycoprotein synthesis in mouse salivary glands by isoproterenol and by tannins. *J. Biol. Chem.* 260:4418-4423.

Méndez, D. A. D., Cortés, C. A., Fuente, M. B., López, C. C., Ávila, G. E. 2009. Efecto de un complejo enzimático en dietas sorgo-soya sobre la digestibilidad ileal de aminoácidos, energía metabolizable y productividad en pollos. *Téc. Pecu. Méx.* 47: 15-25.

Messina, M., y Barnes, S. 1991. The role of soy products in reducing risk of cancer. *J. Nat. Cancer Inst.* 83:541-547.

Mitchell, H. H. 1924. A method of determining the biological value of protein. *J. Biol. Chem.* 58: 873–882.

Mitra, P., Chakraverty R. y Chandra A. 1996. Production of proteolytic enzymes by solid state fermentation- Overview. *J. Sci. and Ind. Res.* 55: 439-449.

Montagne, L., Tollec, R. y Lalles V. P. 2001. Intestinal digestion of dietary and endogenous proteins along the small intestine of calves fed soybean or potato. *J. Anim. Sci.* 79: 2719-2730.

Morales, M. M. A., Cervantes, R. M., Cuca, G. M., Figueroa, V. L., Pro, M. A., Araiza, P. B., Cervantes, R. M., Torrentera, O. N. 2002. Digestibilidad ileal de aminoácidos y comportamiento productivo en cerdos alimentados con dietas a base de trigo, adicionadas con una proteasa fungal. *Agrociencia.* 36:515-522.

Morton, R. K., Palk, B. A. y Raison, J. K. 1964. Intracellular components associated with protein synthesis in developing wheat endosperm. *Biochem. J.* 91:522-528.

Mosenthin, R., Sauer, W. C., Blank, R., Huisman, J. y Fan, M. Z. 2000. The concept of digestible AA in diet formulation for pigs. *Livest. Prod. Sci.*; 64:265–280.

Moughan, P. J. 2003. AA digestibility and availability in food and feedstuffs. In Ball RO editor. *Digestive Physiology in Pigs. Proc. 9th Intl. Symp. Vol. 1.* Univ. Alberta, Alberta, Canada. Pp.199–221.

Moughan, P. J. y Schutttert, G. 1991. Composition of nitrogen containing fractions in digesta from the distal ileum of pigs fed a protein free diet. *J. Nutr.* 121:1570-1574.

Moughan, P. J., Darragh, A. J., Smith, W. C. y Butts, C.A. 1992. Evaluation of the isotope dilution technique for determining ileal endogenous nitrogen excretion in the rat. *J. Sci. Food Agr.* 58:165-172.

Mroz, Z., Bakker, G. C. M., Jongbloed, A. W., Dekker, R. A., Jongbloed, R. y van Beers, A. 1996. Apparent digestibility of nutrients in diets with different energy density, as estimated by direct and marker methods for pigs with and without ileo-cecal cannulas. *J. Anim. Sci.* 74:403-412.

Nelson, T. S. y Kirby, L. K. 1987. The calcium binding properties of natural phytate in chick diets. *Nutr. Rep. Int.* 35: 949-955.

Newkirk, R. W., Classen, H. L., Scott, T. A. y Edney, M. J. 1999. Commercial desolventization toasting conditions reduce the content and availability of amino acids in canola meal. *Poult. Sci.* 78:1-16.

- Nieves, D., Barajas, A., Delgado, G., González, C. y Ly, J. 2008. Forrajes tropicales en conejos. Comparación entre métodos directo e indirecto. *Biagro* 20: 67-72.
- NRC. 1998. Nutrient requirements of swine. 10th Ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Nyachoti, C. M., de Lange, C. F. y Schulze H. 1997. Estimating endogenous amino acid flows at the terminal ileum and true ileal amino acid digestibilities in feedstuffs for growing pigs using the homoarginine method. *J. Anim. Sci.* 75:3206-3213.
- Nyachoti, C. M., de Lange, C. F., McBride, B. W., y Schulze, H. 1996. Significance of endogenous gut nitrogen losses in the nutrition of growing pigs: A review. *Can. J. Anim. Sci.* 77:149-163.
- Osborne, T. B. y Mendel, L. B. 1914. Nutritive properties of the maize kernel. *J. Biol. Chem.* Vol.18:1-16.
- Ovchinnikov, A. y Kalashnikova, G. 2001. The performance pigs from different types of rational crossbreeding. *Timiryazev Agriculture Academy No. 4*, 3-4.
- Parra, S. J. y Gómez, Z. A. 2009. Importance of the use of different digestibility techniques in pig nutrition and food formulation. *Revista MVZ Córdoba.* 1:1633-1641.
- Pedersen, C., Boersma, M. G. y Stein, H. H. 2007. Energy and nutrient digestibility in NutriDense corn and other grains fed to growing pigs. *J. Anim. Sci.* 85:2473-2483.
- Perdersen, C. y Boisen S. 2002. Establishment of tabulated values for standardized ileal digestibility of crude protein and essential amino acids in common feedstuffs for pigs. *Acta Agric. Scand. Sect. A. Animal Sci.* 52: 121-140.
- Prassana, B. M., Vasal, S. K., Kassahun, B. y Singh, N. N. 2001. Quality protein maize. *Current Sci.* 81:1308-1319.
- Prattley, C. A. y Stanley, D. W. 1982. Protein phytate interactions in soybeans. I. Localization of phytate in protein bodies and globoids. *J. Food Biochem.* 6:243-253.
- Rademacher, M., Sauer, W. C. y Jansman, J. M. 1999. Standardized ileal digestibility of amino acids in pigs. Frankfurt, Germany: Degusa-Hüls.
- Ravindran, V. 2010. Aditivos en la alimentación animal: presente y futuro. Madrid. XXVI Curso de especialización FEDNA.
- Reddy, N. R. y Sathé, S. K. Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.* 28:91-92.
- Reis de Souza, T. C. y Mariscal-Landín, G. 1997. El destete, la función digestiva y de la digestibilidad de los alimentos en cerdos jóvenes. *Téc. Pecu. Méx.* 35:145-159.
- Reis de Souza, T. C., Mar, B. y Mariscal, L. G. 2000. Canulación de cerdos posdestete para pruebas de digestibilidad ileal: Desarrollo de una metodología. *Téc. Pecu. Méx.* 38:143-150.

Ríos, J. A. S. 2009. Respuesta productiva de pollos broilers a la adición de complejos enzimáticos (proteasas, xilanasas, celulasas, amilasas, α -galactosidasas) y b-glucanasas, xilanasas, pectinasas, hemicelulasas en dietas basadas en maíz y soya. Tesis. Universidad de San Francisco de Quito. Ecuador.

Rojo, G. A., Pérez, M. V. G., Bayardo, V. H., Correa, C. J. y Cuarón, I. J. A. 2001. Pasta de canola como suplemento proteico en dietas para la finalización de cerdos. *Tec. Pecu. Méx.* 39:179-192.

Rooney L. W. y Miller F. R. 1982. Variation in the structure and kernel characteristics of sorghum. *Proc. Sorghum Grain Quality Symp. Int. Crops. Res. Inst. for the semi-arid tropics, Hyderabad, India.* Pp. 143-161.

Rooney, L. W. y Pflugfelder, R. L. 1986. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. *J. Anim. Sci.* 63:1607-1623.

Rubin, R., Levanony, H., y Galili, G. 1992. Evidence for the presence of two different types of protein bodies in wheat endosperm. *Plant. Physiol.* 99:718-724.

Rutherford, S. M. y Moughan, P. J. 1990. Guanidination of lysine in selected dietary proteins. *J. Agric. Food Chem.* 38:209–211.

SAS, 2008. SAS/STAT Statistical Analysis System. User's Guide (Versión 9.2) Cary NC: SAS Inst. Inc.

Sauer, W. C. y Ozimek, L. 1986. Digestibility of amino acids in swine: results and their practical applications. *A Review. Livest. Prod. Sci.* 15:367-388.

Sauer, W. C., Stothers, S. C. y Phillips, G. D. 1977a. Apparent availabilities of amino acids in corn, wheat and barley for growing pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 57: 585-597.

Sauer, W. C., Stothers, S. C. y Parker, R. J. 1977b. Apparent and true availabilities of amino acids in wheat and milling by-products for growing pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 57: 775-784.

Schulze, H., van Leeuwen, P., Versteegen, M. W. y van der Berg, J. W. 1995. Dietary level and source of neutral detergent fiber and ileal endogenous nitrogen flow in pigs. *J. Anim. Sci.* 73:441-448.

Sève B. y Henry, Y. 1996. Protein utilization in non-ruminants. En *Protein Metabolism and Nutrition, Proc. 7th Intl. Symp., Vale de Santarém, Portugal.* Pp 59–82.

Shewry, P. R. y Halford, N. G. 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J. of Exp. Bot.* 53:947-958.

Shewry, P. R., Tatham, A. S. y Halford, N. G. 1999. The prolamins of the Triticeae. In *Seed Proteins* by P. R. Shewry and R. Casey. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht. Pp.35-78.

Shewry, P. R., Geaudoin, F., Jenkins, J., Griffiths-Jones, S. y Mills, E. N. C. 2002. Plants proteins families and their relationship to food allergy. *Biochem. Soc. Trans.* 30:906-910.

Slominski, B. A. 1994. Hydrolysis of galactooligosaccharides by commercial preparations of α -galactosidase and β -fructofuranose: potential for use as dietary additives. *J. Sci. Food Agric.* 65:323-330.

Smits, C. H. M. y Annison, G. 1996. Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition-towards a physiologically valid approach to their determination. *World's Poult. Sci. J.* 52:204-221.

Soria, F. A. I., Mariscal, L. G., Gómez, R. S., Cuarón, I. J. A. 2009. Efecto de la adición de enzimas fibrolíticas y una fitasa para cerdos en crecimiento sobre la digestibilidad de nutrientes. *Téc. Pecu. Méx.* 47: 1-14.

Souffrant, W.B. 1991. Endogenous nitrogen losses during digestion in pigs. En: MWA Versteegen, J Huisman, den Hartog, L.A. (eds.), *Proc. of the 5th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*. Pudoc, Wageningen, The Netherlands.

Stein, H. H., Sève, B., Fuller, M. F., Moughan, P. J., de Lange, C. F. M. 2007. Invited review: Amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: Terminology and application. *J. Anim. Sci.* 85:172-180.

Stein, H. H., Pedersonm C., Wirt, A. R. y Bohlke, R. A. 2005. Additivity of values for apparent and standardized ileal digestibility of amino acids in mixed diets fed to growing pigs. *J. Anim. Sci.* 83:2387-2395.

Stein, H. H., Trottier, N. L., Bellaver, C., y Easter, R. A. 1999. The effect of feeding level and physiological status on total flow and amino acid composition of endogenous protein at the distal ileum in swine. *J. Anim. Sci.* 77:1180-1187.

Stein, H. H., Kim, S., Nielsen, T. T. y Easter, R. A. 2001. Standardized ileal protein and amino acid digestibility by growing pigs and sows. *J. Anim. Sci.* 79:2113-2122.

Stein, H. H., Séve, B., Fuller, M. F., Moughan, P. J., de Lange, C. F. M. 2006. Invited review: Amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients. Terminology and application. *J. Anim. Sci.* 85:172-180.

Sunna, A. y Antranikian, G. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in biotechnology. Informa Healthcare.* 1:39-67.

Takahashi, M., Beno, Y. y Mitsuoka, T. 1980. Utilization of ammonia nitrogen by intestinal bacteria isolated from pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:30-35.

Taverner M. R., Hume, I. D. y Farrel, D. J. 1981. Availability to pigs of amino acids in cereals grains I. Endogenous levels of amino acid in ileal digesta and feces of pigs given cereal diets. *Br. J. Nutr.* 46:159-171.

Tombs, M. P. 1967. Protein bodies of the soybean. *Plant Physiol.* 42:797-813.

Valette, P., Malouin H., Corring T., Savoie L., Gueugneau A. M. y Berot S. 1992. Effects of diets containing casein and rapeseed on enzyme secretion from the exocrine pancreas in the pig. *Br. J. Nutr.* 67:215-222.

Van Soest P. J. y Goering, H. K. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Agric. Handbook No. 379. ARS USDA, Washington, D. C.

Vries, R. P. y Visser, J. 2001. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall. Microb. Mol. Biol. Rev. 65: 497-522.

Wallace, J. C., Barnoti, C., Nisi, M. M., Formica, B., Seghezzo, M. L., Molfese, F., Jensen, C., Nisi, J., y Helguera, M. 2003. Variabilidad genética de proteínas de reserva en trigos candeales argentino y su interacción con la calidad industrial. Agriscientia. 20:19-27.

Wang, H. y Fuller, M. F. 1989. The optimum dietary amino acid patten for growing pigs. British Journal of Nutrition. 62:77-89.

Wang, H. y Murphy, P. A. 1994. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety crop year and location. J. Agric. Food Chem. 42:1674-1677.

Wilhem, G. 1997. Phytases in cereals and hemicelluloses in canola (rapeseed) meal and lupins. Dept. Anim. Sci. University of Manitoba, Winnipeg, M. B., Canada.

Wilson, L. M., Whitt, S. R., Ibañez, A. M., Rocheford, T. R., Goodman, M. M. y Buckler, E. S. 2004. Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association. The plant cell. 16:2719-2733.

Wolf, M. J., Khoo, U. y Seckinger, H. L. 1967. Subcellular structure of endosperm protein in high lysine and normal corn. Science. 157:556-557.

Yada, R. Y. 2004. Proteins in food processing. Ed. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England. Pp. 182.