

Enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación ruminal *in situ* del pasto king grass (*Pennisetum hybridum*) en dos edades de corte

Exogenous fibrolytic enzymes in ruminal degradation *in situ* of king grass (*Pennisetum hybridum*) pasture in two cutting ages

°Jorge G. Quintana-Zamora¹, Juan H. Avellaneda-Cevallos^{1,2}, Edwin O. Tapia-Moreno¹, Mayra M. Peña Galeas³, Alexandra E. Barrera-Álvarez¹, Piedad F. Yépez-Macías¹

¹Facultad de Ciencias Pecuarias, Campus Finca Experimental "La María" km 7 via Quevedo-El Empalme. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. EC.120501. Quevedo, Ecuador. °jquintana@uteq.edu.ec; javellaneda@uteq.edu.ec; etapia@uteq.edu.ec; barreraalvarez@yahoo.com; pyopez@uteq.edu.ec

²Programa de Ganadería, Estación Experimental Tropical Pichilingue, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias-INIAP, Quevedo, Ecuador.

³Centro de Investigación y Desarrollo, Universidad Técnica de Babahoyo, Extensión Quevedo, Ecuador. mayra.pena.galeas@gmail.com

Resumen

Se evaluó el efecto de un compuesto enzimático fibrolítico exógeno (Enzima; Fibrozyme®; 0 y 1.50 g enzima/kg MS) en la digestibilidad y fermentación ruminal en una dieta y un forraje, en heno de pasto king grass (*Pennisetum hybridum*) cortado a 35 y 70 días. Se incubaron bolsas de nylon en ovinos fistulados al rumen con muestras de heno de king grass a 0, 12, 24, 48 y 72 h. Se tomaron muestras de heces y orina para cuantificar el nitrógeno retenido. La degradabilidad *in situ* de la MS de heno de king grass durante 12, 24, 48 y 72 h no fue afectada por el compuesto enzimático fibrolítico exógeno, tanto para dietas completas como para el forraje. En la digestibilidad *in vivo* ($p>0.05$) de los nutrientes fue mayor en el heno de 35 d comparado con el heno de 70 d el cual no fue influenciada por el compuesto enzimático fibrolítico exógeno. La retención de nitrógeno fue mayor para el heno de 35 d sin ser influenciado por el compuesto enzimático. Se concluye que las enzimas fibrolíticas exógenas no afectan la digestión de los nutrientes del heno del pasto king grass.

Palabras clave: degradabilidad *in situ*, rumen, incubación.

Abstract

The effect of an exogenous fibrolytic enzyme compound (Fibrozyme® 0 and 1.50 g enzyme/kg DM enzyme) on ruminal digestibility and fermentation was evaluated in a diet and king grass hay forage cut at 5 and 70 days. Nylon bags were incubated in the rumen fistulated sheep with king grass hay samples at 0, 12, 24, 48 and 72 h, feces and urine samples were taken to quantify the nitrogen retained. *In situ* degradability of MS king grass hay for 12, 24, 48 and 72 h was not affected by exogenous fibrolytic enzyme compound for both complete diets and for forage. *In vivo* digestibility ($p>0.05$) of nutrients was higher in hay 35 d compared to 70 d hay which was not influenced by exogenous fibrolytic enzyme compound. Nitrogen retention was higher for 35 d hay without being influenced by the enzyme compound. We conclude that exogenous fibrolytic enzymes do not affect digestion of nutrients king grass hay pasture.

Key words: *in situ* degradability, rumen, incubation.

Introducción

Aun en los sistemas más intensivos de producción, los forrajes continúan siendo el componente más importante de las raciones entregadas a los animales. Con el transcurso de los años se ha mejorado notablemente la calidad de los forrajes y la digestibilidad de la pared celular, por medio de avances agronómicos y genéticos. A pesar de dichos avances, la digestibilidad de la pared celular de los forrajes continúa limitando el consumo de los mismos, contribuyendo además a aumentar la polución ambiental causada por el ganado (Jung y Allen, 1995).

En términos de la anatomofisiología de los rumiantes, es conocido que estas especies presentan un ecosistema microbiano muy diverso adaptado para la digestión de fuentes de alimentos fibrosos; se considera también que la pared celular de las plantas presenta estructuras no entendidas completamente, y que las propiedades químicas de algunos compuestos de la pared celular vegetal y la matriz tridimensional entrelazada de los polisacáridos, lignina y los compuestos fenólicos limitan la digestión de la pared celular por parte de los microorganismos ruminales (González, 2004).

Con la finalidad de aumentar la eficiencia de la utilización del pienso por los rumiantes, los investigadores han estudiado el efecto de la utilización de productos de la biotecnología, especialmente la suplementación con enzimas fibrolíticas exógenas compuestas de celulasa y hemicelulasa (Martins *et al.*, 2007). Las enzimas fibrolíticas exógenas no son sintetizadas por los microorganismos ruminales, por lo cual se adicionan al alimento para aumentar la degradación de la fibra (Meraz *et al.*, 2012).

Es así que la suplementación con enzimas fibrolíticas exógenas, a pesar de la incertidumbre e inconsistencia de los resultados obtenidos hasta hoy, se presenta actualmente como una de las alternativas tecnológicas capaces de contribuir a estimular los complejos mecanismos de degradación de la pared celular vegetal de los pastos, forrajes ensilados, pajas de cereales, cereales y otras fuentes de alimento de uso frecuente en la nutrición de rumiantes (González, 2004). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes niveles de enzimas fibrolíticas exógenas (enzima; Fibrozyme®; 0 y 1.50 g enzima/kg MS), sobre la degradabilidad *in situ* de la materia seca, digestibilidad *in vivo* y balance nitrógeno en una dieta y un forraje, de heno de pasto king grass (*Pennisetum hybridum*) cortado a 35 y 70 días.

Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en la finca experimental “La María”, de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador, ubicada en el km 7 de la vía Quevedo-El Empalme, perteneciente al cantón Mocache, provincia de Los Ríos, a una altura de 73 msnm. La precipitación anual fue de 1690 mm. El experimento se efectuó en el área de ruminología del departamento de pasto y forrajes. Se emplearon cuatro borregos Pelibuey x Katahdin con cánula ruminal y alimentados con dietas 60% heno king grass y 40% balanceado (Cuadro 1).

Se aplicó un diseño cuadro latino 4x4 con un arreglo factorial 2x2 y cuatro repeticiones donde los factores fueron dos edades de corte (35 y 70 d), dos niveles de enzima (0 y 1 g Fibrozyme kg⁻¹). Cada periodo experimental duro 17 d, dividido en 7 d para la adaptación de los animales a las dietas experimentales y 10 para el proceso de muestreo. El producto enzimático Fibrozyme (Alltech INC, Nicholasville, KY, USA). El compuesto enzimático fibrolítico exógeno es una combinación de extracto de la fermentación de *Aspergillus niger* y *Trichoderma viride* y fermentos solubles, protegidos por técnicas de glucosilación. Su actividad xilanásica es de 100 UI/g (una unidad xilanásica es la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de xilosa), se aplicó directamente en el ambiente ruminal (1 g kg⁻¹ MS), antes de racionar el alimento, a las 8:00 y 16:00 h. El agua se ofreció *ad libitum*. Se analizó el contenido de materia seca (MS), nitrógeno (N) y cenizas (AOAC, 1990), tanto en las dietas completas como en los forrajes (Cuadro 1).

Para la prueba de digestibilidad *in situ*, los primeros tres días se incubaron muestras de dietas completas y los últimos tres días muestras de heno de king grass (35 y 70 d) de acuerdo al tratamiento correspondiente (Huntington y Givens, 1995; Ørskov y McDonald, 1979; Stern *et al.*, 1997; Vanzant *et al.*, 1998). Se emplearon bolsas de nylon (14 x 6 cm) con 6 g de MS de cada dieta y forraje molidos con una criba de 2 mm. El proceso de incubación dentro del rumen, tuvo los siguientes tiempos: 0, 12, 24, 48 y 72 h, las bolsas con muestras se sujetaron a cadenas de acero inoxidable (una por animal), 10 bolsas (2 por cada tiempo), y se retiraron en orden directo. Después las bolsas se lavaron con agua hasta que el afluente sea claro, éstas se secaron a temperatura ambiente y luego en una estufa de aire forzado a 65 °C por 48 horas, posteriormente se pesaron en balanza analítica.

Por cuatro días se midió el consumo de alimento, se pesó el alimento suministrado y rechazado. Para la recolección de heces, en los ovinos se utilizaron

Cuadro 1. Dietas experimentales y su composición química

Ingredientes (%)	Dieta+Enz	Dieta-Enz	Dieta+Enz	Dieta-Enz
Maíz	28.50	28.50	28.50	28.50
Pasta de soya	6.00	6.00	6.00	6.00
Melaza	4.00	4.00	4.00	4.00
Urea	0.50	0.50	0.50	0.50
Premezcla de vitamina y minerales	1.00	1.00	1.00	1.00
Heno de king grass 35 días	60.00	60.00		
Heno de king grass 70 días			60.00	60.00
	King grass 35 d 60% + Balanceado 40%	King grass 70 d 60% + Balanceado 40%		
Humedad total	11.94	11.76		
Materia seca, %	88.06	88.24		
Ceniza, %	11.75	10.63		
Proteína, %	11.64	9.08		
Fibra cruda, %	16.61	19.96		
Extracto Etereo, %	2.17	1.95		
Calcio, %	0.03	0.12		
Energía bruta, Kcal g ⁻¹	3.43	3.39		

Dieta+Enz=Dieta+Enzima, Dieta-Enz=Dieta-Enzima. Análisis hechos en el laboratorio de Bromatología, UTEQ (base seca).

arneses a los cuales se fijó una bolsa de tela, las mismas fueron pesadas y se tomó una alícuota del 10% del total evacuado. Para el balance de nitrógeno se recolectó la orina en recipientes plásticos que contenían 50 mL de H₂OS₄ (ácido sulfúrico) al 50%, se midió la excreción diaria (peso y volumen) y se ocupó una alícuota diaria del 10% del total evacuado. Los resultados se analizaron con un cuadro latino con arreglo factorial de tratamientos (SAS, 1999).

Resultados y discusión

Degradabilidad *in situ* de la MS dietas completas

La degradabilidad *in situ* de la materia seca (MS) de las dietas completas (mezcla de forraje y concentrado), fue diferente ($p < 0.05$) a las 12, 24, 48 y 72 h por efecto de la edad de la planta, siendo mayores las respuestas para el heno de 35 d (40.74, 54.83, 62.20 y 72.67%, respectivamente), en comparación con el heno de 70 d (33.79, 44.58, 53.21 y 65.81%, correspondientemente), no hubo efecto ($p > 0.05$) de la enzima fibrolítica exógena sobre la degradabilidad de las dietas estudiadas (Cuadro 2). Estas respuestas concuerdan a las reportadas por Yescas *et al.* (2002) quienes evaluaron un complejo enzimático fibrolítico exógeno sobre la degradabilidad de dietas completas que contenían rastrojo de avena y maíz, para estos autores la degradabilidad *in situ* de

la MS de dietas completas no fue diferente ($p > 0.05$) a las 12, 48 y 72 h, sin embargo, a las 24 h fue mayor ($p \leq 0.05$) la degradabilidad de la dieta con paja de avena, sin ser lo último efecto del complejo fibrolítico exógeno. Similarmente, Moreno *et al.* (2007) no encontraron efecto del complejo enzimático después de las 12 horas de incubación; así como, también Avellaneda *et al.* (2009) en su estudio valorando el efecto de las enzimas en la digestión del pasto *Panicum maximum*. La mayor respuesta observada en la degradabilidad de la MS de pasto de 35 d, puede deberse al mayor contenido de carbohidratos de fácil fermentación y al menor contenido de compuesto fenólicos que limiten el acceso por parte de los microorganismos ruminales.

Degradabilidad *in situ* de la MS del forraje

La degradabilidad *in situ* de la materia seca (MS) del forraje del pasto king grass fueron diferentes ($p < 0.05$) por efecto de la edad de corte, siendo mayor la degradabilidad a las 12, 24 y 48 h en el heno de pasto king grass de 35 d (28.99, 39.84 y 52.81%, en orden) al compararse con el heno de 70 d (19.30, 27.49 y 40.98%), sin embargo, no se presentó efecto con el uso del compuesto fibrolítico exógeno (Cuadro 3). Estos resultados contrastan con los reportados por Pinos-Rodríguez *et al.* (2002) que al adicionar un compuesto fibrolítico exógeno en la degradabilidad *in vitro* de la materia seca (MS) del pasto ballico (*Lolium perenne*) encontraron un incremento ($p < 0.05$) de la desaparición

Cuadro 2. Efecto del compuesto enzimático fibrolítico exógeno en la degradabilidad *in situ* (%) en dieta completa de pasto king grass cortado cada 35 y 70 d alimentado a ovinos tropicales

Incubación (h)	King grass 35 d		King grass 70 d		EEM	P<		
	+Enz	-Enz	+Enz	-Enz		Enz	FOR	Enz x FOR
0	21.80 a	24.27 a	20.44 a	18.66 a	1.82	0.85	0.100	0.28
12	40.90 a	40.58 a	32.90 b	34.69 b	1.41	0.62	0.002	0.48
24	53.77 a	55.88 a	45.32 b	43.84 b	1.08	0.78	<.0001	0.15
48	58.26 a	66.14 a	54.50 b	51.91 b	3.67	0.49	0.040	0.20
72	72.29 a	73.05 a	66.02 b	65.61 b	1.45	0.90	0.003	0.70

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p > 0.05$). -Enz = forraje sin compuesto enzimático; +Enz = forraje con compuesto enzimático; FOR = factor forraje; Enz = factor compuesto enzimático; Enz x FOR = compuesto enzimático x compuesto enzimático; EEM = error estándar de la media.

de la (MS) a las 48 y 72 h, obteniéndose estos resultados posiblemente a las altas cantidades del compuesto enzimático (200 mg) por gramo de sustrato empleado. Sin embargo, concuerdan con los resultados indicados por Avellaneda-Cevallos *et al.* (2007), quienes hasta las primeras 24 h de incubación no reportaron diferencias ($p < 0.05$) en la digestibilidad *in vitro* de la materia seca de ecotipos de pastos Brachiarias, por efecto de la adición de un compuesto enzimático fibrolítico exógeno, presumiéndose que ese tiempo de incubación no fue suficiente la evidenciar la acción del compuesto utilizado.

Así mismo, Tricarico *et al.* (1998) encontró que la digestibilidad *in vitro* de la materia seca de la festuca (*Festuca arundinaceae*) se incrementó por efecto de un compuesto enzimático fibrolítico exógeno (Fibrozyme®) en las primeras 12 h de incubación, pero así mismo reportan que no encontraron efecto después de las 18 h, estos hallazgos para estos autores, sugieren que Fibrozyme® puede mejorar la digestibilidad de

los henos a través de un mecanismo sinérgicos con las enzimas de los microorganismos ruminales, durante las primeras horas de incubación; de igual manera, Pinos-Rodríguez *et al.* (2002) Corroboran lo anterior, ya que reportaron incrementos de la degradabilidad de forrajes de alfalfa y ballico tan solo durante las primeras 24 h de incubación. La desaparición de la enzima fue constante (44.10 a 42.60%) en las primeras 6 h de incubación *in vitro* con liquido ruminal, pero cuando la incubación llegó a 12 h la desaparición aumentó y permaneció constante hasta las 72 h (51.60%).

Por otra parte, Mandebvu *et al.* (1998) evaluaron el efecto de la variedad del pasto bermuda (Tifton 85 y Común), del estado de madurez a la cosecha (3 y 6 semanas) y un compuesto enzimático (sin y con), reportaron que la degradabilidad *in situ* de la MS de las variedades estudiadas no disminuyó por efecto del estado de madurez durante las primeras 48 h de incubación, ni por efecto de la aplicación de un complejo fibrolítico exógeno al ensilaje de estos forrajes durante las 72 h

Cuadro 3. Efecto del compuesto enzimático fibrolítico exógeno en la degradabilidad *in situ* (%) de la MS del forraje de pasto king grass cortado cada 35 y 70 d, alimentado a ovinos tropicales

Incubación (h)	King grass 35 d		King grass 70 d		EEM	P<		
	+Enz	-Enz	+Enz	-Enz		+Enz	-Enz	Enz x FOR
0	11.10 a	8.40 a	7.27 b	7.65 b	1.24	0.38	0.110	0.26
12	27.41 a	30.56 a	21.00 b	17.60 b	2.07	0.95	0.003	0.16
24	38.17 a	41.52 a	28.31 b	26.68 b	1.90	0.66	0.001	0.23
48	52.78 a	52.84 a	40.22 b	41.75 b	2.85	0.79	0.006	0.80
72	61.11 a	60.14 a	51.11 a	55.07 a	4.44	0.74	0.140	0.59

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p \geq 0.05$)

-Enz = forraje sin compuesto enzimático; +Enz = forraje con compuesto enzimático; FOR = factor forraje; Enz = factor compuesto enzimático; Enz x FOR = compuesto enzimático interacción forraje; EEM = error estándar de la media

de incubación, discrepando con el presente estudio en la primera variable estudiada (estado de madurez), y concordando con lo reportado por el efecto de las enzimas. Contrario a lo anterior, en lo referente al efecto de las enzimas fibrolíticas exógenas, Krause *et al.* (1998) y Yang *et al.* (1999) mencionan que estos compuestos (enzimas) incrementaron la solubilidad de la materia seca por un cambio en la composición de los alimentos producto del efecto hidrolítico, así mismo, expresan que este efecto es proporcional a la concentración y al nivel de enzima empleado. Esta diferencia con la presente investigación, pudiera deberse a tipo de estructura que posee el forraje empleado por Yang *et al.* (1999) que utilizaron una leguminosa de clima templado (alfalfa), en la evaluación de un compuesto fibrolítico exógeno.

Digestibilidad *in vivo*

Así mismo la digestibilidad *in vivo* de la materia seca (MS) (Cuadro 4) del heno del pasto king grass no fue influenciado ($p>0.05$), por el compuesto enzimático fibrolítico exógeno ($p=0.93$), ni por la edad del forraje ($p=0.30$), aunque hubo mayor digestibilidad cuando los borregos recibieron heno de king grass de 35 d (67.64%) comparado con el heno de 70 d (64.70%). Estos resultados coinciden con los reportados por Avellaneda *et al.* (2003) quien evaluó la adición de un compuesto fibrolítico exógeno en la digestibilidad *in vivo* de la materia seca (DIVMS) del pasto guinea (*Panicum maximum* var. Mombasa) cortado a los 35 y 90 d, encontrando mayor digestibilidad en el heno de 35 d comparado con el de 90 d, sin reportar efecto de la enzima fibrolítica exógena. De igual manera Hristov *et al.* (1998) no encontraron efectos del compuesto fibrolítico exógeno de la MS de una dieta completa, que contenía silo de maíz como

fuerza de forraje.

En cuanto al porcentaje de digestibilidad la materia orgánica (MO), proteína cruda (PC), fibra bruta (FB), extracto etéreo y elementos libres de nitrógeno (ELN) (Cuadro 4), fue mayor ($p<0.01$) cuando los borregos recibieron heno de king grass de 35 d, pero no fue influenciada por el compuesto fibrolítico exógeno ($p>0.05$). Estos resultados concuerdan con los reportados por Avellaneda (2003), quien encontró que el porcentaje de digestibilidad de la MO y PC, fue mayor cuando los borregos recibieron heno de guinea de 35 d, pero no hubo cambios al adicionar el compuesto fibrolítico exógeno.

Balance de nitrógeno

El consumo de nitrógeno (g d^{-1}) fue mayor ($p=0.04$) para el heno de pasto king grass de 35 d sin ser afectado ($p=0.54$) por el compuesto enzimático (Cuadro 6). La excreción de nitrógeno (g d^{-1}) en las heces no fue afectada por la edad de corte ($p=0.56$) ni por el nivel del compuesto enzimático ($p=0.81$). La excreción de nitrógeno en la orina no fue influenciada por la edad de corte, ni tampoco por el complejo enzimático, para los henos de 35 y 70 d. Estos resultados concuerdan con Avellaneda (2003) quien no reportó cambios en la excreción de nitrógeno por efecto por un compuesto enzimático exógeno y el estado de madurez del forraje evaluado; pero este autor discrepa en lo referente a la excreción de nitrógeno en orina, ya que observó que los pastos de mayor edad (90 d) provocan mayores pérdidas de nitrógeno. Sin embargo, coinciden sobre la retención (g d^{-1}) de este nutriente, toda vez que en la presente investigación se incrementa ($p<0.01$) cuando los animales consumieron un forraje de menor edad de corte (35 d).

Cuadro 4. Efecto del compuesto enzimático fibrolítico exógeno en la digestibilidad *in vivo* (%) de pasto king grass cortado cada 35 y 70 d, alimentado a ovinos tropicales

Variable	King grass 35 d		King grass 70 d		EEM	P<		
	+Enz	-Enz	+Enz	-Enz		Enz	FOR	Enz x FOR
Materia seca	67.04 a	68.25 a	65.08 a	64.33 a	2.59	0.93	0.300	0.71
Materia orgánica	72.13 a	75.01 a	69.04 b	68.38 b	1.31	0.43	0.010	0.22
Proteína Total	68.06 a	69.59 a	58.66 b	58.84 b	2.22	0.71	0.003	0.77
Fibra total	46.79 a	49.49 a	47.41 a	47.94 a	2.95	0.60	0.880	0.72
Extracto etéreo	79.74 a	81.38 a	77.63 a	74.05 a	3.07	0.76	0.170	0.42
Elementos libres de nitrógeno	25.99 a	24.38 a	24.90 a	22.73 a	1.97	0.37	0.510	0.89

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p\geq 0.05$)

-Enz = forraje sin compuesto enzimático; +Enz = forraje con compuesto enzimático; FOR = factor forraje; Enz = factor compuesto enzimático; FOR x Enz = interacción forraje x compuesto enzimático; EEM = error estándar de la media.

Conclusiones

La degradabilidad *in situ* de la materia seca, digestibilidad *in vivo*, y balance nitrógeno no se modificaron por la adición de enzimas fibrolíticas (Enzima; Fibrozyme®; 0 y 1.50 g enzima kg⁻¹ MS) en heno del pasto king grass cortado a los 35 y 70 días. El heno del pasto king grass cortado a los 35 días tuvo mayor degradabilidad *in situ*, y mejor porcentaje de digestibilidad *in vivo*. El consumo de nitrógeno del heno de king grass cortado a los 35 días fue mayor al ser comparado con el heno de king grass a los 70 días.

Agradecimiento

A la ex-Fundación para la Ciencia y la Tecnología (FUNDACYT-SENACYT), por el financiamiento para la ejecución del proyecto. Así mismo, al Colegio de Postgraduados-México, por su participación como contraparte Internacional.

Bibliografía

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. (15th ed., Vol. 1). Washington, DC., USA: Association of Official Analytical Chemists
- Avellaneda, J. 2003. Efectos de enzimas fibrolíticas exógenas en características nutritivas en gramíneas tropicales. Tesis de Doctor en Ciencias. Montecillo-Texcoco, Edo. de México, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Programa en Ganadería. Colegio de Postgraduados. Montecillo-Texcoco. Edo de Mexico.
- Avellaneda, J.H., Pinos-Rodríguez J.M., González-Muñoz, S. S., Bárcena, R., Hernández, A., Cobos, M., Hernández, D., and Montañez, O. 2009. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and digestion of Guinea grass hay. *Animal Feed Science and Technology*. 149: 70-77.
- Avellaneda-Cevallos, J.H., González, S.S., Pinos-Rodríguez J.M., Hernández-Garay, A., Montañez-Valdez, O., and Ayala-Oseguera, J. 2007. Enzimas fibrolíticas exógenas en la digestibilidad *in vitro* de cinco ecotipos de Brachiarias. *Agronomía Mesoamericana*. 18(1): 11-17.
- González, E. 2004. Utilización de enzimas fibrolíticas en cabras Lecheras. Evaluación de su actividad y características fermentativas *in vitro*. Tesis doctoral. Barcelona. España. Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona. 184 P.
- Hristov, A.N., McAllister, T.A., and Cheng, K.J. 1998. Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharide degrading enzymes on rumen Fermentation and nutrient digestibles. *Journal of Animal Science* 72: 3146-3156.
- Huntington, J.A. and Givens, D.I. 1995. The *in situ* techniques for studying the rumen degradation of feeds: A review of the procedure. *Nutrition Abstracts and Reviews* 65:63-93.
- Jung, H. G., and Allen, M.S. 1995. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages in ruminants. *Journal of Animal Science*
- Krause, M., Beauchemin, K., Rode, L., Farr, B., and Norgaard, P. 1998. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high grain diet fed to growing cattle. *Journal of Animal Science* 76:2912-2920.
- Mandebvu, P., West, J.W., Gates, R., and Hill, G.M. 1998. Effect of hay maturity, forage source, or neutral detergent fiber content on digestion of diets containing Tifton 85 bermudagrass and corn silage. *Animal Feed Science and Technology*. 73(3): 281-290
- Martins, A., Vieira, P., Berchielli, T., Prado, I., Lempp, B., and Paula, M. 2007. Degradabilidade *in situ* e observações microscópicas de volumosos em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas exógenas. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 36(6): 1927-1936.
- Meraz, E., Loera, O., Mendoza, G., Meneses, M., Cobos, M., Hernández, D., Angeles, S., Melgarejo, L., Pinos, J. 2012. Efecto del pH y del líquido ruminal clarificado en la estabilidad de un producto enzimático fibrolítico. *Agrociencia*, 46(4): 347-358.
- Moreno, R., Pinos-Rodríguez, J.M., González, S., Álvarez, G., García, J.C., Mendoza, G., and Bárcena, R. 2007. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación ruminal *in vitro* de dietas para vacas lecheras. *Interciencia*. 32(12): 850-853.
- Orskov, E. and Mc Donald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science Cambridge* 92:499-503.
- Pinos-Rodríguez, J., González-Muñoz, S., Mendoza-Martínez, G., Bárcena-Gama, R., Cobos-Peralta, M. 2002. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la digestibilidad *in vitro* de la pared celular de heno de alfalfa (*Medicago sativa*) o de ballico (*Lolium perenne*). *Interciencia*. 27(1): 28-32.
- SAS, 1999. User's Guide: Statistics [CD-ROM Computer file]. Version 8. SAS Inst. Inc., Cary,

- NC.
- Stern, M.D., Bach, A., and Calsamiglia, S. 1997. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. *Journal of Animal Science* 75:2256-2276.
- Tricarico, J.M., Dawson, K.A., Newman, K.E. 1998. Effects of an exogenous microbial enzyme preparation (Fibrozyme) on ruminal digestion of fescue hay. *Journal of Animal Science* 76 (Suppl. 1):289 (Abstr.).
- Vanzant, E.S., Cochran, R.C., and Titgemeyer, E.C. 1998. Standardization of in situ techniques for ruminant feedstuff evaluation. *Journal of Animal Science* 76:2717-2729.
- Yang, W.Z., Beauchemin, K.A., and Rode, L. 1999. Effects of an enzyme feed additive on extents of digestion and milk production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82:391-403.
- Yescas, R., Barcena, R., Mendoza, G., Gonzalez, S., Cobos, M., Ortega, M. 2002. Digestibilidad *in situ* de dietas completas con rastrojo de maíz o paja de avena con enzimas fibrolíticas. Instituto de recursos genéticos y Productividad. Programa en Ganadería. Colegio de postgraduados. Montecillo-Texcoco. Edo de México.