



EVALUACIÓN DE LA INCLUSIÓN DE NOPAL (*Opuntia ficus indica*) EN COMBINACIÓN DE ENZIMA CELULASA SOBRE LA RESPUESTA PRODUCTIVA EN OVINOS

KARINA CASTILLO HERNÁNDEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial

para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

EN ZOOTECNIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

TESIS

EVALUACIÓN DE LA INCLUSIÓN DE NOPAL (*Opuntia ficus indica*) EN
COMBINACIÓN DE ENZIMA CELULASA SOBRE LA RESPUESTA
PRODUCTIVA EN OVINOS

POR:

KARINA CASTILLO HERNÁNDEZ

Elaborada bajo supervisión del comité particular de asesoría y aprobada
como requisito parcial, para optar al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN ZOOTECNIA

COMITÉ PARTICULAR:


Asesor principal: Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Asesor: Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

Asesor: Dr. Fernando Ruiz Zárate

Asesor: Dr. Jesús Manuel Fuentes Rodríguez

Asesor: Dr. Roberto García Elizondo


Dr. Fernando Ruiz Zárate
Subdirector de Posgrado

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México,
Junio, 2013

ARADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme concluir una etapa más en mi vida y darme lo necesario para continuar.

A mis padres, María Esperanza Hernández Munguía y Rafael Castillo Medina, porque siempre creyeron en mí y me dieron su amor y apoyo incondicional, me brindaron todas las herramientas necesarias para seguir adelante, gracias por todo lo que han hecho por mí, son mi mejor motivo y mi mayor orgullo, madre eres la mejor mamá del mundo y tus consejos han sido los que me han formado, padre no hay mejor papá que tú, siempre has estado conmigo y tu amor me ha empujado en momentos difíciles, los amo.

A mis hermanos, Wendy Castillo Hernández y Rafael Castillo Hernández, porque a pesar de la distancia nunca estuvimos separados y siempre estuvieron conmigo.

A mis sobrinos, Claudia Camila Castillo Hernández, Romina Castillo González y Mariano Rafael Castillo Hernández, a pesar de ser personas tan pequeñas son las que me han dado grandes lecciones, los quiero demasiado.

A mis tías Josefina Hernández Munguía y Claudia Concepción Hernández Munguía, siempre han sido parte de mi desarrollo personal, gracias por sus consejos y amor.

A la familia Castillo Medina, por su apoyo y cariño.

A mi asesor principal, Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez, gracias por su apoyo brindado a través de estos años, por su paciencia y confianza para llevar a cabo el proyecto de investigación.

A mis asesores, Dr. Mario Alberto Cruz Hernández, Dr. Jesús Manuel Fuentes Rodríguez, Dr. Fernando Ruíz Zárate y Dr. Roberto García Elizondo, por su colaboración en el proyecto y su disponibilidad.

Al Dr. Alberto Guerrero Rodríguez, gracias por tu incondicional apoyo, por tu paciencia y dedicación en la elaboración del proyecto, gracias sobre todo por nuestra amistad.

Al Ing. Pedro Guerrero Rodríguez, en todo momento tu entereza y carácter me ayudaron a seguir y fuiste un gran soporte durante este transcurso, gracias por apoyarme y ayudarme a concluir esta etapa, simplemente gracias porque siempre has estado para mí.

A la L.C.N. Laura Marisela, por haber sido una guía en áreas del conocimiento en las que necesité pulir, gracias por haberme transmitido tus conocimientos y habilidades, y sobre todo gracias por ser una gran amiga.

COMPENDIO

EVALUACIÓN DE LA INCLUSIÓN DE NOPAL (*Opuntia ficus indica*) EN COMBINACIÓN CON ENZIMA LA CELULASA SOBRE LA RESPUESTA PRODUCTIVA EN OVINOS

TESIS:

POR:

KARINA CASTILLO HERNÁNDEZ

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ZOOTECNIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, Junio 2013

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Palabras clave: ovinos, celulasa, nopal, comportamiento productivo, metabolitos, ácidos grasos volátiles, pH

En cualquier sistema de producción pecuaria bajo condiciones de estabulación, la alimentación de los animales representa del 70 al 80% de los costos totales de producción. Por lo tanto se ha hecho imperante contar con ingredientes alternativos que permitan abaratar los costos de producción y nuevas tecnologías que puedan ser implementadas para el mismo objetivo. Con respecto a lo anterior existen otros ingredientes que ya forman parte de la alimentación de rumiantes pero que sin embargo la mayoría de ellos necesita

mejorar su valor nutricional, ayudados por nuevas tecnologías como por ejemplo el uso de enzimas. En atención a lo anterior en el presente trabajo se utilizaron 15 borregas de raza criolla, con el objetivo de evaluar la inclusión de una enzima celulasa comercial (EC) (SIGMA®) y un extracto enzimático de celulasa (EU) producida en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) aplicadas al nopal (*Opuntia ficus indica*), que formaba parte de la dieta de los ovinos en un nivel de inclusión de 13%, se estudiaron tres tratamientos, el tratamiento 1 (T1) fue el tratamiento testigo, el tratamiento 2 (T2) fue al que se agregó EC y el tratamiento 3 (T3) la adición de la EU. Se evaluó el comportamiento productivo en base al consumo diario de materia seca (CDMS), ganancia diaria de peso (GDP) y conversión alimenticia (CA), igualmente se evaluó la producción de AGV's, metabolitos en suero sanguíneo y pH ruminal. El alimento se sirvió a las 9:00am y 4:00pm durante 45 días. Se asperjaba la enzima del T2 y T3 sobre el nopal 40 minutos antes y después se incluía a la dieta, el cual era adicionado de acuerdo al consumo diario de cada animal, posteriormente se agregaban el resto de los ingredientes formado una dieta integral, el rechazo se retiraba y se pesaba. Al analizar las variables CDMS, GDP, CA y metabolitos en suero sanguíneo no hubo ninguna diferencia significativa ($P>0.05$) entre tratamientos. En la producción de AGV's solo se presentó diferencia significativa entre tratamientos en la producción de ácido acético, mostrando mayor producción del mismo en los tratamientos T2 y T3, no existiendo diferencia significativa entre ambos. El pH presentó diferencia significativa ($P<0.05$) entre los tratamientos, el T1 y T3 fueron los mejores. A pesar de que no hubo una respuesta de aumento en la producción, ni en la mayoría de las variables investigadas, sí se pudo observar que el extracto enzimático de celulasa producido en la UAAAN es capaz de competir a nivel comercial con enzimas producidas en laboratorios establecidos, a costos más accesibles.

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|---|--------|
| AGRADECIMIENTOS | I |
| COMPENDIO | II |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Justificación | 2 |
| 1.2 Hipótesis | 3 |
| 1.3 Objetivo general | 3 |
| 1.4 Objetivos específicos | 3 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 4 |
| 2.1 Nopal | 4 |
| 2.1.1 Generalidades del nopal | 4 |
| 2.1.2 Clasificación taxonómica y contenido nutricional | 5 |
| 2.1.3 Usos del nopal | 7 |
| 2.1.3.1 Nopal como forraje | 7 |
| 2.2 Degradación de carbohidratos en el rumen | 8 |
| 2.3 Enzimas | 11 |
| 2.3.1 Tipos de enzimas | 11 |
| 2.3.2 Celulasa | 13 |
| 2.3.2.1 Microorganismos que favorecen a la producción de celulasa | 14 |
| 2.3.2.1.1 Microorganismos aeróbicos y anaeróbicos | 14 |
| 2.3.3 Modo de acción | 15 |
| 2.3.4 Caracterización físico-química de la celulasa | 17 |
| 2.3.5 pH y peso molecular | 17 |
| 2.3.6 Sustrato | 18 |
| 2.3.7 Inóculo | 19 |
| 2.3.8 Cinética enzimática | 20 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.3.8.1 | Generalidades | 20 |
| 2.3.9 | Interacción enzima-sustrato de la celulosa | 20 |
| 2.3.10 | Cinética de hidrólisis enzimática | 23 |
| 2.4 | Enzimas en la nutrición animal | 25 |
| 2.4.1 | Enzimas fibrolíticas | 26 |
| 2.4.1.1 | Enzimas fibrolíticas en la alimentación del rumiante | 26 |
| 2.4.2 | Modo de acción | 27 |
| 2.4.3 | Actividades enzimáticas involucradas en la digestión de la pared celular | 28 |
| 2.4.4 | Enzimas exógenas | 29 |
| 2.4.4.1 | Impacto de enzimas exógenas sobre la fermentación ruminal | 29 |
| 2.4.5 | Grado de inclusión de enzima en la dieta del rumiante | 29 |
| 2.4.6 | Método para proporcionar la enzima en los rumiantes | 30 |
| 2.4.7 | Variabilidad en la respuesta animal | 31 |
| 2.4.8 | Nivel de productividad animal | 32 |
| 2.4.9 | Uso de complejos enzimáticos para la degradación de fibra en el rumen utilizando nopal como base de la dieta en rumiantes | 32 |
| III. | MATERIALES Y MÉTODOS | 34 |
| 3.1 | Descripción de la ubicación del área de investigación | 34 |
| 3.2 | Etapas I. Activación de la cepa VML-2 y obtención del inóculo | 34 |
| 3.2.1 | Material Biológico | 34 |
| 3.2.2 | Preparación de medio sólido y siembra de la cepa VML-2 | 34 |
| 3.2.3 | Tinción de Gram y obtención del inóculo | 34 |
| 3.3 | Etapas II. Fermentación para la obtención de extracto enzimático | 35 |
| 3.3.1 | Preparación del medio líquido e incubación del inóculo | 35 |
| 3.4 | Etapas III. Evaluación del comportamiento productivo en ovinos | 36 |
| 3.4.1 | Animales utilizados | 36 |
| 3.4.2 | Tratamientos | 36 |
| 3.4.3 | Preparación de los animales | 36 |
| 3.4.4 | Prueba de alimentación | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4.5 Variables determinadas en el experimento | 37 |
| 3.4.6 Comportamiento productivo | 38 |
| 3.4.7 Determinación de metabolitos | 38 |
| 3.4.8 Determinación de AGV'S | 38 |
| 3.4.9 Determinación de Ph | 38 |
| 3.4.10 Análisis Estadístico | 39 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 40 |
| 4.1 Comportamiento productivo | 40 |
| 4.2 Metabolitos en suero sanguíneo | 45 |
| 4.3 Ácidos grasos volátiles | 47 |
| 4.4 Ph | 49 |
| V. CONCLUSIONES | 51 |
| VI. RESUMEN | 52 |
| VI. LITERATURA CITADA | 54 |
| VII. APÉNDICE | 59 |

ÍNDICE DE CUADROS

| No. de cuadro | | Página |
|---------------|--|--------|
| 2.1 | Clasificación taxonómica del nopal | 5 |
| 2.2 | Contenido de agua entre especies y variedades de nopal forrajero en Saltillo, Coahuila. | 6 |
| 2.3 | Análisis bromatológico de diferentes géneros, especies y variedades de nopal. | 6 |
| 2.4 | Clasificación de enzimas según su complejidad. | 12 |
| 2.5 | Bacterias con alta actividad específica de celulasas. | 17 |
| 2.6 | Hongos con alta actividad específica de celulasas. | 18 |
| 3.1 | Composición del medio líquido específico para la producción de celulasa. | 35 |
| 3.2 | Fórmula alimenticia para los diferentes tratamientos | 37 |
| 4.1 | Análisis estadístico de las variables de comportamiento productivo. | 41 |
| 4.2 | Concentración de metabolitos sanguíneos de ovinos de raza criolla alimentados con una dieta a base de nopal y enzima celulasa. | 46 |
| 4.3 | Perfil de AGV'S de ovinos criollos alimentados con una dieta a base de nopal adicionado con enzima celulasa. | 47 |
| 4.4 | pH de ovinos criollos alimentados con una dieta a base de nopal adicionado con enzima celulasa. | 49 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| No. de figura | | Página |
|----------------------|--|---------------|
| 2.1 | Variedad de nopales. | 4 |
| 2.2 | Esquema de la fermentación que se produce en el rumen. | 9 |
| 2.3 | Síntesis de los mecanismos de digestión en los órganos digestivos de los rumiantes. | 11 |
| 2.4 | Clasificación de enzimas. | 12 |
| 2.5 | Mecanismo de hidrólisis enzimática en la celulosa. | 15 |
| 2.6 | Hidrólisis enzimática de la celulosa. | 16 |
| 2.7 | Interacción enzima-sustrato. | 21 |
| 2.8 | Etapas de la hidrólisis enzimática. | 21 |
| 2.9 | Metabolismo de la celulosa. | 22 |
| 4.1 | Gráficas de cajas de las respuestas productivas en ovinos de las variables CDMS y GDP. | 41 |
| 4.2 | Gráfica de caja de la respuesta productiva en ovinos de la variable CA. | 41 |

I. INTRODUCCIÓN

Se conoce que en el norte de México la mayoría de los estados cuentan con clima seco, según la clasificación de Köppen, este tipo de clima se caracteriza por tener precipitaciones escasas e irregulares. Los veranos son calientes con escasas de lluvias y los inviernos muy fríos (Inzunza, 2005); esto da como consecuencia que en verano la producción de forraje no sea tan vasta para el mantenimiento de los animales (rumiantes) y en los meses de invierno no cuenten con alimento que satisfaga sus necesidades y por lo tanto exista una merma en la producción, incluso una gran pérdida de animales que ocasiona desequilibrio económico para los productores.

Por lo tanto es imperante contar con alimentos alternativos que persistan a la escases de agua y al invierno, que posean las cualidades alimenticias que requieren los animales para su mantenimiento y producción. El nopal, es una planta que desde hace siglos se ha aprovechado de diversas maneras, principalmente para la alimentación humana, con fines medicinales y de nutrición, así como para la alimentación del ganado (Murillo 2003).

La idea de utilizar la *Opuntia* para alimentar el ganado no es reciente. En el siglo XIX hubo un abundante comercio de esta planta. El nopal es un forraje interesante, dado que cuenta con la característica de que bajo condiciones de escases de agua es capaz de proporcionar energía a través de los carbohidratos disponibles en su estructura, con mucha más eficiencia que los pastos y las leguminosas, responde bien a la fertilización, tolera una poda intensa y se puede suministrar al ganado como forraje fresco o ya ensilado (García, 2003). Sin embargo el desconocimiento del uso apropiado del mismo ha ocasionado que se requiera la aplicación de tecnologías sobre éste para poder lograr que tenga un mejor efecto sobre los animales y que ponga a

disposición de los microorganismos ruminales toda esa energía que provee a los mismos. Como se conoce, las plantas están compuestas entre otros carbohidratos, de celulosa y hemicelulosa, que junto a diversos compuestos como la lignina, proporcionan rigidez a la planta, pero el animal por sí mismo no produce las enzimas necesarias para digerir la celulosa.

En el mismo sentido, se sabe que la enzima específicamente celulasa cuenta con la propiedad de degradar la celulosa de los forrajes que son ofrecidos a los animales domésticos. En este contexto, adquiere relevancia el conocimiento específico de las características físico-químicas de la enzima celulasa, los microorganismos y factores que favorecen su producción para conocer de qué manera se puede eficientar el proceso de obtención de la misma y el beneficio sobre los coeficientes de digestibilidad en los rumiantes que aporta al adicionarla al nopal como un previo hidrolizante de la celulosa.

1.1 Justificación

En cualquier sistema de producción pecuaria alrededor del 60% al 70% del total de los costos de producción se deben exclusivamente al rubro de la alimentación. La zona norte del país se dedica a la producción masiva de carne de bovino y caprino para abasto y exportación.

Por lo anterior, es necesario el conocimiento de nuevas tecnologías, como por ejemplo la producción y aplicación de enzimas, que se empleen en el área de nutrición animal, y que a su vez permitan el aprovechamiento de ingredientes alternativos, como el nopal, o los propios de cada entidad para el mejor aprovechamiento de la fibra y su explotación adecuada que permita el abastecimiento nutricional y reducción en los costos de producción generando una manufactura más eficiente y funcional que se vea reflejada de manera integral en los animales, específicamente en la respuesta productiva, que incluye mejor eficiencia o aprovechamiento de los nutrientes en la digestión, precursor de una mayor actividad microbiana, un eficiente balance de

nutrientes, un adecuado perfil ruminal y metabólico que finalmente beneficien de igual manera al productor y al consumidor.

1.2 Hipótesis

La inclusión de nopal (*Opuntia ficus indica*) en conjunto con la enzima celulasa en la dieta de los ovinos mejora los procesos metabólicos y digestivos.

1.3 Objetivo general

Conocer el aporte al proceso digestivo en rumiantes que ofrece el nopal en combinación con la enzima celulasa y proporcionar información adecuada que permita la mejor utilización del nopal y de la enzima en la dieta de ovinos.

1.4 Objetivos específicos

- Elaborar dietas a base de nopal y enzima celulasa.
- Evaluar la respuesta productiva en ganado ovino en términos de consumo diario de alimento, ganancia diaria de peso y conversión alimenticia.
- Evaluar AGV's y pH ruminal al finalizar la prueba de comportamiento.
- Evaluar el perfil metabólico en suero sanguíneo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Nopal

2.1.1 Generalidades

“Nopal” es el nombre común que reciben las cactáceas del género *Opuntia*, este género y su familia son originarias de América; se piensa que su origen se podría localizar en México, puesto que en este país existe el mayor número de géneros e individuos (Granados, 1991).

Las cactáceas han desarrollado notables adaptaciones a la aridez; sus hojas han sido reducidas a espinas o escamas y los tallos han asimilado muchas de las funciones de la hoja, como es el caso de la fotosíntesis, además de almacenar agua (García, 2003).

Las características del género *Opuntia* son variables, y se destaca principalmente en la forma de los cladodios y el tamaño y color de los frutos como se muestra en la figura 2.1.



Figura 2.1. Variedades de nopales (Flores, 2003).

Existen 258 especies del género *Opuntia* (López, 2010) de las cuales según estudios elaborados por el gobierno federal en 2009 en México se encuentran 93 especies silvestres de *Opuntia* spp. (Scheinvar *et al.*, 2010).

2.1.2 Clasificación taxonómica y contenido nutricional

La clasificación taxonómica de la familia de las cactáceas se presenta en el cuadro 2.1:

Cuadro 2.1. Clasificación taxonómica del nopal (Flores *et al.*, 1995)

| | |
|------------|---------------------------------|
| Reino | <i>Plantae</i> |
| Subreino | <i>Embryophita</i> |
| División | <i>Angiospermae</i> |
| Clase | <i>Dycotyledonea</i> |
| Subclase | <i>Dialipétalas</i> |
| Orden | <i>Opuntiales</i> |
| Familia | <i>Cataceae</i> |
| Subfamilia | <i>Opuntioideae</i> |
| Tribu | <i>Opuntiae</i> |
| Géneros | <i>Opuntia</i> y <i>Nopalea</i> |

Ha sido imperante conocer el valor nutricional que posee el género *Opuntia*, debido a su uso en humanos y posteriormente dentro de la ganadería como forraje. El aporte nutricional de cualquier alimento arroja datos que permiten conocer una aproximación de los nutrientes que ofrece cada especie de plantas ayudando a la inclusión adecuada del nopal dentro de cualquier dieta humana o animal.

En el Cuadro 2.2 se menciona las diferencias en el contenido de agua y el aporte nutricional de las mismas y además en el Cuadro. 2.3 se muestran diferentes especies de *Opuntias*.

Cuadro 2.2. Análisis bromatológico de diferentes géneros, especies y variedades de nopal (por ciento en base a materia seca) (López *et al.*, 2003).

| Especie | MS | MO | PC | Fibra | Ceniza | ELN |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|--------------|---------------|------------|
| <i>Nopalea spp.</i> | 19.69 | 73.79 | 8.92 | 17.21 | 26.21 | 50.7 |
| <i>O. chrysacantha</i> | 15.52 | 73.45 | 3.54 | 4.32 | 26.55 | 64.33 |
| <i>O. tenuispina</i> | 12.45 | 70.21 | 4.42 | 5.14 | 29.80 | 59.52 |
| <i>O. megacantha</i> | 10.12 | 74.51 | 7.71 | 3.75 | 25.44 | 68.87 |
| <i>O. rastrera</i> | 14.41 | 59.89 | 2.78 | 6.18 | 40.11 | 43.23 |
| <i>O. azurea</i> | 12.55 | 68.88 | 4.54 | 3.98 | 30.12 | 59.84 |
| <i>O. cantabrigiensis</i> | 11.86 | 68.46 | 4.79 | 3.71 | 31.54 | 58.87 |
| <i>O. engelmanni</i> | 15.07 | 68.41 | 3.32 | 3.58 | 31.59 | 60.32 |
| <i>O. lucens</i> | 17.45 | 69.59 | 3.67 | 2.58 | 30.43 | 62.75 |
| <i>O. lindehimeri</i> | 11.57 | 74.51 | 4.15 | 3.02 | 25.50 | 66.25 |
| <i>O. robusta</i> | 10.38 | 81.41 | 4.43 | 17.63 | 18.59 | 57.61 |
| <i>O. streptocantha</i> | 16.01 | 79.38 | 3.17 | 18.88 | 20.62 | 55.34 |
| <i>O. leucotricha</i> | 14.01 | 74.01 | 7.56 | 14.01 | 26.00 | 49.78 |
| <i>O. imbricata</i> | 17.71 | 84.25 | 7.11 | 11.51 | 15.75 | 63.86 |
| <i>O. cacanapo</i> | 16.95 | 72.51 | 5.19 | 11.21 | 27.49 | 54.04 |
| <i>O. stenopetala</i> | 13.24 | 77.87 | 8.84 | 9.14 | 22.13 | 58.16 |
| <i>O. duranguensi</i> | 10.34 | 82.94 | 4.51 | 8.23 | 17.06 | 68.91 |
| <i>O. ficus indica</i> | 11.29 | 86.93 | 3.81 | 7.62 | 13.07 | 74.13 |
| <i>O. spp.</i> | 10.01 | --- | 5.71 | 8.11 | 12.01 | 55.01 |
| <i>O. imbricata</i> | 10.41 | --- | 5.01 | 7.81 | 17.30 | 68.11 |

MS: Materia Seca, MO: Materia Orgánica, PC: Proteína Cruda, ELN: Extracto libre de Nitrógeno.

Cuadro 2.3. Contenido de agua entre especies y variedades de nopal forrajero en Saltillo, Coahuila México (López *et al.*, 2003).

| Especie | Contenido de agua | |
|--------------------------------------|-------------------|--------|
| | Máxima | Mínima |
| <i>O. ficus indica</i> | 93 | 88 |
| <i>O. cantabrigienis</i> | 84 | 68 |
| <i>O. lindheimeri</i> var. tricolor | 86 | 72 |
| <i>O. lindheimeri</i> var. subarmata | 87 | 76 |
| <i>O. imbricata</i> | 84 | 70 |

2.1.3 Usos del nopal

El nopal se ha aprovechado de múltiples maneras, desde la comercialización del fruto así como en la alimentación humana como verdura, de igual forma se le ha encontrado más modos de uso, una de ellas es como forraje para ganado, en la industria farmacéutica y cosmética, para la conservación de suelos especialmente aquéllos que son poco fértiles (Flores y Ramírez, 1995) y como una fuente de colorante natural en la producción de la “grana cochinilla”. Sin dejar de lado que en las comunidades rurales de las zonas áridas y semiáridas de México el nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) constituye una fuente de ingreso considerable (Flores y Olvera, 1995).

2.1.3.1 Nopal como forraje

Como forraje el nopal (*Opuntia* spp.) se ha utilizado desde el establecimiento de las diferentes culturas en México pero a finales del siglo XX fue que concibió su importancia como planta forrajera, pues a partir de este momento se buscó controlar su uso debido a la inclusión desmedida ya sea como complemento en las dietas alimenticias o como alimento del ganado en pastoreo, para evitar la tala irracional de la cual eran objeto las nopaleras por parte de los productores. Y desde ese entonces se ha promovido su plantación

para industrializarlo y para reforestar amplias áreas sin vegetación, buscando con ello controlar la erosión del suelo y su extinción (Anaya *et al.*, 2004).

Para el consumo de nopal en ovinos se ha recomendado de acuerdo a investigaciones realizadas tomando en cuenta que el requerimiento energético para la supervivencia de una oveja de 35 Kg es de aproximadamente 350 g de nutrientes digestibles totales (TDN, por sus siglas en inglés) por día, arrojando que para satisfacer esta necesidad la oveja necesita ingerir 538 g de cactus seco, considerando que los cladodios frescos sin espinas contienen 90 por ciento de agua el animal debe consumir de 5 a 6 Kg de cactus fresco diariamente, pero la oveja solo puede comer un promedio de 4 Kg diarios (Kock, 2003), sin embargo en condiciones extremas se ha reportado que ovinos adultos pueden consumir hasta 9 a 10 Kg de nopal en base real por día como única ración (López, 2003).

En el caso de los bovinos requieren 2.85 Kg de TDN por día para satisfacer los requerimientos de un animal de 400 Kg de peso, para esto el animal requeriría consumir 4.4 Kg de cactus seco lo cual representa una ingestión diaria de 44 a 45 Kg de cladodios frescos, sin embargo el animal generalmente no consume más de 40 Kg de cactus al día (Kock, 2003).

2.2 Degradación de carbohidratos en el rumen

Es conocido que las plantas están compuestas, entre otros carbohidratos, de celulosa y hemicelulosa, que junto a diversos compuestos como la lignina, proporcionan la rigidez a la planta. En el interior del rumen las poblaciones microbianas convierten los materiales vegetales en ácidos grasos de bajo peso molecular, especialmente en acetato y propionato, que satisfacen las necesidades nutritivas del animal (Castillo *et al.*, 2005) como se muestra en la figura 2.2.

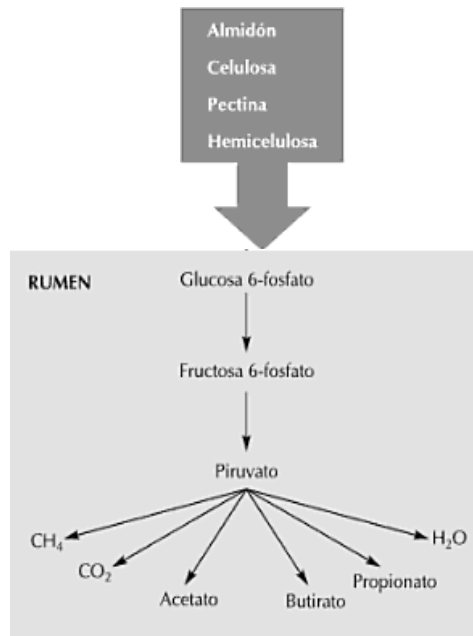


Figura 2.2 Esquema de la fermentación que se produce en el rumen (Castillo *et al.*, 2005).

Estructuralmente la celulosa es un polímero de glucosas unidas por enlaces β 1-4 glucosídicos, y su estructura fibrilar le permite unirse entre sí por puentes de hidrógeno, creando fibrillas de gran resistencia. La degradación de celulosa la inician los microorganismos celulolíticos que representan entre el 1 y 5% de la flora ruminal (Castillo, *et al.*, 2005). Las uniones glucosídicas de tipo β no son atacadas por enzimas digestivas, sólo pueden ser degradadas por las enzimas microbianas liberadas por la flora ruminal lo cual representa la base de la simbiosis bacteria-rumiante en los procesos digestivos fermentativos. La celulosa representa del 10 al 30 % de la materia seca del forraje y su digestibilidad varía entre el 50 y el 75 % (Mattioli, *et a.*, 2033).

La hemicelulosa se encuentra en una concentración algo menor, del 10 al 25% de la materia seca y su digestibilidad varía entre el 35 y el 80 %. Las variaciones en la digestibilidad de ambas (celulosa y hemicelulosa) están provocadas fundamentalmente por la concentración de lignina en el forraje (Mattioli, *et al.*, 2003). A pesar de que la lignina no es un carbohidrato sino un polímero de unidades fenil propano de estructura muy compleja siempre se ha considerado como parte importante de la fibra que es consumida por el animal,

tomando en cuenta que representa al menos el 3% de la materia seca en los forrajes tiernos y aumenta con el ciclo vegetativo hasta concentraciones superiores al 15% (Govea, 2005).

La degradación de los carbohidratos estructurales sigue los siguientes pasos:

a) *Los microorganismos celulolíticos se adhieren a la superficie de los trozos de fibra vegetal, cortada por efecto de la masticación, mezclado y rumia con el fin de exponer la pared celular. Si bien el ataque bacteriano puede realizarse sobre la superficie de la hoja, esta está recubierta por ceras que perjudican la adhesión celular y en este caso las bacterias inician su acción sobre los estomas foliares libres de ceras, de cualquier modo la degradación sería muy lenta si no mediase la ruptura del forraje.*

b) *Los microorganismos liberan en el medio ruminal celulasas que realizan la digestión extracelular de la celulosa produciendo residuos pequeños, especialmente celobiosa (disacárido). El efecto de las celulasas sobre la superficie de la fibra vegetal se observa como canales, visibles al microscopio, denominados “figuras de corrosión”.*

c) *La celobiosa es incorporada a la bacteria y atacada por la celobiasa, que la desdoblará en dos glucosas.*

d) *La glucosa es utilizada por el microorganismo para obtener energía vía glucolítica y producir AGV como producto final, principalmente acetato, que es eliminado del soma bacteriano (Pereira, et al., 2010).*

En la figura 2.3 se muestran los procesos bioquímicos que se llevan a cabo durante la fermentación de los carbohidratos en el rumen.

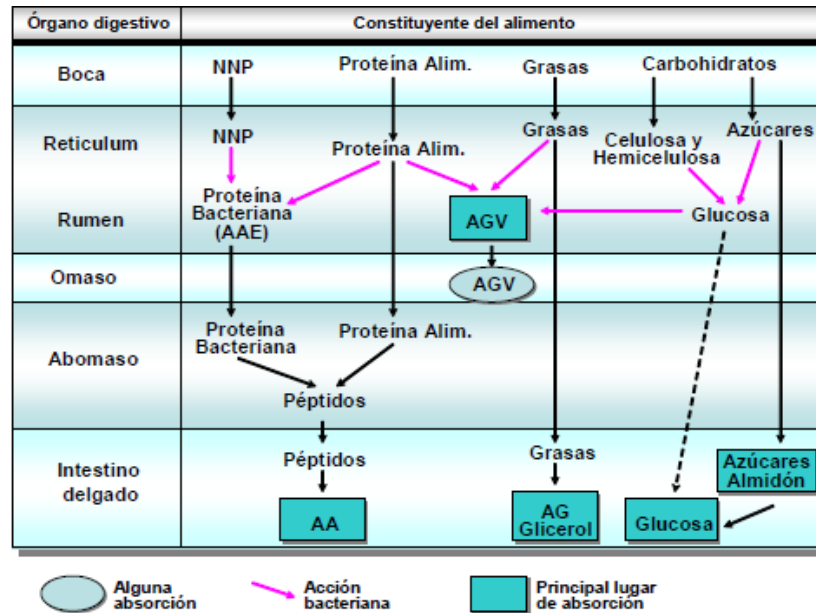


Figura 2.3. Síntesis de los mecanismos de digestión en los órganos digestivos de los rumiantes (Nava *et al.*, 2001).

2.3 Enzimas

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas en los seres vivos, es decir, constituyen sustancias que, sin consumirse en una reacción, aumentan notablemente su velocidad. Solamente aceleran las reacciones que espontáneamente podrían producirse. Ello hace posible que en condiciones fisiológicas tengan lugar reacciones que sin catalizador requerirían condiciones extremas de presión, temperatura o pH (Gaitán, *et al.*, 2007).

2.3.1 Tipos de enzimas

Las enzimas se pueden clasificar de dos maneras de acuerdo a su complejidad (Figura 2.4) y de acuerdo a su actividad (Cuadro 2.4).

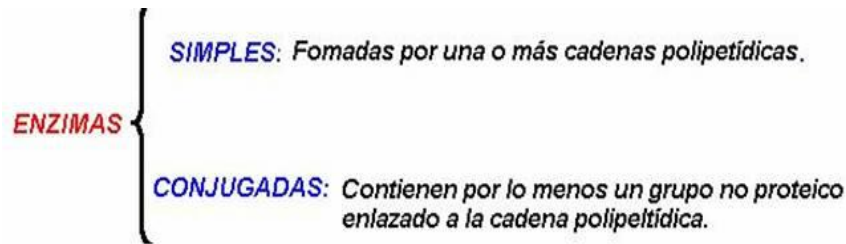


Figura 2.4. Clasificación de enzimas (Ovando, 2005).

En las enzimas conjugadas se pueden distinguir dos partes:

- Apoenzima: Es la parte polipeptídica de la enzima.
- Cofactor: Es la parte no proteica de la enzima (Eliécer, 2003).

Cuadro 2.4. Clasificación de enzimas según su complejidad (Marín, 2007).

| Tipo de enzimas | Actividad |
|-------------------------|--|
| <u>Hidrolasas</u> | Catalizan reacciones de hidrólisis. Rompen las biomoléculas con moléculas de agua. A este tipo pertenecen las enzimas digestivas. |
| <u>Isomerasas</u> | Catalizan las reacciones en las cuales un isómero se transforma en otro, es decir, reacciones de isomerización. |
| <u>Ligasas</u> | Catalizan la unión de moléculas. |
| <u>Liasas</u> | Catalizan las reacciones de adición de enlaces o eliminación, para producir dobles enlaces. |
| <u>Oxidorreductasas</u> | Catalizan reacciones de óxido-reducción. Facilitan la transferencia de electrones de una molécula a otra. Ejemplo: la glucosa, oxidasa cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. |
| <u>Tansferasas</u> | Catalizan la transferencia de un grupo de una sustancia a otra. Ejemplo: la transmetilasa es una enzima que cataliza la transferencia de un grupo metilo de una molécula a otra. |

2.3.2 Celulasa

La celulasa es *una glicosil hidrolasa*, producida por hongos y bacterias, así como también por algunos animales. Esta enzima posee un rol muy importante en la biosfera, ya que es responsable de la degradación de la celulosa, la que comprende la fuente de carbono más abundante en la tierra. Este polímero es un homopolisacárido (compuesto por un solo tipo de monómero) rígido e insoluble, que contiene hasta cientos de miles de unidades de glucosa, unidas mediante enlaces del tipo β -1,4-glucosídico (Marín, 2007). Pero además la configuración β le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, las cuales no se presentan aisladas sino unidas entre sí mediante enlaces de hidrógeno intramolecular formando una estructura supramolecular cristalina y organizada resistente a la hidólisis (Ovando *et al.*, 2005).

Estas enzimas han sido clasificadas según su actividad en: endoglucanasas, las cuales hidrolizan los enlaces 1,4- β –glucosídicos en forma aleatoria en el interior de la cadena; celobiohidrolasas o exoglucanasas, encargadas de hidrolizar los enlaces 1,4- β - glucosídicos, liberando celobiosa desde los extremos no reducidos de la cadena; y β -glucosidasas, que catalizan la hidrólisis de la celobiosa liberando β -D-glucosa. Los dominios catalíticos de las celulasas se encuentran en 16 familias de glicosil hidrolasas (Marín, 2007).

La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinergista de un grupo de celulasas, que presentan diferentes sitios de enlace, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa. El sistema de celulasa típico incluye tres tipos de enzimas: la endo- β -1,4-glucanasa, la exo- β 1,4-glucanasa y la β -1,4-glucosidasa (Montes *et al.*, 2002).

2.3.2.1 Microorganismos que favorecen a la producción de celulasa

2.3.2.1.1 Microorganismos aeróbicos y anaeróbicos

Las enzimas celulasas son producidas por una variedad de bacterias y hongos aeróbicos y anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Sin embargo, solo algunos de ellos producen enzima celulasa extracelular capaz de hidrolizar la celulosa (Carrera, 2002).

A partir de los hongos aeróbicos, tales como: *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium solani*, *Talaromyces emersonii* y *Trichoderma koningii*, se han obtenido los complejos celulolíticos utilizados en la mayoría de los estudios, debido a que presentan un sistema enzimático completo de celulasas capaces de degradar parcial o totalmente la celulosa en celobiosa y glucosa. Entre estos microorganismos, el hongo filamentoso *T. reesei* se caracteriza por la efectividad que tiene en la degradación de la celulosa nativa y cristalina con el complejo celulolítico que produce y secreta. Otros microorganismos productores de celulasas incluyen a los hongos aeróbicos termófilos (*Sporotrichum thermophile*, *Thermoascus aurantiacus* y *Hunicola insolens*, los hongos aeróbicos mesófilos (*Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis*, *Sphaeromonas communis*), las bacterias aeróbicas mesófilas y termofílicas (*Cellulomonas* sp., *Cellvibrio* sp., *Microbispora bispora* y *Thermomonospora* sp.), y las bacterias anaeróbicas mesofílicas y termofílicas (*Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Clostridium thermocellum*). Entre estos microorganismos, los termofílicos son de interés por su capacidad de producir enzimas celulolíticas termoestables, las cuales son en general estables bajo condiciones severas, incluso en niveles de pH altamente ácidos o alcalinos así como temperaturas de hasta 90°C (Castillo *et al.*, 1994).

Las enzimas celulolíticas producidas por las bacterias del género *Bacillus* presentan básicamente actividad endo- β -1,4-glucanasa y exo- β -1,4-glucanasa;

pero tienen una característica particular, en especial las enzimas producidas por *Bacillus subtilis* y es la resistencia a ser inhibida por la glucosa o celobiosa (Walker *et al*, 1991).

2.3.3 Modo de acción

La transformación de la celulosa por vía enzimática implica la acción de un sistema multienzimático, el complejo celulasas, constituido básicamente por tres enzimas: endoglucanasa, que ataca al azar enlaces β -1,4-glicosídicos de la cadena de celulosa; exoglucanasa o celobiohidrolasa, que actúa sobre el extremo no reductor de la cadena dando lugar a unidades de celobiosa, y β -glucosidasa, que hidroliza específicamente celobiosa para dar lugar a glucosa (Lojewska *et al.*, 2005) (Figura 2.5).

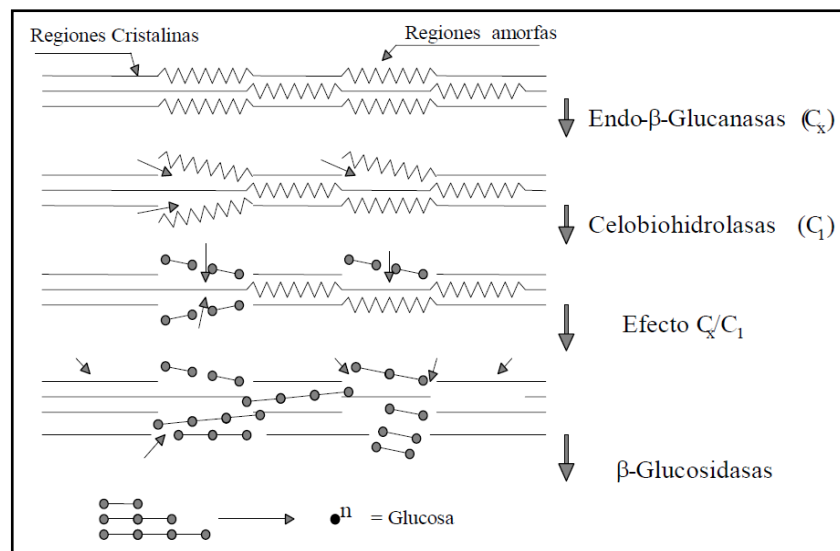


Figura 2.5. Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa (Torres *et al.*, 2009).

El mecanismo propuesto en la literatura para la degradación de la celulosa puede resumirse en tres etapas: Primero la endo β -1,4-glucanasa actúa al azar sobre los enlaces β -1,4 glucosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman la molécula de la celulosa, y convierte las cadenas largas a oligosacáridos, los cuales mantienen la configuración β de su estructura. La acción de esta enzima es sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa o sobre la superficie de las microfibrillas, y tiene como resultado la

disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos reactivos que sirven de sustrato para la posterior acción de C1.

En la segunda etapa la exo β -1,4-glucanasa, la cual es una enzima que corta la cadena 1,4 β -D-glucano a partir del extremo reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas, lo que provoca la remoción de unidades de celobiosa o glucosa. Ambas enzimas endoglucanasa y exoglucanasa son inhibidas por uno de los productos de la hidrólisis enzimática, la celobiosa, lo que disminuye la eficiencia de la hidrólisis.

Una vez degradadas las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucanasa y la exoglucanasa. Finalmente, una etapa que limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa mediante la acción de la β -1,4-glucosidasa C_b , porque las glucanasas son inhibidas por la celobiosa (Torres *et al.*, 2009). En la siguiente Figura 2.6 se muestra cada uno de los pasos descritos de la hidrólisis enzimática de la celulosa:

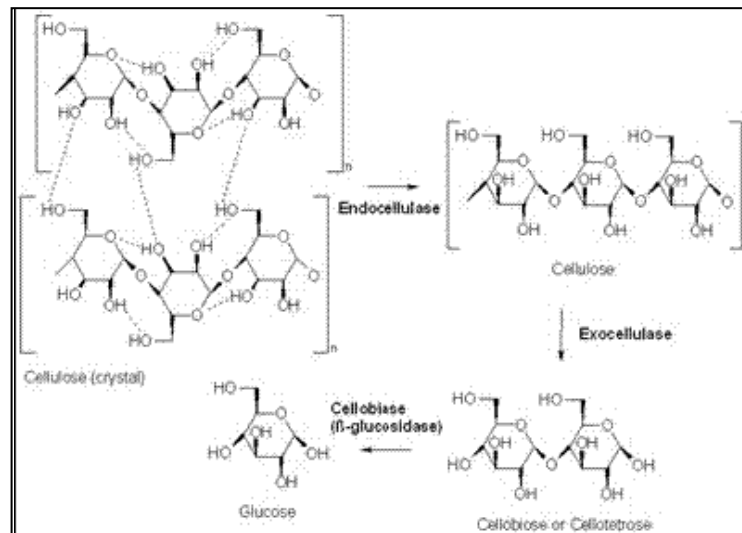


Figura 2.6. Hidrólisis enzimática de la celulosa (Torres *et al.*; 2009).

2.3.4 Caracterización físico-química de la celulasa

Poder producir la enzima celulasa conlleva muchas ventajas, tanto es así que existen laboratorios destinados a la producción de la misma para sus múltiples usos como en la industria alimentaria para consumo humano y alimento para animales. Con lo anterior es de requisito conocer las características específicas que se requiere para conseguir una adecuada producción de celulasa, por ejemplo el pH óptimo de desarrollo de los microorganismos productores de celulasa, su peso molecular, la concentración de sustrato y de inóculo necesarios para su obtención. Sin embargo de estos, cuatro son esenciales a considerar para la obtención de enzima:

- Concentración del sustrato (S): generalmente dado como porcentaje en peso del total de la masa de la mezcla de reacción. Es importante tomar en cuenta que ese porcentaje es sólo para la proteína presente en el sustrato.
- Relación enzima-sustrato (E/S): es la cantidad de enzima requerida en el proceso de hidrólisis de una proteína. Está dada como unidades de una actividad por Kg de sustrato.
- pH.
- Temperatura (Prado *et al.*, 1999).

2.3.5 pH y peso molecular

En el Cuadro 2.5 se muestra el pH al que se deben encontrar ciertas bacterias capaces de producir la enzima celulasa, y el cuadro 6 enlista los hongos capaces de producir dicha enzima:

Cuadro 2.5. Bacterias con alta actividad específica de celulasas (Gaitán *et al.*, 2007).

| Microorganismo | Actividad específica ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) | pH Óptimo |
|---------------------------------|--|-----------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | 514 | 5-7 |
| <i>Clostridium thermocellum</i> | 428 | 7 |
| <i>Streptomyces murinus</i> | 6.7 | 6 |
| <i>Bacillus macerans</i> | 5030 | 6 |
| <i>Bacillus sp.</i> | 369.6 | 9 |

Cuadro 2.6. Hongos con alta actividad específica de celulasas (Gaitán *et al.*, 2007).

| Microorganismo | Actividad específica ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) | pH Óptimo |
|---------------------------------|--|-----------|
| <i>Sclerotium rolfsii</i> | 475 | 3.3 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 194 | 5 |
| <i>Achlya bisexualis</i> | 7840 | 6 |
| <i>Orpinomyces sp.</i> | 3659 | 5.8 |
| <i>Rizhopus chinensis</i> | 4800 | ND |
| <i>Penicillium brefeldianum</i> | 405 | 4.2 |

El pH óptimo para la actividad de las celulasas producidas por bacterias abarca un amplio rango, el cual incluye condiciones alcalinas y acidas.

Utilizando la herramienta de EXPASY en Prot Param, se obtuvo el peso molecular (90759.0 g/mol) y el punto isoeléctrico (4.95) a partir de la secuencia de *Bacillus cereus*. El cálculo del peso molecular que da el programa, es únicamente la suma de los pesos de todos los residuos en la secuencia, sin embargo este programa no tiene en cuenta modificaciones como glicosilaciones o fosforilaciones, lo cual puede llevar a la obtención de resultados experimentales diferentes a los obtenidos en la teoría (Gaitán, *et al.*, 2007).

2.3.6 Sustrato

Las enzimas son más eficientes cuando las concentraciones de sustrato son excesivas en relación con las concentraciones de las enzimas. Donde el producto se obtiene a la máxima velocidad para la cantidad de enzima presente (Coutiño, 2011).

Existen dos modalidades para explicar la actividad enzimática en el sistema enzima-sustrato o bien llamado *llave-cerradura*:

- a) La enzima es capaz de orientar los sustratos, de tal forma que sus sitios reactivos queden cerca uno del otro y de los grupos catalíticos enzimáticos. Este hecho acelera la reacción química y se conoce como efecto de proximidad. Si se considera que los sustratos no son esféricos, la reacción sólo ocurrirá cuando las moléculas tengan la orientación adecuada. Este fenómeno tiene una contribución cualitativa importante en la catálisis enzimática, sin embargo, el efecto cuantitativo es difícil de evaluar.
- b) El sustrato, al acomplejarse con la enzima, origina una ligera deformación en ella hacia un arreglo inducido, que se puede sumar a la actividad catalítica (Prado, *et al.*, 1999).

En catálisis enzimática son posibles un sin número de fenómenos como catálisis covalente, electrostática, multifuncional, con efectos de solventes, entre otros, aunque con las ideas básicas del complejo enzima-sustrato y sitio activo es posible formular modelos cinéticos (Prado, *et al.*, 1999) que permitan orientar a cerca de lo que ocurre con respecto a la relación existente entre la enzima y el sustrato.

2.3.7 Inoculo

La selección de la fuente de la enzima (inoculo) dicta, en gran medida el éxito de la obtención de la misma e incluso su purificación. Aunque también es frecuente que para algunas personas interesadas en un tejido u organismo particular no hay forma de seleccionar la fuente de la enzima. Si la fuente no es tan importante, es posible seleccionar aquéllos organismos o tejidos que puedan ser obtenidos en grandes cantidades o incluso, cuando sea posible generar sobreproductores(Prado, *et al.*, 1999).

Antes de seleccionar la fuente es recomendable familiarizarse con las características de la enzima.

2.3.8 Cinética enzimática

2.3.8.1 Generalidades

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad de la enzima. La velocidad de una reacción catalizada por una enzima puede medirse con relativa facilidad, ya que en muchos casos no es necesario purificar o aislar la enzima. La medida se realiza siempre en las condiciones óptimas de pH, temperatura, presencia de cofactores y se utilizan concentraciones saturantes de sustrato (Vilches, 2006).

2.3.9 Interacción enzima-sustrato de la celulosa

Como la celulosa es un sustrato insoluble, sus características cinéticas difieren sustancialmente de las usuales reacciones homogéneas catalizadas por enzimas. En este caso, la hidrólisis enzimática se produce en medio

heterogéneo y envuelve las siguientes etapas: a) transferencia de las moléculas de enzima (E), de la solución acuosa a la superficie de sustrato de celulosa (S), b) formación del complejo enzima-sustrato (ES), previa adsorción de las moléculas de enzima sobre la celulosa, c) transferencia de las moléculas de agua hacia los centros activos del complejo (ES), d) reacción en la superficie del sustrato y transferencia de los productos solubles (P), glucosa y celobiosa, desde la superficie de la celulosa hasta el baño acuoso, e) descomposición de las cadenas de celobiosa en glucosa por medio de las β -glucosidasas (Morán, *et al*, 2008). E las Figuras 2.7, 2.8 y 2.9 se muestra la interacción que se lleva a cabo entre la enzima y el sustrato, además de la descripción del metabolismo de la celulasa.

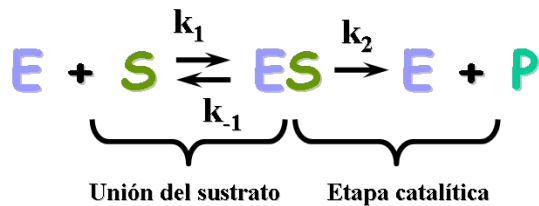


Figura 2.7. Interacción enzima-sustrato (Sun, 2004).

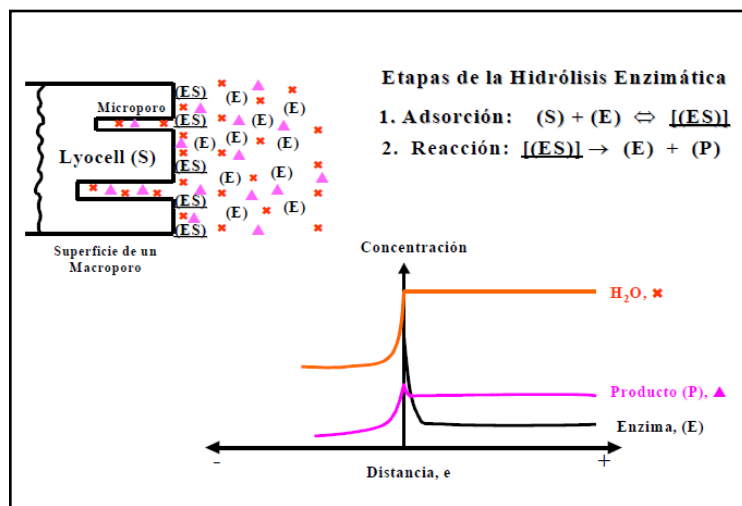


Figura 2.8. Etapas de la hidrólisis enzimatica (Sun, 2004).

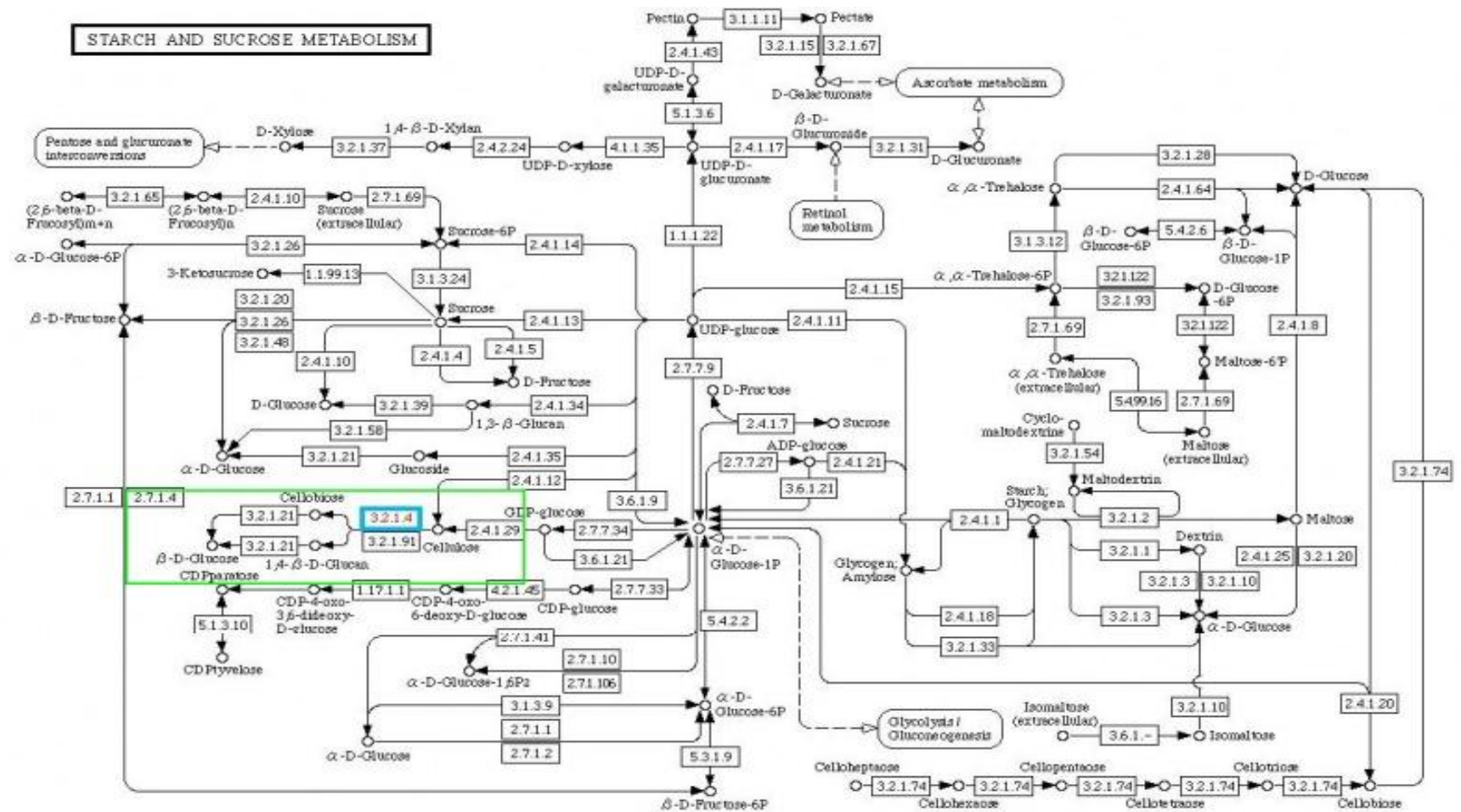


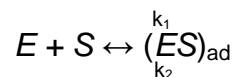
Figura 2.9. Metabolismo de la celulasa (Ovando *et al*; 2005).

Esta reacción catalítica no sólo se ve afectada claramente por el pH y la temperatura, sino que debe considerarse el efecto que producen la coexistencia de productos químicos en el baño de tratamiento (tensoactivos) o aplicados sobre el sustrato (colorantes) (Eliécer, 2003).

La especificidad de la catálisis hace que para el caso de las celulasas utilizadas para el tratamiento enzimático, las condiciones óptimas de pH y temperatura sean de 5-6 y 40-50 °C, respectivamente, variando en función del tipo de enzima a utilizar. Por lo tanto, la efectividad y reproducibilidad del tratamiento dependerá del control de estas dos variables (Sun, 2004).

2.3.10 Cinética de hidrólisis enzimática

Como la celulosa es un sustrato insoluble, sus características cinéticas difieren sustancialmente de las usuales reacciones homogéneas catalizadas por enzimas. La hidrólisis de un sustrato insoluble de celulosa requiere la adsorción previa de la enzima sobre el mismo. El proceso de adsorción/desorción puede ser descrito según:



Donde: E, representa la concentración de enzima, S, la del sustrato, $(ES)_{ad}$, la concentración de enzima adsorbido sobre el sustrato, y k_1 y k_2 son las constantes para la adsorción y desorción, respectivamente. La etapa de adsorción ha sido modelizada, por numerosos autores, por medio de la isoterma de Langmuir o por modificaciones de ésta. Si se considera la relación k_1/k_2 igual a la constante de adsorción K_{12} , el modelo de Langmuir puede escribirse:

$$E_{ad} = \frac{E_{sat} K_{12} E_f}{1 + K_{12} E_f}$$

Donde: E_{ad} , representa la concentración de enzima adsorbido en el equilibrio, E_{sat} , la cantidad de enzima adsorbido a saturación y E_f , la concentración de enzima libre en disolución en el equilibrio.

La ecuación cinética de Michaelis-Menten asume que la formación del complejo enzima-sustrato (ES) es un requisito previo para la reacción enzimática:



Donde: k_a y k_a' , representan las constantes directa y reversible de formación del complejo activado, respectivamente, k_b , la velocidad de reacción y P, el producto de reacción.

Si la relación enzima/sustrato es pequeña y las concentraciones de sustrato están comprendidas entre los límites de saturación, la velocidad de reacción inicial (v) puede expresarse:

$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$

Donde: V_m , representa la velocidad máxima de reacción (a saturación de enzima) y K_m , la constante media de saturación ($K_m = (k_a' + k_b)/k_a$).

La aplicación de la ecuación clásica de Michaelis-Menten permite calcular los parámetros de velocidad máxima de hidrólisis a saturación ($V_{m\acute{a}x}$) y la constante de media saturación (K_m), que proporcionan información útil sobre el mecanismo de hidrólisis. Sin embargo, si se toma en cuenta que la reacción se produce en un sólido hidratado, en el que es prácticamente imposible cambiar la concentración de los lugares específicos del sustrato, parece más conveniente establecer la velocidad de hidrólisis en función de la concentración de enzima que en función de la concentración de sustrato, tal

y como lo expresa la ecuación de Michaelis-Menten. Además, teniendo en cuenta que el efecto sinérgico del complejo enzimático desaparece a altas concentraciones de enzima, como las utilizadas normalmente en el ámbito industrial, es apropiado expresar la velocidad de reacción en función de la concentración de enzima. De forma análoga a la ecuación propuesta por Michaelis-Menten se puede calcular una velocidad máxima de hidrólisis a saturación ($V_{em\acute{a}x}$) y una constante de media saturación (K_e), según la siguiente ecuación:

$$v_0 = \frac{V_{em\acute{a}x} [E_0]}{k_e + [E_0]}$$

Donde:

V_0 : velocidad inicial de hidrólisis.

$V_{em\acute{a}x}$: velocidad máxima de hidrólisis a saturación de enzima.

k_e : constante de media saturación.

$[E_0]$: concentración inicial de enzima.

La modelización de la cinética de hidrólisis, incluyendo la etapa adsorción de enzima, ha ocupado un gran número de trabajos en el cual los modelos asumen que la velocidad inicial de hidrólisis es proporcional a la concentración del complejo enzima-sustrato formado (Morán *et al.*, 2008).

2.4 Enzimas en la nutrición animal

En los últimos años se han utilizado enzimas como aditivos en dietas para rumiantes debido al interés que se ha tenido por eficientar el aprovechamiento integral de los nutrientes que componen las raciones. El uso de las enzimas exógenas ha sido muy diverso pues se han implementado para aumentar la digestibilidad de los nutrientes, para complementar la actividad de las enzimas endógenas y para eliminar los factores anti-nutricionales de los nutrientes existentes (Classen *et al.*, 1991).

2.4.1 Enzimas fibrolíticas

Como ya se mencionó anteriormente las enzimas son proteínas globulares que catalizan reacciones químicas específicas en sistemas biológicos. Estas enzimas digestivas están involucradas en la transformación de macromoléculas complejas (celulosa, hemicelulosa, almidones, proteínas, etc.) presentes en las dietas de los rumiantes, en moléculas más simples (azúcares, péptidos, aminoácidos, etc.) y son esenciales para el animal, ya que las macromoléculas no se absorben directamente en el tracto digestivo a menos que sean degradadas a moléculas más simples (Dean, 2008).

El mecanismo de acción de las enzimas fibrolíticas exógenas es a través de la hidrólisis de algunos componentes de las plantas que impiden la digestión, incrementando por tanto el valor nutritivo de la ración. Por ejemplo, la celulosa es hidrolizada a través de un proceso complejo que involucra la acción de diferentes celulasas, incluyendo endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. En general, las endoglucanasas hidrolizan las cadenas de celulosa aleatoriamente para producir oligómeros de celulosa de varios grados de polimerización; las exoglucanasas hidrolizan la cadena de celulosa desde el lado no reducido produciendo celobiosa y las β -glucosidasas hidrolizan las cadenas cortas de celulosa y la celobiosa hasta glucosa (Beauchemin *et al.*, 2003).

2.4.1.1 Enzimas fibrolíticas en la alimentación del rumiante

Es conocido que las enzimas fibrolíticas pueden aumentar la digestibilidad de la dieta y en algunas investigaciones que se han realizado se ha mostrado que el resultado ha sido positivo. Se ha demostrado además que las enzimas mejoran la digestibilidad de la MS y fibra de las dietas en vacas lecheras (Beauchemin *et al.*, 1999, Rode *et al.*, 1999). También se han hecho estudios en donde se encontró que las enzimas fibrolíticas mejoraron la digestibilidad de la MS en estudios *in vitro* como en estudios *in situ*. Sin embargo, algunos investigadores no han logrado respuestas positivas similares cuando se utilizan enzimas fibrolíticas. Algunos investigadores

informaron que muchos factores deben ser considerados cuando se utilizan enzimas fibrolíticas ya que su utilización puede en determinado caso no influir sobre el rendimiento animal, debido a factores como: preparación de la enzima, cantidad de enzima, pre incubación, contenido de humedad del sustrato, y la interacción de la enzima con el sustrato (Beauchemin, 2002).

Varios estudios recientes han examinado el uso de productos de enzimas exógenas en las dietas de alto forraje para alimentar al ganado en crecimiento. Hay evidencia de que la adición de enzimas fibrolíticas a dietas de forraje puede mejorar la digestibilidad de la fibra, el incremento de la digestibilidad mejora el rendimiento del ganado el cual puede depender del estado fisiológico del ganado y las condiciones del experimento (Medina *et al.*, 2006).

2.4.2 Modo de acción de las enzimas en el rumen

En el rumen, la estrecha relación entre las bacterias y las partículas de alimento digestivo y enzimas digestivas se concentra cerca de sustratos específicos (Flores, 2006).

Cuanto mayor es la proporción de la dieta tratada con enzimas, mayores serán las probabilidades de que las enzimas perduren en el rumen. Si es estable la alimentación en el complejo de enzimas, las enzimas se solubilizan en el fluido ruminal y rápidamente el flujo del rumen (Rojo *et al.*, 2007).

Se mostró evidencia convincente de que la aplicación de enzimas para alimentar, causa cambios estructurales que se producen, con la alimentación más susceptible a la degradación de la pared celular en las ganancias del rumen de una manera erosiva, y es bien sabido que una limitación importante para la digestión es la colonización y penetración limitada de los microbios celulolíticos y sus enzimas hidrolíticas sobre las superficies expuestas de los piensos (Beauchemin *et al.*, 2002).

La respuesta positiva resultante en cuanto a producción con la utilización de aditivos enzimáticos se atribuye a los efectos ruminales, es decir, con la adición de las enzimas a la dieta aumenta la capacidad hidrolítica en el rumen por la unión bacteriana a las partículas de alimento. A lo anterior se une, la estimulación de las poblaciones microbianas del rumen y los efectos sinérgicos con hidrolasas de los microorganismos ruminales (Colombatto *et al.*, 2002). Todo lo anterior mejora la digestibilidad de la dieta ofrecida, debido a que la actividad enzimática aumenta en el rumen.

El aumento de la capacidad hidrolítica del rumen también puede conducir a un aumento de la digestibilidad de la fracción de carbohidratos, además de aumentar la digestibilidad de los componentes de la fibra de la dieta, lo que explica por qué enzimas fibrolíticas pueden ser eficaces en las dietas de alto concentrado (Beauchemin *et al.*, 2002).

2.4.3 Actividades enzimáticas involucradas en la digestión de la pared celular

La medición de actividades enzimáticas debe llevarse a cabo bajo condiciones estrictas, con respecto a la temperatura, pH, fuerza iónica, concentración de sustrato, y el tipo de sustrato; todos estos factores afectan a la actividad de una enzima (Ramírez *et al.*, 2004), por lo cual es necesario dar las condiciones óptimas para su mejor y mayor actividad.

Las actividades enzimáticas de los productos comerciales más comunes, son medidas proporcionando al microorganismo las características adecuadas en el medio ambiente en el cual tienen su actividad (Torres, *et al.*, 2009). La mayoría de las enzimas comerciales necesita una temperatura de aproximadamente 60 ° C y un pH entre 4 y 5 (Coughlan, 1985). Sin embargo, la temperatura óptima y pH para evaluar la actividad enzimática no son representativos de las condiciones en el rumen, que son más cercanas a un pH de 6,0 a 6,7 y 39 ° C (Van Soest, 1994). Así, las actividades citadas para los productos enzimáticos comerciales son

considerablemente más altos que para los que miden un pH y una temperatura similar a la del rumen. Además, debido a las condiciones de los ensayos y el método de expresar la actividad enzimática varía entre los fabricantes, es difícil comparar los productos enzimáticos o predecir la eficacia del producto (Beauchemin *et al.*, 2002).

2.4.4 Enzimas exógenas

2.4.4.1 Impacto de enzimas exógenas sobre la fermentación ruminal

Los efectos de algunas enzimas fibrolíticas exógenas sobre la degradación de forraje son sustanciales, por lo tanto, se considera importante examinar los cambios en la formación de productos finales de la fermentación. El aumento de GP y degradación de la MS se espera que conduzca a un incremento importante en la producción de AGV, sin embargo, los cambios en la porción molar de AGV pueden ser inconsistentes debido a que estos están en función de las actividades enzimáticas suministradas por la enzima fibrolítica exógena y su impacto en la degradación ruminal de la fibra y forraje en actividades microbianas (Marín, 2007).

2.4.5 Grado de inclusión de enzima en la dieta del rumiante

Desde años atrás se han hecho estudios tomando diferentes niveles de aplicación de enzimas y se han obtenido respuestas no lineales para ganado de carne en crecimiento (Beauchemin *et al.*, 1995). En un estudio, se utilizó heno de alfalfa y el ganado alimentado aumentó en un 24 a 30% con menores niveles de enzima añadida (0,25 a 1 ml / kg de MS) como resultado del aumento de la ingesta, pero niveles más altos de enzima (2 y 4 ml / kg de MS) no fueron eficaces. Con heno timothy, un nivel alto (4 ml / kg de MS) de las enzimas exógenas se mejoró la GDP de ganado en un 36% como resultado de un aumento del 17% en la

digestibilidad de la FDA y un aumento del 14% en el consumo de MS digestible (Padrón *et al.*, 2010). Otros autores mencionan que el nivel óptimo de la adición de enzimas depende del sustrato, lo cual indica la necesidad de determinar los ritmos de aplicación óptimos de cada preparado para sustratos o alimentos específicos (González, 2004).

2.4.6 Método para proporcionar la enzima en los rumiantes

La aplicación de enzimas fibrolíticas exógenas en una forma líquida sobre el alimento antes de su consumo puede tener un efecto positivo en el rendimiento animal según estudios que se han realizado (Beauchemin, *et al.*, 2002). En contraste, en otras investigaciones la inclusión de las enzimas en el rumen no ha sido eficaz (Sutton *et al.*, 2001). La estrecha asociación de enzimas con la alimentación puede permitir alguna forma de ataque pre digestible de las enzimas sobre la fibra de la planta y / o potenciar la unión de las enzimas a la alimentación, lo que aumenta la resistencia de las enzimas a la proteólisis en el rumen (Montes *et al.*, 2002).

Aparentemente, hay poco o ningún requisito para una fase de reacción o tiempo de incubación entre el tratamiento y la alimentación de forrajes. Pero en un estudio se observó un aumento en la digestibilidad en el total del tracto digestivo cuando una solución de enzimas se aplicó a heno antes de la alimentación, pero no había diferencia entre aplicar la enzima inmediatamente antes de la alimentación o en un período de incubación de 24 horas (Lewis, 1996). También se han realizado estudios *in vitro* que han reportado resultados similares (Colombatto, 2000).

Se puede esperar que las enzimas exógenas sean más eficaces cuando se aplica a alimentos de alta humedad (por ejemplo, ensilajes) en comparación con los piensos secos, debido al mayor contenido de humedad. El requisito de agua en la hidrólisis de azúcares solubles a partir de polímeros complejos es un principio fundamental bioquímico. Además, los valores de pH de ensilaje son por lo general óptimos para la mayoría de

las enzimas fúngicas. Sin embargo, en la práctica, algunas enzimas exógenas son más eficaces cuando se aplican en forma líquida al forraje seco en comparación con el forraje húmedo (Beauchemin *et al.*, 2002). Feng *et al* citado por (Beauchemin-1996) aplicaron una solución de enzima directamente a la hierba y no se observó ningún efecto cuando se añadió al forraje fresco o marchito, sin embargo, cuando se aplicó a la hierba seca, las enzimas incrementaron la digestibilidad de MS y fibra.

2.4.7 Variabilidad en la respuesta animal

En general, los resultados con ganado vacuno y vacas lecheras indican una respuesta positiva a las enzimas, pero los resultados son variables. Aunque esta variabilidad puede ser vista como una indicación de que los aditivos enzimáticos no son una tecnología adecuada para rumiantes, se cree que gran parte de la variabilidad puede atribuirse a factores como el tipo de enzima, el nivel de suplementación, método de aplicación de enzima, la energía y equilibrio de los animales de ensayo (Beauchemin, 2007).

De igual manera en ovinos y caprinos las respuestas han sido variables, pues se han obtenido resultados muy heterogéneos; en un estudio realizado en ovinos se utilizó una mezcla de enzimas fibrolíticas (celulasa y xilanasas), adicionadas a un alimento granulado, se agregó aproximadamente 0.5g/d de enzima al alimento, en ovejas lecheras de dos razas distintas con diferente nivel de ingestión y producción de leche. La comparación de ambas razas se realizó en los periodos de cría y ordeño, lo que permitió el estudio de los efectos de las enzimas en condiciones muy diversas. Los resultados que se obtuvieron indicaron la ausencia de efectos significativos en la ingestión, producción y composición de leche de los dos tipos de ovejas y condiciones productivas (Caja *et al.*, 2003).

En otro estudio se alimentó ovinos de engorda adicionando al alimento una mezcla de enzimas amilolíticas, celulolíticas y proteolíticas (Agrozyme®, 1.5, 3 y 6g/d) y al finalizar la prueba no se afectó la conversión

o la GDP en los ovinos alimentados con una mezcla de maíz molido y heno de alfalfa. De igual manera en otra investigación se avalúo a ovinos suplementados con enzimas fibrolíticas y los resultados fueron semejantes a la anteriores pues no hubo efectos sobre la GDP ni sobre el consumo de alimento, las raciones estuvieron basadas en heno de alfalfa y cebada (González, 2004).

Y como se mencionó anteriormente los resultados al probar las enzimas en especies rumiantes han sido inconsistentes, debido a que son numerosos factores los que intervienen en la evaluación de las mismas, como por ejemplo la composición de la ración que se ofrece a los animales, el tipo de preparado enzimático usado, el complemento de las actividades enzimáticas, el nivel de enzima suministrado y el método y momento de la aplicación a la ración (Caja *et al.*, 2003).

2.4.8 Nivel de productividad animal

De acuerdo a lo mencionado anteriormente se pudo observar que el uso de un producto de enzimático mejoró la digestibilidad de la dieta cuando se evaluó en las vacas lecheras, pero no en las ovejas. Estos resultados indican que las enzimas exógenas y fibrolíticas mejoran la digestión de la alimentación cuando la digestibilidad potencial de la dieta no es alcanzada, porque la digestión se ve afectada. Esta es la "pérdida" de la energía digestible que se capta con el uso de enzimas para alimentación animal (Beauchemin, 2007).

En atención a lo anterior su puede inferir que la tecnología enzimática existente tal vez puede que no beneficie a los rumiantes alimentados en mantenimiento (Rojo *et al.*, 2007), sino que la mayor respuesta puede ser obtenida en rumiantes que estén siendo alimentados para obtener su productividad máxima o rumiantes que estén en crecimiento y aún no hayan llegado a su etapa adulta.

2.4.9 Uso de complejos enzimáticos para la degradación de fibra en el rumen utilizando nopal como base de la dieta en rumiantes

Se adicionaron enzimas, específicamente celulasas y xilanasas para probar su efecto sobre la degradabilidad *in situ* de la materia seca, fibra detergente neutra y fibra detergente ácida residual en dos dietas con harina de *Opuntia ficus-indica*, variedad Itálica (10 y 33.3%), así como la determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles con diferentes niveles de enzimas, dando como resultado efectos no significativos en el incremento de la degradación de la fibra de la harina, pero al mismo tiempo se mostró efecto significativo sobre el incremento de ácidos grasos volátiles, aunque fue sólo en la dieta que incluyó el 33.3% de la inclusión de harina de nopal (Nazareno *et al.*, 2011).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción de la ubicación del área de investigación

La presente investigación fue llevada a cabo en las instalaciones del Laboratorio de producción animal y en la unidad metabólica ubicada dentro de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, la cual se localiza en Buenavista, Saltillo, Coahuila, a 8km de la ciudad. Sus coordenadas geográficas son 25°20´ latitud norte y 101°26´ longitud oeste, con una altura promedio de 1,752msnm.

El presente trabajo de investigación se desarrolló en tres etapas, las cuales se describen a continuación:

3.2 Etapa I. Activación de la cepa VML-2 y obtención del inóculo

3.2.1 Material Biológico

El microorganismo utilizado para llevar a cabo el presente estudio fue la cepa VML-2 (Vaca Alimentada con Masilla y Levadura), la cual pertenece al cepario del Departamento de Producción Animal, misma que fue identificada y purificada por Valdez (2010).

3.2.2 Preparación del medio de cultivo sólido y siembra de la cepa VML-2

Se preparó medio sólido, agar Shaelder (BD BBLTM), siguiendo las especificaciones indicadas por el proveedor. En agua destilada se disolvió 4.186g de agar por cada 100ml de agua destilada, en un matraz Erlenmeyer de 250ml a flama de mechero, una vez disuelto y con aspecto cristalino se esterilizó en autoclave a 121°C, el tiempo para la esterilización fue de 15 minutos a una presión de 15Lb. Una vez esterilizado el medio se prosiguió a

vaciar este en 10 cajas Petri estériles, cada caja almacenó 20ml de agar, al solidificarse el medio se sembró en un área desinfectada a nivel de mechero por el método de estriado. Sembrada la bacteria se colocó en una incubadora (Felisa®) durante 96 horas en condiciones anaeróbicas ajustándose la temperatura a 39°C para lograr su adecuado desarrollo.

3.2.3 Tinción de Gram y obtención del inculo

Transcurridas las 96 horas de incubación de la bacteria se retiraron las cajas Petri de la incubadora para llevar a cabo la prueba de tinción de Gram y poder comprobar la morfología microscópica de la bacteria, la obtención de muestra de cada una de las cajas Petri fue llevada a cabo en un área previamente desinfectada. Una vez identificada la morfología de las bacterias obtenidas se adicionó con micropipeta 2ml de agua destilada a 3 cajas Petri seleccionadas recuperando de cada una de ellas 1ml.

3.3 Etapa II. Fermentación para la obtención de extracto enzimático

3.3.1 Preparación del medio líquido e incubación del inculo

Se preparó un medio líquido específico para la producción de la celulasa (cuadro 7) empleando como única fuente de carbono la carboximetilcelulosa (CMC).

Cuadro 3.1. Composición del medio líquido específico para la producción de celulasa.

| Componente | Cantidad (%) |
|--|--------------|
| NaCl | 0.5 |
| NaNO ₃ | 0.3 |
| KCL | 0.5 |
| Fuente de C (celulosa) Carboximetil celulosa de sodio (GOLDEN BELL) | 1.0 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.2 |
| MgSO ₄ | 0.01 |

Inmediatamente después de que se preparó la solución salina en conjunto con la CMC se incubó en la misma 1ml de inculo bacteriano de la

cepa VML-2, se colocó en una incubadora a 39°C durante 96 horas en condiciones de anaerobiosis.

3.4 Etapa III. Evaluación del comportamiento productivo en ovinos

3.4.1 Animales utilizados

Se utilizaron 15 ovinos hembras, 5 ovinos por tratamiento, todas de raza criolla, con una edad promedio aproximada de 1 año 6 meses, todas provenientes del ejido Buñuelos el cual se encuentra ubicado al sur de Coahuila, tiene una altitud de 1953 metros sobre el nivel del mar, las coordenadas geográficas son 23°03'01'' latitud Norte y 101°10'59'' longitud Oeste.

3.4.2 Tratamientos

En el experimento se evaluaron tres tratamientos, se avalúo el efecto de una enzima comercial y el extracto enzimático producido en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; el tratamiento 1 (T1) fue el tratamiento testigo que fueron animales alimentados con una dieta a base de nopal sin adicionar ninguna enzima al nopal, el tratamiento 2 (T2) animales alimentados con una dieta a base de nopal adicionando a este 40 minutos antes de ser ofrecido a los animales una enzima celulasa comercial, el tratamiento 3 (T3) animales alimentados con una dieta a base de nopal agregando al nopal extracto enzimático de celulasa 40 minutos antes de ser ofrecido a los animales.

3.4.3 Preparación de los animales

Antes de iniciar el experimento se pesó cada uno de los animales, además fueron vacunados contra edema maligno, carbón sintomático y pasteurella e igualmente todos fueron desparasitados.

3.4.4 Prueba de alimentación

La prueba de alimentación tuvo una duración de 45 días, la dieta base ofrecida a los animales se presenta en el cuadro 3.2.

Cuadro 3.2. Formula alimenticia para los diferentes tratamientos.

| INGREDIENTE | % DE INCLUSIÓN | % MS |
|-----------------|----------------|------|
| Avena (Forraje) | 17 | 91 |
| Nopal | 13 | 7.6 |
| Maíz | 24 | 88 |
| Sorgo | 24 | 90 |
| Harinolina | 10 | 91 |
| Soya | 5.8 | 89 |
| Calcio | 0.5 | 0 |
| Melaza | 5.7 | 75 |

La dieta fue formulada en base al contenido nutricional de las tablas del NRC (2000).

El alimento se ofrecía a las 9:00am y a las 4:00pm, el volumen ofrecido se ajustaba de acuerdo al consumo de los animales. Todo el alimento rechazado se retiraba y se daba alimento fresco.

3.4.5 Variables determinadas en el experimento

Las variables analizadas en el experimento fueron las siguientes:

- a) Comportamiento productivo
 - Consumo diario de materia seca (CDMS)
 - Ganancia diaria de peso (GDP)
 - Conversión alimenticia (CA)
- b) Metabolitos en suero sanguíneo
 - Glucosa
 - Urea
 - Creatinina
 - Colesterol
 - Proteínas totales

c) Concentración de AGV'S

→ Acético

→ Propiónico

→ Butírico

d) pH

3.4.6 Comportamiento productivo

En una bitácora se anotaba diariamente el alimento que era ofrecido a cada uno de los animales ajustándose al consumo de cada unidad experimental, al retirar cada mañana el alimento rechazado éste se pesaba, de esta manera se obtuvo por diferencia el CDMS (alimento ofrecido menos alimento rechazado).

Como ya se mencionó los animales fueron pesados antes de iniciar la prueba y al finalizar el experimento se pesaron de nuevo, y en base a esta diferencia se determinó la GDP. Para determinar la conversión alimenticia se utilizaron las variables anteriores dividiendo CDMS/GDP.

3.4.7 Determinación de metabolitos

Se extrajo una muestra de sangre de cada unidad experimental para determinar los metabolitos sanguíneos, estas muestras fueron obtenidas al finalizar el experimento. Las muestras se extrajeron de la vena aorta ubicada en el cuello de los animales. Para cada muestra se utilizaron las técnicas propuestas por los laboratorios RANDOX, y WIENER LAB.

3.4.8 Determinación de AGV's

Para determinar la concentración de ácidos grasos volátiles se extrajo líquido ruminal de cada uno de los animales, la extracción fue llevada a cabo al finalizar la prueba. La técnica utilizada correspondió a las técnicas según Tejada (1992) y Castellanos *et al.* (1990).

3.4.9 Determinación de pH

Una vez que se terminó la prueba de comportamiento, a los 45 días, se procedió a extraer líquido ruminal, con una bomba de vacío, de cada

uno de los ovinos de los diferentes tratamientos inmediatamente después de ser extraída la muestra se midió con un potenciómetro el pH de cada muestra y se registró en la bitácora para su posterior análisis estadístico.

3.4.10 Análisis estadístico

Las variables correspondientes a comportamiento productivo (CDMS, GDP y CA) en conjunto con metabolitos sanguíneos (creatinina, urea, colesterol, glucosa y proteínas totales) y concentración de AGV'S se analizaron conforme a un diseño estadístico de bloques completamente al azar, bloqueando por edad y peso. Todas las variables fueron analizadas utilizando la prueba de Tukey mediante el Minitab 16 Statistical Software.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Comportamiento productivo

Una vez que se concluyó la prueba de comportamiento se analizaron los datos obtenidos para comportamiento productivo, los cuales se muestran en el Cuadro 4.1.

Cuadro 4.1. Análisis estadístico de las variables de comportamiento productivo

| Variables | Tratamientos | | |
|-----------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | T1 | T2 | T3 |
| CDMS g/d* | 1,114 ^a | 1,138 ^a | 1,219 ^a |
| GDP g/d* | 174 ^a | 208 ^a | 228 ^a |
| CA Kg* | 7.10 ^a | 5.50 ^a | 5.80 ^a |

*CDMS: Consumo diario de materia seca, *GDP: Ganancia diaria de peso, *CA: Conversión alimenticia.

Como se puede observar no hay diferencia significativa ($P>0.05$) en ninguna de las tres variables, CDMS, GDP Y CA, sin embargo podemos observar que en los tres casos existen tendencias, es decir la variable CDMS muestra que en el T1 donde no hubo inclusión de ninguna enzima el resultado que se produjo fue menor (1,114 g/d) que en el T2 (1,138 g/d) y T3 (1,219 g/d). Se puede inferir con estos datos que a pesar de que no hay diferencia significativa entre tratamientos sí existe un efecto positivo, aunque mínimo, en los ovinos a los cuales se les ofreció el nopal (*Opuntia ficus indica*) asperjada con EC (T2) y la EU (T3). En la Figura 4.1 el efecto no significativo ($P>0.05$) en las variables CDMS, GDP entre los tres tratamientos.

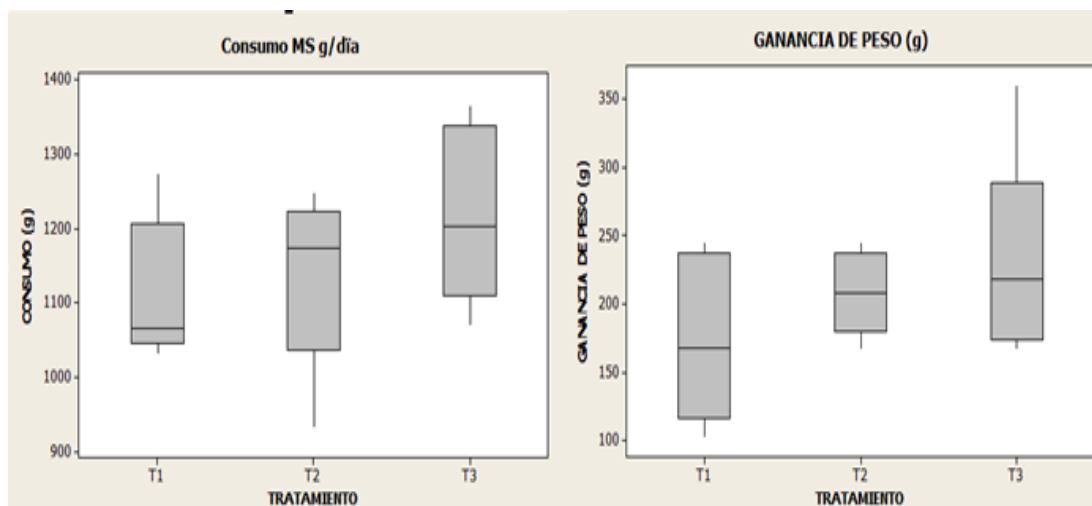


Figura 4.1. Gráficas de cajas de las respuestas productivas en ovinos de las variables CDMS y GDP.

En estas gráficas de caja se puede apreciar lo mencionado anteriormente, cada caja representa las cinco repeticiones de cada tratamiento, y el hecho de que cada una en algún punto coincida con las demás indica que no hay diferencia significativa entre tratamientos como también lo muestra la Figura 4.2.

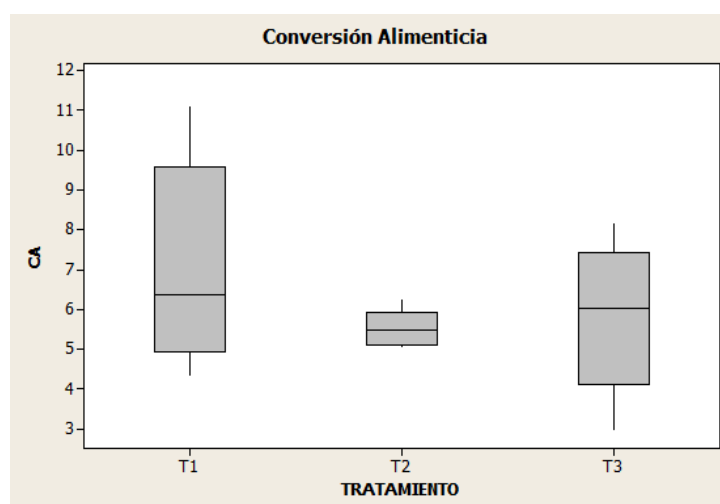


Figura 4.2. Gráfica de caja de la respuesta productiva en ovinos de la variable CA.

Como ya se mencionó anteriormente, es conocido que los procesos para obtener un hongo puro como: *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium solani*, *Talaromyces emersonii* y *Trichoderma koningii* (Castillo et al., 1994) o una bacteria pura tales como la *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides succinogenes*, *Rominococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y

Clostridium thermocellum (Castillo *et al.*, 1994) capaces de producir una enzima en particular son muy estrictos y específicos, debido a que se necesitan condiciones óptimas de pH, temperatura y un medio específico para su producción y obtención del producto esperado que es la enzima que se requiera producir. De acuerdo a Eliécer (2003) las enzimas se obtienen por fermentación en cultivos semi-sólidos, sumergidos, extracción de tejidos ya sea en plantas o animales bajo condiciones controladas, lo cual indica que se requiere de seguir una metodología de normas estrictas establecidas.

En este contexto también se puede obtener, de acuerdo a los resultados arrojados por el análisis estadístico que el extracto enzimático, producida dentro de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro tiene efectos similares que la enzima comercial probada, dando como resultado preliminar que a pesar de que no se cuenta con la tecnología más sofisticada para la producción de la enzima celulasa a nivel laboratorio, sí se produjo una enzima capaz de competir a nivel comercial con enzimas obtenidas en laboratorios que siguen procesos rigurosos estandarizados.

El extracto enzimático de celulasa obtenido a través de un proceso metódico seguido en el laboratorio de la Universidad tuvo la finalidad de ser un previo degradador del carbohidrato más abundante en el mundo que es la celulosa. En referencia a esto la celulasa actúa sobre la celulosa de una manera específica para llevar a cabo la degradación de este compuesto por vía enzimática, la celulosa está constituida básicamente por un complejo multi-enzimático de tres enzimas: endoglucanasa, que ataca al azar enlaces β -1,4-glicosídicos de la cadena de celulosa; exoglucanasa o celobiohidrolasa, que actúa sobre el extremo no reductor de la cadena dando lugar a unidades de celobiosa, y β -glucosidasa, que hidroliza específicamente celobiosa para dar lugar a la glucosa (Lojewska *et al.*, 2005).

Haciendo referencia a lo anterior la finalidad de tener una degradación previa del nopal era proporcionar a los microorganismos alojados específicamente en el rumen, monómeros de glucosa que les permitiera

agilizar los procesos metabólicos y generar energía al rumiante de una manera más eficiente, ya que estos son los encargados de producir en su mayor parte la energía que requiere el animal para llevar a cabo los procesos metabólicos como la glucólisis, ciclo de Krebs y transferencia de electrones, logrando con esto una mayor eficiencia alimenticia, así como la obtención de un alimento con mayor valor nutritivo, es decir, el nopal que fue el ingrediente alternativo, tuviera para los microorganismos del rumen los carbohidratos con mayor disponibilidad y que se pudiera aprovechar de él con más eficiencia el contenido de nutrientes, y así al formar la dieta integral la cual proveyera al rumiante lo necesario para su mantenimiento y producción.

Conjuntamente hay diferentes motivos que sugieren la necesidad de implementar tecnologías que ayuden a la mejor digestión de los nutrientes que se ofrecen al rumiante, como puede ser la aplicación de una enzima, como por ejemplo:

- La digestibilidad de la materia orgánica en rumiantes raramente supera el 90% y resulta con frecuencia considerablemente menor.
- Se dispone actualmente de nuevos alimentos para rumiantes, muchos de ellos subproductos de baja calidad, en lo que las enzimas pueden ser de especial utilidad para mejorar sus posibilidades digestivas (Torres *et al.*, 2009).

Y lo que se busca optimizar en la alimentación de los rumiantes para mejor aprovechamiento de los nutrientes ofrecidos en las dietas o lo que buscan las estrategias nutricionales básicas es:

- Maximizar la fermentación de los carbohidratos que son imposibles de digerir en el intestino delgado.
- Minimizar la fermentación de carbohidratos que son digeridos y absorbidos en el intestino delgado.
- Maximizar la síntesis de proteína microbiana a partir de nitrógeno no proteico (NNP).
- Minimizar la degradación de proteína alimenticia a nivel ruminal (Morán *et al.*, 2008).

Retomando el análisis del cuadro de resultados 9 se pudo observar que no hubo diferencia significativa entre tratamientos cuando se evaluó la GDP, denotando que al igual que en el CDMS hubo tendencias en las cuales se observó que el T1 (1,746 g/d) fue el menos eficiente en comparación con los demás T2 (2,084 g/d) y T3 (2,282); estos resultados coinciden con Titi y Lubbadah (2004) quienes probaron una suplementación con una mezcla de enzimas celulolíticas en una ración de ovejas de raza Awassi, en donde no se presentaron efectos sobre el consumo diario de materia seca (CDMS), además en otro estudio realizado por Treacher *et al* (1996) en rumiantes, en donde se aplicó un preparado enzimático para degradar celulosa empleado por medio de aspersión diariamente a la base de fibra de la ración, no se observaron efectos sobre la ganancia de peso, sin embargo sí hubo un aumento en la ingestión del alimento.

Fue en la década de los 60's cuando por primera vez se emplearon las enzimas como degradadores previos del alimento ofrecido a rumiantes (González, 2004), y fue entonces cuando se llevó a cabo un estudio donde se probó una mezcla de enzimas amilolíticas, celulolíticas, y proteolíticas (Agrozime[®]; 1.5, 3 y 6 g/d) además de que se agregó una enzima proteolítica eficaz (Ficin[®], Merck and Company; 5, 10 y 20 g/d) y sin embargo no hubo diferencia en la ganancia media diaria de peso (GMD o GDP) en los ovinos de engorda alimentados con la suplementación de ambas enzimas, cabe mencionar que la mezcla enzimática se aplicó a toda la dieta de los mismos (Theurer *et al.*, 1963). Igualmente no se encontraron efectos en el consumo de alimento y la GDP en borregos suplementados con enzimas fibrolíticas a raciones basadas a heno de alfalfa (González, 2004).

Recordando lo mencionado anteriormente, se hizo también para la variable de conversión alimenticia (CA) el análisis estadístico en donde no se encontró diferencia significativa entre tratamientos y que al igual que el CDMS y GDP se mostró una tendencia y los tratamientos 2 (550 g/d) y 3 (580 g/d) dieron mejores resultados que en el T1 (710 g/d). Estos resultados coinciden con Sánchez *et al* (1996) en donde probó el efecto que tendría la suplementación del ensilado de maíz con enzimas fibrolíticas (celulasas y

xilanasas) en rumiantes, la enzima se utilizó en diferentes concentraciones, y finalmente no se observó la relación esperada entre dosis-respuesta en los animales, pues no hubo diferencia significativa entre tratamientos en cuanto a conversión alimenticia (CA) o índice de conversión (IC), de la misma forma evaluaron CDMS y GDP, en las cuales tampoco se reportó diferencia significativa entre tratamientos.

Cabe mencionar que son muchos los factores que intervienen para poder hacer un análisis integral del nopal (*Opuntia ficus indica*) en conjunto con la enzima, sin embargo cada vez se está más cerca de poder inferir con más exactitud el uso ideal de la enzima sobre la fibra y cómo beneficiar aún más a cualquier rumiante en su proceso digestivo, pues hay autores que afirman que “las enzimas exógenas podrían afectar la utilización de los alimentos en rumiantes tanto a través de sus efectos en el alimento, antes de ser consumidos, como a través de un estímulo en la digestión en el rumen y/o en el tracto digestivo pos-ruminal” (González, 2004). Otros autores además mencionan que la finalidad de las enzimas fibrolíticas y de las enzimas exógenas es eliminar los factores antinutritivos de los alimentos, como se mencionó con anterioridad, además de aumentar la digestibilidad de los nutrientes, y complementar la actividad de las enzimas existentes en el sistema digestivo de cada animal (Bedford, 1993); otros mencionan que su uso ha logrado mejorar la digestibilidad ruminal y aumentar la producción de leche o el crecimiento de los rumiantes (Yang *et al.*, 1999); se tiene la posibilidad de crear a menor costo un extracto enzimático que sea tan eficiente como enzimas ya ubicadas en el mercado que puedan dar un valor agregado a esos ingredientes alternativos como el nopal y generar beneficios tanto a quienes son encargados de producir el extracto enzimático como al productor de cualquier especie animal y finalmente al consumidor.

4.2 Metabolitos en suero sanguíneo

Al finalizar la prueba de comportamiento se analizaron las muestras sanguíneas de cada ovino, los resultados se presentan en el Cuadro 4.2.

Como se puede observar no hay diferencia significativa ($P > 0,05$) entre tratamientos para ninguna de las variables que se consideraron. Estos

resultados coinciden con los arrojados en el estudio de Knowlton *et al* (2002), el cual estudió el efecto de la adición de enzimas, las vacas a las cuales se les aplicó el alimento con la enzima se encontraban al inicio o al final de la lactación y éstas tenían una dieta a base de forraje que se incluían en la ración al 45 y 61% respectivamente. En este estudio se pudo denotar que la GDP mejoró en los animales suplementados con la enzima pero que estos efectos no pudieron ser respaldados con el incremento de los residuos analizados en la sangre, metabolitos, ellos no encontraron diferencia significativa entre tratamientos cuando evaluaron la urea y el fósforo que se encontraba en las muestras de sangre de las vacas evaluadas.

Cuadro 4.2. Concentración de metabolitos sanguíneos de ovinos de raza criolla alimentados con una dieta a base de nopal y enzima celulasa.

| Variables | Tratamientos | | |
|-------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| | T1 | T2 | T3 |
| Glucosa mg/dl | 31.9 ^a | 28.9 ^a | 37.3 ^a |
| Urea mg/dl | 10.7 ^a | 21.8 ^a | 26.2 ^a |
| Proteínas totales mg/dl | 34.4 ^a | 37.7 ^a | 41.3 ^a |
| Colesterol mg/dl | 160.0 ^a | 116.4 ^a | 188.6 ^a |
| Creatinina mg/dl | 9.1 ^a | 8.4 ^a | 6.3 ^a |
| Calcio mg/dl | 8.8 ^a | 7.8 ^a | 11.1 ^a |
| Fósforo mg/dl | 2.5 ^a | 1.7 ^a | 2.2 ^a |

En otro estudio llevado a cabo por Hristov *et al* (2000), el cual evaluó la digestibilidad aparente incluyendo MS (materia seca), PB (proteína bruta) y la FDN (fibra detergente neutra), además de evaluar la excreción urinaria de alantoína y ácido úrico y conjuntamente la concentración de glucosa y urea en sangre en becerras novillonas. Este estudio no se mostró ningún efecto significativo en ninguna de las variables mencionadas anteriormente incluyendo las concentraciones de glucosa y urea en sangre.

Como se pudo observar al comparar los resultados que se analizaron de cada una de las muestras sanguíneas obtenidas de cada unidad experimental de esta investigación, con los resultados de otros reportes, se observa que se asemejan y se puede inferir que la enzima celulasa en

general y las enzimas comercial y la que se produjo en la universidad no tienen ningún efecto positivo sobre la respuesta en metabolitos.

4.3 Ácidos Grasos Volátiles

Al analizar estadísticamente los datos obtenidos al estudiar el líquido ruminal de cada unidad experimental con la técnica mencionada anteriormente, arrojó los resultados presentados en el cuadro 4.3.

Cuadro 4.3. Perfil de AGV's de ovinos criollos alimentados con una dieta a base de nopal adiconado enzima celulasa.

| Variables | Tratamientos | | |
|---|--------------------|-------------------|-------------------|
| | T1 | T2 | T3 |
| Acetato $\mu\text{M}/\text{dl}$ | 24.1 ^{b*} | 27.4 ^a | 28.3 ^a |
| Propionato $\mu\text{M}/\text{dl}$ | 6.7 ^a | 6.5 ^a | 7.4 ^a |
| Butirato $\mu\text{M}/\text{dl}$ | 6.7 ^a | 6.5 ^a | 7.4 ^a |
| Acetato: Propionato $\mu\text{M}/\text{dl}$ | 3.6 ^a | 4.2 ^a | 3.8 ^a |

*Las medias que no comparten una misma literal son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Con la adición de la enzima celulasa al nopal en la dieta de los ovinos a excepción del acetato, no se encontró diferencia significativa entre tratamientos cuando se analizaron los AGV's de las muestra. Lo cual coincide con Feng *et al* (1996), ellos aplicaron enzimas directamente sobre el alimento y no encontraron efectos sobre los porcentajes molares o la concentración total de AGV's, este estudio fue realizado *in vitro*. Igualmente en una investigación realizada por Yang *et al* (2002) se encontró que la suplementación enzimática no afectó la concentración total de AGV's, pero sí aumentaron las proporciones molares de acetato y redujo las de propionato, lo cual coincide en el resultado del aumento en la producción de acetato arrojado en esta investigación, pues como se observa en el cuadro anterior la única variable en la cual hubo diferencia significativa entre tratamientos es en la producción de acetato; este estudio se realizó en condiciones *in vitro* en un sistema de doble flujo continuo para investigar los efectos de la adición de enzimas fibrolíticas y el pH sobre los parámetros fermentativos, la digestibilidad y la síntesis de proteína microbiana en una ración para vacas lecheras.

Además, relacionado con lo anterior, cabe mencionar que hay autores (Caja, 2003) que coinciden en que el mayor efecto positivo en rumiantes se ha obtenido cuando las enzimas fibrolíticas (celulasas y xilanasas) se han empleado en animales en lactancia y crecimiento, pues es en estos dos casos ha sido cuando ha habido mejor respuesta en los animales. Si se recuerda es el ácido acético el promotor de la producción de leche, por tal motivo si los resultados han sido mejores en rumiantes en lactación aumentando su producción de leche, se puede inferir que la producción de ácido acético aumenta cuando se han aplicado las enzimas fibrolíticas a la dieta de los rumiantes de cualquier especie.

Por ejemplo González (2003) menciona en su investigación que ha habido estudios en los cuales se ha encontrado un efecto positivo con la inclusión de enzimas en la dieta de vacas lecheras, en las cuales se utilizó una ración a base de heno de alfalfa, ensilaje de heno de alfalfa y trigo tratados con un preparado de enzimas fibrolíticas en donde la producción de leche aumentó en un 14.8%. También menciona otro estudio en donde se suplementaron vacas lecheras incluyendo enzimas fibrolíticas en las raciones y las vacas a las cuales se les incluyó la enzima en la dieta produjeron 1.3kg/d más de leche que las del tratamiento control.

Por lo tanto de acuerdo al cuadro 11 se puede observar que las enzimas probadas, tanto la comercial como la producida en la Universidad, tienen efectos similares; también se observó que hubo diferencia significativa entre tratamientos en la variable de producción de ácido acético y se puede ver que aunque entre ambas enzimas no hay diferencia significativa entre tratamientos sí existe una tendencia en la cual se puede observar que el resultado, aunque por muy poca diferencia, fue mejor cuando se utilizó la enzima que se produjo en la Universidad pues esta produjo una concentración de ácido acético de 28.3 $\mu\text{M}/\text{dl}$ y la enzima comercial produjo 27.4 $\mu\text{M}/\text{dl}$ de concentración de ácido acético.

Con lo anterior se puede mencionar que a pesar de que no hubo una marcada diferencia significativa entre los tratamientos sí hubo una respuesta similar en cuanto a los resultados que produjeron las enzimas probadas en los ovinos sobre la producción de AGV's.

4.4 pH

De acuerdo al análisis estadístico aplicado las muestras de líquido ruminal analizadas arrojaron diferencia significativa entre tratamientos ($P < 0.05$), los resultados que se obtuvieron se presentan en el Cuadro 4.4.

Cuadro 4.4. pH de ovinos criollos alimentados con una dieta a base de nopal y adicionado con enzima celulasa.

| Variable | Tratamientos | | |
|----------|-------------------|------------------|------------------|
| | T1 | T2 | T3 |
| pH | 6.9 ^{ab} | 7.3 ^b | 6.7 ^a |

Nota: Las medias que no comparten una misma literal son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

El pH óptimo del rumen se considera dentro de los rangos 5.5 y 6.9 (Relling *et al.*, 2003), en el cuadro anterior se puede observar que el tratamiento que mejor conservó las mejores condiciones de pH ruminal es el tratamiento 1 y 3, es importante mencionar que este tratamiento es el de los ovinos suplementados con la enzima producida dentro de las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

En relación a lo anterior y comparando los resultados existen investigaciones en las cuales se ha encontrado que al utilizar enzimas fibrolíticas el pH en el rumen ha disminuido lo cual es opuesto a los resultados que se obtuvieron en esta investigación. Hristov *et al* (2000) llevaron a cabo un experimento en el cual se probó la aplicación de enzimas fibrolíticas con actividad β -glucanasa en novillas canuladas, en donde se utilizó una ración basada en granos y ensilados, ambos de cebada, en respuesta a la aplicación de enzima sobre el alimento ofrecido a las novillas el pH ruminal disminuyó, con esto tenemos que la enzima que fue aplicada en el tratamiento 3 (EU) mejoró las condiciones de pH del rumen a diferencia de los resultados que se han hecho en otros trabajos, y como se muestra en el cuadro 12 el pH que tuvieron las borregas que se encontraban en el

tratamiento 2 fue más alto a comparación con el tratamiento 1 (tratamiento testigo) y 3 (EU), y como se mencionó anteriormente el pH óptimo al que los microorganismos que se encuentran en el rumen llevan a cabo el metabolismo de los nutrientes es entre 5.5 y 6.9 por lo tanto esto es un punto importante, pues a diferencia de la enzima comercial las borregas u ovinos a los cuales se suplemento con la enzima comercial respondieron mejor en cuanto al efecto de la misma enzima sobre el pH.

V. CONCLUSIONES

La inclusión de enzima celulasa en la dieta de ovinos alimentados con una ración que incluyó al nopal como una fuente de forraje, al cual se le adicionó la enzima, no produjo efectos significativos ($P < 0.05$) sobre el comportamiento animal.

Tampoco se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos cuando se evaluó el perfil metabólico y sanguíneo en las unidades experimentales de los tres tratamientos.

La adición de la enzima celulasa al nopal ofrecido a los ovinos mejoró la producción de ácido acético.

Al comparar las enzimas utilizadas en esta investigación se mostró que la enzima producida en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro mejora las condiciones de pH en el rumen que la enzima comercial analizada.

Finalmente se puede hacer inferencia de que a pesar de que no se obtuvieron resultados que mostraran mayor eficiencia en los parámetros analizados con la inclusión de ambas enzimas, sí se logró producir una enzima capaz de competir a nivel comercial con enzimas producidas en laboratorios ya establecidos pues ambas mostraron resultados similares en cada una de las variables que se analizaron.

VI. RESUMEN

Con el motivo de probar la hipótesis de que la inclusión de nopal (*Opuntia ficus indica*) en conjunto con la enzima celulasa en la dieta de rumiantes mejora los procesos metabólicos y digestivos, se llevó a cabo un experimento en el cual se utilizaron 15 ovinos hembras de raza criolla, aplicando un diseño bloques completamente al azar, bloqueando por peso. Se compararon dos enzimas, una comercial (EC) (SIGMA®) y una enzima generada en el laboratorio de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (EU). Se analizaron tres tratamientos, en los cuales el tratamiento 1 (T1) era el tratamiento testigo, el tratamiento 2 (T2) era el tratamiento al cual se le aplicó la EC y el tratamiento 3 (T3) fue el tratamiento al que se le adicionaba la EU. Se estudiaron diversas variables, el comportamiento productivo analizando específicamente consumo diario de materia seca (CDMS), ganancia diaria de peso (GDP) y conversión alimenticia (CA). Además se hizo el análisis de metabolitos en suero sanguíneo, determinando las concentraciones de AGV'S (acético, propiónico y butírico) y finalmente se analizó el pH ruminal de cada una de las unidades experimentales. Los resultados arrojaron que en las variables de CDMS, GDP y CA no hubo diferencia significativa entre tratamientos; cuando se analizaron los AGV'S solo se encontró diferencia significativa en la variable de ácido acético mostrando que en los tratamientos T2 y T3 hubo mayor producción de éste ácido graso no habiendo diferencia significativa entre estos dos tratamientos. En el análisis de metabolitos no hubo diferencia significativa entre tratamientos y en cuanto al pH el T1 junto con el T3 mostraron ser los más óptimos en cuanto al mantenimiento del pH ruminal, manteniendo el T1 pH de 6.9 y el T3 un pH de 6.7. El efecto poco positivo que se mostró en esta investigación de la implementación de enzima celulasa sobre el nopal en la alimentación en rumiantes puede ser debido a que son varios factores los que afectan la actividad de las enzimas, como

por ejemplo el tipo de aplicación, el momento de aplicación, el pienso sobre el cual se aplique, etc, sin embargo se logro producir una enzima EU capaz de competir a nivel comercial con menores costos de producción.

VII. LITERATURA CITADA

- Aguilera S.J.I., G. Lozano, F. Méndez. 2005. Utilización de nopal como alimento animal. Sistema de Educación Continua en Producción Animal en México A.C. México.
- Anaya, M., R. Bautista. 2004. El nopal forrajero en México: del siglo XVI al siglo XX. Universidad Autónoma de Chapingo. México. pp. 169.
- Bedford, M.R. 1993. Mode of action of feed enzymes. J. Appl. Poult. Res. 2:85-92.
- Carrera, J. 2002. Enzimas Industriales, Biorreactores, Variables de Control, Guías de Laboratorio y Biotecnología Agrícola y Vegetal. *Grupo de investigación Asubagroin*. México. pp. 15.
- Castellanos, A. Llamas, G. Shimada A. 1990. Manual de Técnicas de investigación en Ruminología. Primera Edición. Sistema de Educación Continua en Producción Animal en México A.C. México, D.F. pp. 144.
- Castillo, F., M.D. Roldán, R. Blasco, M.J. Huertas, F.J. Caballero, C. Moreno, M. Martínez. 2005. Biotecnología ambiental. Editorial Tébar. México. pp. 594.
- Castillo, M. R., M. Gutiérrez, J. Linden, R. P. Tengerdy. 1994. Mixed cultura solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production. *Biotechnol. Lett* 16(9): 967-972.
- Castillo, M. R., M. Gutiérrez, J. Linden, R. P. Tengerdy. 1994. Mixed cultura solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production. *Biotechnol. Lett* 16(9): 967-972.
- Coutiño, L. B del C. (2011). Empleo de microorganismos ruminales para la producción y cuantificación de actividad celulasa usando diversas fuentes de carbono (papel periódico, papel filtro y caboximetil celulosa). Tesis Licenciatura. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. pp. 80.

- Eliécer, C.J. 2003. Producción y aplicación de enzimas industriales. Tesis licenciatura. Universidad de Cauca. Colombia. Pp. 3.
- Eskin Michael.1990. Biochemistry of Foods. Academic Press Inc. San Diego California. P: 492.USA.
- Flores V., C.A., J.M. de Luna E. y P.P. Ramírez. 1996. Mercado mundial de nopalito. ASERCA-CIESTAM-Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Flores, V., C.A. y J. Olvera. 1995. La producción de nopal verdura en México. Memorias del VI Congreso Nacional y IV Congreso Internacional sobre el conocimiento y aprovechamiento del nopal. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.
- Flores, V., Claudio A. 2003. Nopalitos y tunas, producción, comercialización, poscosecha e industrialización. 1. Ed. Centro de Investigaciones a Económicas, sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM). Universidad Autónoma de Chapingo. México.
- Gaitán, B. D. M., L. I. P. Pérez. (2007). Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y de compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Cali, Colombia. pp. 114.
- García, A. M. 2003. La familia de las cactáceas: Alternativa para la agricultura en zonas áridas en el siglo XXI. Editorial Trillas. México pp. 3-4.
- González, G. E. 2004. Utilización de enzimas fibrolíticas en cabras lecheras. Evaluación de su actividad y características fermentativas *in vitro*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. España. Pp. 146.
- Govea, R. 2005. Descripción morfológica de hongos anaerobios del rumen de ovinos y efecto de la fibra en su actividad *in vitro*. Tesis doctorado. Universidad de Colima. Manzanillo, Colima. pp. 131.
- Granados, S.D., y P.A.D. Castañeda. 1991. El Nopal: Historia, fisiología, genética e importancia frutícola. México: Trillas. Pp. 227.
- Kock, G. 2006. El uso del nopal como forraje en las zonas áridas de Sudáfrica. Estudio FAO producción y protección vegetal. Revista Salud Pública y Nutrición. Monterrey, Nuevo León. pp. 126.
- L.G., J.J., J.M. Fuentes, A. Rodríguez. 2003. Producción y uso de *Opuntia* como forraje en el centro-norte de México. Estudio FAO producción y

protección vegetal. Revista Salud Pública y Nutrición. Monterrey, Nuevo León. pp. 39-40.

- Lojewska J, Miskowiec, Pronienwicz LM. 2005. Cellulose oxidative and hydrolytic degradation: In situ FTIR approach. Polymer Degradation and Stability. Journal Animal Science. 35:1014-1019
- López, J.J. 2011. Uso y manejo del nopal forrajero en el noreste de México. IX Simposium-Taller Nacional y II Internacional de producción del nopal y el maguey. Escobedo, Nuevo León, México.
- Marín, A. R. M., O. Salazar. 2007. Caracterización y expresión recombinante de una celulasa de origen antártico. Tesis Maestría. Universidad de Chile. Santiago de Chile. pp. 78.
- Mattioli, G., Relling A. 2003. Fisiología Digestiva y metabólica en rumiantes. Facultad de ciencias veterinarias. Tesis licenciatura. Barcelona, España. pp. 72.
- Medina, M., G. Tirado, I. Mejía, I. Camarillo, C. Cruz. Digestibilidad *in situ* de dietas con harina de nopal conteniendo un preparado de enzimas fibrolíticas exógenas. Instituto tecnológico el Llano, Aguascalientes, México. pp. 5.
- Montes, H. C., I. Magaña. 2002. Enzimas con aplicación industrial. Editorial Santillana. México. Pp. 18.
- Morán, J., A. Vázquez, V. P. Cyras. (2008). Extracción de celulosa y obtención a partir de fibra Sisal-Characterización. Tesis maestría. Universidad de Chile. Santiago de Chile. pp. 6.
- Murillo, A. B. 2003. El nopal, alternativa para la agricultura de zonas áridas en el siglo XXI. Centro de investigaciones del noreste. Monterrey, Nuevo León. Pp. 1-2.
- Nava, C.C., A. Díaz. 2001. Introducción a la digestión ruminal. Tesis licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. pp. 76.
- Nazareno, M. A., C. A. Padrón. 2011. Nuevas tecnologías desarrolladas para el aprovechamiento de cactáceas en la elaboración de alimentos, componentes funcionales y propiedades antioxidantes. Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional del Estero. Argentina. pp. 37.
- NRC. 2000. Nutrient requirements of dairy cattle (7th Ed.). National Academy Press, Washington, D.C. pp. 45-85.

- Ovando, L., K. N. Waliszewski. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*, pp. 113-122.
- Padrón, C.A., M.J. Moreno, 2010. Evaluación del uso de enzimas y filtración por gravedad para la clarificación de una mezcla diluida de pulpa de frutos cactus (*Opuntia boldinghii* Britton & Rose), jugos de naranja y toronja. Tesis de maestría. Barcelona, España. pp. 35
- Prado, B. L. A, S. Huerta, G. Rodríguez, G. Saucedo. 1999. Avances en purificación y aplicación de enzimas en Biotecnología. Editorial Casa Abierta al Tiempo. México. pp. 367.
- Ramírez, O. L., F. A. Urrego. 2003. Producción de celulasas a partir del hongo *Trichoderma sp.* y aprovechamiento de la fibra prensada de palma como medio de cultivo. Tesis Maestría. Universidad de Chile. Santiago de Chile. pp. 5.
- Sánchez, W.K., Hunt, C.W., Guy, M.A., Pritchard, G.T., Swanson, B., Warner, T. Y Treacher, R.J. (1996) En: *Proceedings of American Dairy Science Association*. Crovallis, Oregon.
- Scheinvar, L., C. Gallegos, G. Olalde. 2010. Estado del conocimiento de las especies del nopal (*Opuntia spp.*) productoras de xoconostles silvestres y cultivadas. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp 25.
- Sun X. F. 2004. Comparative study of crude and purified cellulose from wheat straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.;52:8.
- Tejada, I. 1992. Control de Calidad y Análisis de Alimentos para Animales. Tesis licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 86.
- Theurer, B. Woods, W., Borrougghs, W. 1963. Influence of enzyme supplements in lamb fattening rations. *J. Anim. Sci.* 22:150-154.
- Torres, G. G., T. Arbaiza, F. Carcelén, O. Lucas. (2009). Comparación de las técnicas *in situ*, *in vitro* y enzimática (celulasa) para estimar la digestibilidad de forrajes en ovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 20 (1): pp. 5-9.
- Treacher, R., McAllister, T.A., Poop, J.D., Mir, P., Cheng, K. Jr. 1996. Effects of exogenous cellulases an xylanases on feed utilization and growth performance of feedlot streers. *Can J. Anim. Sci.* 77:541 (Abstr.).
- Valdez, S.L.G. 2010. Estudio microbiológico de líquido ruminal de ganado Holstein alimentado con dietas enriquecidas con productos de la industria cervecera (Masilla y levadura). Tesis licenciatura. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. pp. 39.

- Vilches, P. L. (2006). Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. Tesis de Maestría. Universidad de Perú. Caraz, Perú. pp. 9.
- Walker, L. P., D. B. Wilson. Enzymatic hydrolysis of cellulose: an Overview. *Bioresource Technology. J Dairy Sci* 71:3458-65.
- Yang, W.Z., Beauchemin, K.A., Rode, L.M. 1999. Effects of enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *J.Dairy Sci.* 82:391-403.

VIII. APÉNDICE

Análisis estadístico del comportamiento productivo (CDMS, GDP y CA) en ovinos alimentados con una dieta a base de nopal y enzima celulasa.

Modelo lineal general: CONSUMO vs. T; B

| Factor | Tipo | Niveles | Valores |
|--------|------|---------|---------------|
| T | fijo | 3 | 1; 2; 3 |
| B | fijo | 5 | 1; 2; 3; 4; 5 |

Análisis de varianza para CONSUMO, utilizando SC ajustada para pruebas

| Fuente | GL | SC Sec. | SC Ajust. | CM Ajust. | F | P |
|--------|----|---------|-----------|-----------|------|-------|
| T | 2 | 30590 | 30590 | 15295 | 2,14 | 0,180 |
| B | 4 | 96482 | 96482 | 24120 | 3,38 | 0,067 |
| Error | 8 | 57058 | 57058 | 7132 | | |
| Total | 14 | 184129 | | | | |

S = 84,4524 R-cuad. = 69,01% R-cuad.(ajustado) = 45,77%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

| T | N | Media | Agrupación |
|---|---|--------|------------|
| 3 | 5 | 1219,9 | A |
| 2 | 5 | 1138,6 | A |
| 1 | 5 | 1114,4 | A |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

| B | N | Media | Agrupación |
|---|---|--------|------------|
| 2 | 3 | 1251,2 | A |
| 1 | 3 | 1225,0 | A |
| 4 | 3 | 1184,2 | A |
| 3 | 3 | 1081,0 | A |
| 5 | 3 | 1046,8 | A |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Modelo lineal general: GDP vs. T; B

| Factor | Tipo | Niveles | Valores |
|--------|------|---------|---------------|
| T | fijo | 3 | 1; 2; 3 |
| B | fijo | 5 | 1; 2; 3; 4; 5 |

Análisis de varianza para GDP, utilizando SC ajustada para pruebas

| Fuente | GL | SC Sec. | SC Ajust. | CM Ajust. | F | P |
|--------|----|---------|-----------|-----------|------|-------|
| T | 2 | 7346 | 7346 | 3673 | 0,79 | 0,484 |
| B | 4 | 5632 | 5632 | 1408 | 0,30 | 0,867 |
| Error | 8 | 36966 | 36966 | 4621 | | |
| Total | 14 | 49943 | | | | |

S = 67,9757 R-cuad. = 25,98% R-cuad.(ajustado) = 0,00%

Observaciones inusuales de GDP

| Obs | GDP | Ajuste | EE de ajuste | Residuo | Residuo estándar |
|-----|---------|---------|--------------|---------|------------------|
| 13 | 359,000 | 256,133 | 46,436 | 102,867 | 2,07 R |

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

| T | N | Media | Agrupación |
|---|---|-------|------------|
| 3 | 5 | 228,2 | A |
| 2 | 5 | 208,4 | A |
| 1 | 5 | 174,6 | A |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

| B | N | Media | Agrupación |
|---|---|-------|------------|
| 3 | 3 | 231,7 | A |
| 5 | 3 | 209,7 | A |
| 4 | 3 | 205,3 | A |
| 1 | 3 | 200,7 | A |
| 2 | 3 | 171,3 | A |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Modelo lineal general: CA vs. T; B

| Factor | Tipo | Niveles | Valores |
|--------|------|---------|---------------|
| T | fijo | 3 | 1; 2; 3 |
| B | fijo | 5 | 1; 2; 3; 4; 5 |

Análisis de varianza para CA, utilizando SC ajustada para pruebas

| Fuente | GL | SC Sec. | SC Ajust. | CM Ajust. | F | P |
|--------|----|---------|-----------|-----------|------|-------|
| T | 2 | 6,904 | 6,904 | 3,452 | 1,05 | 0,394 |
| B | 4 | 16,733 | 16,733 | 4,183 | 1,27 | 0,357 |
| Error | 8 | 26,361 | 26,361 | 3,295 | | |
| Total | 14 | 49,997 | | | | |

S = 1,81523 R-cuad. = 47,28% R-cuad.(ajustado) = 7,73%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

| T | N | Media | Agrupación |
|---|---|-------|------------|
| 1 | 5 | 7,1 | A |
| 3 | 5 | 5,8 | A |
| 2 | 5 | 5,5 | A |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

| B | N | Media | Agrupación |
|---|---|-------|------------|
| 2 | 3 | 8,1 | A |
| 1 | 3 | 6,2 | A |
| 4 | 3 | 5,8 | A |
| 3 | 3 | 5,5 | A |
| 5 | 3 | 5,1 | A |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Análisis estadístico del pH en ovinos alimentados con una dieta a base de nopal y enzima celulasa.

Modelo lineal general: PH vs. T; B

| Factor | Tipo | Niveles | Valores |
|--------|------|---------|--------------------|
| T | fijo | 3 | T1; T2; T3 |
| B | fijo | 5 | R1; R2; R3; R4; R5 |

Análisis de varianza para PH, utilizando SC ajustada para pruebas

| Fuente | GL | SC Sec. | SC Ajust. | CM Ajust. | F | P |
|--------|----|---------|-----------|-----------|------|-------|
| T | 2 | 0,80265 | 0,80265 | 0,40133 | 4,46 | 0,050 |
| B | 4 | 0,11917 | 0,11917 | 0,02979 | 0,33 | 0,850 |
| Error | 8 | 0,71955 | 0,71955 | 0,08994 | | |
| Total | 14 | 1,64137 | | | | |

S = 0,299906 R-cuad. = 56,16% R-cuad.(ajustado) = 23,28%

Observaciones inusuales de PH

| Obs | PH | Ajuste | EE de ajuste | Residuo | Residuo estándar |
|-----|---------|---------|--------------|----------|------------------|
| 8 | 6,77000 | 7,21467 | 0,20487 | -0,44467 | -2,03 R |

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

| T | N | Media | Agrupación |
|----|---|-------|------------|
| T2 | 5 | 7,3 | A |
| T1 | 5 | 6,9 | A B |
| T3 | 5 | 6,7 | B |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

| B | N | Media | Agrupación |
|----|---|-------|------------|
| R5 | 3 | 7,1 | A |
| R2 | 3 | 7,1 | A |
| R4 | 3 | 7,0 | A |
| R3 | 3 | 6,9 | A |
| R1 | 3 | 6,9 | A |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.