

01674



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL

**EVALUACIÓN DE PAREDES CELULARES
(*Saccharomyces cerevisiae*) Y ENZIMAS COMO
PROMOTORES DEL CRECIMIENTO Y DE LA SALUD
INTESTINAL EN DIETAS PARA POLLOS DE
ENGORDA**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

ORTÍZ HERNÁNDEZ ABIGAIL

TUTOR: AVILA GONZÁLEZ ERNESTO
COMITÉ TUTORAL: LOPEZ COELLO CARLOS
CUCA GARCIA MANUEL

México, D. F.

2005

0350052



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.

DECLARACION

El autor da conocimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que este ejemplar de Tesis, esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario

A T E N T A M E N T E



MVZ Abigail Ortíz Hernández

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo reseccional.

NOMBRE: ABIGAIL ORTIZ
HERNANDEZ

FECHA: 16 - NOV - 05

FIRMA: [Handwritten Signature]

DEDICATORIA

CON RESPETO DEDICO EL SIGUIENTE TRABAJO A:

A MIS PADRES

Rosa Ma. Hernández y Pedro Ortíz.

Por sus consejos, comprensión, apoyo y amor que me han brindado durante mi vida para llegar a lograr todas mis metas.

A MIS HERMANAS

Raquel y Beatriz como muestra de cariño y amistad.

A

Dra. Irene Cruz González y Dr. Javier Bracho por su apoyo y ayuda.
Gracias.

A mis Maestros, Compañeros y Amigos.

GRACIAS A TODOS

Agradecimientos

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme cursar mis estudios de Maestría en Ciencias de la Producción y Salud Animal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DEGEP), por el apoyo de beca complementaria otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola, (FMVZ-UNAM). Quien me brindo las facilidades y el financiamiento para la realización del trabajo de investigación de esta tesis.

A mi asesor principal, Dr. Ernesto Ávila González, por su paciencia y enseñanzas proporcionadas durante la realización de esta tesis, sin cuya colaboración este trabajo no hubiera sido posible.

A mis asesores Dr. Carlos López Coello y al Dr. Manuel Cuca García, por compartir sus conocimientos y valiosas sugerencias para la culminación de esta tesis.

Al Dr. José Antonio Quintana y a la Dra. Silvia Carrillo Domínguez, quienes fungieron como parte de mi comité tutorial, gracias por el tiempo, sugerencias y apoyo en este trabajo.

A todo el personal académico del C.E.I.E.Pv por toda la ayuda, tiempo y amistad brindados, en especial a la Dra. Elizabeth y al Dr. Tomas.

A todo el personal del Departamento de Producción Animal: Aves de la FMVZ, en especial a la Dr. Ma. Teresa Casaubon, por su gran ayuda y paciencia durante la realización de este trabajo.

Un especial agradecimiento al Dr. Edgar Meraz, Adriana Tenorio, a mis amigos Elvia y José por brindarme su tiempo para que gran parte de este trabajo se realizara, gracias.

A todos ustedes, ¡Muchas gracias!

1. INDICE	PAGINA
I. RESUMEN _____	1
II. SUMMARY _____	2
III. INTRODUCCION _____	3
IV REVISION DE LITERATURA	
2.1. Antibióticos _____	5
2.2. Alimentos funcionales _____	10
2.2.1. Probióticos _____	10
2.2.2. Prebióticos _____	11
2.3. Pared celular del <i>Saccharomyces cerevisiae</i> _____	12
2.4. Enzimas _____	18
V. JUSTIFICACION _____	24
VI. HIPOTESIS _____	25
VII. OBJETIVOS _____	26
VIII. MATERIAL Y METODOS _____	27
IX. RESULTADOS _____	33
X. DISCUSION _____	41
XI. CONCLUSIONES _____	47
XII. LITERATURA CITADA _____	48
XIII. ANEXOS _____	57

2. LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

PAGINA

Cuadro 1.	Componentes de la pared celular del <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ._____	57
Cuadro 2.	Composición de los Polisacáridos no amiláceos (PNA's) de la soya._____	57
Cuadro 3.	Composición de las dietas basales empleadas en el experimento en pollos de engorda._____	58
Cuadro 4.	Efectos principales sobre el comportamiento productivo de pollos de engorda a los 21 días de edad._____	59
Cuadro 5.	Efecto de los promotores del crecimiento y enzimas sobre el pH en ciegos, pesos promedio de hígado, páncreas, proventrículo y molleja (llenos) en aves de 21 días de edad._____	60
Cuadro 6.	Efecto de los promotores del crecimiento y enzimas sobre peso de proventrículo y molleja (vacíos), intestino delgado (lleno y vació) y longitud de vellosidades (intestino medio) en pollitos de 21 días de edad._____	61
Cuadro 7.	Efecto de los promotores del crecimiento y enzimas sobre el pH en ciegos, pesos de hígado, páncreas, proventrículo y molleja (llenos) de pollos de 42 días.	62
Cuadro 8.	Efecto de los promotores del crecimiento y enzimas sobre el peso promedio de proventrículo y molleja (vacíos), intestino delgado (lleno y vació), longitud de vellosidades (intestino medio) y análisis estadísticos en pollos de 42 días._____	63

Cuadro 9.	Efecto de los promotores del crecimiento y enzimas sobre los parámetros productivos de pollos de engorda a los 45 días de edad. _____	64
Cuadro 10.	Comportamiento productivo a los 45 días de edad en pollos de engorda. _____	65
Cuadro 11.	Efecto de los promotores del crecimiento y enzimas sobre pigmentación de la piel en vivo, en canal y peso de la canal en pollos de 45 días. _____	66
Cuadro 12.	Efecto de los promotores del crecimiento y enzimas sobre el título de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle en pollos de engorda. _____	67
Cuadro 13.	Monitoreo de <i>Salmonella</i> en pollos de 1, 21 y 42 días de edad. _____	68

FIGURAS**PAGINA**

Figura 1.	Longitud de las vellosidades en el intestino medio en pollos de engorda de 21 días con los diferentes promotores del crecimiento y enzimas. _____	69
Figura 2.	Longitud de las vellosidades en el intestino medio en pollos de engorda de 42 días con los diferentes promotores del crecimiento y enzimas. _____	69
Figura 3.	Ganancia de peso en pollos de engorda de 45 días alimentados con los diferentes promotores de crecimiento. _____	70
Figura 4.	Conversión alimenticia en pollos de engorda de 45 días alimentados con los diferentes promotores de crecimiento. _____	70
Figura 5.	Pigmentación en vivo, en pollos de engorda de 45 días alimentados con los diferentes promotores de crecimiento y enzimas. _____	71
Figura 6.	Amarillamiento de la canal en pollos de engorda a los 45 días (después del refrigerado), alimentados con los diferentes promotores de crecimiento y enzimas. _____	71

I. RESUMEN

ORTÍZ HERNÁNDEZ ABIGAIL. Evaluación de Paredes Celulares *Saccharomyces cerevisiae* y enzimas como promotores del crecimiento y salud intestinal en dietas para pollos de engorda. (Tutor principal: Dr. Ernesto Ávila González, Comité tutorial: Dr. Carlos López Coello, Dr. Manuel Cuca García).

Se evaluó el efecto de la adición de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* y enzimas digestivas en dietas a base de sorgo-pasta de soya en pollos de engorda. Se midió el comportamiento productivo, peso de órganos, pH en ciegos, longitud de vellosidades en intestino medio y título de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle (ENC). Se utilizaron 1050 pollos Ross x Ross de 1 a 45 días de edad. Se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x2, un factor fue la dieta y el otro con y sin la adición de enzimas (complejo enzimático a base de glucanasa 50 FBG/g, pectinasa 5000 PSU/g). Los tratamientos fueron T1: Testigo; T2: antibiótico (Flavomicina 8 ppm) y T3: paredes celulares (*Saccharomyces cerevisiae* 500 g/t). La ganancia de peso y conversión alimenticia a los 21 días fue mayor ($P < 0.05$) en T2 y T3, no así ($P > 0.05$) para la adición de enzimas. No hubo diferencias ($P > 0.05$) entre factores para el consumo de alimento y la mortalidad. La ganancia de peso y conversión alimenticia a los 45 días fue mejor ($P < 0.05$) en T2 y T3, sin diferencias ($P > 0.05$) para el factor enzimas. No hubo diferencias ($P > 0.05$) entre factores para el consumo de alimento y mortalidad. El peso de los órganos a los 21 días fue diferente ($P < 0.05$) en T2 para el peso del proventrículo y molleja vacíos. El peso de órganos a los 42 días fue diferente ($P < 0.05$) para el peso del intestino lleno. Hubo diferencias ($P < 0.05$) al factor enzimas en peso de intestino lleno e intestino vacío. La medición de pH a los 21 días fue diferente ($P < 0.05$), se observó efecto a la adición de paredes celulares y enzimas; sin embargo, no hubo diferencias ($P > 0.05$) entre factores en la medición del pH a los 42 días de edad. No hubo diferencia ($P > 0.05$) entre factores en la medición de las vellosidades en intestino medio a los 21 días; pero en pollos de 42 días, se observaron diferencias ($P < 0.05$) cuando se adicionaron enzimas. Hubo diferencias ($P < 0.05$) para el título de anticuerpos contra ENC para la dieta observándose el mayor título de anticuerpos en la dieta con antibiótico. La flavomicina y las paredes celulares empleados como promotores del crecimiento tuvieron un efecto positivo al mejorar la ganancia de peso y la conversión alimenticia en pollos de engorda.

PALABRAS CLAVE: Pollo de engorda, paredes celulares, enzimas, vellosidades intestinales

II. Summary

Evaluation of cellular walls *Saccharomyces cerevisiae* and enzymes as a growth promoters and intestinal health in broilers diets. (Tutor Principal: Dr. Ernesto Ávila González, Comité tutorial: Dr. Carlos López Coello, Dr. Manuel Cuca García).

The objective of this study, was to evaluate the effect of cellular walls (*Saccharomyces cerevisiae*) and digestive enzymes in broilers diets. Variables were productive performance, organs weight, cecal pH, villi length in half intestine and antibodies titles against Newcastle illness (ENC). One thousand fifty chickens Ross x Ross were used from 1 to 45 days age. A complete randomized design with a factorial arrangement 3x2 of treatments was used, factors were diet and addition or with digestive enzymes (enzymatic complex with glucanases 50 FBG/g, and pectinases 5000 PSU/g). Treatments (T) were T1: control diet; T2: antibiotic (Flavomicin 8 ppm); T3: cellular walls (*Saccharomyces cerevisiae* 500 g/Ton). There were differences ($P < 0.05$) for T2 and T3 for weight gain and feed conversion, the antibiotic addition and cellular walls show a favorable response in broilers 21 days age. There were no differences ($P > 0.05$) for the enzymes addition on weight gain. There were no differences ($P > 0.05$) among factors for feed intake and mortality. There were differences ($p < 0.05$) for weight and feed conversion to the antibiotic addition and cellular walls, and there were no differences ($P > 0.05$) for enzymes factor in broilers 42 days age. There were no differences ($P > 0.05$) among factors for feed intake and mortality. Organs weight in chickens 21 days were different ($P < 0.05$) for T2, proventriculus and of the gizzard holes. There were differences ($P < 0.05$) on additive factor for the weight of full intestine. There were differences ($P < 0.05$) for enzymes factor in the weight of full intestine and empty intestine. The pH were different ($P < 0.05$), being alone effect to the addition of the cellular walls; difference also existed ($P < 0.05$) for the addition of enzymes. However there was not differences ($P > 0.05$) among factors in the weight to the 42 days of age. In the mensuration of the villi in half intestine to the 21 days didn't have difference ($P > 0.05$) among factors; but in chickens of 42 days, was statistical difference to the factor enzymes. For the title of antibodies against ENC a difference ($P < 0.05$) for the factor additive being the adult titles of antibodies in the diet with the antibiotic flavomicin. The results of this investigation showed the effect of the flavomicin and the cellular walls as growth promoters, improving the gain of weight and feed conversion of broilers chicks.

WORDS KEY: Broilers, cellular walls, enzymes, intestinal villi

III. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos se emplean para la prevención y control de las enfermedades, en el caso de la industria agropecuaria se estima que a nivel mundial, aproximadamente el 50 % se emplean como promotores de crecimiento. El uso de ellos en dosis subterapéuticas, es con la finalidad de prevenir infecciones por patógenos, mejorar la conversión alimenticia y la producción de carne y huevo (Morales y Téllez, 2001, Huyghebaert, 2003)

Sin embargo, el uso de antibióticos como promotores del crecimiento ha generado controversia a nivel mundial en científicos y consumidores, por el descubrimiento de cepas bacterianas resistentes y la posible presencia de antibióticos residuales en el organismo del ave. Como resultado de ello, en Europa y Brasil se tomó la decisión de restringir el uso de antibióticos como promotores del crecimiento a partir del año 2006, por lo que es necesario el desarrollo de nuevas alternativas que proporcionen y tengan beneficios similares (Huyghebaert, 2003).

Algunos productos utilizados como alternativas son los probióticos, prebióticos, simbióticos y paredes celulares, los cuales actúan directamente en el tubo digestivo, e influyen sobre la microflora intestinal, disminuyen la población de microorganismos entéricos patógenos y mejoran la digestibilidad de algunos nutrientes. En particular los productos de levaduras en sus paredes, contienen cantidades importantes de polisacáridos y proteínas que intervienen en la adsorción de patógenos, tienen efectos adjuvantes e inmunomodulatorios en el sistema inmune, estimulan el crecimiento de bacterias benéficas y mejoran la absorción de nutrientes así como el desempeño productivo de las aves (McKellar, 1998, Huyghebaert, 2003,).

Por otra parte, en los últimos años se han desarrollado productos a base de enzimas para destruir factores antinutricionales presentes en granos y pastas de oleaginosas, ingredientes empleados en la elaboración de alimentos balanceados para aves. La destrucción de los factores antinutricionales (polisacáridos no amiláceos), permiten una mejor absorción y utilización de los nutrientes y crean condiciones favorables para el crecimiento de microorganismos benéficos en el tubo gastrointestinal (Avila, 2003).

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antibióticos

El empleo de niveles subterapéuticos de antibióticos en la industria animal, es una práctica que se ha realizado desde la década de los 40's, con la finalidad de mejorar el crecimiento y proteger contra los efectos adversos de microorganismos entéricos patógenos. Esta práctica mejora la producción y rentabilidad animal. Moore *et al.* (1946) reportan que la utilización del antibiótico estreptomina mejoró el crecimiento y eficiencia alimenticia en pollos de engorda y pavos. Rosen (1995) realizó una revisión de 12,153 artículos para evaluar la respuesta productiva de los antibióticos adicionados en el alimento como promotores del crecimiento y reportó que en el 72 % de los casos, el uso de antibióticos afecta de forma positiva el desempeño productivo de las aves, cuando se conjunta con prácticas de manejo, alimentación y sanidad adecuadas.

Se tiene una gran cantidad de información de los beneficios generados por los antibióticos, de como afectan la fisiología del animal y el efecto que tienen sobre la población microbiana que habita en el tracto intestinal, sin embargo, la información es limitada acerca de cómo los antibióticos promueven el crecimiento (Phillips, 1999). Los antibióticos son sustancias biológicas producidas naturalmente por hongos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos y actualmente los antibióticos incluyen sustancias producidas sintéticamente que poseen habilidades antimicrobianas. El mecanismo por el cual los antibióticos influyen en la microflora intestinal y mejoran el crecimiento de las aves, no ha sido explicado por completo, pero se han propuesto varios modos de acción (Ratcliff, 2000).

Primero, los antibióticos controlan y limitan el crecimiento de bacterias (*Clostridium perfringens*) perjudiciales para las aves. Alteran propiedades del

metabolismo celular, que tiene como resultado una disminución del crecimiento y la muerte de la bacteria. Algunos antibióticos interfieren en la estructura y mantenimiento de la pared celular, bloquean la incorporación del pentapéptido mural dentro de la estructura del peptidoglucano de la pared celular (bambermicina), mientras que otros interrumpen las propiedades de transducción de proteínas en el ribosoma (virginiamicina). Debido a su rápida velocidad de crecimiento y proliferación, las bacterias son vulnerables a los antibióticos que actúan de forma activa en el metabolismo celular, limitan el crecimiento y proliferación e inhiben la producción de toxinas y subproductos (principalmente de especies bacterianas Grampositivas) en el lumen intestinal (Waibel *et al.*, 1991; Caston y Leeson, 1992; Parks *et al.*, 2000).

Segundo, los antibióticos limitan el crecimiento y colonización de numerosas especies no-patógenas de bacterias en el intestino, incluyendo *lactobacillos* (penicilina), *bifidobacteria* (ampicilina), *bacteroides* (clindamicina) y *enterococos* (kanamicina), que son bacterias productoras de ácido láctico que predominan en la parte baja del tubo gastrointestinal (Tannock, 1997; Parks *et al.*, 2000). La reducción de bacterias en el tubo intestinal, puede disminuir la competencia de nutrientes entre el ave y microorganismos y reducen los efectos adversos del estrés inmunológico durante el crecimiento (Ferket, 1991).

El tubo gastrointestinal es una línea de defensa contra los microorganismos ya que el tejido linfoide asociado al intestino, detecta las características antigénicas y es activado por la presencia de uno o varios agentes microbianos iniciando la respuesta inmune. La presencia de microflora normal en el lumen intestinal, produce un efecto inflamatorio en las células de revestimiento de la pared intestinal y tiene como consecuencia un incremento en el peso de la masa intestinal (intestino delgado, tejido linfoide y células reticuloendoteliales) y la producción de tejidos se incrementa en una proporción de 40 % por la presencia de microorganismos (Visek, 1978). Una respuesta aguda del sistema inmune

requiere una gran cantidad de energía metabólica. Para cubrir los requerimientos energéticos se incrementan los procesos de gluconeogénesis, lipólisis, etc (Stutz *et al.*, 1983). La presencia de microflora residente, provoca una mayor estimulación del sistema inmune que puede disminuir el crecimiento y desempeño óptimo del ave (Klasing, 1988; Cook, 2000).

El efecto de los antibióticos en el peso de los segmentos intestinales, se atribuye principalmente a una disminución en la capa muscular y no en la mucosa. También ejercen sus efectos principalmente en la capa circular y longitudinal, y no en la capa epitelial. Sin embargo, se menciona que el mayor impacto de los antibióticos en el peso intestinal, es en la lámina propia (mucosa) y no en la parte inferior de la capa muscular. Ferket *et al.* (2002) reportan que la utilización de antibióticos, produce aparentemente un incremento en el peso de duodeno, asociado principalmente en la mucosa e indican un ligero efecto estimulador en el tejido linfático.

Postma *et al.* (1999) y Stutz *et al.* (1983) observaron una reducción en la lámina propia, tejido linfoide, células reticuloendoteliales e informan que el peso intestinal de aves alimentadas con antibiótico como promotor es igual al peso intestinal en aves libres de gérmenes; debido a que la reducción en la lámina propia del ileon y células reticuloendoteliales, son similares. Un epitelio intestinal delgado, en aves libres de gérmenes o animales alimentados con antibióticos, puede mejorar la absorción de nutrientes y reduce las demandas metabólicas del sistema gastrointestinal y permiten que la energía sea utilizada con propósitos productivos, como el crecimiento muscular. (Visek, 1978). Bedford (2000) y Cook. (2000) señalan que el adelgazamiento de la pared intestinal puede deberse a que los antibióticos inhiben la producción microbiana de poliaminas y ácidos grasos volátiles, conocidos por aumentar la velocidad de recambio y actividad de los enterocitos incrementando el requerimiento de energía neta.

Otros autores, mencionan que la adición de antibióticos en las dietas favorece el desarrollo de microorganismos sintetizadores de vitaminas, aminoácidos y ácidos grasos volátiles en el tubo intestinal, reducen la producción de metabolitos microbianos como amoníaco y aminos, que al pasar vía sistémica son inactivadas en el hígado provocando hipertrofia de los hepatocitos (Jin *et al.*, 1998); disminuyen la renovación de las capas epiteliales, elevan el nivel de la fosfatasa alcalina favoreciendo el transporte de nutrientes a través de la pared intestinal y mejoran el aprovechamiento de la ración (Postma *et al.*, 1999; Avila, 2003).

La Flavomicina (nombre genérico bambermicina), es producida por el microorganismo *Streptomyces bambergiensis*, microorganismo que crece en un medio acuoso y en condiciones aeróbicas. La bambermicina también es producida, en menor cantidad por *S. Ederensis*, *S. geysiriensis* y *S. ghanaensis*. Actualmente la bambermicina es una mezcla de cuatro componentes activos que pertenecen a un grupo de antibióticos que contienen fósforo-glicolípidos y tiene un espectro antimicrobial similar al de la penicilina. Estos compuestos inhiben la síntesis de la pared celular o bloquean de forma irreversible la incorporación de la molécula UDP-Nac-muramilpentapeptido o impide la unión del peptidoglucano en la estructura de la pared celular (Glasby, 1992).

Stutz y Lawton (1984) mencionan que la adición de antibióticos en dietas, disminuyen el peso del duodeno, jejunio e ileón en las aves. Henry *et al.* (1987) reportan una disminución del peso intestinal en pollos de engorda alimentados con virginiamicina y flavomicina del 19 % y 14 % respectivamente debido principalmente a un adelgazamiento de la pared del tubo intestinal. En estudios realizados (Salmón y Stevens, 1990; Firman y Kirn, 1989; Waldroup *et al.*, 1985), se ha observado que la inclusión de bambermicina en la dieta como promotor del crecimiento, mejora el peso corporal en pollos de engorda, incluso cuando son desafiados con bacterias patógenas (*Salmonella* y *Clostridium perfringens*), pero

no en aves desafiadas con *Campylobacter jejuni* (Bolder *et al.*, 1999). Caston y Leeson (1992) reportaron un incremento en ganancia de peso y rendimiento en canal en pavos alimentados con flavomicina, efecto que se aprecia mejor en los machos.

En un estudio comparativo (Cromwell, 1999) para evaluar las paredes celulares y antibióticos como promotores del crecimiento en pavos, se observó que la adición de 1kg/t de paredes celulares de la primera a la quinta semana y 0.5 kg/t de la sexta semana de edad en adelante así como 2 g/t de ingrediente activo de flavomicina; lograron mejorar el peso y la conversión alimenticia de las aves. Sin embargo, cuando las paredes celulares y los antibióticos se adicionaron juntos, no hubo diferencia, sugiriendo un posible sinergismo entre los dos compuestos. Los efectos de los antibióticos, adicionados en las dietas para pollos de engorda, como promotores del crecimiento son: disminución en desuniformidad de la parvada, incremento de la digestión intestinal, absorción de carbohidratos y grasas que resulta en una disminución de nutrientes excretados al ambiente como nitrógeno y fósforo, mejor salud animal, reducción en la eliminación de patógenos, aumento de la resistencia a enfermedades, reducción en mortalidad, mejor conversión alimenticia, pigmentación y disminución de los costos de producción (Miles *et al.*, 1984; Woodward *et al.*, 1988; Salmón y Stevens, 1990; Waibel *et al.*, 1991; Cromwell, 1999;).

Los antibióticos en la alimentación animal están bajo escrutinio de científicos, consumidores y reguladores gubernamentales debido al desarrollo de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos después de un uso prolongado (Phillips, 1999; Ratcliff, 2000). Se cree que la resistencia a niveles subterapéuticos es debido a la rápida capacidad de mutación bacteriana y que algunas bacterias patógenas como *Salmonella* y *Campylobacter* poseen genes resistentes y existe la posibilidad de que sean transferidos a la flora intestinal. Como consecuencia de este problema, en algunos países de Europa se prohibió el uso

de 4 antibióticos como promotores del crecimiento Virginamicina, Espiramicina, Tilosina y Bacitracina de zinc, permaneciendo actualmente solo 4 antibióticos con autorización (Flavofosfolipol, Salinomicina sódica, Avilamicina y Monensina sódica), pero existiendo la posibilidad de que puedan enfrentar legislaciones similares en otros países (Céline, 2003). Por consiguiente, la industria avícola debe desarrollar alternativas "naturales" y "seguras" para mejorar la producción, prevención, tratamiento de enfermedades y reducir los costos de producción (Ratcliff, 2000). Estas alternativas pueden incluir ácidos orgánicos, probióticos, nucleótidos, oligosacáridos, enzimas, betaina, extractos de plantas y alimentos funcionales (Hooge, 1999).

2.2. Alimentos funcionales

Los alimentos funcionales como los probióticos y prebióticos son aquellos que aportan beneficios a la salud del consumidor. Cuando se adicionan en la dieta, poseen un efecto benéfico en las funciones del organismo (Bruce *et al.*, 1999; Morales y Téllez, 2001). Entre los beneficios que promueven hacia el organismo, se encuentra la función fisiológica, incluyendo el control del tiempo gastrointestinal (regulación de la motilidad), mantenimiento de la mucosa, incrementó de la capacidad digestiva, modificación de la microflora intestinal, estimulación de los mecanismos de defensa inespecíficas del tubo intestinal, modulación de la respuesta inmune, reducción en la inflamación y presentación de alergias hacia los alimentos (Walker y Duffy, 1998, Morales y Téllez, 2001, Isolauri *et al.*, 2001).

2.2.1. Probióticos

Se definen como suplementos alimenticios con microorganismos viables (bacterias, hongos y levaduras) que proporcionan efectos benéficos para el consumidor (huésped) (Havenaar y Huuis, 1992; Havenaar *et al.*, 1992), debido a

que promueven un mejor balance en la población microbiana del tubo digestivo. Entre los microorganismos más utilizados como probióticos se encuentran el *Aspergillus* spp, *Bacillus* spp, *Bacteroides* spp, *Bifidobacterium* spp, *Lactobacillus* spp, *Leuconostoc* spp, *Pedicoccus* spp, *Propionibacterium* spp, *Streptococcus* spp, *Enterococcus* y levaduras como *Saccharomyces* (Berg, 1998, Avila, 2003).

Los probióticos actúan sobre bacterias patógenas Gram-negativas, la forma de acción es la competencia por sitios de adhesión en la superficie intestinal (Fuller, 1997); favoreciendo la colonización de microorganismos benéficos, crean un medio menos propicio para el crecimiento de patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Clostridium* y *Campilobacter* (Batungbacal *et al.*, 2002). Debido a un incremento en la inmunoestimulación (mayor producción de linfocitos T y B), se tiene una disminución en la producción de toxinas y aumentan la disponibilidad de aminoácidos, vitaminas y enzimas (Fuller, 1997). La acción antagonista de las bacterias productoras de ácido láctico hacia los patógenos, ha sido atribuida a la producción de sub-productos metabólicos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas como componentes de la actividad bactericida (Batungbacal *et al.*, 2002).

2.2.2. Prebióticos

El término prebiótico describe a los suplementos alimenticios no absorbidos o hidrolizados por el animal en el tubo digestivo y generan efectos benéficos para la salud, ya que estimulan el desarrollo y crecimiento de bacterias en el intestino, además de ser sustratos selectivos para una o varias bacterias benéficas como *Bifidobacterias* y *Lactobacillus* (Gibson y Fuller 2002; Huyghebaert, 2003).

Los mecanismos de acción aún no están claros, pero se ha observado que estos sustratos, promueven el desarrollo de microflora benéfica, favorecen la producción de sustancias antibacterianas (bacteriocinas), estimulan la respuesta

inmune, mantienen la integridad de la mucosa intestinal, modifican la actividad enzimática, influyen sobre la permeabilidad de la mucosa mejorando la protección contra bacterias y virus entéricos, disminuyen la eliminación de sustancias tóxicas en el intestino, aumentan el tiempo de tránsito gastrointestinal y favorecen el metabolismo de los lípidos (Fuller, 1997; Isolauri *et al.*, 2001).

Se han identificado 3 oligosacáridos que son utilizados como prebióticos, los mananoligosacáridos, fructooligosacáridos y galactosacáridos. Los mananoligosacáridos son derivados de la pared celular de las levaduras y poseen un alto grado de antigenicidad debido a sus componentes como la manosa y glucanos. Los beneficios de los mananoligosacáridos se basan en mecanismos que incluyen, la modificación de la flora intestinal, reducción en la velocidad de recambio de la mucosa intestinal, así como la modulación del sistema inmune en el lumen intestinal (Parekh, 1993).

2.3. Pared Celular del *Saccharomyces cerevisiae*

La pared celular del *Saccharomyces cerevisiae* comprende del 15–30 % del peso seco de la célula, de esta 80–85 % son polisacáridos (principalmente glucosa y manosa) y del 10 al 15 % son proteínas (Blondeau, 2001); mientras que el resto de la pared esta compuesto en proporción mínima de lípidos y fosfatos inorgánicos (Joseleau *et al.*, 1999) (Cuadro 1).

De los polisacáridos, los mayores componentes son β -glucanos (1,3), β -glucanos (1,6), mananoproteínas y quitina. Estos componentes están unidos covalentemente y forman complejos de macromoléculas, para formar y proporcionar flexibilidad a la pared celular. La estructura de la pared celular esta formada de una capa interior que consiste en moléculas de β -glucanos (1,3) y forman una red tridimensional que rodea a la célula entera. Esta red se mantiene unida por los puentes de hidrógeno múltiples que se forman entre los β -glucanos

(1,3). En la capa externa se unen las mananoproteínas de la pared celular a los β -glucanos (1,3) no reducidos, también pueden estar unidas directa o indirectamente a través de interconexiones entre β -glucanos (1,6). En la siguiente capa se acoplan las cadenas de quitina a la fracción no reducida de los β -glucanos (1,3) (Kollar *et al.*, 1997).

Los β -glucanos se describen como polímeros de glucosa que forman el mayor polímero estructural de la pared celular (Kollar *et al.*, 1997). Se han descrito tres clases de β -glucanos: a) β -glucanos (1,3) álcali-insolubles insolubles en ácido acético, b) β -glucanos (1,3) solubles en álcali y c) los β -glucanos (1,6) muy ramificados (Aguilar y Francois, 2003). Se cree que los β -glucanos (1,3) álcali-insolubles, están involucrados en el mantenimiento, fuerza y forma de la pared; los β -glucanos (1,3) solubles en álcali, se ha propuesto que confieren flexibilidad a la pared celular; y los β -glucanos (1,6) juegan un papel central en la organización de la pared celular, junto con los β -glucanos(1,3), mananoproteínas y quitina (Kollar *et al.*, 1997).

Los β -glucanos (1,3) poseen una conformación helicoidal (Krainer *et al.*, 1994). Tales hélices están compuestas de una sola cadena de polisacáridos o de tres cadenas de hidrógeno unidas (una triple hélice). Las mananoproteínas de la pared celular son polipéptidos altamente glucosilados y a menudo representan del 50-95 % del peso de los carbohidratos (Kapteyn *et al.*, 1999). Las mananoproteínas en la superficie de la célula de levadura determinan la respuesta y el comportamiento antigénico de la célula. La quitina es uno de los componentes glucosilados que se encuentran en menor cantidad en la pared celular, se une a los enlaces de β -glucanos (1,3), β -glucanos (1,6) no reducidos y la unión de quitina y β -glucanos (1,3) son unidades estructurales esenciales para la insolubilidad de la pared celular (Kollar *et al.*, 1997).

Uno de los más prometedores oligosacáridos son los manano-oligosacáridos, que son un complejo de glucomananoproteínas de la pared celular de las levaduras. Estos componentes intervienen en la adsorción de patógenos entéricos así como en la regulación inmunológica. Durante los últimos 15 años se han realizado investigaciones para determinar el mecanismo por el cual las paredes celulares impiden la colonización de bacterias patógenas en el tubo gastrointestinal. Se cree que ciertos componentes de la superficie bacteriana llamadas lectinas, están involucradas en el ataque al tejido entérico mediante la adhesión de bacterias a las células epiteliales, aunque hay varias lectinas específicas para azúcares como galactosa y manosa; las lectinas específicas para manosa predominan en los patógenos intestinales (*E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter diversus*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophilia*). Estas lectinas se localizan en el exterior de la célula y están asociados con el pili o fimbria de las bacterias. Las células bacterianas con pili específico para la manosa se unen al tubo intestinal. Una vez que están unidas a las células, pueden colonizar el tracto y causar enfermedad (Moran, 2004).

La adhesión de patógenos a la superficie del epitelio intestinal (colonización), es el punto crítico para iniciar la infección. Las bacterias con fimbria tipo 1, producen adhesinas que tienen afinidad por residuos específicos de carbohidratos (manosa), localizados en la superficie de las glucoproteínas de las células huésped. Bacterias patógenas que poseen fimbria Tipo 1 como *E. coli* y *Salmonella*, se adhieren específicamente a la manosa de la pared celular, impidiendo que puedan fijarse a las células epiteliales del tubo gastrointestinal e iniciar la colonización debido, a que la lectina se aglutinará con la manosa de la pared celular del *Saccharomyces cerevisiae*. Las paredes no son degradadas por las enzimas digestivas, atraviesan el tubo gastrointestinal con el patógeno unido, previniendo la colonización de microorganismos patógenos y evitando

subsecuentes reinfecciones entéricas (Ojeniyi, 1989; Spring, 1997; Oyofu *et al.*, 1989; Parks *et al.*, 2000).

Para entender la importancia de los oligosacáridos en el sistema inmunológico, se han realizado investigaciones, en las cuales se ha podido identificar que tienen un efecto adjuvante e inmunomodulatorio, que pueden ser considerados como dos componentes de la immunoestimulación. Un adjuvante es una sustancia que aumenta la respuesta inmunológica a una vacuna, droga o antígeno, así como la resistencia a infecciones bacterianas, hongos, virus y parásitos; y se menciona que un lipopolisacárido como adjuvante, mejora la inmunidad humoral y celular (Klasing 1988). Sin embargo la actividad de adjuvante no es la única manera en que los lipopolisacáridos afectan el sistema inmunológico, tienen también la capacidad de reconocer algunos antígenos a los que han sido expuestos con anterioridad e iniciar la respuesta inmune con mayor rapidez, debido a la formación de anticuerpos específicos de los polisacáridos de superficie contra el antígeno. Además de los adjuvantes y las propiedades del antígeno, los oligosacáridos contienen manosa que también afecta el sistema inmunológico por estimulación del hígado para secretar a la proteína ligadora de manosa. Esta proteína se une a la cápsula bacteriana e inicia la cascada del complemento (Janeway, 1993).

La acción protectora de los β -glucanos (1,3), se ha descrito como un inmunomodulador no específico debido a que involucra diferentes vías inmunes que incluyen: la activación de macrófagos (incremento en número y tamaño, estimula la secreción de lisozima y TNF), estimulación de células T, sistema reticuloendotelial (SRE), activación de las células NK (natural killer), activación de vías clásicas y alternativas del complemento y un aumento en la producción de anticuerpos, mejorando la resistencia a enfermedades, la eficacia de las vacunas y reduce los efectos tóxicos de los productos microbianos en tejidos infectados. También se reporta una reducción en el tejido inflamatorio, que puede estar

asociado con la unión e inactivación del antígeno, involucrado directamente en la reacción de hipersensibilidad modulado por uno o más compuestos de la cascada de citocinas (Bonh y BeMiller, 1995).

El efecto de los mananoligosacáridos utilizados en la alimentación animal, es una mejor salud intestinal y desempeño productivo en una gran variedad de especies, ya que actúan como nutrientes para otros organismos benéficos. Se menciona que al utilizar paredes celulares en dietas de pollo de engorda, en comparación con una dieta testigo (antibióticos), el desempeño productivo fue similar, el porcentaje de mortalidad en la dieta testigo fue mayor que en la dieta adicionada con paredes celulares, lo que indica que las paredes celulares mejoran la viabilidad al compararlo con los antibióticos evaluados (avilamicina, bacitracina, virginiamicina utilizados como promotores del crecimiento) (Hooge, 2004).

Santin *et al.* (2001) reportaron que la inclusión de 0.2 % de paredes celulares del *S. Cerevisiae* en las dietas de pollos de engorda, favorece el desarrollo intestinal incrementando la altura de las vellosidades durante los primeros 7 días de edad y posiblemente está correlacionado con una mejor ganancia de peso durante el ciclo de producción. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Iji *et al.* (2001) quienes observaron un incremento en la longitud de las vellosidades del yeyuno con la adición de 3.0 y 5.0 g/kg de paredes celulares en dietas para pollos de engorda.

Savage *et al.* (1996) mencionan que la adición de paredes celulares del *S. Cerevisiae* en las dietas modifican la morfología y estructura de la mucosa intestinal, observando una disminución en la profundidad de las criptas del duodeno, yeyuno y ciego en pavos de 8 semanas alimentados con dietas suplementadas con 0.1 % de paredes celulares. Estos cambios en la profundidad

de las criptas están correlacionados con un incremento significativo en la velocidad de crecimiento a las 8 semanas.

Se han realizado experimentos para observar el efecto de las paredes celulares del *S. Cerevisiae* en la inmunidad celular y humoral. Lilburn *et al.*, (2000) señalan que la inclusión de 0.5 y 1 g/kg de paredes celulares mejora el título de anticuerpos. Savage y Zakrzewska (1997) mencionan que la adición de paredes celulares a razón de 1 g/kg en la dieta, mejora los niveles de IgG e IgA en suero de pavos.

Waldroup *et al.* (2003) mencionan que la adición de un oligosacárido en la dieta puede suprimir la presencia de patógenos entéricos, regula la respuesta inmune y mejora la integridad de la mucosa intestinal en pavos y pollos. Oyofe *et al.* (1989) reportan que la adición de manosa disminuye el número de bacterias adheridas a las células de la superficie intestinal en un 90 % al compararlas con el tratamiento testigo (no adicionado manosa), en aves de 10 días desafiadas con *Salmonella*. Cuando la manosa se adiciona en el agua de bebida, disminuye la colonización por *Salmonella* en los muestreos realizados a los 21 y 28 días en los respectivos tratamientos.

Ouhida *et al.* (2002) citan que en pollos de engorda alimentados con dietas bajas en energía y suplementados con β mananos y enzimas, se obtienen pesos y conversiones alimenticias similares a los informados en pollos alimentados con dietas de alta energía; y mencionan que la suplementación de β mananos simultáneamente con proteasas en la dieta, tiende a incrementar aparentemente el tiempo en el tracto digestivo (íleon) en aves de 21 a 42 días de edad.

2.4. Enzimas

La adición de enzimas en la industria de los alimentos balanceados, se inició hace más de 30 años, mediante el empleo de β -glucanasas en las dietas a base de cebada. Actualmente se producen varias enzimas de utilidad práctica en la alimentación animal a partir de microorganismos (hongos, levaduras y bacterias). Entre las enzimas hidrolasas que se han desarrollado para la práctica alimenticia están las amilasas, proteasas, xilanasas, fitasas, hemicelulasas y celulasas. Estas pueden mejorar la digestión de carbohidratos, proteínas y el aprovechamiento del fósforo en el tracto gastrointestinal. Las dietas para pollos de engorda se elaboran en México principalmente a base de granos como el maíz o sorgo y en otros países trigo y cebada, los cuales contienen cantidades considerables de polisacáridos no amiláceos (PNA) como los xilanos que no pueden ser hidrolizados por las enzimas endógenas del ave, por lo que se requiere incluirlas en el alimento. Al no ser hidrolizados estos azúcares en el intestino delgado, forman complejos que dan como resultado una mayor viscosidad en el lumen intestinal, lo que interfiere con la digestión y absorción de los nutrimentos (Camiruaga *et al.*, 2001).

El empleo de granos de cereales de baja viscosidad como el sorgo y el maíz, llamados así por su bajo contenido de PNA (Polisacáridos No Amiláceos) pueden ser mejor utilizados por los animales al incrementarse su digestibilidad mediante enzimas apropiadas. El uso de enzimas comerciales en los alimentos para aves puede complementar a las enzimas endógenas del tubo gastrointestinal e incrementar la digestibilidad de los granos y de la pasta de soya por lo que son consideradas como promotores del crecimiento (Ávila, 2005).

La adición de enzimas como las carbohidrasas, proteasas, lipasas y fitasas en el alimento para aves es necesaria, para eliminar factores antinutricionales de

los cereales, mejorar la digestibilidad y el valor nutrimental de los ingredientes; la selección apropiada de las enzimas con que se suplementa la dieta depende de su sitio de actividad, características del sustrato, rango de actividad enzimática y del estado fisiológico del animal (Marquardt *et al.*, 1994; Batungbacal *et al.*, 2002).

Las células de los cereales contienen proteínas, almidones y lípidos, sustancias que en la mayoría de animales pueden ser rápidamente digeridas y absorbidas. Las paredes celulares contienen celulosa, hemicelulosa y lignina que son esencialmente indigestibles por las aves, ya que no tienen la capacidad de sintetizar las enzimas requeridas para hidrolizar los pentosanos (xilanos), arabinos y mananos que son los componentes de la hemicelulosa, por lo que no constituyen una fuente energética para las aves. Esto puede mejorarse al añadir enzimas a la dieta, ya que las aves tienen una limitada habilidad para absorber los pentosanos, siendo éstos utilizados sólo en niveles del 10 % de la materia seca (MS). La pared celular de los cereales consta de diferentes polisacáridos: los polisacáridos fibrilares (principalmente celulosa), polisacáridos de la matriz (hemicelulosas y pectinas) y sustancias incrustantes (lignina). Las concentraciones de estos componentes varían entre diferentes especies, influenciadas por el estado fenológico de la planta y determina las propiedades físicas y químicas de los polisacáridos, afectando su acción fisiológica (Camiragua *et al.*; 2001).

Los polisacáridos no amiláceos son polímeros macromoleculares de azúcares simples o monosacáridos ligados por uniones específicas llamadas glucosídicas. La naturaleza de las uniones determina su susceptibilidad a ser degradadas por las enzimas digestivas de las aves. Los polisacáridos comúnmente presentes en la pared celular de los cereales son: la celulosa β (1-4) D-glucano, que es resistente a las enzimas que degradan el almidón, siendo las uniones alfa las de más fácil degradación; los β -D-glucanos, que son polímeros lineales de glucosa con uniones glucosídicas β -(1-3), (1-4); y los arabinoxilanos,

más complejos que los anteriores, compuestos de 2 azúcares: arabinosa y xilosa en una estructura ramificada y los polisacáridos más complejos están presentes principalmente en las leguminosas (Beudeker, 1996).

La solubilidad es una propiedad importante que determina la actividad antinutritiva de PNA en dietas de pollos. Las solubilidades de los PNA están determinadas no sólo por su estructura primaria, sino también por la forma como ellos están ligados a otros componentes de la pared celular. Muchos polisacáridos dan soluciones viscosas al ser disueltos en agua. La viscosidad depende de algunos factores incluyendo el tamaño de molécula, si es ramificada o lineal, la presencia de grupos cargados, su estructura y concentración (Annison, 1991).

Redford y Morgan (1996) han propuesto dos mecanismos que explican la actividad antinutritiva de los cereales debido al componente arabinoxilano del grano. Los arabinoxilanos consisten en una cadena de 13 monómeros con enlaces 1,4 unidos a xilosa, este enlace es atacado por la arabinosa y constituye la fracción soluble en agua de los PNA. El primer mecanismo propuesto es que el arabinoxilano es impermeable al ataque enzimático en el intestino delgado. El segundo mecanismo propuesto es que una proporción de los arabinoxilanos presentes se disuelven en el intestino y causan el incremento en la viscosidad, lo cual reduce la difusión del nutriente por la formación de gel. Cowan *et al.* (1993), Ward (1996) y Batungbacal *et al.* (2002), mencionan que enzimas, como las pentosanas, hidrolizan a los arabinoxilanos en polímeros más pequeños (arabinosa, xilosa) disminuyendo de esta forma la presencia de material viscoso en el intestino; mejoran la digestión y absorción de nutrientes, incrementan la velocidad de digestión, afectando de forma indirecta la microflora intestinal ya que degradan la pared celular de cereales como el maíz, trigo y avena, y produciendo, azúcares libres, que en íleon y ciegos son fuentes de energía para bacterias benéficas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Las enzimas β -glucanasas, celulasas y proteasas se han usado como suplementos con buenos resultados especialmente en dietas basadas en trigo, cebada (10-50 %) y centeno. Ellas actúan sobre los PNA presentes en la pared celular, disminuyendo la viscosidad del tubo gastrointestinal, aumentando la digestibilidad de la materia seca, proteína y aminoácidos (met, cis, y lis); incrementan el contenido de energía metabolizable de la dieta, reducen la retención de grasa, tamaño y peso del duodeno, yeyuno, ileon, colon, páncreas, hígado y proventrículo y de esta manera reduce el consumo de alimento, mejorando así la ganancia de peso y la conversión alimenticia (Beudeker, 1996).

Varios investigadores citados por Camiruaga *et al.* (2001) han estudiado la respuesta productiva de los animales no rumiantes frente a una suplementación enzimática en las dietas, midiendo las variables como peso vivo, consumo de alimento, ganancia de peso, conversión alimenticia, peso de la canal, así como el tamaño y peso de órganos. Los resultados son variables y dependen del tipo de enzima aplicado. Morgan *et al.* (1995) mencionan que la presencia de polisacáridos indigestibles provoca un mayor desarrollo de los órganos digestivos incluyendo el páncreas, debido a una mayor producción enzimática para compensar la digestión intestinal.

La pasta de soya ingrediente utilizado como fuente de proteína de origen vegetal, tiene alto contenido de PNA. En la pared celular de la soya, los PNA constituyen de un 20–25 % de la materia seca (Cuadro 2), estos carbohidratos son resistentes a las enzimas digestivas y su digestión en los monogástricos es parcial debido a la forma en que se combinan con polisacáridos principalmente con estructuras de pectina. Debido a su viscosidad estos PNA producen un efecto de barrera, inhibiendo la posibilidad de contacto sustrato-enzima e incrementan el tránsito intestinal, reduciendo la digestibilidad y absorción de grasas y proteínas, (Zanella *et al.*, 2003; Rebole *et al.*, 1999).

Algunas de las preparaciones multienzimáticas contienen pectinasas, β -glucanasas y hemicelulasas y se utilizan para hidrolizar los PNA presentes en los alimentos elaborados a base de soya, canola, chícharo y girasol. Los complejos enzimáticos mejoran la digestibilidad de los ingredientes protéicos en el alimento de aves, cerdos y otros animales monogástricos. Las pectinasas y las β -glucanasas son enzimas que degradan una amplia gama de polisacáridos que se encuentran en la pared celular de las materias primas vegetales, como los β -glucanos, hemicelulosa y pectina. Una vez que los polisacáridos son degradados, los nutrientes de los alimentos que se encontraban "atrapados" pueden ser liberados y utilizados por el animal, se reduce la viscosidad del contenido intestinal, permitiendo una mejor digestibilidad y tránsito de nutrientes en el tubo gastrointestinal (Anónimo, 2003).

Los efectos de la utilización de complejos enzimáticos en el alimento son: la hidrólisis de la pared celular, lo que permite que los nutrientes retenidos puedan entrar en contacto con las enzimas digestivas de los animales. La hidrólisis de la fibra disminuye los problemas de viscosidad en el tubo gastrointestinal, debido a la degradación de las paredes celulares de los ingredientes, que tiene como resultado un incremento en la digestibilidad protéica e incremento de la energía metabolizable. Por lo que el uso de compuestos multienzimáticos a base de celulasas, amilasas, maltasas, proteasas y lipasas en la alimentación animal, es con el objeto de mejorar la utilización de los cereales, así como de otros componentes de la dieta con alto valor energético, principalmente pasta de soya (60-75 %) (Azcona y Schang, 1993).

Resultados obtenidos en pruebas experimentales reportan que la inclusión de 300 g/t del complejo enzimático Ronozyme VP (a base de β -glucanasas, pectinasas y hemicelulasas), en dietas que contienen 20 % de harina de soya, incrementa la EMA (energía metabolizable aparente) aproximadamente en un 4% al incrementar el nivel de inclusión de la enzima tiene como resultado un aumento

en la utilización de energía y el efecto de las enzimas sobre la digestibilidad de proteína es apreciado con dosificaciones inferiores de enzimas. Se menciona que con la inclusión de 300 – 500 g/t del complejo enzimático (β -glucanasas, pectinasas y hemicelulasas), se puede reducir del 2 – 3 % el nivel de proteína bruta en la formulación de la dieta (Anónimo, 2003). Camiruaga *et al.* (2001) informan que la suplementación enzimática con proteasas, celulasas, mejora el peso y la eficiencia alimenticia; y puede incrementar entre un 5 – 8 % la energía metabolizable de la soya y un aumento del 5% en la disponibilidad de metionina-cistina y lisina. Richter *et al.* (1993) y Spring *et al.* (1996) afirman que dosis de 350 g de β -glucanasa/t de alimento y 200 g de proteasa/t de alimento, son suficientes para obtener óptimos resultados y mejorar la conversión alimenticia hasta en un 6.5 %.

Batungbacal *et al.* (2002) mencionan que en pollos el uso de probióticos puede complementar la acción de las enzimas exógenas y mejorar el desempeño productivo debido a una mejor digestión de nutrientes, principalmente en la parte baja del intestino, incrementando la ganancia de peso, mejorando la conversión alimenticia y viabilidad. La suplementación de enzimas y probióticos en las dietas de pollos de engorda a base de maíz-pasta de soya, mejora el comportamiento productivo y disminuye la mortalidad debida a *Colibacillosis* en ausencia de antibióticos como promotores de crecimiento.

V: JUSTIFICACIÓN

Debido a que el uso de antibióticos como promotores de crecimiento en la producción animal, es una práctica que desaparecerá en un futuro cercano a nivel mundial; la industria avícola esta buscando algunos sustitutos a los antibióticos como promotores del crecimiento. Dentro de estas alternativas se mencionan a las paredes celulares por su efecto contra las bacterias patógenas y su acción benéfica sobre el sistema inmune; así como reducir a través de enzimas, factores antinutricionales, como los polisacáridos no amiláceos que pueden permitir el desarrollo de bacterias patógenas. El siguiente estudio, se planteó con el fin de investigar el efecto de la pared celular del *Saccharomyces cerevisiae* y enzimas a base de glucanasas y pectinasas de reciente aparición en el mercado mexicano; y como estos compuestos influyen en el comportamiento productivo y modifican la fisiología de la digestión y absorción intestinal.

VI. HIPÓTESIS

La adición de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* y enzimas en el alimento, mejoran el desempeño productivo del pollo de engorda, debido a que estos productos pueden modificar la fisiología de la absorción y digestión intestinal y disminuyen la presencia de patógenos entéricos.

VII. OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto de la adición en la dieta de las paredes celulares del *Saccharomyces cerevisiae*, con y sin enzimas, como alternativa para sustituir a los antibióticos utilizados como promotores de crecimiento y evaluar su efecto en la salud intestinal en pollos de engorda.

Particulares

- Evaluar el efecto de las paredes celulares del *Saccharomyces cerevisiae* sobre el comportamiento productivo (peso corporal, consumo de alimento, conversión alimenticia, mortalidad, pigmentación y rendimiento de la canal) en pollos de engorda.
- Evaluar el efecto de las paredes celulares del *Saccharomyces cerevisiae* sobre el pH en ciegos y peso de órganos en pollos de engorda.
- Evaluar el efecto de las paredes celulares del *Saccharomyces cerevisiae* sobre el tamaño de las vellosidades del intestino medio en pollos de engorda.
- Evaluar el efecto de las paredes celulares del *Saccharomyces cerevisiae* sobre el título de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle, en pollos de engorda.
- Monitorear el efecto de las paredes celulares del *Saccharomyces cerevisiae* sobre la presencia de *Salmonella* a partir de hisopos cloacales en pollos de engorda.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

Localización

La presente investigación se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza y Extensión en Producción Avícola (C.E.I.E.P.Av) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, ubicado en la delegación Tlahuac, a una altura de 2250 m.s.n.m entre los paralelos 19° 15' latitud Oeste. Bajo condiciones de clima templado húmedo Cw, siendo enero el mes más frío y mayo el mes más caluroso, su temperatura promedio anual es de 16 ° C y una precipitación pluvial anual media de 747 mm (INEGI, 2002)

Manejo de las aves

Se realizó un experimento, con 1050 pollos de engorda, de la línea comercial Ross x Ross, de un día de edad. Las aves fueron colocadas en una caseta convencional con piso de cemento y cortinas laterales, el agua y alimento se proporcionaron *ad libitum*. En cada corral se empleó un bebedero automático de campana y un comedero de tolva (plástico). Se utilizaron criadoras catalíticas, durante las primeras cuatro semanas, posteriormente la temperatura y ventilación se regularon mediante el uso de cortinas laterales. Las aves de todos los tratamientos se vacunaron a los 10 días de edad, contra la enfermedad de Newcastle cepa La Sota en aplicación simultánea vía ocular y subcutánea.

Alimentación de las aves

Se emplearon dietas con base a sorgo-pasta de soya que cubrían las necesidades sugeridas por Cuca *et al.* (1996) para pollos de engorda (Cuadro 3). La inclusión del antibiótico, paredes celulares y enzimas en los tratamientos fueron a expensas del sorgo de la dieta base de la siguiente forma: Flavomicina 200 g/t, equivalente a 8 ppm, paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* 500 g/t* y de un complejo enzimático** (Glucanasa 50 FBG/g, Pectinasa 5000 PSU/g) que se adicionaron a razón de 1g/kg de pasta de soya en la dieta.

* Safmannan/SAF AGRI MÉXICO

** Ronozyme VP (CT) DSM Nutritional Products

Las fases de alimentación durante el experimento fueron las siguientes:

- 1) Iniciación: 1 – 21 días de edad, dieta con 21 % de proteína y 2946 kcal/kg de EM.
- 2) Finalización: 22 – 45 días de edad, dieta con 19 % de proteína y 3052 kcal/kg de EM.

Variables evaluadas

Parámetros productivos

Los parámetros productivos a medir fueron los siguientes: Peso corporal: todas las aves de cada tratamiento fueron pesadas semanalmente durante el periodo de engorda. Consumo de alimento: se registró semanalmente y se calculó de la siguiente forma, peso de alimento servido al iniciar la semana menos peso del alimento al terminar la semana, dividiendo entre el número de aves en el periodo. Conversión alimenticia (ajustada): se expresó como la cantidad de alimento consumido por kilogramo de peso corporal producido (Quintana 1999).

Pigmentación en piel

Se realizó a través de un colorímetro de Reflectancia Minolta CR300, calibrado con fondo blanco. La medición del pigmento en vivo, se llevó a cabo a la sexta semana en la región del apterilo lateral (vena de la grasa) en cinco aves por réplica; y la medición de pigmento en canal se realizó en tres aves por réplica después del desplumado y posterior al enfriado, en la misma región. El rendimiento en canal se determinó en tres aves por réplica, seleccionadas al azar, a los 42 días de edad. Las aves seleccionadas fueron identificadas y pesadas para ser sacrificadas bajo condiciones comerciales, registrando el peso de la canal (Fletcher y Cason, 1991).

Determinación de pH en ciego

Se realizó a los 21 y 42 días, en dos aves por réplica, 10 por tratamiento inmediatamente después del sacrificio.

Pesaje de órganos

Se realizó a los 21 y 42 días de edad, en dos aves por repetición, 10 aves por tratamiento fueron seleccionadas al azar para tomar los pesos de molleja, proventrículo, intestino, páncreas e hígado. Después del sacrificio se removió el aparato digestivo, y se hizo el pesaje de hígado y páncreas; de molleja, proventrículo e intestino, en estos órganos se tomaron dos pesajes con y sin contenido intestinal. Para remover el contenido, los órganos fueron lavados y secados para su posterior pesaje. La porción de intestino pesada fue intestino delgado y el contenido fue removido de forma manual. El peso de los órganos se expresó en base al % de peso vivo y se calculó: $\text{peso del órgano} \times 100 / \text{peso del pollo}$ (Nitsan *et al.*, 1991).

Determinación del tamaño de vellosidades

La medición de las vellosidades se realizó en 2 pollos por réplica, 10 pollos por tratamiento a los 21 y 42 días de experimentación. Se utilizaron aves de peso promedio y se les retiró el alimento 12 horas antes de la toma de muestras. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, e inmediatamente después del sacrificio, se colectaron muestras de aproximadamente 1 cm de intestino medio a partir del divertículo de Meckel, el contenido intestinal se removió inyectando aire y las muestras fueron fijadas en formol al 10 % durante 24 hrs. Estas muestras se procesaron con la técnica de inclusión en parafina, secciones de 4 μm de espesor fueron teñidas con hematoxilina y eosina. Los cortes histológicos se evaluaron en un microscopio electrónico de la Marca Zeiss, con el ocular 15X y el objetivo 3.2X. En el ocular 15X, se colocó una lente reticulada con 20 cuadros por lado, a través de un micrómetro de platina y utilizando el objetivo 3.2X, se determinó que cada

subdivisión de la lente midió 160 μ . Para evaluar el largo de las vellosidades se midieron 10 vellosidades a partir de la membrana basal de la lámina propia de la mucosa hasta el ápice de la vellosidad (Luna 1968).

Medición del título de anticuerpos contra Newcastle (ENC)

A los 10 días de experimentación todas las aves fueron vacunadas contra la enfermedad de Newcastle vía oral y subcutánea, con cepa La sota. A los 7, 25 y 35 días postvacunación, se tomaron 5 muestras de sangre por réplica, con un total de 25 muestras por tratamiento y se determinó el título de anticuerpos contra ENC mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI). Para la obtención del suero se tomaron 2 mL de sangre de la vena radial.

Monitoreo de *Salmonella*

Se tomaron hisopos cloacales, de 3 pollos por réplica, tomando un total de 9 muestras por tratamiento en los días 1, 21 y 42 de experimentación. Los hisopos se colocaron en tubos con caldo tetrionato, fueron incubados por 24 horas a temperatura ambiente para su posterior siembra en agar Mac Conkey y Verde Brillante. Las muestras fueron incubadas por 24 horas a 37 °C, y se realizaron pruebas bioquímicas, solo donde se observó crecimiento bacteriano de colonias sospechosas.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron 1050 pollos de engorda, sexados de un día de edad, distribuidos en 6 tratamientos con 5 repeticiones de 35 pollos cada una. Se empleó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 3x2; donde el primer factor fueron los promotores de crecimiento (flavomicina, paredes celulares y sin promotor) y el segundo fue con y sin la adición de enzimas. Los tratamientos fueron los siguientes:

Tratamiento 1 (T1): Testigo

Tratamiento 2 (T2): Testigo + antibiótico

Tratamiento 3 (T3): Testigo + paredes celulares

Tratamiento 4(T4): Testigo + enzimas.

Tratamiento 5 (T5): Testigo + Antibiótico + enzimas

Tratamiento 6 (T6): Testigo + Paredes celulares + enzimas.

El modelo estadístico empleado para analizar las variables en estudio fue:

$$Y_{ijk} = \mu + PC_i + NE_j + (PC\ NE)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Valor de la variable de respuesta (peso corporal, consumo de alimento, conversión alimenticia, mortalidad, rendimiento de la canal, tamaño de las vellosidades, título de anticuerpos ENC y pH correspondientes al i-ésimo tipo promotor de crecimiento (PC) y al j-ésimo nivel de enzima en la j-ésima repetición (E).

μ = Media general poblacional para peso corporal, consumo de alimento, conversión alimenticia, mortalidad, rendimiento de la canal, tamaño de las vellosidades, título de anticuerpos ENC y pH.

PC_i = Efecto del i -ésimo tipo de promotor de crecimiento.

NE_j = Efecto del j -ésimo nivel de enzimas.

$(PC\ NE)_{ij}$ = Efecto de la interacción del i -ésimo tipo de promotor de crecimiento y del j -ésimo nivel de enzimas.

E_{ijk} = Error experimental, asociado a cada una de las observaciones.

Los datos obtenidos en porcentaje, mortalidad y peso de órganos, se transformaron utilizando la raíz cuadrada del Arcoseno. Los resultados se analizaron con el procedimiento GLM (SAS,1996). La comparación de medias se hizo mediante la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1988).

IX. RESULTADOS

Los resultados promedio del comportamiento productivo y de los análisis estadísticos durante los primeros 21 días de experimentación, se presentan en el Cuadro 4. Existió diferencia estadística para el factor promotor del crecimiento ($P < 0.05$) en la ganancia de peso, observándose mayores aumentos de peso en las aves que recibieron el antibiótico (630 g) respecto, a los que consumieron las paredes celulares y la dieta testigo. Se aprecia también que las ganancias de peso en los pollitos fueron similares con y sin enzimas; no se encontró diferencia ($P > 0.05$) al factor enzimas y la interacción aditivo x enzima no fue significativa.

En consumo de alimento se aprecia que los consumos fueron similares, no existiendo diferencia estadística ($P > 0.05$) al factor promotor de crecimiento y al factor enzimas, tampoco hubo efecto de interacción significativo; pero se nota que el consumo de las aves alimentadas con antibiótico fue mayor (927 g) al compararlo con las aves que consumieron paredes celulares (906 g). El análisis estadístico de la conversión alimenticia indica un efecto significativo para el factor promotor del crecimiento, la conversión fue mejor en las aves que recibieron el antibiótico flavomicina (1.47); no se encontró diferencia ($P > 0.05$) a la adición de enzimas y la interacción de factores (Cuadro 4).

Los resultados de la medición promedio de pH en ciegos, peso del hígado, páncreas y el proventrículo (lleno) en aves de 21 días se observan en el Cuadro 5. Se encontró diferencia ($P < 0.05$) para el factor promotor de crecimiento en pH del ciego, se observa que este fue menor en las aves que consumieron las paredes celulares y el antibiótico (6.62 vs 6.77); como se puede ver existió diferencia también al factor enzimas ($P < 0.0001$). Los pollos alimentados con el complejo enzimático muestran un menor pH (6.53) que el testigo. Para peso del hígado el factor aditivo no fue significativo, se aprecia que los pesos son similares entre las dietas. Se encontró diferencia ($P < 0.06$) para el factor enzimas, observándose que

el menor peso (2.6 % del peso vivo (PV)) fue en las aves que consumieron el complejo enzimático en el alimento y que la interacción promotor del crecimiento x enzima no fue significativa.

No existió diferencia ($P>0.05$) para el factor aditivo en el peso de páncreas, observándose pesos similares en las aves que consumieron el antibiótico, las paredes celulares y la dieta testigo. No se encontró diferencia estadística al factor enzimas y la interacción promotor del crecimiento x enzimas tampoco fue significativa. En peso del proventrículo y de la molleja llenos, se puede ver que fue menor en las aves que consumieron el antibiótico flavomicina (en 8.4 %) en el alimento. No se encontró diferencia ($P>0.05$) al factor enzimas y se aprecia que no existió diferencia ($P<0.05$) a la interacción promotor del crecimiento por enzima.

En el Cuadro 6, se encuentran los resultados del análisis estadístico de los efectos principales de peso de proventrículo y molleja (vacío), intestino delgado (lleno y vacío) y longitud de vellosidades (intestino medio) en pollitos de 21 días de edad. Para el peso de proventrículo y molleja vacíos se encontró diferencia para el factor promotor del crecimiento ($P<0.06$). Como se puede ver el menor peso de los órganos fue en los pollitos que recibieron el antibiótico (2.72 % PV) y paredes celulares (2.82 %PV) al compararlos con los animales que consumieron la dieta testigo (2.91 %PV), se aprecia también que el peso de los órganos con y sin enzimas fueron similares y la interacción promotor del crecimiento x enzimas no fue significativa. En peso del intestino lleno se nota que no hubo diferencia ($P>0.05$) al factor promotor del crecimiento, ya que el menor peso fue en las aves que consumieron la flavomicina (3.72 %PV). No se encontró diferencia ($P>0.05$) al factor enzimas y se observan pesos similares con y sin la adición de enzimas. Por otra parte, la interacción promotor del crecimiento por enzima no fue significativa.

En el peso del intestino vacío se observa, que el menor peso se encontró en las aves que consumieron el antibiótico en el alimento (3.09 %PV), también se

puede apreciar que el menor peso del intestino fue en las aves que no consumieron enzimas, no existiendo diferencia ($P>0.05$). Además en el Cuadro 6, se observa que la longitud de las vellosidades fue similar para el factor promotor del crecimiento no existiendo diferencia ($P>0.05$) entre las dietas, se nota que las vellosidades más largas se encontraron en las aves que consumieron la dieta con antibiótico (1200 μ). Por otra parte no existió diferencia para el factor enzimas ($P>0.05$), se puede observar que la mayor longitud de vellosidades, fue en los pollitos que no consumieron el complejo enzimático (1224 μ) en el alimento, además se aprecia que la interacción promotor del crecimiento x enzima no fue significativa ($P>0.05$). En la Figura 1, se muestran los resultados obtenidos para la longitud de las vellosidades de cada tratamiento, se observa claramente que la mayor longitud se obtuvo en los pollitos que consumieron la flavomicina y la dieta testigo.

En el Cuadro 7, se presentan los resultados del análisis estadístico y la medición de pH en ciegos, el peso promedio del hígado, páncreas y proventrículo (lleno) en aves de 42 días. En la medición de pH se nota que no hubo diferencia ($P>0.05$) al factor promotor del crecimiento, sin embargo se observa que las menores mediciones fueron en las aves que consumieron la flavomicina (7.22) y paredes celulares (7.22); no se encontró diferencia ($P>0.05$) al factor enzimas. Por otra parte la interacción promotor del crecimiento por enzima no fue significativa.

No se encontró diferencia ($P>0.05$) para el factor promotor del crecimiento en peso del hígado, se aprecia que el peso fue menor en las aves que consumieron el antibiótico y las paredes celulares (2.10 vs 2.20 %PV); como se ve, tampoco existió diferencia al factor enzimas ($P>0.05$). Se observa que los pollos alimentados con el complejo enzimático tuvieron peso similares y la interacción promotor del crecimiento x enzima no fue significativa. No hubo diferencia ($P>0.05$) para el factor promotor del crecimiento en el peso de páncreas, se puede observar que los pesos son similares entre la aves que

consumieron las diferentes dietas, no se encontró diferencia estadística al factor enzimas y la interacción promotor del crecimiento x enzimas.

En peso de proventrículo y molleja llenos (Cuadro 7), se aprecia que los pesos fueron similares, no existiendo diferencia ($P>0.05$) al factor promotor del crecimiento. Se nota que el menor peso de los órganos fue en las aves que consumieron la dieta testigo (2.01 %PV), para el factor enzimas y en la interacción no hubo efecto significativo, el peso de los órganos fue similar con y sin la adición de enzimas.

En el Cuadro 8, se presentan los pesos promedio de proventrículo y molleja (vacío), intestino delgado (lleno y vacío), la longitud de vellosidades (intestino medio) y los análisis estadísticos en aves de 42 días. No existió diferencia estadística para el factor promotor del crecimiento ($P>0.05$), sin embargo porcentualmente para el peso de proventrículo y molleja vacíos se nota que los pesos son mayores, en los pollos que recibieron el antibiótico (1.79 %PV), con respecto a las aves que consumieron las paredes celulares (1.73) y la dieta testigo (1.72). Se aprecia también que el menor peso de los órganos fue en los pollos que consumieron las enzimas en el alimento (1.70). No se encontró diferencia ($P>0.05$) al factor enzimas y la interacción promotor del crecimiento x enzima no fue significativa.

Se encontró diferencia ($P< 0.05$) para el factor promotor del crecimiento en peso del intestino con quimo (lleno). En el Cuadro 8, se observa que fue menor en las aves que consumieron el antibiótico y las paredes celulares en el alimento (2.41 vs 2.49 % PV) que en las aves alimentadas con la dieta testigo; como se ve también existió diferencia al factor enzimas ($P<0.05$). Los pollos alimentados con el complejo enzimático tuvieron menor peso del intestino (2.43 %PV) y no existió diferencia estadística a la interacción promotor del crecimiento x enzima. No se encontró diferencia ($P>0.05$) para el efecto promotor del crecimiento en el peso del

intestino vacío, se observa que el peso fue similar en las aves que recibieron el antibiótico y las paredes celulares en la dieta al compararlos con el testigo. Hubo diferencia estadística significativa al factor enzimas, obteniendo los menores pesos las aves que consumieron el complejo enzimático (2.05 % PV) al compararlo con el peso de las aves que no consumieron las enzimas (2.20 % PV).

No se encontró diferencia estadística al factor promotor del crecimiento para la longitud de las vellosidades (Cuadro 8). Se nota que las vellosidades más largas se encontraron en las aves alimentadas con la dieta testigo (1340 μ) y se observa que la longitud fue menor en los pollos que consumieron el antibiótico y las paredes celulares respectivamente (1298 y 1278 μ). Por otra parte existió diferencia para el factor enzimas ($P < 0.05$), se puede ver que las vellosidades con mayor longitud se encontraron en las aves que consumieron la dieta adicionada con el complejo enzimático (1372 μ), además se aprecia que la interacción promotor del crecimiento x enzima fue diferente ($P < 0.06$). La Figura 2, muestra claramente el efecto de interacción, se observa que al adicionar del complejo enzimático en el alimento se incrementó la longitud de las vellosidades en los pollos de 42 días.

Los efectos principales del comportamiento productivo y mortalidad a los 45 días, se muestran en el Cuadro 9. Se encontró diferencia ($P < 0.05$) para el efecto promotor del crecimiento, observándose que la ganancia de peso final en las aves fue mayor (2469 g) en los pollos que recibieron el antibiótico en la dieta, cuando se compararon con el testigo (2401 g), sin existir diferencia ($P > 0.05$) entre los pollos que recibieron antibiótico y paredes. La adición de estos promotores en la dieta mejoran la ganancia de peso en un 2.81 % y 1.19 % respectivamente. En la Figura 3, se observa como la ganancia de peso fue mejor con la adición del antibiótico flavomicina. También se observa que no hubo diferencia estadística para el factor enzimas y la interacción promotor del crecimiento x enzima. En consumo de alimento no hubo diferencia ($P > 0.05$) al factor promotor del crecimiento, pero se aprecia que el menor consumo fue en los pollos alimentados con las paredes

celulares (4729 g) y no existió diferencia ($P>0.05$) al factor enzimas ni la interacción.

En la conversión alimenticia no existió diferencia ($P>0.05$) entre factores ni en la interacción sin embargo; se nota que las aves que consumieron la dieta testigo tuvieron peor conversión alimenticia ($P<0.06$) al compararlo con las aves que consumieron la flavomicina y las paredes celulares (1.94). La Figura 4, muestra el mejor comportamiento obtenido en conversión alimenticia, cuando los pollos recibieron el antibiótico flavomicina o las paredes celulares en el alimento hubo tendencia numérica favorable. En la mortalidad acumulada en porcentaje, no se observó diferencia ($P>0.05$) entre factores y no se encontró diferencia estadística a la interacción promotor del crecimiento x enzima. En el Cuadro 10, se muestra el comportamiento productivo obtenido en cada uno de los tratamientos a los 45 días de edad, se aprecia que la mayor ganancia de peso fue en los pollos que consumieron el antibiótico flavomicina (2469 g).

Los efectos principales de la medición de pigmento en vivo y canal para luminosidad (L) y amarillamiento (b), peso de la canal y los análisis estadísticos a los 45 días de edad se presentan en el Cuadro 11. Se aprecia que no existió diferencia ($P>0.05$) al factor promotor del crecimiento y al factor enzimas en luminosidad en vivo. La interacción promotor del crecimiento x enzima no fue significativa, notándose que los valores obtenidos son similares entre tratamientos. Para el amarillamiento en vivo no se encontró diferencia al factor promotor del crecimiento, se ve que los valores obtenidos son similares. No existió diferencia ($P>0.05$) al factor enzimas, los valores más altos (25.6) se encontraron en las aves que no consumieron las enzimas en el alimento, la interacción promotor del crecimiento x enzima fue significativa. La Figura 5, muestra los resultados obtenidos para el amarillamiento en vivo de cada tratamiento, evidenciando claramente la interacción y se observa que al adicionar el complejo enzimático en el alimento se obtuvieron menores mediciones en la pigmentación. Para

luminosidad en canal no hubo diferencia ($P>0.05$) entre factores ni la interacción promotor del crecimiento x enzima, se aprecia que los valores obtenidos en las canales son similares entre tratamientos.

En amarillamiento de la canal (Cuadro 11) no hubo diferencia ($P>0.05$) al factor promotor del crecimiento. La mayor pigmentación fue en las aves que consumieron la dieta adicionada con el antibiótico flavomicina (51.5) al compararlo con las aves testigo (50), también se aprecia que existió diferencia ($P<0.05$) a la interacción promotor del crecimiento x enzima. La Figura 6, muestra los resultados de la medición del amarillamiento en canal de cada tratamiento después de la refrigeración, se observa claramente la interacción entre el complejo enzimático y la flavomicina, encontrando las mediciones más altas para la pigmentación. No se encontró diferencia ($P>0.05$) para el efecto promotor del crecimiento, en peso de la canal, observándose que el mayor peso fue en los pollos que recibieron antibiótico y las paredes celulares en la dieta (1810 y 1747 g), cuando se compararon con la dieta testigo. La adición de estos promotores en la dieta mejoran el peso de la canal en un 7.95 % y 4.21 % respectivamente. No se observó diferencia ($P>0.05$) al factor enzimas y la interacción promotor del crecimiento x enzima tampoco fue significativa.

Los datos promedio del título de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle (ENC) y los análisis estadísticos durante el periodo de experimentación, se presentan en el Cuadro 12. Existió diferencia ($P< 0.05$) para el factor promotor del crecimiento en la medición de anticuerpos al día 21, se observa que el mayor título de anticuerpos se obtuvo en las aves que consumieron el antibiótico flavomicina (4.35) al compararlo con los títulos de las aves que consumieron las paredes celulares y la dieta testigo en el alimento (3.61 vs 3.67). No existió diferencia ($P>0.05$) al factor enzimas y no fue significativa la interacción promotor del crecimiento x enzima.

No se encontró diferencia ($P>0.05$) en el título de anticuerpos para el efecto promotor del crecimiento; en las aves a los 39 días. El título de anticuerpos fue mayor en las aves que recibieron las paredes celulares al compararlos con la dieta testigo. No hubo diferencia estadística significativa al factor enzimas y la interacción. En la medición de los anticuerpos a los 49 días de edad no se encontró diferencia estadística al factor promotor del crecimiento. Se aprecia que el mayor título fue en las aves que consumieron las paredes celulares en el alimento (4.02). No se encontró diferencia ($P>0.05$) al factor enzimas y la interacción promotor del crecimiento x enzima no fue significativa.

En el Cuadro 13, se muestran los resultados del monitoreo contra *Salmonella* a partir de hisopos cloacales en las aves al 1, 21 y 42 días de edad. No se encontraron muestras positivas durante la realización del experimento en los pollos alimentados con las diferentes dietas.

X. DISCUSION

Parámetros productivos a 21 días

Los resultados referentes a la ganancia de peso en pollos de 21 días mostraron un efecto significativo a la adición del antibiótico representando un 4.67 % más de peso vivo. Esta información coincide con lo informado por Rosen (1995) en un estudio referente al efecto promotor de los antibióticos. Por otra parte para la adición de enzimas no se observó durante las tres primeras semanas de experimentación efecto en ganancia de peso y consumo de alimento. Este resultado es similar al obtenido por Huff *et al.* (1998) quienes reportan no haber encontrado diferencias significativas ($P>0.05$) en peso de pollos alimentados con dietas en base a maíz y adicionadas con enzimas a los 21 días de edad.

Sin embargo en otra investigación Al Bustany (1996) reportó un pequeño efecto en la ganancia de peso a las 3 semanas de edad al adicionar enzimas, en comparación a los resultados obtenidos por White *et al.* (1981), Broz y Frigg (1986), citados por Al Bustany (1996) quienes reportan efectos mayores. Probablemente una razón por la que se obtienen resultados variables, es el tipo de dieta usada y la variación en el contenido de β glucanos solubles. Se ha determinado también que la adición de más de una enzima en las dietas a base de cereales puede mejorar la conversión alimenticia (Cleophas *et al.*, 1995 Ward, 1996); sin embargo estos resultados no coinciden con los obtenidos en este experimento, con la mezcla de enzimas empleada.

Peso de órganos y longitud de las vellosidades intestinales

En el peso de los órganos a los 21 días de edad no se encontró diferencia estadística a la adición de enzimas en ninguna de las mediciones, estos datos no coinciden con los mencionados por Brenes *et al.* (1993) quienes obtuvieron en dietas con lupinos, reducciones en peso y tamaño del proventrículo, páncreas,

hígado, duodeno, yeyuno e ileon. Se menciona que una menor viscosidad intestinal producto de la acción enzimática exógena disminuye el peso relativo del páncreas y del intestino debido a los efectos de las enzimas sobre la absorción de nutrientes, evitando un trabajo mayor a las enzimas endógenas. Es posible que el alimento mezclado con las enzimas llegue hasta estos órganos casi completamente digerido y por lo tanto se produzca un menor desarrollo muscular debido a que realizan un menor trabajo (Veldman y Vahl, 1994). Sin embargo, en este experimento solo se observó una disminución en el peso del intestino a los 42 días al adicionar el complejo enzimático.

El efecto aditivo, por adición de antibióticos en la dieta, solo fue diferente estadísticamente en el peso del proventrículo y de la molleja a los 21 días y en peso del intestino a los 42 días. Estos últimos resultados coinciden con los reportados por otros autores (Izat *et al.*, 1990; Postma *et al.*, 1999; Bedford 2000; Cook 2000) que mencionan una disminución en el peso intestinal al adicionar los antibióticos en la dieta (bacitracina, virginamicina), resultados que han sido consistentes en muchos trabajos.

En lo referente a la medición del pH los resultados que se obtuvieron en este experimento, a los 21 días coinciden con los reportados por otros investigadores, quienes mencionan que la adición de paredes celulares, disminuye el pH en ciegos debido a una mayor producción de ácido láctico por la presencia de bacterias benéficas, generando condiciones menos propicias para la colonización de bacterias patógenas a nivel intestinal. Lo anterior está asociado con una mayor resistencia a enfermedades y una mejor producción. Sin embargo, este efecto no se observó en la parte final del experimento (Sping 2000).

En longitud de las vellosidades al adicionar las paredes celulares no se produjeron cambios en la mucosa intestinal. Estos resultados no coinciden con los reportados por Santin *et al.* (2001), Iji *et al.* (2001), Savage *et al.* (1996), quienes

mencionan que la adición de paredes celulares del *Saccharomyces cerevisiae* incrementa la longitud de las vellosidades intestinales y que posiblemente está relacionado con una mejor ganancia de peso. Sin embargo en este experimento la ganancia de peso en los pollos que consumieron las paredes celulares fue similar a la obtenida con el testigo positivo (dieta con antibiótico), el cual fue el mejor tratamiento; no siendo influenciada por la longitud de las vellosidades, las cuales fueron más cortas al adicionar las paredes celulares.

En experimentos realizados se han utilizado diferentes niveles de inclusión de las paredes y cabe señalar que entre los experimentos, los resultados son inconsistentes sobre el uso de las paredes celulares en la producción animal, ya que los datos han sido contrastantes en cuanto a su uso como promotores del crecimiento. Lo anterior puede ser debido a variaciones en los diferentes componentes de la pared celular del *Saccharomyces cerevisiae*, (β -glucanos, mananos, quitina), a los métodos de cultivo, o a la estabilidad y características del propio microorganismo (Aguilar y Francois, 2003).

Parámetros productivos 45 días

Los datos obtenidos mostraron un efecto promotor del crecimiento con el antibiótico, la adición de las paredes celulares del *Saccharomyces cerevisiae* en el alimento de pollos de engorda, fueron una alternativa para sustituir a la flavomicina como promotor del crecimiento, como se demostró en la presente investigación. La adición de 0.05 % de paredes celulares mejoró el peso corporal en un 1.19 % más y se observó, mejor conversión alimenticia (2.51 %) al adicionar las paredes celulares y el antibiótico que en la dieta testigo. Es importante mencionar que las aves que estuvieron consumiendo las paredes celulares, presentaron pesos similares a los obtenidos con el antibiótico, el cual resultó ser el tratamiento, en donde se observaron los mejores parámetros de producción. Resultados que coinciden con los reportados por otros investigadores, los cuales mencionan que la adición de los antibióticos, mejora la ganancia de peso y la conversión

alimenticia, cuando se adicionan en las dietas. (Waldroup *et al* 1985; Firman y Kirn, 1989; Salmon y Stevens, 1990).

Resultados similares fueron reportados por Santin *et al.* (2001), en donde evaluaron la presencia de paredes celulares sobre el desarrollo de los pollos de engorda, encontrando que la adición de 0.2 % es suficiente para competir con los promotores del crecimiento sin tener efectos negativos. De igual manera, en la investigación realizada por Onifade *et al.* (1999) en pollos de engorda, donde suplementaron las dietas con paredes celulares y las compararon con un antibiótico, utilizando dietas con baja proteína y alta concentración de fibra, encontrando un incremento en la ganancia de peso, por lo que lo proponen como un sustituto de los promotores del crecimiento.

Los beneficios en los parámetros productivos cuando se adicionan las paredes celulares, pueden ser debidos a los mecanismos ya propuestos en otras especies, encaminadas a una mejor digestibilidad y aprovechamiento de nutrientes, como el efecto de la anaerobiosis a nivel intestinal y mejorando la calidad del entorno de la flora microbiana, el incremento de ácidos grasos volátiles y la producción de enzimas (Knudsen *et al.*, 1993, Blondeau, 2001).

Para la adición de enzimas en la dieta y el efecto sobre los parámetros productivos, no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) para la ganancia peso y la conversión alimenticia en los pollos que consumieron la dieta adicionada, estos resultados coinciden con los obtenidos por Kolodziej *et al.* (1994) citado por Camiruaga, 2003 quien afirma que el uso prolongado de enzimas más allá de los 28 días no produce cambios positivos en los parámetros productivos del pollo de engorda.

Pigmentación de la piel

Los datos promedio obtenidos en este experimento para el amarillamiento de la piel en vivo no indicaron diferencia significativa a la adición de las paredes celulares o el antibiótico. Esta variable, en investigaciones realizadas en pollos no ha sido evaluada por otros autores, posiblemente debido a la poca importancia que tiene en algunos países la pigmentación de la piel en los pollos. Sin embargo, cabe mencionar que existió interacción ($P < 0.05$) para el amarillamiento de la canal con el antibiótico, estos resultados coinciden con los reportados en los que se menciona que la adición del antibiótico en las dietas mejora la pigmentación de la piel, por una mejor integridad de la mucosa intestinal que permite una mayor absorción de los nutrientes.

Rendimiento en canal

Los resultados obtenidos en este experimento en peso de la canal no mostraron efecto ($P > 0.05$) a la adición de paredes celulares y al antibiótico; estos resultados no coinciden con los obtenidos por Izat *et al.* (1990) quienes indican que la adición de antibióticos comúnmente usados (virginiamicina) en las dietas para pollos de engorda pueden mejorar el peso de la canal. Sin embargo coinciden con los datos informados por algunos investigadores, quienes señalan no haber encontrado diferencia estadística ($P > 0.05$) en rendimiento de la canal al adicionar los probióticos en la dieta. No se encontró diferencia estadística a la adición de enzimas en el alimento, los resultados obtenidos concuerdan con lo encontrado por Francesch *et al.* (1994), quienes informaron que el rendimiento de canal no es afectado por la adición de un complejo enzimático (β -glucanasa, xilanasa, celulasa) en el alimento.

Título de anticuerpos

Para la medición del título de anticuerpos los resultados obtenidos bajo estas condiciones experimentales, no coinciden con los reportados por Sping

(2000) quien menciona que la adición de las paredes celulares en la dieta, mejora el título de anticuerpo contra la enfermedad de Newcastle, sin embargo es importante señalar que el mejor título de anticuerpos se obtuvo en la dieta adicionada con los antibióticos.

Para el monitoreo contra Salmonella, no se encontraron muestras positivas entre los tratamientos, esto probablemente debido a las condiciones sanitarias de la granja y que las aves no fueron desafiadas contra esta bacteria.

XI. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos, bajo las condiciones experimentales empleadas se puede concluir lo siguiente:

Existió un efecto promotor del crecimiento de la flavomicina al ser adicionada en las dietas para pollos de engorda.

La adición de las paredes celulares de la levadura en la dieta de los pollos de engorda mostró también un efecto promotor del crecimiento.

La adición de las paredes celulares disminuye el pH en ciegos, al adicionarse en las dietas.

El efecto promotor de las paredes celulares del *Saccharomyces cerevisiae* no pudo ser atribuido a cambios en la longitud de las vellosidades en intestino medio.

La adición de las paredes celulares del *Saccharomyces cerevisiae* en la dieta de pollos de engorda no incremento el título de anticuerpos contra la ENC.

La adición de un complejo enzimático a base de glucanasas 50 FBG/g y pectinasa 5000 PSU/g en dietas sorgo + soya, no mostró un efecto positivo en la respuesta productiva de los pollos de engorda, sin embargo mejora el amarillamiento de la canal.

XII. LITERATURA CITADA

1. Aguilar UB, Francois JM. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol* 2003;37:268-274.
2. Al Bustany Z. The effect of pelleting an enzyme supplemented barley-based diet. *Anim Feed Sci and Techn.* 1996;58:283-288.
3. Anónimo. RONOZYME VP una preparación multienzimática para aumentar el valor nutricional de las proteínas vegetales. 2003
4. Annison G. Relationship between the levels of non-starch polysaccharides and the apparent metabolizable energy of wheats assayed in broilers chickens. *J Agriculture and Food Chemistry* 1991;39:1252-1256.
5. Ávila GE. Higiene en el alimento como sinónimo de sanidad aviar. Memorias de la XXVIII, Convención Anual ANECA; Boca del Río (Veracruz) México. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC 2003.
6. Ávila GE. Utilización de enzimas en dietas para aves. XI Jornadas Médico Avícola. UNAM 2005.
7. Azcona JO, Schang MJ. Digestibilidad verdadera de aminoácidos en materias primas argentinas. *Balanceados Argentinos. CAFAB* 1993;73:24-28.
8. Batungbacal RM, Luis SE, Centeno RJ. Performance of broilers fed corn-soybean based diets with different levels of enzyme-probiotic supplement. *Phillips J Vet Med* 2002;39:58-66.
9. Bedford M. Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimize subsequent problems. *World Poul Sci J* 2000;56:347-365.
10. Berg RD. Probiotics, prebiotics or oncobiotics. *Trends Microbiol* 1998;89(6):89-92.

11. Blondeau K. La paroi des levures, structure et fonctions, potentiels thérapeutiques et technologiques. Université Paris Sud. 2001.
12. Beudeker R. The benefits of enzymes in poultry nutrition. *Intl Poul Production* 1996;4:13-15.
13. Bonh JA, BeMiller JN. (1-3)-D-glucans as biological response modifiers: A review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers* 1995;28(1):3-14.
14. Bolder NM, Wagenaar JA, Putirulan FF, Veldman KT, Sommer M. The effect of flavophospholipol (Flavomycin?) and salinomycin sodium (Sacox?) on the excretion of *Clostridium perfringens*, *Salmonella enteritidis*, and *Campylobacter jejuni* in broilers after experimental infection. *Poult Sci* 1999;78:1681-1689.
15. Brenes A, Marquardt R, Guenter W, Rotter B. Effect of enzyme on the nutritional value of raw, autoclaved, and dehulled lupins (*Lupinus albus*) in chicken diets. *Poult Sci* 1993;72:2281-2293.
16. Bruce G, Schiffrin EJ, Reniero R, Mollet B, Pfeifer A, Neese J. The development of functional foods: lessons from the gut. *Trends Biotechnol* 1999;17(12):492-499.
17. Camiruaga M, Garcia F, Elera R, Simonetti C. Respuesta productiva de pollos broilers a la adición de enzimas exógenas a dietas basadas en maíz o triticale. *Cien Inv Agr* 2001;28(1):23-36.
18. Caston LJ, Leeson S. The response of broiler turkeys to flavomycin. *Can J Anim Sci* 1992; 72:445-448.
19. Céline T. Prohibición y autorización de nuevos aditivos en Europa. Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) France. 2003.
20. Cleophas G, Hartingsveldt W, Somers W, Lugt J. Enzymes can play an important role in poultry nutrition. *Poult Adviser* 1995;28:39-43.
21. Cook M.E. Interplay of management, microbes, genetics, immunity affects animal growth, development. *Feedstuffs* 2000;3:11-12.

22. Cowan W, Jorgensen O, Rasmussen P, Wagner P. Role of single activity xylanase components in improving feed performance in wheat based poultry diets. *Agro Food Industry Hi Tech* 1993; 4:11-14.
23. Cromwell GL. Safety issues, performance benefits of antibiotics for swine examined. *Feedstuffs* 1999;7:18.
24. Cuca GM, Ávila GE, Pro MA. Alimentación de las aves. 8va. ed. Chapingo Edo. de México: Universidad Autónoma Chapingo. 1996:80-82.
25. Ferket PR. Effect of diet on gut microflora of poultry. *Zootechnica* 1991; 7/8:44-49.
26. Ferket PR, Parks CW, Grimes JL. Mannan oligosaccharides versus antibiotics for turkeys. In: *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries* 2002:43-63.
27. Firman JD, Kirn BN. Research Note: Effects of monensin and bambamycin on the performance of market turkeys. *Poult Sci* 1989;68:1724-1726.
28. Fletcher DL, Cason JA. Comparison of two methods for determining broiler processing yield. *Poult Sci* 1991;1010-1014
29. Francesch M, Pérez A, Esteve E, Brufau J. *Br Poult Sci* 1994;35:2,259-272.
30. Fuller R. The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. *Br Poult Sci* 1997;18: 85-94.
31. Gibson GR, Fuller R. Symposium: Probiotic bacteria: Implications for human health aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J Nutr.* 2002;391-395.
32. Glasby JS. *Encyclopedia of Antibiotics*. 3rd Edition. John Wiley and Sons, New York. 1992.
33. Havenaar R, Brink BT, Huis JHJ. Selection of strain for probiotic use. In: Fuller R, editor. *Probiotics. The scientific basis*. London (UK): Chapman and Hall. 1992;209-224.
34. Havenaar R, Huis JHJ. Probiotics: a general view. In the lactic acid bacteria. *Elsevier Appl Sci* 1992;1:151-170.

35. Henry PR, Ammerman CB, Campbell DR, Miles RD. Effect of antibiotics on tissue trace mineral concentration and intestinal tract weight of broiler chicks. *Poult Sci* 1987;66:1014-1018.
36. Hooge DM. Antibiotics and their alternatives for poultry examined. *Feedstuffs* 1999;17:59.
37. Hooge DM. Meta-analysis of broiler chicken pen trial evaluating dietary mannanoligosaccharide, 1993-2003. *Intl J Poult Sci* 2004;3 (3):163-174.
38. Huff W, Moore P, Waldroup P, Waldroup A, Balong J, Huff G, Rath N, Daniel T, Raboys V. Effect of dietary phytase and high available phosphorus corn on broiler chicken performance. *Poult Sci* 1998;77:1899-1904.
39. Huyghebaert G. Replacement of antibiotics in poultry. Eastern Nutrition Conference. Canadá. 2003;55-75.
40. Iji PA, Saki AA, Tivey DR. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a mannan oligosaccharide. *J Sci Food Agric* 2001;81:1186-1192.
41. INEGI. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. México 2005. <http://www.inegi.gob.mx>.
42. Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. Intestine Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):444s- 450s.
43. Izat AL, Colberg M, Reiber MA, Adams MH, Skinner JT, Cabel MC, Stilborn HL, Waldroup PW. Effects of different antibiotics on performance, processing characteristics, and parts yield of broiler chickens. *Poult Sci* 1990;69:1787-1791.
44. Janeway CA. *Scientific American*. 1993;September.73-79.
45. Jin ZL, Ho WY, Adbdullah N, Jalludin S. Growth performance intestinal microbial populations and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poult Sci* 1998;77:(1):259-265.
46. Joseleau JP, Lefebure A, Ruel K, Adrian J. Les glucides de paroi des levures. *Aliment industrielles*. 1999.

47. Kapteyn JC, Van Den Ende H, Klis FM. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta* 1999;1426(2):373-383.
48. Klasing KC. Nutritional aspects of leukocytic cytokines. *J Nutr* 1988;118:1436-1446.
49. Kollar R, Reinhold BB, Petrakova E, Yeh HJC, Ashwell G, Drgonova J, Kapteyn JC, Klis FM, Cabib E. Architecture of the yeasts cell wall- (1-6)-glucan interconnects mannoprotein, (1-3)-glucan and chitin. *J Biol Chem* 1997;272(28):17762-17775.
50. Krainer E, Stark RE, Naider F, Alagramam K, Becker JM. Direct observation of cellwall glucans in whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* by magic-angle-spinning C-13-NMR. *Biopolymers*. 1994;34(12):1627-1635.
51. Knudsen KEB, Borg JB, Inge H. Digestion of polysaccharides and other major components in the small and large intestine of pigs fed on diets consisting of oat fractions rich in β -D-glucan. *B. J of Nutrition*. 1993;70:537-556.
52. Lilburn M, Dixon J, Cotter P, Paluch B, Malzone A, Sefton T, Connolly A. Modulation of humoral immunity in commercial laying hens by a dietary probiotic. *Poult Sci* 2000;79(Suppl-1) 38.
53. Luna LG. Manual of histological staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed; American Registry of Pathology; McGraw-Hill. New York, 1968.
54. Marquardt RR, Boros D, Guenter W, Crow G. The nutritive value of barley, rye, wheat and corn for young chicks as affected by use of a *Trichoderma reesei* enzyme preparation. *Anim Feed Sci Technol* 1994;45:363-378.
55. Miles RD, Janky DM, Harms RH. Virginiamycin and broiler performance. *Poultry Sci* 1984;63:1218-1221.
56. Morales NG, Téllez IG. Exclusión competitiva y uso de prebióticos en producción avícola. *Nutrición y alimentación. Departamento de producción animal: Aves conjuntamente con la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas*. 2da. Ed. Mexico D.F. 2001.

57. Moran CA. Functional components of the cell wall of *Sacharomyces cerevisiae*: applications for yeast glucans and mannan. Re-imagining the feed industry. Alltech 20th International Feed Industry Symposium. 2004.
58. Moore PR, Evanson A, Luckey TD, McCoy E, Elvehjen CA, Hart EB. Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick. *J Biolog Chemistry* 1946;165:437-441.
59. Morgan A, Bedford M, Wilo A, Nurninen M, Autio K, Poutanen K, Parkkonen T. How enzymes improve the nutritional value of wheat. *Zootecnica International* 1995;18(4):44-50.
60. Nitsan Z, Ben-Avraham G, Zoref Z, Nir I. Growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. *Br Poult Sci* 1991 Jul;32(3):515-23
61. Ojeniyi AA. Public health aspects of bacteria drug resistance in modern battery and town village poultry in the tropics. *Acta Vet Scand* 1989;30:127-132.
62. Onifade AA, Odunsi AA, Babatunde Gm, Olorede BR, Muma E. Comparison of the supplemental effects of *Saccharomyces cerevisiae* and antibiotics in low protein and high fibre diets fed to broiler chickens. *Arch Tierernahr* 1999;52(1):29-39
63. Ouhida I, Perez JF, Anguita M, Gasa J. Influence of β mannase on broiler performance, digestibility, and intestinal fermentation *J Appl Poult Res* 2002;11:244-249.
64. Oyofa BA, Deloach JR, Corrier DE, Norman JO, Ziprin RL, Mollenhauer HH. Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with D-mannose. *Poult Sci* 1989; 68(10):1357-1360.
65. Parekh R. Carbohydrate engineering in modern drug discovery. In: *The Biotechnology Report*. Campden Publishing Ltd, London. 1993;p.135.
66. Parks CW, Grimes JL, Ferket PR, Fairchild AS. The case for mannanoligosaccharides in poultry diets. An alternative to growth promotant antibiotics?. In: *Biotechnology in the Feed Industry*. Proceedings of Alltech's 16 th Annual Symposium. 2000;p.45- 60

67. Phillips I. Assessing the evidence that antibiotic growth promoters influence human infections. *J Hospital Infections* 1999;43:173-178.
68. Postma J, Ferket PR, Croom WJ, Kwakkel RP. Effect of Virginiamycin on intestinal characteristics of turkeys. In: *Proceedings of the 12th European Symposium on Poultry Nutrition* (R.P. Kwakkel and J.P.M. Bos, eds). World's Poultry Science Association, Dutch branch. Het Spelderholt, Beekbergen, the Netherlands. 1999:p.188.
69. Quintana LJA. *Avitecnía: Manejo de las aves domésticas más comunes*. 3ra. ed. Trillas S.A de C.V. México. 1999.
70. Ratcliff J. Antibiotic bans- a European perspective. In: *Proceedings of the 47th Maryland Nutrition Conference for Feed Manufacturers*. March 22-24. 2000;135-152.
71. Rebole A, Rodriguez ML, Alzueta C, Ortiz LT, Treviño JA. A short note on effect enzyme supplement on the nutritive value of broiler chick diets containing maize, soybean meal and full-fat sunflower seed. *Anim Feed Sci Technol* 1999;78:153-158.
72. Redford M, Morgan A. The use of enzymes in poultry diets. *World Poult Sci J* 1996. Vol.52. March.
73. Richter GA, Lemser A, Muller G, Flachowsky, Schubert R. Evaluation of different enzyme mixtures and doses in broiler diets based on wheat and barley. *Vitamine und weitere Zusatzstoffe bei Mensch und Tier: 4. Symposium*. September 30-October 1. Jena (Thuringen). 1993;399-402.
74. Rosen GD. Antibacterials in poultry and pig nutrition. In: *Biotechnology in animal feeds and animal feeding*. (R.J. Wallace and A. Chesson, eds). VCH Verlagsgesellschaft mbH. D-69451.Weinheim, Germany. 1995.
75. Salmon RE, Stevens VI. Effect of bambemycins (Flavomycin) in diets for growing turkeys. *Poult Sci* 1990;69:1133-1140.
76. Santin E, Maiorka A, Macari M, Grecco M, Sanchez JC, Okada TM, Myasaka AM. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Appl Poult Res* 2001;10(3):236-244.

77. SAS. Institute. User's Guide: Statistics. Release 6.12.SAS: Institute Inc. 1996.
78. Savage TF, Cotter PF, Zakrzewska EI. The effect of feeding a mannanoligosaccharide on immunoglobulin plasma IgA and bile IgA of Wrolstad MW male turkeys. *Poult Sci* 1996;75(Suppl1):143.
79. Savage TF, Zakrzewska EI. The performance of male turkeys fed a starter diet containing a mannan oligosaccharide. *Zootech Int* 1997;20:30-32.
80. Spring P, Newman K, Wenk C, Messikommer R, Vrajes M. Effect of pelleting temperature on the activity of different enzymes. *Poult Sci* 1996;75:357-361.
81. Spring P. Effect of mannanoligosaccharide on different cecal parameters and on cecal concentration of enteric pathogens in poultry. Dissertation. Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland. 1997.
82. Spring P, Wenk C, Dawson KA, Newman KE. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of Salmonella-challenged broiler chicks. *Poult Sci* 2000;79:205-211.
83. Steel RGD, Torrie JH. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. 2nd Inc., New York:Mcgraw-Hill, 1988.
84. Stutz MW, Johnson SL, Judith FR. Effects of diet, bacitracin and body weight restrictions on the intestine of broiler chicks. *Poult Sci* 1983;62:1626-1632.
85. Stutz MW, Lawton GC. Effects of diet and antimicrobials on growth, feed efficiency, intestinal *Clostridium perfringens*, and ileal weight of broiler chicks. *Poult Sci* 1984;63:2036-2042.
86. Tannock GW. Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents, and probiotics. In: *Gastrointestinal Microbiology* (R.I. Mackie, B.A. White and R.E. Isaacson, eds), Chapman and Hall, New York. 1997: 434-465.
87. Veldman A, Vahl H. Xylanase in broiler diets with differences in characteristics and content of wheat. *Br Poult Sci*1994;35:537-550.

88. Visek WJ. The mode of growth promotion by antibiotics. *J Anim Sci* 1978;46:1447-1469.
89. Waibel PE, Halvorson JC, Noll SL, Hoffbeck SL. Influence of virginiamycin on growth and efficiency of large white turkeys. *Poult Sci* 1991;70:837-847.
90. Waldroup PW, Spencer GK, Waibel PE, Quarles CL, Grant RJ. The use of bambermycins (Flavomycin?) and halofuginone (Stenorol?) in diets for growing turkeys. *Poult Sci* 1985; 64:1296-1301.
91. Waldroup PW, Rondon EO, Fritts CA. Comparison of Bio-Mos® and antibiotic feeding programs in broiler diets containing copper sulfate¹. *Intl J Poult Sci* 2003;2(1): 28-31.
92. Walker WA, Duffy LC. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. *J. Nutr Biochem* 1998;9 (12):668-675.
93. Ward NE. Intestinal viscosity, broiler performance. *Poult Digest* 1996;4:12-16.
94. Woodward SA, Harms RH, Miles RD, Janky DM, Ruiz N. Research note: Influence of virginiamycin on yield of broilers fed four levels of energy. *Poult Sci* 1988;67:1222-1224.
95. Zanella I, Sakomura NK, Silversides FG, Figueirido A, Pack M. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. *Poult Sci* 2003;82:1011-1016.

XIII. ANEXOS

Cuadro 1. Componentes de la pared celular del *Saccharomyces.cerevisiae*.

Componente (grado de polimerización)	Peso molecular (kDa)	% Masa celular
β (1,3) glucanos	240	30 – 50
β (1,6) glucanos	24	10
Mananoproteínas	100 – 200	25 – 50
Quitina	25	1 – 3

Cuadro 2. Composición de los Polisacáridos no amiláceos (PNA) de la soya.

Componente	% de NSP solubles	% de NSP insolubles
Ramnosa	0.4	0.4
Arabinosa	3.8	6.9
Xilosa	0.8	7.7
Manosa	1.9	4.2
Galactosa	5.4	8.5
Glucosa	3.5	0.0
Ácidos urónicos	11.5	10.0
Celulosa	0.0	35.0
Total	27.3	72.7

Cuadro 3. Composición de las dietas basales empleadas en el experimento en pollos de engorda.

Ingrediente	Dieta de iniciación	Dieta de finalización
	(1 – 21 días)	(22 - 45 días)
Sorgo (9% PC*)	616.752	655.089
Pasta de soya(46% PC*)	323.015	276.730
Aceite	14.799	25.400
Ortofosfato	18.701	16.510
Carbonato de calcio	15.469	14.041
Sal (NaCl)	4.440	3.894
Vitaminas y minerales**	2.500	2.500
DL- Metionina	2.346	1.767
Cloruro de colina 60 %	1.000	0.800
Nicarbacina	0.500	0.500
L-Lisina HCL	0.365	-
Antioxidante	0.150	0.100
Pigmento (avelut)	0.000	2.667
Total (kg)	1000	1000
	Análisis calculado	
Proteína Cruda (%)	20.9	19.07
Energía Metabolizable (Kcal/kg)	2946	3052
Lisina (%)	1.13	1.03
Metionina (%)	0.57	0.50
Metionina +Cistina (%)	0.90	0.79
Calcio total (%)	1.00	0.90
Fósforo disponible (%)	0.50	0.45

* Proteína Cruda

** Vitamina A (12,000,000 UI), Vitamina D3 (2,500,000 UI), Vitamina E (15,000 UI), Vitamina K (2.0 g), Vitamina B1 (2.25 g), Vitamina B2 (7.5 g), Vitamina B6 (3.5 g), Vitamina B12 (20 mg), Ácido fólico (1.5 g), Biotina (125 mg), Ac. Pantoténico (12.5 g), Niacina (45 g), Hierro (50 g), Zinc (50 g), Manganeso (110 g), Cobre (12 g), Yodo (0.30 g), Selenio (200 mg), Cobalto (0.2)

Cuadro 4. Efectos principales sobre el comportamiento productivo de pollos de engorda a los 21 días de edad.

	Ganancia de peso * (g) Media ± EE	Consumo alimento (g) Media ± EE	Conversión Alimenticia Media ± EE
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO			
Testigo	602.0 ± 8.80 ^a	913.5 ± 9.43	1.51 ± 0.011 ^a
Antibiótico	630.1 ± 8.22 ^b	926.9 ± 7.96	1.47 ± 0.013 ^b
Paredes celulares	599.6 ± 9.05 ^a	905.6 ± 6.61	1.51 ± 0.013 ^a
ENZIMAS			
Sin	610.8 ± 8.33 ^a	918.7 ± 6.76	1.50 ± 0.013 ^a
Con	610.4 ± 7.43 ^a	912.0 ± 6.92	1.49 ± 0.010 ^a
Fuente de variación		Probabilidad	
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO	0.0494	0.1847	0.0445
ENZIMAS	0.9681	0.4795	0.4943
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO X ENZIMAS	0.8412	0.2406	0.4524

a,b: Valores con distinta letra en cada columna son diferentes estadísticamente (p<0.05).

* El Peso inicial promedio por pollo fue de 40.0 g.

EE: error estándar

Cuadro 5. Efecto de los promotores del crecimiento y enzimas sobre el pH en ciegos, pesos promedio de hígado, páncreas, proventrículo y molleja (llenos) en aves de 21 días de edad.

	pH ciegos	Hígado % Peso vivo	Páncreas % Peso vivo	Proventrículo y molleja llenos % Peso vivo
	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO				
Testigo	7.00 ± 0.12 ^a	2.7 ± 0.003	0.33 ± 0.0005	3.66 ± 0.003
Antibiótico	6.77 ± 0.16 ^{ab}	2.8 ± 0.002	0.36 ± 0.0010	3.35 ± 0.004
Paredes celulares	6.62 ± 0.11 ^b	2.6 ± 0.002	0.36 ± 0.0006	3.42 ± 0.001
ENZIMAS				
Sin	7.06 ± 0.86 ^a	2.8 ± 0.002	0.36 ± 0.0006	3.50 ± 0.002
Con	6.53 ± 0.94 ^b	2.6 ± 0.002	0.35 ± 0.0006	3.45 ± 0.003
Fuente de variación		Probabilidad		
PROMOTORES DEL CRECIMIENTO	0.0493	0.2930	0.0602	0.1344
ENZIMAS	0.0001	0.0668	0.1398	0.6413
PROMOTORES DEL CRECIMIENTO X ENZIMAS	0.3898	0.3197	0.8075	0.0851

a b: Valores con distinta letra en cada columna son diferentes estadísticamente (p<0.05).

EE: error estándar

Cuadro 6. Efecto de los promotores del crecimiento y enzimas sobre peso de proventrículo y molleja (vacíos), intestino delgado (lleno y vacío) y longitud de vellosidades (intestino medio) en pollitos de 21 días de edad.

	Proventrículo y molleja vacíos % Peso vivo Media ± EE	Intestino lleno % Peso vivo Media ± EE	Intestino vacío % Peso vivo Media ± EE	Longitud de Vellosidades (μ) Media ± EE
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO				
Testigo	2.91 ± 0.0013 ^a	3.84 ± 0.001	3.28 ± 0.002	1183 ± 51.27
Antibiótico	2.72 ± 0.0021 ^b	3.72 ± 0.002	3.09 ± 0.002	1200 ± 27.70
Paredes celulares	2.82 ± 0.0008 ^{ab}	3.86 ± 0.002	3.37 ± 0.002	1181 ± 13.21
ENZIMAS				
Sin	2.81 ± 0.0011 ^a	3.87 ± 0.002	3.21 ± 0.002	1224 ± 32.39
Con	2.82 ± 0.0015 ^a	3.75 ± 0.001	3.29 ± 0.001	1153 ± 17.92
Fuente de variación				
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO	0.0546	0.5264	0.2999	0.9031
ENZIMAS	0.8247	0.4144	0.0887	0.0877
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO X ENZIMAS	0.3235	0.9009	0.4258	0.5437

a b: Valores con distinta letra en cada columna son diferentes estadísticamente (p<0.05).

EE: error estándar

Cuadro 7. Efecto de los promotores del crecimiento y enzimas sobre el pH en ciegos, pesos de hígado, páncreas, proventrículo y molleja (llenos) de pollos de 42 días.

	pH ciegos	Hígado % Peso vivo	Páncreas % Peso vivo	Proventrículo y molleja lleno % Peso vivo
	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO				
Testigo	7.27 ± 0.05	2.25 ± 0.001	0.22 ± 0.0006	2.01 ± 0.001
Antibiótico	7.22 ± 0.07	2.10 ± 0.002	0.21 ± 0.0011	2.12 ± 0.002
Paredes celulares	7.22 ± 0.07	2.20 ± 0.001	0.20 ± 0.0009	2.11 ± 0.001
ENZIMAS				
Sin	7.28 ± 0.05	2.20 ± 0.001	0.21 ± 0.0006	2.13 ± 0.002
Con	7.20 ± 0.05	2.16 ± 0.001	0.21 ± 0.0008	2.02 ± 0.001
Fuente de variación		Probabilidad		
PROMOTORES DEL CRECIMIENTO	0.8414	0.1080	0.3318	0.3523
ENZIMAS	0.3075	0.6818	0.7133	0.1203
PROMOTORES DEL CRECIMIENTO X ENZIMAS	0.0913	0.9579	0.6434	0.2789

EE: error estándar

Cuadro 8. Efecto de los promotores del crecimiento y enzimas sobre el peso promedio de proventrículo y molleja (vacíos), intestino delgado (lleno y vacío) longitud de vellosidades (intestino medio) y análisis estadísticos en pollos de 42 días.

	Proventrículo y molleja Vacío % Peso vivo Media ± EE	Intestino lleno % Peso vivo Media ± EE	Intestino vacío % Peso vivo Media ± EE	Longitud de Vellosidades (μ) Media ± EE
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO				
Testigo	1.71 ± 0.008	2.72 ± 0.002 ^a	2.25 ± 0.002 ^a	1340 ± 39.78 ^a
Antibiótico	1.79 ± 0.019	2.41 ± 0.001 ^b	2.06 ± 0.001 ^a	1298 ± 38.72 ^a
Paredes celulares	1.73 ± 0.013	2.49 ± 0.02 ^{ab}	2.07 ± 0.001 ^a	1278 ± 40.38 ^a
ENZIMAS				
Sin	2.68 ± 0.013	2.65 ± 0.002 ^a	2.20 ± 0.001 ^a	1237 ± 30.42 ^b
Con	1.70 ± 0.009	2.43 ± 0.001 ^b	2.05 ± 0.001 ^b	1372 ± 23.23 ^a
Fuente de variación				
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO	0.2556	0.0159	0.0619	0.3646
ENZIMAS	0.0685	0.0157	0.0134	0.0009
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO X ENZIMAS	0.2278	0.8404	0.5272	0.0607

a b: Valores con distinta letra en cada columna son diferentes estadísticamente (p<0.05).

EE: error estándar

Cuadro 9. Efecto de los promotores del crecimiento y enzimas sobre los parámetros productivos de pollos de engorda a los 45 días de edad en pollos de engorda.

	Ganancia de peso (g)	Consumo alimento (g)	Conversión Alimenticia (g/g)	Mortalidad Acumulada (%)
	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO				
Testigo	2401 ± 24.08 ^b	4783 ± 32.69	1.99 ± 0.01	3.42 ± 0.32
Antibiótico	2469 ± 9.74 ^a	4790 ± 31.86	1.94 ± 0.01	4.57 ± 0.37
Paredes paredes	2430 ± 18.05 ^{ab}	4729 ± 40.70	1.94 ± 0.01	2.59 ± 0.37
ENZIMAS				
Sin	2434 ± 11.12 ^a	4756 ± 28.58	1.95 ± 0.01	3.24 ± 0.29
Con	2432 ± 20.37 ^a	4779 ± 29.52	1.96 ± 0.01	3.81 ± 0.30
Fuente de variación	Probabilidad			
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO	0.0477	0.3845	0.0634	0.4315
ENZIMAS	0.9366	0.5351	0.5256	0.6495
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO X ENZIMAS	0.2368	0.0834	0.6935	0.8107

a b: Valores con distinta letra en cada columna son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

EE: error estándar

Cuadro 10. Comportamiento Productivo a los 45 días de edad en pollos de engorda.

Tratamientos	Ganancia de Peso (g)	Consumo de Alimento (g)	Conversión alimenticia
T1 Testigo	2425.0 ^a	4835.2	1.99
T2 Testigo + Antibiótico	2468.8 ^b	4747.1	1.92
T3 Testigo + Paredes celulares	2408.6 ^a	4683.1	1.94
T4 Testigo + enzimas	2377.3 ^a	4730.9	1.99
T5 Testigo + Antibiótico + enzimas	2468.9 ^b	4832.9	1.95
T6 Testigo + Paredes celulares + enzimas	2451.1 ^b	4774.7	1.94

a, b: Valores con distinta letra son diferentes $P(<0.05)$

Cuadro 11. Efecto de los promotores del crecimiento y enzimas sobre pigmentación de la piel en vivo, en canal y peso de la canal en pollos de 45 días.

	Pigmento vivo (L) *	Pigmento vivo (b)*	Pigmento canal refrigerado (L) *	Pigmento canal refrigerado (b) *	Peso canal (g)
	Media ± EE	Media ± EE *	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO					
Testigo	67.98 ± 0.28	25.46 ± 0.69	75.69 ± 0.33	50.01 ± 0.75	1676 ± 41.18
Antibiótico	68.47 ± 0.35	25.39 ± 0.68	75.70 ± 0.31	51.50 ± 1.05	1810 ± 45.19
Paredes celulares	67.92 ± 0.26	24.26 ± 0.60	76.23 ± 0.55	50.73 ± 0.83	1747 ± 41.96
ENZIMAS					
Sin	68.40 ± 0.21	25.61 ± 0.64	75.61 ± 0.33	50.02 ± 0.61	1738 ± 30.13
Con	67.83 ± 0.25	24.46 ± 0.38	76.13 ± 0.33	51.48 ± 0.79	1750 ± 35.26
Fuente de variación	Probabilidad				
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO	0.3609	0.2672	0.5484	0.4210	0.1273
ENZIMAS	0.1058	0.0931	0.2701	0.1224	0.8162
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO X ENZIMAS	0.6222	0.0170	0.1841	0.0393	0.6205

CIE L*b* (L)* Luminosidad, (b)* Amarillamiento

EE: error estándar

Cuadro 12. Efecto de los promotores del crecimiento y enzimas sobre el títulos de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle en pollos de engorda.

	21 días de edad (7 días post vacunación) Media ± EE	39 días de edad (25 días post vacunación) Media ± EE	49 días de edad (35 días post vacunación) Media ± EE
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO			
Testigo	3.67 ± 0.12 ^b	4.49 ± 0.11	4.00 ± 0.18
Antibiótico	4.35 ± 0.19 ^a	4.88 ± 0.28	3.95 ± 0.14
Paredes celulares	3.61 ± 0.12 ^b	4.93 ± 0.13	4.02 ± 0.07
ENZIMAS			
Sin	3.94 ± 0.17 ^a	4.69 ± 0.09	4.11 ± 0.09
Con	3.81 ± 0.13 ^a	4.81 ± 0.20	3.87 ± 0.11
Fuente de variación		Probabilidad	
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO	0.0044	0.1412	0.9163
ENZIMAS	0.4786	0.4058	0.1101
PROMOTOR DEL CRECIMIENTO X ENZIMAS	0.2287	0.0823	0.1293

a b: Valores con distinta letra en cada columna son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

EE: error estándar

Cuadro 13. Monitoreo de *Salmonella* en pollos de 1, 21 y 42 días de edad.

DIETAS	Día 1 <i>Salmonella sp</i> (+)	Día 21 <i>Salmonella sp</i> (+)	Día 42 <i>Salmonella sp</i> (+)
Testigo	0/9	0/9	0/9
Testigo + Antibiótico	0/9	0/9	0/9
Testigo + Paredes celulares	0/9	0/9	0/9
Testigo + Enzimas	0/9	0/9	0/9
Testigo + Antibiótico + Enzimas	0/9	0/9	0/9
Testigo + Paredes celulares + Enzimas	0/9	0/9	0/9

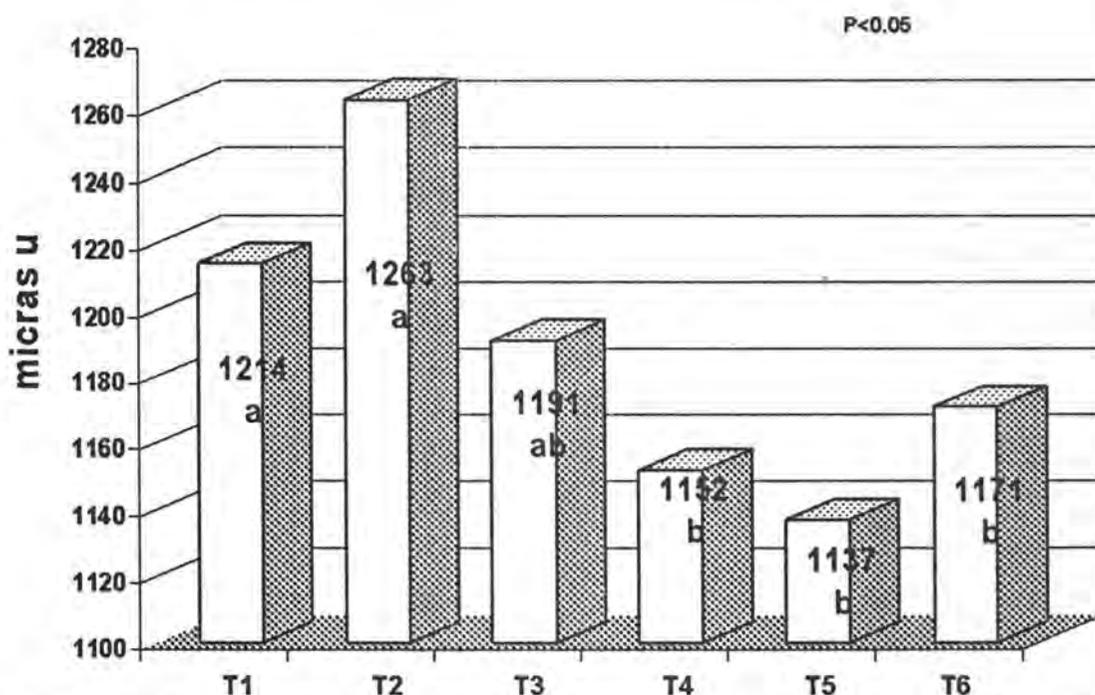


Figura 1. Longitud de las vellosidades en el intestino medio en pollos de engorda de 21 días con los diferentes promotores del crecimiento y enzimas.

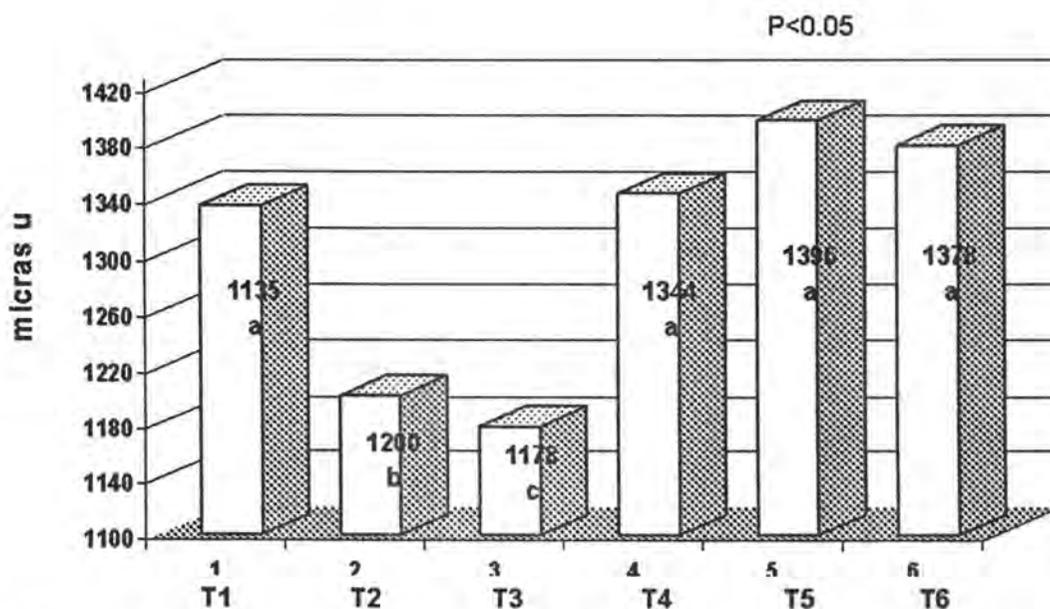


Figura 2. Longitud de las vellosidades en el intestino medio en pollos de engorda de 42 días con los diferentes promotores del crecimiento y enzimas.

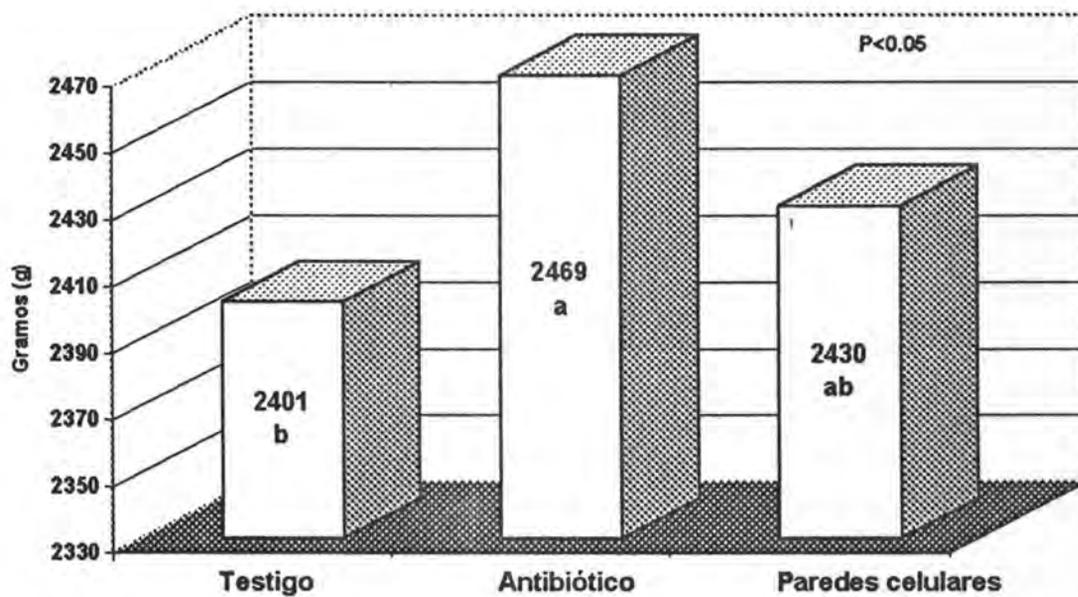


Figura 3. Ganancia de peso en pollos de engorda de 45 días alimentados con los diferentes promotores de crecimiento.

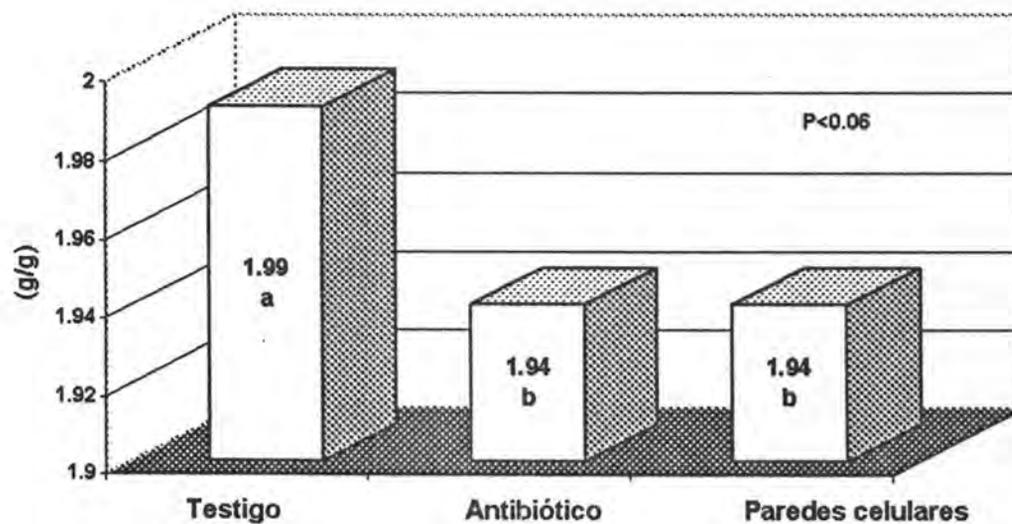


Figura 4. Conversión alimenticia en pollos de engorda de 45 días alimentados con los diferentes promotores de crecimiento.

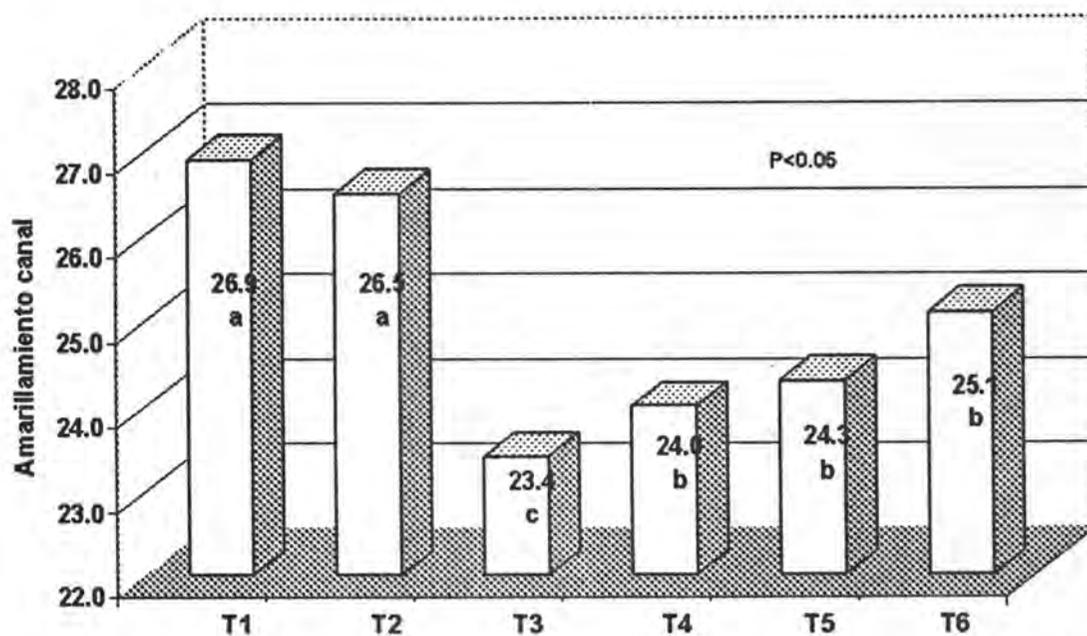


Figura 5. Pigmentación en vivo, en pollos de engorda de 45 días alimentados con los diferentes promotores de crecimiento y enzimas.

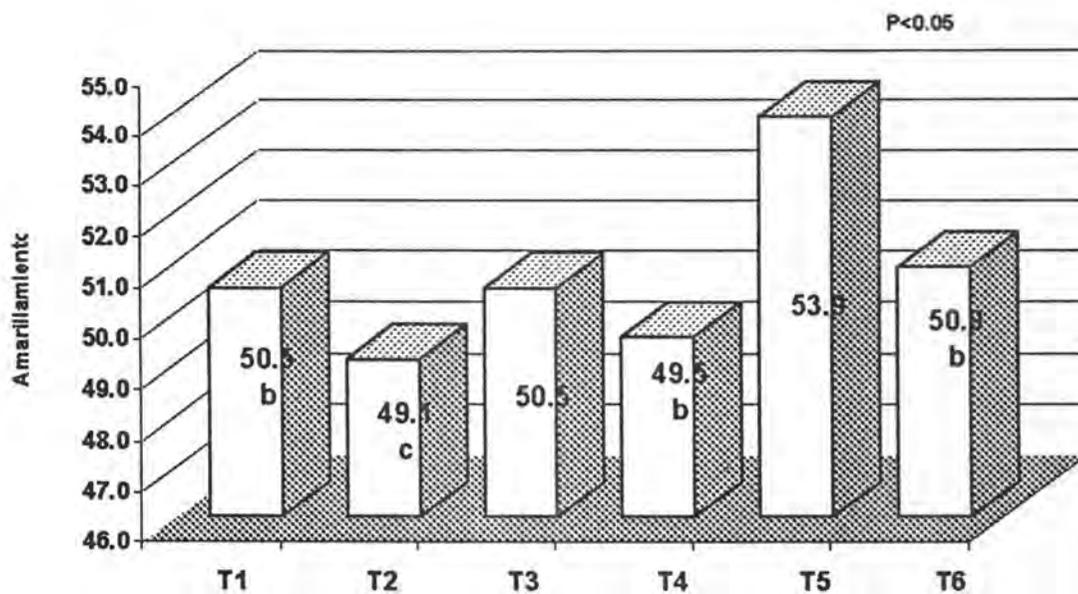


Figura 6. Amarillamiento de la canal en pollos de engorda a los 45 días después del refrigerado, alimentados con los diferentes promotores de crecimiento y enzimas.