



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Facultad de Veterinaria

Departamento de Producción Animal

**Estrategias para mejorar el valor nutritivo de
los forrajes en producción convencional y
ecológica**

Strategies for improving the nutritive value of
conventional and organic forages

Alexey Díaz Reyes

León, 2017



Memoria presentada por Alexey Díaz Reyes y dirigida por las doctoras María Dolores Carro Travieso y María José Ranilla García para optar al grado de Doctor por la Universidad de León, dentro del Programa de Doctorado “Medicina, sanidad y producción animal y ciencia de los alimentos”.

León, 2017



Los trabajos que componen esta Tesis Doctoral han sido financiados por los siguientes proyectos:

Estudio de los mecanismos de acción de distintos compuestos naturales que modifican la fermentación ruminal en el ganado ovino. Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2008-04707-C02-02).

Estrategias para mejorar el valor nutritivo de forrajes para la alimentación del ganado ovino en producción ecológica en Castilla y León. Financiado por la Junta de Castilla y León (LE129A12-1).

El autor de esta Tesis Doctoral disfrutó, durante la realización de los estudios de doctorado de una Beca de Investigación de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) durante 18 meses y de una beca de la Junta de Castilla y León en el marco de la Estrategia Regional de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2007-2013, cofinanciada por el Fondo Social Europeo.

Mis más sinceros agradecimientos a mis directoras, María José Ranilla y María Dolores Carro, por su excelente trabajo, su gran ayuda y comprensión, su infinita paciencia y su enorme apoyo en todo momento.

De la misma forma, quisiera agradecer su ayuda a todas las personas del Departamento de Producción Animal de la Universidad de León, que de una forma u otra a lo largo de tantos años me ayudaron en el trabajo y a sentirme como en casa. A todas ellas, muchas gracias. Agradecer además a todas las instituciones que han puesto a nuestra disposición los medios y recursos económicos necesarios para la realización de esta Tesis Doctoral.

A mi familia de Cuba y de España.

A mi gran amigo y hermano.

Índices

Índice de contenidos

	Pág.
Índice de contenidos.....	i
Índice de figuras.....	vii
Índice de tablas.....	ix
Listado de abreviaciones.....	xv
Capítulo I- Introducción, planteamiento del problema y objetivos.....	1
Capítulo II- Revisión bibliográfica.....	4
II. 1- Fermentación ruminal.....	4
II. 1.1- Fermentación de los hidratos de carbono.....	4
II. 1.2- Digestión de los compuestos nitrogenados.....	5
II. 1.3- Fermentación ruminal de los lípidos.....	6
II. 2.- Microorganismos ruminales.....	7
II. 2.1- Bacterias.....	7
II. 2.2- Protozoos.....	8
II. 2.3- Hongos.....	9
II. 3- Modificación de la fermentación ruminal.....	9
II. 3.1- Aditivos microbianos.....	10
II. 3.1.1- Las levaduras como aditivo microbiano en animales rumiantes.....	12
II. 3.1.1.1- Efectos en rumiantes adultos.....	13
II. 3.1.1.2- Componentes de las paredes celulares de las levaduras, su efecto en la dieta animal.....	18
II. 3.2- Utilización de enzimas como aditivos en la dieta de animales rumiantes.....	21
II. 3.2.1- Tipos de enzimas fibrolíticas utilizadas. Mecanismos de acción.....	22
II. 3.2.2- Efectos directos sobre los alimentos.....	24

II. 3.2.3-	Efectos a nivel ruminal.....	25
II. 3.2.4-	Efecto de las enzimas en el rendimiento productivo de animales rumiantes.....	27
II. 4-	Ganadería y agricultura ecológica.....	31
II. 4.1-	La ganadería ecológica: evolución y desarrollo.....	32
II. 4.2-	Situación en el mundo de la agricultura ecológica.....	34
II. 4.3-	La agricultura ecológica en Europa.....	36
II. 4.4-	Situación e importancia de la ganadería ecológica en España.....	36
II. 4.5-	Agricultura y ganadería ecológica en Castilla y León..	40
II. 4.6-	El cultivo ecológico de cereales para la alimentación Animal.....	43
Capítulo III-	Materiales y métodos generales.....	45
III. 1-	Animales y colección de líquido ruminal para los estudios in vitro.....	45
III. 2-	Preparación de las muestras de forraje para los estudios in vitro.....	45
III. 3-	Procedimiento experimental de los estudios con CNRMR.....	46
III. 4-	Sistema de fermentadores de flujo semicontinuo (Rusitec).....	48
III. 4.1-	Descripción del sistema.....	48
III. 4.2-	Manejo del sistema.....	49
III. 5-	Procesado de las muestras y análisis químico.....	51
III. 5.1-	Composición química.....	51
III. 5.2-	Parámetros ruminales (pH, amoníaco, Ácidos grasos volátiles y ácidoláctico.....	52
III. 5.3-	Producción de gas y su composición (metano).....	53
III. 5.4-	Análisis del enriquecimiento en ¹⁵ N.....	53

III. 5.5- Actividad enzimática.....	54
III. 5.6- Extracción de ADN y análisis automatizado de los espacios intergénicos ribosomales (<i>Automated Ribosomal Itergenic Spacer Analysis, ARISA</i>).....	55
Capítulo IV- Pruebas experimentales.....	58
IV.1- Treatment of tropical forages with exogenous fibrolytic enzymes: effects on chemical composition and in vitro rumen fermentation.....	58
IV.1.1- Introduction.....	59
IV.1.2- Materials and Methods.....	60
IV.1.2.1- Substrates, enzymes and characterization of enzymatic activities.....	60
IV.1.2.2- Effects of method of application of enzymes on in vitro gas production (Experiment 1).....	62
IV.1.2.3- Effects of enzymes on chemical composition of substrate.....	64
IV.1.2.4- Effects of enzymes on in vitro ruminal fermentation (Experiment 2).....	64
IV.1.2.5- Analytical procedures, calculations and statistical analyses.....	65
IV.1.3- Results.....	66
IV.1.3.1- Effects of method of application of enzymes on in vitro gas production (Experiment 1).....	66
IV.1.3.2- Effects of enzymes on in vitro ruminal fermentation (Experiment 2).....	70
IV.1.4- Discussion.....	70
IV.1.5- Acknowledgements.....	77
IV.1.6- References.....	78
IV.2- <i>In vitro</i> evaluation of commercial fibrolytic enzymes for improving the nutritive value of low-quality forages.....	82
IV.2.1- Introduction.....	83

IV.2.2- Materials and methods.....	84
IV.2.2.1- Substrates and enzymes.....	84
IV.2.2.2- Effects of enzymes on <i>in vitro</i> gas production kinetics, <i>in vitro</i> ruminal fermentation and forage fibre composition.....	85
IV.2.2.3- Analytical procedures.....	87
IV.2.2.4- Calculations and statistical analyses	87
IV.2.3- Results.....	88
IV.2.4- Discussion.....	97
IV.2.5- Conclusions.....	99
IV.2.6- Acknowledgements.....	99
IV.2.7- References.....	99
IV.3- Effects of a yeast enzymatic hydrolyzate on <i>in vitro</i> ruminal fermentation.....	103
IV.3.1- Introduction	105
IV.3.2- Materials and methods.....	106
IV.3.2.1- Substrates and additives.....	106
IV.3.2.2- <i>In vitro</i> fermentation of substrates.....	106
IV.3.2.3- Analytical procedures.....	107
IV.3.2.4- Calculations and statistical analyses.....	107
IV.3.3- Results and Discussion.....	107
IV.3.4- Conclusions.....	111
IV.3.5- Acknowledgements.....	111
IV.3.6- References.....	112
IV.4- Influence of a yeast hydrolyzate on <i>in vitro</i> rumen fermentation and bacterial diversity in batch cultures and Rusitec fermenters	115
IV.4.1- Introduction.....	117
4.4.2- Materials and Methods.....	118

IV.4.2.1- Animals and diet.....	118
IV.4.2.2- Yeast hydrolyzate (YH), substrates, and in vitro fermentations in batch cultures.....	119
IV.4.2.3- Rusitec trial.....	120
IV.4.2.3.1- Experimental design and sampling.....	120
IV.4.2.3.2- DNA extraction and Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA).....	121
IV.4.2.4- Analytical procedures.....	122
IV.4.2.5- Calculations and statistical analyses.....	122
IV.4.3- Results.....	123
IV.4.3.1- Batch cultures fermentations.....	123
IV.4.3.2- Fermentation in the Rusitec system.....	124
IV.4.4- Discussion.....	129
IV.4.5- Conclusions.....	133
IV.4.6- Acknowledgements.....	133
IV.4.7- References.....	134
IV.5- Estudio comparativo de la producción y el valor nutritivo de dos cereales forrajeros (avena y centeno) cultivados en condiciones convencionales y ecológicas.....	139
IV.5.1- Introducción.....	140
IV.5.2- Material y métodos.....	141
IV.5.2.1- Cultivos y manejo.....	141
IV.5.2.2- Composición química y digestibilidad <i>in vitro</i>	143
IV.5.2.3- Fermentación ruminal.....	144
IV.5.2.4- Cálculos y análisis estadístico.....	145
IV.5.3- Resultados y discusión.....	146
IV.5.4- Conclusiones.....	153
IV.5.5- Agradecimientos.....	153
IV.5.6- Referencias bibliográficas.....	153

IV.6- Nutritive value for ruminants of winter oats–legume intercrops in organic cultivation.....	156
IV.6.1- Introduction.....	157
IV.6.2- Materials and methods.....	158
IV.6.2.1- Experimental design and cultivars.....	158
IV.6.2.2- In vitro incubations.....	159
IV.6.2.3- Calculations, analytical procedures and statistical analyses.....	160
IV.6.3- Results.....	161
IV.6.4- Discussion.....	165
IV.6.5- Acknowledgments.....	167
IV.6.6- References.....	167
Capítulo V- Discusión general.....	170
Capítulo VI- Conclusiones / Conclusions.....	183
Capítulo VII- Resumen / Summary.....	186
Capítulo VIII- Referencias bibliográficas.....	196

Índice de figuras

	Pág.
Figura II.1. Desarrollo del área de producción de cereales ecológicos desde el 2004 hasta el 2014 (hectáreas) (FiBL/INFOAM, 2016)	34
Figura II.2. Países con mayor área de producción de cereales orgánicos en 2014 (ha) (FiBL/INFOAM, 2016).....	35
Figura II.3. Distribución de la tierra dedicada a cereales orgánicos a nivel mundial según el tipo de cereal, 2014 (Un total de 3,4 millones de hectáreas) (FiBL/INFOAM, 2016).....	35
Figura II.4 Porcentaje que representa el número de explotaciones de ganadería ecológica en las comunidades autónomas dentro del total nacional (MAGRAMA, 2016).....	39
Figura II.5. Distribución en España de las explotaciones de ovino de cría ecológica en 2014 (MAGRAMA, 2016).....	39
Figura II.6. Porcentaje de los principales cultivos en producción ecológica en Castilla y León (Año 2014)(MAGRAMA, 2016).....	41
Figura II.7. Superficie en hectáreas inscrita en agricultura ecológica en Castilla y León (Año 2015)(MAGRAMA, 2016).....	42
Figura II.8. Porcentaje por orientación productiva en el total de las explotaciones de ganadería ecológica en Castilla y León (Año 2014)(MAGRAMA, 2016).....	42
Figura III.1. Sistema de cultivos no renovados de microorganismos ruminales.....	48
Figura III.2. Sistema de fermentadores de flujo semicontinuo (Rusitec).....	50
Figure IV.4.1. Dendrograms of ARISA profiles of bacterial communities in solid (A) and liquid (B) phase from Rusitec fermenters on days 3, 8 and 14 of incubation and either supplemented with a yeast hydrolyzate (YH) or not (CON). Numbers 1 to 4 correspond to individual fermenters (FER). Two identical incubation runs (1, 2) were performed.....	130

Figura V.1. Procedimiento seguido para la obtención de las diferentes fracciones del hidrolizado enzimático de levadura <i>S. cerevisiae</i>	174
Figura V.2. Evolución de la producción diaria de ácidos grasos volátiles a lo largo del período de incubación en fermentadores Rusitec que recibían una dieta 50:50 de heno de alfalfa:concentrado y suplementada con un hidrolizado de levadura (—●—) o sin suplementar (—○—).....	177
Figura V.3. Evolución de la relación acético/propiónico a lo largo del período de incubación en fermentadores Rusitec que recibían una dieta 50:50 de heno de alfalfa:concentrado y suplementada con un hidrolizado de levadura (—●—) o sin suplementar (—○—).....	177
Figura V.4. Evolución de la cantidad de amoníaco en el efluente de fermentadores Rusitec que recibían una dieta 50:50 de heno de alfalfa:concentrado y suplementada con un hidrolizado de levadura (—●—) o sin suplementar (—○—).....	178

Índice de tablas

	Pag
Tabla II.1. Superficie (ha) de agricultura ecológica en 2014 (MAGRAMA, 2016).....	38
Table IV.1.1. Chemical composition (g/kg DM) of forages.....	61
Table IV.1.2. Parameters of gas production kinetics (A, c, AFR and T _{1/2}) and organic matter effective degradability (OMED) of forages incubated in batch cultures of rumen microorganisms and supplemented with enzymes at the time of incubation (CELO , XYLO and MIXO) or 24 h before incubation (CEL , XYL and MIX).....	67
Table IV.1.3. Effect of the 24 h pre-treatment with exogenous fibrolytic enzymes on neutral detergent fibre (NDF), hemicellulose, acid detergent fibre (ADF) and cellulose content (g/kg dry matter (DM)) of forages (n = 4).....	69
Table IV.1.4. Effect of the 24 h pre-treatment with exogenous fibrolytic enzymes on final ammonia-N concentration, gas and volatile fatty acid (VFA) production, acetate/propionate ratio (Ac/Pr), and degradability of dry matter (DMD) and neutral detergent fiber (NDFD) after 24 h <i>in vitro</i> fermentation of two samples (500 mg DM) of <i>Pennisetum clandestinum</i> with mixed rumen microorganisms (n = 4).....	72
Table IV.1.5. Effect of the 24 h pre-treatment with exogenous fibrolytic enzymes on final ammonia-N concentration, gas and volatile fatty acid (VFA) production, acetate/propionate ratio (Ac/Pr), and degradability of dry matter (DMD) and neutral detergent fiber (NDFD) after 24 h <i>in vitro</i> fermentation of two samples (500 mg DM) of <i>Dichanthium aristatum Benth</i> with mixed rumen microorganisms (n = 4).....	73

Table IV.1.6. Effect of the 24 h pre-treatment with exogenous fibrolytic enzymes on final ammonia-N concentration, gas and volatile fatty acid (VFA) production, acetate/propionate ratio (Ac/Pr), and degradability of dry matter (DMD) and neutral detergent fiber (NDFD) after 24 h <i>in vitro</i> fermentation of samples (500 mg DM) of <i>Acacia decurrens</i> (A1) and <i>Acacia mangium</i> (A2) with mixed rumen microorganisms (n = 4).....	74
Table IV.2.1. Chemical composition (g/kg dry matter) of forages used in the study.....	84
Table IV.2.2. Endoglucanase and xylanase activity added to forage samples (400 mg of dry matter) in each experimental treatment ¹	86
Table IV.2.3. Effect of 24-h pre-treatment with increasing doses (D1, D2, D3 and D4) of PEN enzyme (Rovabio Excel®, Adisseo) on <i>in vitro</i> gas production kinetics of <i>Pennisetum purpureum</i> clon Cuba CT-115 hay, maize stover and rice straw in batch cultures of ruminal microorganisms (n=4) ¹	89
Table IV.2.4. Effect of 24-h pre-treatment with increasing doses (D1, D2, D3 and D4) of TL1 enzyme (Xylanase Plus Dyadic®) on <i>in vitro</i> gas production kinetics of <i>Pennisetum purpureum</i> clon Cuba CT-115 hay, maize stover and rice straw in batch cultures of ruminal microorganisms (n=4) ¹	90
Table IV.2.5. Effect of 24-h pre-treatment with increasing doses (D1, D2, D3 and D4) of TL2 enzyme (Cellulase Plus Dyadic®) on <i>in vitro</i> gas production kinetics of <i>Pennisetum purpureum</i> clon Cuba CT-115 hay, maize stover and rice straw in batch cultures of ruminal microorganisms (n=4) ¹	91

Table IV.2.6. Effect of 24-h pre-treatment with increasing doses (D1, D2, D3 and D4) of commercial enzymes (PEN , TL1 and TL2) on neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF) content (g/kg dry matter) of <i>Pennisetum purpureum</i> clon Cuba CT-115 hay, maize stover and rice straw (n=4) ¹	93
Table IV.2.7. Effect of increasing doses (D1, D2, D3 and D4) of PEN enzyme (Rovabio Excel®, Adisseo) on gas production after 3, 6 and 9 h, ammonia-N concentration, dry matter degradability (DMD), total volatile fatty acid (VFA) production, molar proportions of VFA, and acetate/propionate ratio (Ac/Pr) after 9 h <i>in vitro</i> fermentation of samples (400 mg DM) of <i>Pennisetum purpureum</i> clon Cuba CT-115 hay, maize stover and rice straw in batch cultures of ruminal microorganisms (n=4)...	94
Table IV.2.8. Effect of increasing doses (D1, D2, D3 and D4) of TL1 enzyme (Xylanase Plus Dyadic®) on gas production after 3, 6, and 9 h, ammonia-N concentration, dry matter degradability (DMD), total volatile fatty acid (VFA) production, molar proportions of VFA, and acetate/propionate ratio (Ac/Pr) after 9 h <i>in vitro</i> fermentation of samples (400 mg DM) of <i>Pennisetum purpureum</i> clon Cuba CT-115 hay, maize stover and rice straw in batch cultures of ruminal microorganisms (n=4)...	95
Table IV.2.9. Effect of increasing doses (D1, D2, D3 and D4) of TL2 enzyme (Cellulase Plus Dyadic®) on gas production after 3, 6, and 9 h, ammonia-N concentration, dry matter degradability (DMD), total volatile fatty acid (VFA) production, molar proportions of VFA, and acetate/propionate ratio (Ac/Pr) after 9 h <i>in vitro</i> fermentation of samples (400 mg DM) of <i>Pennisetum purpureum</i> clon Cuba CT-115 hay, maize stover and rice straw in batch cultures of ruminal microorganisms (n=4)...	96
Table IV.3.1. Effect of a yeast hydrolyzate of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and its fractions and doses on <i>in vitro</i> ruminal fermentation of <i>Pennisetum purpureum</i> vc Cuba CT-115.....	110

Table IV.3.2. Effect of a yeast hydrolyzate of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and its different fractions and doses on <i>in vitro</i> digestibility of <i>Pennisetum purpureum</i> vc Cuba CT-115....	110
Table IV.4.1. Ingredient composition and chemical analysis of medium- (MC) and high-concentrate (HC) diets fed to donor sheep and used as substrates for the <i>in vitro</i> fermentations in batch cultures.....	118
Table IV.4.2. Effects of five doses of a yeasts hydrolysate (0, 100, 200, 300 and 400 µL/30 mL for CON, YT1, YT2, YT3 and YT4, respectively) on volatile fatty acids (VFA) production after <i>in vitro</i> fermentation of diets (300 mg) with medium (MC) and high (HC) concentrate content by mixed rumen micro-organisms for 16 h (n=4).....	125
Table IV.4.3. Effects of five doses of a yeasts hydrolysate (0, 100, 200, 300 and 400 µL/30 mL for CON, YT1, YT2, YT3 and YT4, respectively) on final pH, concentrations of NH ₃ -N and total lactate, production of gas and methane, methane/volatile fatty acid (VFA) ratio and apparently fermented organic matter (AFOM) after <i>in vitro</i> fermentation of diets (300 mg) with a medium (MC) and high (HC) concentrate content by mixed rumen micro-organisms for 16 h (n = 4).....	126
Table IV.4.4. Effects of a yeasts hydrolysate (YH) supplementation on fermentation parameters, diet digestibility, enzymatic activity and microbial protein synthesis in Rusitec fermenters fed a 50:50 forage:concentrate diet (n = 4).....	127
Table IV.4.5. Effects of a yeasts hydrolysate (YH) supplementation on the evolution through the incubation period of Shannon index and numbers of peaks detected in the automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) electropherograms in solid and liquid contents of Rusitec fermenters, and similarity index of ARISA profiles between solid and liquid contents.....	128

Tabla IV.5.1. Producción de materia seca (MS; t MS/ha) y composición química (g/100 g MS) de avena y centeno cultivados en sistemas de producción convencional y ecológica.....	147
Tabla IV.5.2. Características del suelo de las parcelas experimentales cultivadas de forma convencional (CON) y ecológica (ECO) tras la recolección de los cultivos de avena y centeno en julio de 2009.....	148
Tabla IV.5.3. Digestibilidad <i>in vitro</i> (%) de avena y centeno cultivados en sistemas de producción convencional y ecológica.....	150
Tabla IV.5.4. Parámetros de la cinética de producción de gas de avena y centeno cultivados en sistemas de producción convencional y ecológica.....	151
Tabla IV.5.5. Concentración de N amoniacal (NH ₃ -N; mg/L), pH final, producción de ácidos grasos volátiles (AGV; μmol), proporción molar de los principales AGV (mol/ 100 mol) y relación acético/propiónico (Ac/Pr; mol/mol) tras la incubación de muestras de avena y centeno cultivadas en sistemas de producción convencional (CON) y ecológica (ECO).....	152
Table IV.6.1. Dry matter (DM) yield, chemical composition, true <i>in vitro</i> DM degradability (TDMD) and neutral detergent fibre degradability (NDFD) of forage from winter oats as sole crop (oats) and in intercropping with bard vetch (BAV), bitter vetch (BIV) or both legumes (MIX) and harvested in June or July.....	162
Table IV.6.2. Parameters of gas production kinetics and organic matter effective degradability (OMED) of winter oats as sole crop (oats) and in intercropping with bard vetch (BAV), bitter vetch (BIV) or both legumes (MIX), harvested in June or July, and incubated <i>in vitro</i> in batch cultures of rumen micro-organisms.....	163

Table IV.6.3. Production of volatile fatty acid (VFA), acetate:propionate ratio (Ac/Pr) and ammonia-N concentrations of winter oats as sole crop (oats) and in intercropping with bard vetch (BAV), bitter vetch (BIV) or both legumes (MIX), harvested in June or July, and incubated <i>in vitro</i> in batch cultures of rumen micro-organisms.....	164
---	-----

Listado de abreviaciones

%	por ciento
µm	micrómetro
ac:pr	acético:propiónico
ADL	acid detergent lignin
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADNr	ADN ribosómico
AGV / VFA	ácidos grasos volátiles / volatile fatty acid
APC	antibióticos promotores del crecimiento
ARISA	automated ribosomal intergenic spacer analysis / análisis automatizado de la región espaciadora intergénica ribosomal
ARN	ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosómico
BAL	bacterias asociadas al líquido
BAS	bacterias asociadas al sólido
CE	Comisión Europea
CEL	cellulase from <i>Trichoderma longibrachiatum</i>
CH₄	metano
cm	centímetro
CNRMR	cultivos no renovados de microorganismos ruminales
CO₂	dióxido de carbono
CON	control
C_T	ciclo umbral
d	días
DE	degradabilidad efectiva
DEMO	Degradabilidad efectiva de la materia orgánica
DFND	Degradabilidad de la fibra neutro detergente

DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis / electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
DMO	degradabilidad de la materia orgánica
DMS/DMO	desaparición de la materia seca / degradability of dry matter
DVMS	Digestibilidad verdadera de la materia seca
DNS	ácido 3-5 dinitrosalicílico
ECO	ecológico
EEM	error estándar de la media
EM	energía metabolizable
ENZ	enzymes
etc.	etcétera
FAD/ADF	fibra ácido detergente / acid detergent fiber
FISH	fluorescent <i>in situ</i> hybridization / hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia
FND/NDF	fibra neutro detergente/ neutral detergent fibre
g	gramos
g	gravedad
GP	grado de polimerización
h	horas
H₂	hidrogeno
HLEV	Hidrolizado enzimático de levaduras <i>S. cerevisiae</i>
kDa	kilodaltones
kg	kilogramos
L	litro
m	metro
M	molar
mg	miligramos
min	minutos

mL	mililitros
mm	milímetro
mM	milimolar
MO	materia orgánica
MOS	manano oligosacáridos
mOsm	miliosmoles
MS/DM	materia seca / dry matter
mV	milivoltios
N	nitrógeno
n	normal
NH₃	amoníaco
NH₃-N	nitrógeno amoniacal
MYX	1:1 mixture of CEL and XYL
nm	nanómetro
nmol	nanomol
NMP	número más probable
NNA	nitrógeno no amoniacal
NNP	nitrógeno no proteico
°C	grados Celsius
OMED	organic matter effective degradability
OTUs	operational taxonomic unit / unidad taxonómica operacional
PB	proteína bruta
PC	producto completo (hidrolizado)
PCL	pared celular de levaduras
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEN	Rovabio Excel® (produced by <i>Penicillium funiculosum</i>)
PT	pellet bruto
q-PCR	PCR cuantitativa

RFLP	restriction fragment length polymorphism / polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción
RISA	ribosomal intergenic spacer analysis / análisis de la región espaciadora intergénica ribosomal
RR	retículo-rumen
RSS	ribosomal small subunit / subunidad pequeña del ribosoma
RT-PCR	PCR en tiempo real
Rusitec	técnica de simulación ruminal (rumen simulation technique)
s	segundos
S	sobrenadante
SSCP	single strand conformation polymorphism / polimorfismo conformacional de la cadena simple
SSU	small subunit / subunidad pequeña
TCI	taninos condensados insolubles
TCS	taninos condensados solubles
TL-1	Xylanase Plus (produced by <i>T. longibrachiatum</i>)
TL-2	Cellulase Plus (produced by <i>T. longibrachiatum</i>)
TGGE	temperature gradient gel electrophoresis / electroforesis en gel con gradiente de temperatura
T-RFLP	terminal restriction fragment length polymorphism / polimorfismo de la longitud de los fragmentos terminales de restricción
UI	unidad internacional
Vol/vol	volumen/volumen
vs	versus
XYL	xylanase from ruminal microorganisms

Capítulo I.- Introducción, planteamiento del problema y objetivos

Actualmente, uno de los principales retos a los que tiene que hacer frente la humanidad es el de mantener sobre el planeta una población creciente, que supera en la actualidad los 7400 millones de habitantes y podría alcanzar los 8500 millones en 2030 y 9700 millones en 2050, según previsiones de la Organización de Naciones Unidas. Sin embargo, este crecimiento es heterogéneo, ya que la población mundial está creciendo a un ritmo del 1,7% anual en los países en vías de desarrollo, mientras que lo hace a menos del 0,1% en los países desarrollados. Por ello, el incremento poblacional se ubica fundamentalmente en los países en vías de desarrollo, lo que implica un aumento de la pobreza, la malnutrición y la desigualdad. Sin embargo, otra parte de la población mundial, fundamentalmente en los países más desarrollados, se inclina cada vez más por el consumo de productos con alto valor biológico y generados en sistemas productivos con bajo impacto medioambiental y alto grado de bienestar animal, entre los que destacan los productos ecológicos.

La producción de animales rumiantes es una fuente importante de alimentos de elevado valor nutritivo. Además, pueden cubrir sus necesidades nutritivas mediante la utilización de forrajes, lo que los coloca en una situación privilegiada al no competir directamente con los humanos por los alimentos de origen vegetal. La utilización de forrajes y otros alimentos fibrosos por los rumiantes es posible debido a la posesión del rumen, en el que una gran población microbiana, capaz de degradar la fibra, vive en simbiosis con el animal hospedador. La modificación de los procesos que acontecen en el rumen permite mejorar su eficiencia y aumentar el rendimiento productivo de los rumiantes. Este hecho tiene especial interés en los países en vías de desarrollo, en los que su alimentación está basada en numerosos casos exclusivamente en recursos forrajeros de baja calidad, lo que impide la expresión del potencial genético de los animales y reduce la producción de carne y leche.

En los últimos años se han realizado numerosos trabajos con la finalidad de optimizar la eficiencia productiva de los rumiantes mediante la modificación de la fermentación ruminal usando diferentes aditivos alimentarios, entre los que pueden destacarse los ácidos orgánicos, los probióticos, los extractos vegetales y las enzimas (Frater, 2014; Carro *et al.*, 2014; Carro y Ungerfeld, 2015; Retta, 2016). Sin embargo, el empleo de muchos de estos productos no es una alternativa viable en muchos de estos países en vías de desarrollo, fundamentalmente debido a su elevado coste.

Por otra parte, la mayoría de las investigaciones se han realizado con dietas representativas de las que reciben los animales en sistemas de producción

intensiva y los resultados no son extrapolables a los sistemas que se basan fundamentalmente en el uso de forrajes de calidad media-baja. Por ello, son necesarios estudios realizados con los recursos forrajeros que se utilizan en los países en vías de desarrollo y con aditivos que puedan usarse en la práctica en estos países.

Por otro lado, el consumo y comercio de productos ecológicos en los países desarrollados ha aumentado de forma acusada en los últimos años. En Castilla y León, la producción ecológica es también una actividad creciente, aunque el número de ganaderías ecológicas todavía es limitado. Uno de los problemas a los que se enfrentan los ganaderos que desean transformar sus explotaciones hacia la producción ecológica es el desconocimiento del valor nutritivo de los alimentos ecológicos para los animales, especialmente en el caso de los forrajes, ya que este valor depende de las condiciones en las que son producidos. Además, son escasos los estudios que han comparado el valor nutritivo de forrajes ecológicos con el de sus homólogos producidos de forma convencional, ya que la mayoría de este tipo de estudios se ha centrado en la producción de alimentos ecológicos para el consumo humano.

Por todo lo anteriormente expuesto, el objetivo general del presente trabajo de Tesis Doctoral fue analizar diferentes estrategias para mejorar el valor nutritivo de los forrajes para la alimentación de los rumiantes. Estas estrategias se han centrado en la utilización de dos tipos de aditivos (enzimas fibrolíticas y un hidrolizado enzimático de la levadura *S. cerevisiae*) y en la mejora de la productividad y el valor nutritivo de cultivos forrajeros ecológicos.

Para lograr el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de dos enzimas fibrolíticas exógenas (celulasa y xilanasa) y de su mezcla en la fermentación ruminal *in vitro* de seis forrajes tropicales.
- Analizar el efecto de tres preparados enzimáticos comerciales (Rovabio Excel LC, Dyadic Xylanase Plus, y Dyadic Cellulase Plus) en la fermentación ruminal *in vitro* de tres sustratos de baja calidad.
- Valorar el efecto de diferentes fracciones de un hidrolizado enzimático de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la fermentación ruminal *in vitro* de *Pennisetum purpureum* clon Cuba CT-115.
- Analizar la influencia de un hidrolizado enzimático de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación ruminal *in vitro* de dietas mixtas

Introducción, planteamiento del problema y objetivos

utilizando cultivos no renovados de microorganismos ruminales y fermentadores Rusitec.

➤ Analizar los efectos del sistema de cultivo (convencional vs. ecológico) en la producción de materia seca, composición química y la fermentación ruminal *in vitro* de avena y centeno forrajeros en dos épocas diferentes de recolección (preespigado y maduración).

➤ Evaluar el potencial de la avena cultivada en monocultivo e intercalada con otras leguminosas para mejorar el rendimiento y la calidad nutritiva del forraje obtenido en cultivos ecológicos.

Capítulo II.- Revisión bibliográfica

II. 1.- La fermentación ruminal

El hecho más sobresaliente de la digestión en los rumiantes es su capacidad para fermentar todas las formas de celulosa. La celulolisis es un proceso que no está presente en el reino animal: ningún mamífero segrega celulasas, complejo de enzimas que fermenta la celulosa, pero las bacterias y los hongos celulolíticos que conviven simbióticamente en el rumen, producen un complejo enzimático β -1-4 glucosidasa capaz de solubilizar entre el 70 y 90% de la celulosa.

Los productos universales de la fermentación microbiana ruminal son los ácidos grasos volátiles (AGV), principalmente los ácidos acético, propiónico y butírico, que constituyen más del 90% de los ácidos que se producen en el rumen, el CO₂ y el metano (CH₄). En estos procesos se pierde energía en forma de calor y de metano.

II. 1.1- Fermentación de los hidratos de carbono

Los carbohidratos son la principal fuente de energía para los microorganismos ruminales y el componente cuantitativamente más importante de la dieta de los rumiantes. Además de aportar energía a los microorganismos y al rumiante, se encargan de mantener el óptimo funcionamiento del rumen. A partir de los hidratos de carbono se obtienen los compuestos de mayor importancia energética para los rumiantes, los AGV. Estas sustancias se absorben desde el retículo-rumen y proporcionan entre el 50-80% de la energía metabolizable (EM) que ingiere el animal.

En general los azúcares y los carbohidratos solubles se fermentan rápidamente, mientras que los polisacáridos estructurales son degradados con velocidad variable. Los materiales de más difícil fermentación son la celulosa y la hemicelulosa, cuya estrecha asociación con la lignina los hace menos asequibles a la acción microbiana. Por ello, la degradación de la fibra en el rumen no solamente dependerá de la proporción de los componentes que la forman, sino que es más compleja y se verá afectada por una serie de factores como (Rotger, 2005):

- Accesibilidad de los microorganismos al sustrato.
- Densidad y actividad de las poblaciones fibrolíticas presentes en el rumen.
- Factores microbianos que controlan la adhesión e hidrólisis mediante complejos enzimáticos de las poblaciones microbianas adherentes.

- Factores relacionados con el animal (masticación, salivación y cinética ruminal) que determinan la accesibilidad del sustrato a las bacterias (Varga y Kolver, 1997).

La concentración total de AGV en el rumen y las proporciones de cada uno de ellos dependen de la dieta y su modificación. En sentido general, los alimentos fibrosos producen un patrón de fermentación predominantemente acético, con una proporción aproximada de 65% de acético, 25% de propiónico y 10% de butírico. Raciones muy ricas en almidones (concentrados), incrementan la proporción de propiónico hasta alrededor de 45%, pero provocan un efecto negativo en la salud del rumiante, porque tiende a producirse hígado graso, distocia y cetosis ruminal. Por el contrario, cuando predomina en la dieta un forraje de muy baja calidad, se limita la energía y la producción de leche, (Wattiaux y Armentano, 2000). Los microorganismos capaces de digerir las paredes celulares vegetales constituyen una proporción menor de la comunidad microbiana total (Forsberg *et al.*, 2000). Se ha detectado la presencia de enzimas fibrolíticas altamente activas en protozoos (Michalowski *et al.*, 2001; Santra y Karim, 2002 y Bera-Maillet *et al.*, 2005) y hongos (Srinivasan *et al.*, 2001 y Rezaeian *et al.*, 2005).

II. 1.2- Digestión de los compuestos nitrogenados

Las proteínas proporcionan los aminoácidos necesarios para el mantenimiento de las funciones vitales como reproducción, crecimiento y lactancia. Los animales no rumiantes necesitan aminoácidos preformados en su dieta, pero los rumiantes pueden utilizar también otras fuentes de nitrógeno (N) porque los microorganismos que habitan el rumen tienen la habilidad especial de sintetizar aminoácidos y de formar proteína a partir de nitrógeno no proteico (NNP).

En el rumen, cierta cantidad de proteína dietaria puede escapar a la fermentación ruminal y pasar al intestino sin modificarse; es la proteína no degradable en el rumen (proteína by-pass). La proteína microbiana representada por los cuerpos celulares de los microorganismos pasa con las proteínas de la ración que no se modifican por la microflora hasta el intestino donde se digieren en forma similar a la digestión proteica en los monogástricos.

De los nutrientes nitrogenados que consumen los rumiantes, entre el 25 y el 50% llega al ciego, donde existe actividad de enzimas proteolíticas, ureolíticas y desaminasas, lo cual explicaría la elevada concentración de amoníaco en el

contenido cecal. El amoníaco absorbido desde el ciego se convierte a urea en el hígado y puede ser reciclado hacia el rumen vía salival.

Se estima que la microflora ruminal altamente proteolítica representa entre el 30 y el 50% de la población bacteriana. Las bacterias degradan la mayor parte de las proteínas en péptidos y aminoácidos; una alta proporción de los aminoácidos son desaminados hasta NH_3 y cadenas carbonadas. Estas últimas se utilizan para la síntesis de ácidos grasos ramificados.

La velocidad y magnitud de la degradación proteica en el rumen varía entre proteínas de diferentes fuentes y también depende del nivel de la actividad proteolítica, del tiempo de estancia de la proteína en el rumen, del pH y de las especies microbianas presentes, influyendo directamente el tipo de dieta en la actividad proteolítica.

II. 1.3- Fermentación ruminal de los lípidos

Usualmente la dieta consumida por los rumiantes contiene sólo entre un 4 y un 6% de lípidos, en materia seca. Sin embargo, son parte importante de la ración de los animales destinados a la producción de leche, ya que contribuyen directamente a casi el 50% de la grasa en la leche y son la fuente más concentrada de energía en los alimentos (Wattiaux y Armentano, 2000).

El metabolismo de los lípidos se diferencia enormemente en los monogástricos y los poligástricos. Esta diferencia radica, principalmente, en que en los rumiantes la flora microbiana ruminal modifica las sustancias lipídicas, dando lugar a que las grasas que se depositan en los tejidos tengan una composición relativamente constante y diferente de la que aportan los alimentos, mientras que en los monogástricos las grasas de reserva son muy similares a las alimentarias. Es decir, las grasas sufren un proceso de hidrólisis en el rumen, del cual son responsables las lipasas producidas por algunas especies de bacterias ruminales. Tras el proceso de hidrólisis, los ácidos grasos insaturados son en parte sometidos a una hidrogenación y como resultado de esta, la proporción de ácidos grasos insaturados que fluyen posteriormente al intestino para su absorción es significativamente inferior a la que originalmente presenta el alimento.

El grado de hidrogenación en el rumen se encuentra influenciado por el pH, siendo mayor a pH altos, y viceversa. La adición de grasa a la dieta de los rumiantes influye en el comportamiento de la fermentación ruminal y en la secreción de la grasa láctea. Un exceso en la ración resulta negativo en la

digestibilidad de la fibra. Actualmente las grasas se saponifican para formar jabones de calcio u otros, lo que permite su mayor utilización.

II. 2.- Microorganismos ruminales

El rumen es un ecosistema anaerobio microbiano habitado por una compleja población de microorganismos como bacterias, hongos, protozoos y arqueas que viven en simbiosis con el animal hospedador y que están involucradas en la digestión y fermentación de los polímeros vegetales (Uyeno *et al.*, 2015).

Los microorganismos del rumen se clasifican en tres grupos: (I) los microorganismos que se adhieren a la pared del rumen, (II) los que viven libremente y (III) los que están adheridos a las partículas del alimento (Hungate, 1970). Este último grupo representa el 75% del total de microorganismos ruminales y desde el punto de vista ecológico, son los que presentan las mayores ventajas, ya que los que viven libremente salen del rumen más rápido por el flujo de la digesta.

El ecosistema ruminal es enormemente complejo, responde a cambios dietarios y la optimización de la fermentación ruminal dependerá en gran medida del entendimiento que se logre tener de los mecanismos reguladores de los procesos que tienen lugar en él.

II. 2.1- Bacterias

Cada mililitro de contenido ruminal alberga alrededor de 10 000 a 50 000 millones de bacterias, siendo estos los microorganismos más abundantes. Según González, (2002) la mayoría de las bacterias que podemos encontrar en el rumen son anaerobias estrictas Gram negativas, donde se observan bacilos, cocos, cocobacilos, espiroquetas y esporoformes, siendo las principales responsables de la fermentación ruminal. Algunos de los principales grupos de bacterias, de acuerdo con el sustrato utilizado, son los siguientes: bacterias celulolíticas (*Bacteroides ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*), hemicelulolíticas (*Butyrivibrio fibrisolvens*, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, *R. albus*), amilolíticas (*Bacteroides amylophilus*, *B. ruminicola*, *Streptococcus bovis*, *Succinomonas amilolítica*), proteolíticas (*Bacteroides amylophilus*, *B. ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *S. bovis*) y pectinolíticas (*B. fibrisolvens* y *Lachnospira multiparus*).

También algunas bacterias degradan componentes tóxicos de la dieta como los aminoácidos mimosina y sus derivados, componentes del forraje de *Leucaena*, fenoles vegetales como la cumarina y la canavanina, o componentes de la leguminosa *Canavalia ensiformis*, que inhiben algunas bacterias del rumen pero son hidrolizada por otras.

A pesar del papel de las poblaciones protozoaria y fúngica del rumen en la digestión de la pared celular vegetal, parece claro que son las bacterias los microorganismos más activamente implicados en este proceso, tanto cualitativamente, por su alta actividad enzimática, como a nivel cuantitativo, por la magnitud de su repercusión debido a su elevada concentración en el rumen.

II. 2.2- Protozoos

Según Roy (1980) y Rotger (2005), los protozoos del rumen se conocen desde 1843. El contacto con otros animales parece ser la principal vía de inoculación, siendo esta la única para el establecimiento de los protozoos a nivel ruminal.

La población de protozoos en el rumen es menor que la de las bacterias, encontrándose en concentraciones de 10^6 mL⁻¹ de contenido ruminal. Aunque su número sea menor, estos microorganismos tienen un mayor volumen individual, dando lugar a una masa celular de protozoos semejante a la masa de las bacterias.

En el rumen podemos encontrar protozoos ciliados y flagelados. Los ciliados presentan mayor concentración y actividad. Pertenecen a dos órdenes fundamentales: (1) Orden *Trichostomatida*, Familia *Isotrichidae*, Géneros *Isotricha*, *Dasytricha*, *Oligoisotricha*, y predominan cuando la dieta es alta en almidón (grano) y (2) Orden *Entodinomorphida*, Familia *Ophryoscolecidae*. Los protozoos flagelados utilizan azúcares simples y bacterias como sustratos.

El efecto de los protozoos en la digestión de la fibra vegetal depende del papel y de la importancia relativa de los distintos géneros y especies en el ecosistema ruminal (Williams y Coleman, 1988; Jouany y Ushida, 1994 y Fondevila, 1998). En general, la presencia de protozoos aumenta, directa o indirectamente, la fermentación ruminal de la celulosa y hemicelulosa respecto a animales defaunados. Esto es debido a que las actividades enzimáticas endoglucanasa, β -celobiosidasa y β -glucosidasa implicadas en la hidrólisis de la celulosa por una parte, y hemicelulasa y xilanasa, por otra, están ampliamente distribuidas entre los protozoos del rumen (Williams *et al.*, 1984).

Cunningham (1997), reportó que los protozoos ingieren un gran número de bacterias ruminales y mantienen constante la cantidad de estas. Ejercen un efecto negativo sobre las bacterias amilolíticas, debido a que protozoos como los Entodiniomorfos pueden ingerir grandes cantidades de gránulos de almidón, lo que disminuye su disponibilidad para las bacterias amilolíticas. La ingestión de almidón viene acompañada también por una depredación selectiva de las bacterias amilolíticas que se adhieren a los gránulos de estos (Sodiy Arce *et al.*, 2004).

II. 2.3- Hongos

En el rumen existen hongos anaerobios, en una concentración de 10^3 a 10^5 mL⁻¹ fluido ruminal. Ejemplos de estos son: *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communi*, *Piromonas communis* y *Orpinomyces*.

Se plantea que la población de hongos anaerobios del rumen está directamente relacionada con el contenido en fibra de la dieta, y su proporción disminuye en dietas ricas en almidón o azúcares solubles (Grenet *et al.*, 1989). Los hongos ruminales tienen capacidad enzimática de hidrolizar celulosa y xilano, aunque parece que no pectina (Fonty y Joblin, 1991). La acción fúngica sobre la pared celular vegetal y su contribución a la digestión ruminal de ésta, parece estar muy relacionada con su activa colonización. En este sentido, los hongos ruminales son especialmente activos frente a sustratos muy lignificados (Joblin y Naylor, 1989). Por otra parte, la acción mecánica de los hongos en la pared celular vegetal disminuye la rigidez estructural de los forrajes y favorece la ruptura de las partículas de este, aumentando también así la superficie accesible para la acción bacteriana. Cuantitativamente, la magnitud de la contribución de los hongos a la digestión de la pared celular *in vivo* no está totalmente esclarecida.

II. 3.- Modificación de la fermentación ruminal

La modificación de la fermentación ruminal es un enfoque que se encamina a maximizar la producción animal (Kholif *et al.*, 2014; Alsersy *et al.*, 2015; Salem *et al.*, 2015; Valdes *et al.*, 2015; Rojo *et al.*, 2015; Ana *et al.*, 2015; Tarek A. *et al.*, 2016). La población microbiana del rumen puede ser modificada mediante diferentes mecanismos. De esta manera es factible modificar la composición de los productos finales de fermentación de utilidad para el animal (amoníaco, ácidos grasos volátiles), la eficiencia del proceso de conversión de alimentos, las

emisiones ambientales (tales como metano) y la calidad de los productos finales como es la producción de leche o de carne.

El avance en los conocimientos de la microbiología ruminal y el potencial de modificación de la misma resulta de trascendencia en la obtención de productos sanos, seguros, ambientalmente aceptables y que simultáneamente contemplan la productividad y rentabilidad de los sistemas de producción de rumiantes.

Los agentes primarios en la modificación de la fermentación ruminal son la combinación de los alimentos utilizados, su composición y proporción relativa en la dieta (Arelovich, 2008), así como la naturaleza de los diferentes aditivos que se utilizan con este fin. Dentro de estos aditivos, recogidos en el reglamento N° 1831/2003 de la Unión Europea, los aditivos zootécnicos son uno de los grupos que suscita mayor interés desde el punto de vista de la producción animal, ya que su utilización puede mejorar el rendimiento productivo de los animales y disminuir los costes de producción.

En función de sus características y mecanismo de acción, la mayoría de los aditivos zootécnicos se pueden incluir en alguno de estos grandes grupos: probióticos, ácidos orgánicos, preparados enzimáticos y extractos vegetales. Los probióticos fibrolíticos se han usado con mayor frecuencia para mejorar la función digestiva en rumiantes adultos (Sun *et al.*, 2010; Kumar y Sirohi, 2013; Præsteng *et al.*, 2013). A continuación se analizan algunos aspectos relacionados con los aditivos microbianos y los preparados enzimáticos utilizados como modificadores de la fermentación ruminal.

II. 3.1- Aditivos microbianos

El uso de los probióticos como aditivos parece estar fuertemente impulsado por la prohibición de la mayoría de los aditivos antibióticos en la Unión Europea, debido al riesgo especulado de generar resistencia a los antibióticos por la microbiota patógena (Windisch *et al.*, 2008), la presencia de residuos químicos en productos de origen animal y la liberación de antibióticos al medio ambiente (Yamamoto *et al.*, 2014, Martínez-Vaz *et al.*, 2014) y también por el advenimiento de la agricultura ecológica actual (Retta, 2016)

La terminología asociada con la incorporación de cultivos de microorganismos a las dietas de rumiantes es inconsistente y a la vez confusa. El término probiótico se definió como “un suplemento alimenticio microbiano vivo, con efecto beneficioso para el animal hospedador, que mejora el balance microbiano intestinal” (Fuller, 1989). Sin embargo, Vanbelle *et al.* (1990), señalan

que muchos investigadores utilizan el término probiótico para referirse a “recuentos de bacterias viables ácido lácticas, seleccionadas y concentradas” (*Lactobacillus*, *Streptococcus*). En 1989 la FDA (*Food and Drug Administration* de los Estados Unidos) propuso a los fabricantes la utilización del término aditivo microbiano (o DMF, direct fed-microbial) en lugar de probiótico, y lo define como una fuente de microorganismos viables, que incluye bacterias, hongos y levaduras (Castro-Madrigal y Jimeno-Vinatea, 2001).

La mayoría de las bacterias utilizadas en los animales rumiantes pertenecen a las especies *Bacillus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* y entre los hongos destacan *Aspergillus oryzae* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En general, los cultivos de bacterias son más utilizados en los animales jóvenes (prerrumiantes) y los cultivos fúngicos se administran a animales con un rumen funcional (animales en cebo o hembras lecheras), aunque las levaduras también pueden ser eficaces en los animales prerrumiantes. Es de destacar que en los últimos años se han autorizado en la Unión Europea por primera vez probióticos destinados a pequeños rumiantes, tanto a animales jóvenes (corderos y cabritos) como a adultos (ovejas y cabras lecheras), y a búfalas lecheras, ya que anteriormente solo estaban autorizados probióticos destinados al ganado vacuno. Estos hechos avalan la eficacia de estos aditivos en diferentes especies y demuestran el interés de sus fabricantes por aumentar su mercado.

Algunos de estos microorganismos son capaces de soportar altas temperaturas, como las utilizadas en ciertos procesos de fabricación de piensos (granulación, extrusión, etc.), pero otros no pueden sobrevivir en estas condiciones y deben ser protegidos mediante diferentes tratamientos que aseguren su eficacia, lo que suele encarecer el precio del producto comercial. En cualquier caso, para garantizar la máxima eficacia los microorganismos deben mantenerse viables hasta su administración al animal y la forma de presentación se ha diseñado para asegurar esta viabilidad. Hay que recordar que estos aditivos deben administrarse de forma continuada a los animales, ya que los microorganismos incluidos no pueden multiplicarse en el tracto digestivo de los animales rumiantes y su supervivencia en el mismo es muy limitada (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2012; Azzaz *et al.*, 2015 y Azzaz *et al.*, 2016).

Las bacterias como aditivo microbiano se emplearon inicialmente por sus efectos post ruminales beneficiosos, basados en el mantenimiento del equilibrio de la microflora del tracto digestivo, limitando la proliferación de especies potencialmente patógenas (Brashears *et al.*, 2003). Ciertos aditivos microbianos de origen bacteriano pueden además mejorar la función ruminal (Ghorbani *et al.*,

2002; Nocek *et al.*, 2002 y Beauchemin *et al.*, 2003). La acción de estos microorganismos a nivel ruminal tiene efectos diferentes a los que ocurren en el tracto posterior o en los animales monogástricos, pues generalmente, los aditivos microbianos en el rumen actúan en la composición de la comunidad microbiana y su actividad (Castro-Madrigal y Jimeno-Vinatea, 2001). Dentro de las bacterias que se utilizan en la alimentación de rumiantes encontramos algunas aisladas del rumen y otras de origen no ruminal pertenecientes fundamentalmente a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Bacillus* y *Propionibacterium* (Kamra y Agawal, 2004).

Las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* se encuentran dentro de las más estudiadas como aditivos microbianos en rumiantes. Con la adición de *Lactobacillus acidophilus* a la dieta de estos animales se observó un aumento en la ganancia de peso, el consumo de MS, la digestibilidad del alimento y índice de conversión del alimento (Khuntia, 1997; Malik y Sharma, 1998; Ramaswami, 2000 y Prahalada *et al.*, 2001). Al evaluar también en rumiantes cepas de *L. acidophilus* y *L. rhamnosus* se encontró un aumento en la ganancia de peso y en la producción de leche, así como mayor contenido de proteína y grasa de la misma (Bernardeau y Guillier, 2003). Reyes *et al.* (2005), al evaluar estos mismos microorganismos encontraron que las vacas que los consumieron produjeron más leche, y con mayor contenido de proteínas y sólidos no grasos.

Es cierto que las bacterias han demostrado ser eficientes activadoras de la fermentación ruminal; sin embargo, los productos más difundidos en las dietas de rumiantes consisten en extractos de la fermentación de *A. oryzae* y cultivos de *S. cerevisiae*, o ambos (Carro *et al.*, 2014a)

II. 3.1.1- Las levaduras como aditivo microbiano en animales rumiantes

El uso de levaduras en dietas de rumiantes tiene una larga historia. En 1925, Eckles *et al.* publicaron un artículo sobre el uso de levaduras como un suplemento alimenticio para vacas lecheras, señalando la levadura de cerveza como una excelente fuente de proteína en las dietas para este tipo de animales (Carter y Phillips, 1944; Steckley *et al.*, 1979; Johnson y Remillard, 1983). La suplementación con bajos niveles de levadura (<1% de la MS de la dieta) de las dietas de vacas lecheras recibió atención por primera vez en la década de 1950. Sin embargo, ha sido más recientemente cuando se ha analizado cómo bajos niveles de levadura suplementados en la dieta pueden estimular la productividad de los rumiantes.

Las levaduras *Saccharomyces* spp. constituyen uno de los microorganismos más utilizados en la alimentación animal, tanto en monogástricos como en rumiantes. En general, las mejores respuestas en rumiantes se han observado en el caso de vacas lecheras, y los efectos reconocidos se atribuyen principalmente al aumento de la celulolisis ruminal y del flujo de proteína microbiana al intestino (Newbold, 2003). Este efecto puede ser la consecuencia de varias acciones de las levaduras. Por un lado, las levaduras necesitan azúcares y almidón para su metabolismo, por lo que los captan del medio ruminal, evitando que sean empleados por microorganismos productores de ácido láctico, lo cual reduce sus niveles en el rumen y contribuye a estabilizar el pH ruminal y mantenerlo en niveles adecuados para una fermentación óptima. Como consecuencia se produce un aumento en la degradación de la fibra y en la producción de ácidos grasos volátiles, lo que se traduce en una mejora de la eficiencia de utilización del alimento (Carro *et al.*, 2006). Además, al aumentar la degradación de la fracción fibrosa del alimento, se puede estimular su ingestión por los animales, tal y como se ha observado en algunos estudios (Moallem *et al.*, 2009).

II. 3.1.1.1- Efectos en rumiantes adultos

La respuesta a la inclusión de levaduras en la dieta de animales en lactación y animales en crecimiento ha sido variable (Fiems, 1993 y Newbold *et al.*, 1995) y esta variabilidad se ha atribuido parcialmente al tipo de dieta (Wallace y Newbold, 1993). Una estimulación en la síntesis de proteína microbiana en el líquido ruminal en respuesta a la inclusión de levaduras (Kamalamma *et al.*, 1996), conducirá a un incremento en el flujo de proteína microbiana que abandona el rumen y a un mayor flujo de aminoácidos que entran en el intestino delgado. Sin embargo, este incremento en el flujo de proteína microbiana solo podría esperarse que incrementara la producción en situaciones en donde la proteína duodenal fuera limitante. De esta manera, Putmam *et al.* (1997) encontró que la producción de leche de vacas a principios de la lactación que eran alimentadas con una dieta baja en proteína bruta se incrementó cuando se incluyó la levadura, pero no obtuvo respuesta con dietas altas en proteína. De forma similar, las respuestas a la inclusión de levaduras son mayores en las fases iniciales de la lactación que en la mitad o en la parte final de la misma (Günther, 1990).

La respuesta esperada de la inclusión de levaduras vivas en la dieta suele ser un aumento de la ingestión, la producción y la grasa de leche, disminuyendo

en ocasiones la proteína. Van Vuuren (2003), en un trabajo de revisión, encontró que la respuesta positiva a las levaduras ocurrió en 10 de 12 experimentos realizados, sin que se pueda demostrar relación entre el aumento de ingestión y el de producción, o una clara influencia el estado de lactación. Estos resultados son coherentes con la variación de los productos finales de la fermentación ruminal esperados al aumentar la celulolisis y el flujo de proteína microbiana, con un aumento del acetato y disminución del propionato. Según Carro y Ranilla (2002), en los rumiantes adultos se ha observado que el uso de microorganismos tales como *S. cerevisiae* y *A. oryzae* puede incrementar la producción de leche (entre 1 y 2 Kg animal/día) y la ganancia diaria de peso de terneros en cebo (hasta un 20%). Sin embargo, en estos animales la actividad de los aditivos microbianos tampoco es consistente, y en muchos estudios no se ha observado efecto alguno.

El mecanismo de acción de las levaduras en el caso de los animales rumiantes es múltiple y complejo: eliminan trazas de oxígeno que penetran en el rumen (Auclair, 2003) y favorecen así el crecimiento de las bacterias anaerobias estrictas; compiten con las bacterias amilolíticas productoras de lactato por la glucosa y oligosacáridos, disminuyen la producción de lactato; liberan al medio ruminal ácido málico que favorece el crecimiento de *S. ruminantium*, la cual es capaz de metabolizar el lactato hasta propionato; y producen nutrientes que estimulan el crecimiento de las bacterias ruminales.

Acerca del empleo de *S. cerevisiae* existe un consenso general, en la literatura, referido a que se producen incrementos en las poblaciones de bacterias viables totales, así como en la tasa de degradación de la fibra en el rumen e incrementos en el flujo de proteína microbiana desde este hacia el intestino delgado, lo que se traduce en los parámetros productivos. La inclusión en la dieta de *S. cerevisiae* aumentó la producción de leche y el consumo en vacas alimentadas con dietas con alto contenido en concentrado (60:40) (Williams *et al.*, 1991 y Piva *et al.*, 1993). En vacas primíparas y multíparas hubo una tendencia a mejorar la producción de leche al usar *S. cerevisiae* 23 días preparto y 56 días postparto y aumentó el consumo de MS (Robinson y Garret, 1999).

En el rumen, el hidrógeno es un intermediario producido durante la fermentación. El hidrógeno metabólico no se acumula en el rumen porque es rápidamente utilizado por bacterias metanógenas, pero las bacterias acetogénicas hidrogenotróficas son también capaces de utilizar hidrógeno para la producción de acetato. Chaucheyras *et al.* (1995) hallaron que la adición de

células de levadura *S. cerevisiae* mejora el metabolismo hidrogenotrófico de las cepas acetogénicas y su producción de acetato. Al utilizar diferentes cepas de *S. cerevisiae* se encontró que estimulan el crecimiento de bacterias celulolíticas en el rumen, así como de las bacterias proteolíticas. La capacidad de las levaduras para estimular el crecimiento microbiano parece estar relacionada con su habilidad para disminuir las concentraciones potencialmente inhibitorias de oxígeno. Newbold *et al.* (1996) mostraron que la levadura puede estimular la multiplicación de *S. ruminantium* en un medio de incubación con una mezcla de fluido ruminal *in vitro*. De forma similar, Galindo *et al.* (2010) observaron que un hidrolizado enzimático de la levadura *S. cerevisiae* aumentó las poblaciones de bacterias viables totales y de bacterias celulolíticas en condiciones *in vitro*, lo que puede incidir directamente en un incremento en la degradabilidad de los alimentos, especialmente aquellos que contengan un alto contenido en fibra. Se ha demostrado que la estimulación de la degradación de la celulosa por esta levadura está asociada con una disminución del tiempo necesario para el inicio de la degradación, lo que resulta en un incremento inicial en la tasa de digestión, pero no en el incremento en la extensión de digestión por los microorganismos ruminales (Chademana y Offer, 1990; Williams *et al.*, 1991; Erasmus *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 1994 y Callaway y Martin, 1997). Otros estudios no hallaron diferencias en la degradación ruminal (Carro *et al.*, 1992; Enjalbert *et al.*, 1999) o en la digestibilidad de la MS o fibra en el tubo digestivo (Harrison *et al.*, 1988; Malcolm y Kiesling, 1990; Mutsvangwa *et al.*, 1992; Hadjipanayiotou *et al.*, 1997 y Enjalbert *et al.*, 1999), mientras que otros encontraron un incremento del flujo de materia seca al duodeno y de las concentraciones de NH₃ en el duodeno y en el rumen (Williams y Newbold, 1990; Roa *et al.*, 1997). En otros estudios, sin embargo, disminuyó la concentración de amoníaco (El Hassan *et al.*, 1996 y Enjalbert *et al.*, 1999) y se incrementó la síntesis de proteína microbiana en el rumen, mejorando el flujo de aminoácidos que llegan al intestino delgado (Erasmus *et al.*, 1992).

En dietas con altas proporciones de concentrado (70%) la inclusión de *S. cerevisiae* incrementó la degradabilidad de la MS y la FND (Carro *et al.*, 1992) y aumentó la producción de AGV (Carro *et al.*, 1992 y Rossi *et al.*, 1994), pero en otro estudio no se modificó la producción de lactato y amoníaco (Newbold *et al.*, 1996). En un estudio realizado con fermentadores RUSITEC por Öztürk *et al.* (2015) utilizando células hidrolizadas de levaduras *S. cerevisiae*, se encontraron aumentos en las concentraciones de amoníaco consistentes con las encontradas por Vyas *et al.* (2014) en estudios *in vivo*, lo que se puede deber al aporte de nitrógeno contenido en las células de las levaduras, que pudo ser utilizado por

las poblaciones microbianas ruminales. Según Pacheco *et al.* (1997), la mitad de la materia seca de las células de levaduras puede ser proteína. Molisa *et al.* (2014) determinaron que la levadura entera hidrolizada contiene aproximadamente el 38% de proteína, lo que pudo causar el incremento en la concentración de amoníaco observada en su estudio. Andrighetto *et al.* (1993) y Anon (2007), utilizando 50% de ensilado de maíz y 50% de suplemento peletizado y dos dosis de levadura (20 y 40 g/día) en ganado ovino, encontraron que el consumo de MS se incrementó cerca de 200 g/día con la adición de las levaduras. Este hecho se atribuyó a un incremento en la palatabilidad de la dieta y a una estimulación de la actividad fermentativa microbiana en el rumen, especialmente por las bacterias celulolíticas.

Estudios realizados por Callaway y Martin (1997) y Dawson y Girard (1997) con cultivos puros de levaduras y por Newbold *et al.* (1998) con cultivos mixtos encontraron que no todas las bacterias se estimulan por la inclusión de levaduras. Es importante señalar que la variabilidad en la respuesta a la inclusión de levaduras puede estar relacionada con la dieta, pero también existen evidencias de que la cepa de *S. cerevisiae* usada influye en la efectividad del producto, ya que no todas son capaces de estimular la fermentación ruminal con la misma intensidad (Fiems, 1993 y Roa *et al.*, 1997). Newbold *et al.* (1995) señalaron que se debe tener precaución en la selección de la levadura para asegurar que la cepa utilizada sea capaz de estimular la fermentación en el rumen. De la misma manera, la levadura es material biológico y se ve afectada de manera negativa por calentamiento excesivo (El Hassan *et al.*, 1993; Girard y Dawson, 1995 y Koul *et al.*, 1998).

Bach *et al.* (2005) evaluaron los efectos de la suplementación con levaduras vivas (5 g/día; equivalentes a 10^{10} ufc/día) de *S. cerevisiae* cepa CNCM 1077 (Levucell SC2, Lallemand, France) en el pH ruminal de vacas en lactación y observaron que el pH ruminal medio fue mayor cuando las vacas recibieron levaduras que cuando no se suplementaron (6,02 vs 5,51, respectivamente). Además, el porcentaje de tiempo que el pH ruminal estuvo por debajo de 5,6 en las vacas control fue superior al de las vacas suplementadas. Estos resultados son consistentes con otros previos (Michalet-Doreau y Morand, 1996 y Nocek *et al.*, 2003), pero contradicen otros estudios realizados *in vivo* (Robinson y Garret, 1999 y Ghorbani *et al.*, 2002) e *in vitro* (Sullivan y Martin, 1999; Díaz *et al.*, 2009). Los resultados positivos sugieren que la suplementación con levaduras redujo el riesgo y la severidad de la acidosis subclínica.

La información sobre los efectos del empleo de levaduras en el ganado ovino y caprino es más escasa. Abd El-Ggani (2004), analizó la respuesta a la inclusión de un cultivo de *S. cerevisiae* en la ración de cabras Zaraibi (6 g/día) y observó que los animales que recibían este aditivo producían una mayor cantidad de leche, pero con una menor concentración en sólidos totales y proteína. Estos cambios en la producción de leche se atribuyeron a la mayor ingestión de MS que presentaron los animales que recibieron los cultivos de levaduras. En trabajos realizados en cabras al inicio de la lactación, el principal efecto encontrado al suministrar levaduras en la dieta fue la movilización de más reservas (Giger-Reverdin *et al.*, 1996). Erasmus *et al.* (1992) observaron que la producción diaria de leche y su porcentaje de grasa no se afectaron al incluir a *S. cerevisiae* en la dieta, encontrando los mismos efectos Hadjipanayiotou *et al.* (1997) en cabras y ovejas en lactación. Salama *et al.* (2002) tampoco observaron efectos de un aditivo comercial, compuesto por una mezcla de un cultivo de *S. cerevisiae* (6 g/día) y malato, sobre la producción y composición de la leche en cabras Murciano-Granadina, pero las cabras que recibieron el aditivo presentaron un mayor incremento de peso vivo a lo largo del periodo experimental.

En lo que se refiere a la producción de carne, en algunos estudios se ha observado que los corderos de engorde experimentaron mayores ganancias diarias de peso cuando recibieron cultivos de levaduras (Andrighetto *et al.*, 1993; Caja *et al.*, 2000; Haddad y Goussous, 2005), ganancias que en algún caso fueron acompañadas de una mayor ingestión de alimento (Andrighetto *et al.*, 1993). En los casos en los que el consumo de alimento no se modificó, las mayores ganancias de peso se atribuyeron a mejoras de la digestibilidad de la ración ocasionadas por la suplementación con cultivos de levaduras.

II. 3.1.1.2- Componentes de las paredes celulares de las levaduras, su efecto en la dieta animal

Las paredes celulares de las levaduras pueden constituir aproximadamente el 30% de la materia seca de la célula, y representan, por tanto, una importante inversión de esta en su síntesis. A escala estructural, la pared celular de las levaduras está constituida por tres grupos de polisacáridos: polímeros de manosa o manano-proteínas, hasta un 50% de la; polímeros de glucosa o β -glucanos (1,3/1,6), hasta un 55% de la MS; y en menor proporción, polímeros de N-acetil-glucosamina o quitina en un 6% de la MS de la pared celular de la

levadura (Nguyen *et al.*, 1998; Klis *et al.*, 2002; Aguilar-Uscanga y François, 2003).

Los extractos o autolisados de levaduras, también conocidos como hidrolizados de levaduras o paredes celulares de levaduras, son obtenidos a partir de la autólisis o hidrólisis de las levaduras. Estos hidrolizados son fuentes de aminoácidos, nucleótidos, ácido glutámico, vitaminas y minerales. Debido a esta característica, los extractos de levadura son empleados para enriquecer medios de cultivo microbiológicos y optimizar el crecimiento de los microorganismos y son utilizados también en la industria alimentaria como saborizantes (Oriol, 2004; Stone, 2006). Sin embargo, muchos de estos extractos de levaduras son residuos que se obtienen en la industria y que pueden constituir un elemento altamente contaminante del medio ambiente, lo podría evitarse mediante su utilización como suplementos para la alimentación animal.

En el ámbito, desde la pasada década se ha incrementado el interés por la utilización en la dieta de fracciones de paredes celulares de levadura como fuentes de polisacáridos de tipo β -glucanos y manano-oligosacáridos (MOS). Este tipo de polisacáridos son reconocidos como aditivos naturales capaces de ejercer efectos beneficiosos en la salud y productividad del individuo (Hooge, 2004). En una situación similar a la mayoría de los nuevos aditivos naturales, los mecanismos de acción específicos para los diferentes aditivos elaborados a partir de levaduras y sus fracciones empleados en dietas de animales no han sido claramente definidos. A pesar de esto, los beneficios obtenidos en la salud y productividad de los animales por su aplicación en la dieta están bien documentados. Según algunos autores (Nilson *et al.*, 2004; Spark *et al.*, 2005) las mejoras observadas en la productividad y salud de los animales que consumen levaduras podrían ser debidas al aporte de los nutrientes presentes en las células de levaduras y que pueden ser utilizados por el animal en los monogástricos y por los microorganismos ruminales en el caso de los animales rumiantes.

Oeztuerk *et al.* (2016) utilizaron células de *S. cerevisiae* hidrolizadas en fermentadores RUSITEC y observaron un aumento de la producción de AGV y una mejora de los parámetros de la fermentación ruminal, aunque también aumentó la producción de metano. Opsi *et al.* (2012) también observaron un aumento de la producción de metano *in vitro* al utilizar células de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* inactivadas (0,25 a 0,5 g/L) con dietas mixtas con diferentes proporciones de forraje:concentrado. En otro estudio realizado para evaluar *in vitro* el efecto de un hidrolizado de *S. cerevisiae* (Kettunen, 2016), se

encontró un incremento en la producción de gas y un aumento en la concentración y la proporción relativa de ácido propiónico en el medio de fermentación. En el ganado lechero, la suplementación con levadura y/o componentes de la pared celular de la levadura se ha asociado con la reducción del impacto negativo del estrés por calor en el ganado, lo que mejora la producción de leche, mejora el estado inmune, y disminuye la incidencia de mastitis, reduciendo el recuento de células somáticas (Nocek *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2014, Sánchez *et al.*, 2013, 2014, Salinas-Chivaras, 2015)

En general son pocos los trabajos que han analizado el efecto de los derivados de levaduras en animales rumiantes adultos y en su mayoría se refieren a su efecto en la fase de prerrumiantes. Los MOS pueden ser incorporados en la dieta de terneros, ya sea a través del lactorreemplazante o en el concentrado de iniciación, a dosis que fluctúan entre 2 y 8 g/día. La adición de MOS al actorreemplazante ha mostrado efectos beneficiosos sobre la ganancia de peso, la cantidad de alimento consumido y el índice de conversión. Newman *et al.* (1993) y Dildey *et al.* (1997) realizaron ensayos con terneros Holstein estabulados individualmente suplementados con MOS o sin suplementar. Los resultados indicaron que el peso final de los terneros que recibieron el aditivo MOS superó en un 6,5% el peso del grupo control en ambos ensayos.

Como se ha mencionado, los MOS también pueden ser adicionados al concentrado de iniciación. Dvorak *et al.* (1997) realizaron un estudio con 8 tratamientos, en el que utilizaron terneros Holstein destetados a los 56 d de edad, comparando la presencia y ausencia de MOS y/o un antibiótico (neoterramicina) en el lactorreemplazante, y adicionalmente la presencia o ausencia de MOS en un concentrado de iniciación. Dichos autores concluyeron que cuando no se adicionó MOS al concentrado de los terneros tratados con antibióticos se registró una ganancia de peso similar al grupo tratado con MOS y antibiótico, por lo que no se observó efecto alguno cuando el aditivo MOS es adicionado solo en el lactorreemplazante. En cambio, cuando los terneros recibieron MOS en el lactoreemplazante y el concentrado de iniciación, los efectos sobre la tasa de ganancia de peso fueron iguales al grupo tratado con el antibiótico. Cabe mencionar que los resultados obtenidos podrían estar determinados por el estado sanitario de los terneros. De acuerdo a esto, Newman *et al.* (1993) y Dildey *et al.* (1997), en los ensayos antes mencionados, efectuaron menos tratamientos contra la diarrea en animales alimentados con MOS. Dildey *et al.* (1997), al efectuar un análisis de muestras fecales, encontraron mayores concentraciones de coliformes respecto del grupo control. Similares resultados

han sido encontrados por Heinrichs *et al.* (2003) al comparar el efecto de la adición de un antibiótico (neoterramicina) y de MOS en un lactorremplazante.

En otros estudios se ha investigado también el efecto de MOS incorporados a una ración completa mezclada ofrecida a vacas lecheras sobre su producción. De Ondarzá y Silvano-Jones (2000) observaron un incremento en la producción de leche y un menor consumo de MS, lo cual generó una mayor eficiencia en la conversión de los alimentos, indicando un efecto positivo de los MOS sobre la microflora ruminal. No obstante, una vez finalizado el ensayo la producción de leche para el grupo tratado con MOS disminuyó, lo cual indica que el efecto sólo perdura si es incorporado regularmente en la dieta. Cabe señalar que no hubo efecto de los MOS en el porcentaje de proteína y grasa en la leche. Los estudios realizados en animales rumiantes adultos utilizando derivados de las paredes celulares de las levaduras para evaluar su impacto en la fermentación ruminal son escasos, por lo que resulta de gran interés el estudio de estos productos sabiendo que sus componentes pueden constituir fuentes de nutrientes capaces de estimular las poblaciones microbianas ruminales y servir como sustrato para las mismas, y por tanto, influir de forma directa en los procesos fermentativos ruminales.

II. 3.2.- Utilización de enzimas como aditivos en la dieta de animales rumiantes

Las enzimas son producidas por los seres vivos y actúan como catalizadores biológicos de los procesos metabólicos. Estas pueden utilizarse como aditivos en la alimentación de los rumiantes, ya que catalizan reacciones degradativas mediante las cuales los alimentos son digeridos hasta sus componentes químicos, liberando así nutrientes (azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, etc.) que son utilizados para el crecimiento celular, bien sea por los microorganismos ruminales o por el animal hospedador. La suplementación de las dietas de rumiantes con enzimas exógenas tiene el potencial de mejorar la digestibilidad de la pared celular de las plantas, y por lo tanto, de aumentar la eficiencia de utilización del alimento. Comprender la complejidad del ecosistema microbiano ruminal y la naturaleza de sus interacciones con las paredes celulares de las plantas es la clave para el uso de enzimas exógenas con el fin de mejorar la alimentación de los rumiantes (Meale *et al.*, 2014; Tadele y Animut, 2015). De ahí que muchos investigadores se dediquen al estudio de estos aditivos, Salem *et al.*, 2013, 2015; Valdes *et al.*, 2015; Alsersy *et al.*, 2015.

De la variedad de enzimas que pueden utilizarse como aditivos, las que han recibido una mayor atención en los últimos años en los animales rumiantes son las enzimas fibrolíticas, por lo que las siguientes secciones se centran fundamentalmente en ellas.

II. 3.2.1- Tipos de enzimas fibrolíticas utilizadas. Mecanismos de acción

En la actualidad existe un gran número de productos enzimáticos comercializados como aditivos alimentarios para diferentes especies animales, pero la mayoría de ellos son producidos por cuatro bacterias (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus faecium*), y tres especies de hongos (*A. oryzae*, *Trichoderma spp.* y *S. cerevisiae*) (Muirhead, 2001). Sin embargo, en general, ninguno de los productos comerciales constituye una preparación pura formada únicamente por una enzima aislada (Beauchemin y Rode, 1996), sino que presentan una mezcla compleja de proteínas con actividades enzimáticas diversas (Colombatto *et al.*, 2003b).

Las preparaciones enzimáticas fibrolíticas comerciales que pueden utilizarse en la alimentación de los animales rumiantes son caracterizadas según su capacidad para degradar las paredes celulares de los vegetales, y por ello se clasifican principalmente como celulasas o xilanasas. Algunos hongos producen celulasas y xilanasas como entidades independientes, pero otros hongos anaerobios (cepas de los géneros *Neocallimastix*, *Piromyces* y *Orpinomyces*) y bacterias anaerobias (*Clostridium thermocellulum* y *Clostridium cellulolyticum*) producen complejos multi-enzimáticos que tienen actividad celulasa y xilanasas (Phipps *et al.*, 2002).

Sin embargo, como ya se ha indicado, la mayoría de los preparados comerciales no están formados por una única enzima, sino que todos ellos presentan actividades enzimáticas secundarias de tipo amilasa, proteasa o pectinasa (McAllister *et al.*, 2001). Este hecho constituye una ventaja, ya que un mismo preparado enzimático puede ser efectivo con diferentes dietas, pero también representa un problema en el momento de controlar la calidad de los preparados enzimáticos y de extrapolar los resultados obtenidos con una preparación enzimática a otras existentes en el mercado (Carro *et al.*, 2004). Por otra parte, incluso dentro de una misma especie microbiana, los tipos y actividades de las enzimas producidas pueden variar ampliamente, dependiendo de la cepa seleccionada, y del medio y condiciones de cultivo empleados

Las mejoras en la productividad de los animales rumiantes debido al uso de enzimas fibrolíticas como aditivos se han atribuido, generalmente, a aumentos en la digestibilidad de los alimentos. De hecho, se han publicado numerosos artículos en los que se describen efectos positivos de las enzimas sobre la degradabilidad y/o digestibilidad de la MS y de la fibra de los alimentos, determinadas tanto en condiciones *in situ* e *in vitro* (Colombatto *et al.*, 2003a; Giraldo *et al.*, 2007b; Giraldo *et al.*, 2008b y Gado *et al.*, 2013), como *in vivo* (Rode *et al.*, 1999; Beauchemin *et al.*, 2000 y Kung *et al.*, 2000). A pesar de que en los últimos años se han realizado numerosos estudios para investigar los efectos de las enzimas fibrolíticas cuando se utilizan como aditivos en la alimentación de los animales rumiantes, el modo de acción de las mismas todavía no se conoce totalmente. Sin embargo, sí se admite que las enzimas fibrolíticas podrían modificar la utilización de los alimentos por los rumiantes tanto mediante efectos ejercidos directamente sobre dichos alimentos antes de su consumo como mediante efectos sobre los procesos digestivos que tienen lugar en el rumen y/o en el tracto digestivo postruminal (McAllister *et al.*, 2001). Se han propuesto varios modelos potenciales acerca del modo de acción de las enzimas. Estos incluyen el aumento de la colonización microbiana de las partículas del alimento (Yang *et al.*, 1999), la mejora de la fijación y/o el acceso de los microorganismos a las paredes celulares vegetales y con ello la aceleración del ritmo de degradación (Nsereko *et al.*, 2000a) y la mejora de la capacidad de hidrólisis ruminal, debido a la adición de la actividad de las enzimas y su sinergia con las enzimas microbianas ruminales (Newbold, 1997); Morgavi *et al.*, 2000a).

II. 3.2.2- Efectos directos sobre los alimentos

En diferentes estudios se ha observado que la aplicación de enzimas exógenas directamente sobre los alimentos puede provocar una liberación de azúcares solubles (Hristov *et al.*, 1996), y en algunos casos una cierta degradación de la FND y FAD (Krause *et al.*, 1998; Giraldo *et al.*, 2004b).

Los efectos de las enzimas sobre el contenido en FND de los alimentos varían con el tipo de alimento utilizado. Así, Wang *et al.* (2001) observaron que la aplicación de una mezcla de enzimas fibrolíticas a diferentes alimentos provocaba un descenso del 10% en el contenido de FND de la cebada en grano, pero no producía efectos sobre el heno de alfalfa. De forma similar, Giraldo *et al.* (2004b) analizaron los efectos de una celulasa producida por *Trichoderma longibrachiatum* sobre la composición de la pared celular de tres forrajes

tropicales de diferente calidad nutritiva, donde el tratamiento con la celulasa durante 24 h redujo el contenido en FND y FAD de dos de los forrajes, pero no mostró efecto alguno sobre el tercero, que presentaba un elevado contenido en lignina (183 g/Kg MS). Por otra parte, se ha observado que algunos alimentos ensilados contienen componentes que pueden inhibir la actividad de las xilanasas (Nsereko *et al.*, 2000b), hecho que explicaría la ausencia de efectos observada en algunos estudios con alimentos ensilados.

Forsberg *et al.* (2000) señalan que la liberación de azúcares solubles proporcionaría los suficientes carbohidratos adicionales para estimular la colonización de las partículas de alimento y estimular así el crecimiento microbiano. Sin embargo, la cantidad de azúcares liberada representa solamente una pequeña cantidad de los carbohidratos totales presentes en la dieta, por lo que los aumentos observados en la degradabilidad de la fibra no pueden atribuirse únicamente a este efecto (Beauchemin *et al.*, 2003).

En varios estudios (Wang *et al.*, 2001; Beauchemin *et al.*, 2003; Giraldo *et al.*, 2004a y Giraldo *et al.*, 2007b) se ha observado que el pretratamiento de los alimentos con enzimas fibrolíticas durante un tiempo antes de su ingestión por los animales produce mayores efectos que su administración directa en el rumen o su mezclado con los alimentos inmediatamente antes de su administración a los animales, por lo que se acepta que los efectos directos de las enzimas sobre los alimentos contribuyen positivamente a los efectos beneficiosos de las mismas. Sin embargo, también parece claro que únicamente este mecanismo de acción no puede explicar los efectos de las enzimas.

II. 3.2.3- Efectos a nivel ruminal

Hasta hace unos años se ha asumido que las enzimas exógenas eran degradadas rápidamente por las proteasas de los microorganismos ruminales. Si bien es cierto que algunas celulasas de origen fúngico son casi totalmente degradadas tras ser incubadas durante seis horas con líquido ruminal, existen otros productos enzimáticos cuya actividad celulasa y xilanasas permanece constante tras seis horas de incubación en líquido ruminal (Hristov *et al.*, 1998). Este hecho hace que las enzimas puedan mejorar la digestión ruminal a través de la hidrólisis directa de los alimentos una vez ingeridos por los animales.

En diferentes estudios se ha observado que la aplicación de enzimas produjo un aumento de la degradación de la fibra, tanto en condiciones *in vitro* (Feng *et al.*, 1996; Hristov *et al.*, 1996; Carro *et al.*, 2003; Eun *et al.*, 2007) como

in situ (Lewis *et al.*, 1996). Este efecto se ha confirmado en numerosos estudios *in vivo* (Beauchemin *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999), aunque la variabilidad en las respuestas obtenidas es muy amplia. Así, se ha observado que la utilización de aditivos enzimáticos ha producido un aumento en la digestibilidad de la MS y la FND en terneros en cebo (Feng *et al.*, 1992; Beauchemin *et al.*, 1995), en vacas lecheras (Yang *et al.*, 1999; Beauchemin *et al.*, 2000), cabras lecheras (González *et al.*, 2002) y ovejas lecheras (Lee *et al.*, 2000). Togtokhbayar *et al.*, (2015) evaluaron el efecto de dos enzimas xilanasas y celulasas en la degradación ruminal *in vitro* encontrando que estas aumentaron la degradabilidad de la FAD del sustrato así como la producción de acético y propiónico, y la producción total de AGV. Por el contrario, otros estudios no han observado efecto alguno de la suplementación con enzimas fibrolíticas sobre la digestibilidad de la dieta en terneros (Feng *et al.*, 1996; Beauchemin *et al.*, 1997), vacas lecheras (Luchini *et al.*, 1997; Nussio *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 2000) y ovejas (Flores *et al.*, 2002; Titi y Lubbadah, 2004).

En otros trabajos donde se han aplicado estas enzimas a la dieta, se mejoró la unión con el sustrato e incrementó la colonización microbiana del alimento (Yang *et al.*, 1998). Así, diversos estudios *in vitro* han mostrado efectos beneficiosos de las enzimas fibrolíticas sobre la degradación ruminal de los forrajes (Feng *et al.*, 1996; Beauchemin *et al.*, 1998; Titi *et al.*, 1998; Tricarico *et al.*, 1998; Pinos-Rodríguez *et al.*, 2001).

También, estas enzimas han producido efectos positivos importantes sobre la producción de leche (Dawson y Tricarico, 1999; Schingoethe *et al.*, 1999; Pinos-Rodríguez y González, 2001), lo cual ha demostrado que el uso de enzimas fibrolíticas permite aprovechar una mayor cantidad de energía de la fracción de la fibra potencialmente degradable en el rumen y así reducir la cantidad de granos incorporados a las raciones de vacas lecheras. Por otro lado, el efecto de las enzimas fibrolíticas en el ganado de carne alimentado con alta proporción de granos ha sido menos consistente (Beauchemin *et al.*, 1995; Zinn y Salinas, 1999). Este resultado ha sido atribuido a las condiciones de acidez del rumen que limitan su actividad enzimática, a que la magnitud de los cambios en la fracción fibrosa es poco relevante por la escasa cantidad de fibra de la ración, a la potencial degradación de estas enzimas en el rumen y a los métodos de aplicación (Rojo-Rubio *et al.*, 2007).

Aunque los preparados enzimáticos pueden aumentar la actividad celulasa y xilanasas del líquido ruminal (Hristov *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001), la proporción del total atribuible a estos preparados es muy pequeña en

comparación a la que presentan las enzimas producidas por los microorganismos ruminales. Dong *et al.* (1999) observaron que la aplicación de enzimas fibrolíticas a un heno de hierba antes de su incubación *in vitro* con fluido ruminal aumentó la actividad endoglucanasa y xilanasa en el mismo, pero el aumento supuso únicamente un 0,5% de la actividad total endoglucanasa del fluido ruminal. Por ello, es posible que los preparados enzimáticos actúen en sinergismo con los microorganismos ruminales. De hecho, Morgavi *et al.* (2000a) demostraron la existencia de un posible sinergismo entre las enzimas exógenas y las producidas por los microorganismos ruminales, de tal forma que la actividad enzimática final era superior a la suma de ambas actividades individuales.

La mayoría de las enzimas fibrolíticas producidas por los microorganismos ruminales presentan un pH óptimo superior a 6,2 (Matte y Forsberg, 1992), por lo que pueden ser inactivadas cuando los rumiantes reciben dietas con altas proporciones de concentrados y el pH ruminal desciende por debajo de estos niveles. En estas condiciones, las enzimas fúngicas utilizadas como aditivos pueden jugar un gran papel aumentando la degradación del alimento, ya que su pH óptimo suele oscilar entre 4,0 y 6,0 (Gashe, 1992). Morgavi *et al.*, (2000b) analizaron el efecto de enzimas producidas por *Trichoderma longibrachiatum* sobre la degradabilidad *in vitro* del ensilado de maíz a valores de pH de 6,5, 6,0 y 5,5. La adición de estas enzimas no tuvo efecto sobre la degradabilidad del ensilado a valores de pH óptimos para el normal funcionamiento de la flora ruminal celulolítica (6,5), pero aumentó significativamente la degradabilidad de la MS del ensilado a pH 5,5 y 6,0 (en un 35% y un 40%, respectivamente).

Colombatto *et al.* (2003c) analizaron los efectos de dos productos comerciales con diferentes actividades enzimáticas sobre la fermentación ruminal *in vitro* de hojas y tallos de alfalfa, y observaron aumentos de la degradabilidad de la materia orgánica (DMO) en ambas fracciones a las 12 h de incubación *in vitro*. El producto con mayor actividad xilanasa y endoglucanasa fue más efectivo en incrementar la DMO de las hojas que la de los tallos, mientras que el producto con mayor actividad exoglucanasa, pectinasa y amilasa fue más efectivo en el caso de los tallos. Los dos tratamientos enzimáticos aumentaron la DMO a las 96 h de incubación en las hojas, pero sólo la enzima con actividad xilanasa y endoglucanasa incrementó la DMO de los tallos. Estos resultados indican la existencia de interacciones entre el tipo de sustrato y la actividad enzimática, posiblemente debido a la composición de los tejidos en las distintas partes de la planta.

Las respuestas en las pruebas *in vivo* también han sido variables. González *et al.* (2002) observaron mejoras en la digestibilidad de la MS (4,5%) y la materia orgánica (MO) (4,3%) al aplicar un preparado enzimático con actividad celulasa y xilanasa a una dieta mixta compuesta por 65% de forraje y 35% de concentrado en una prueba *in vivo* con cabras lecheras. Por el contrario, Bouattour (2004) utilizó el mismo preparado comercial en ovejas y no observó efectos sobre la digestibilidad de la MS y la MO de una dieta compuesta por 32,5% de heno de alfalfa, 32,5% de heno de gramíneas y 35% de concentrado. Wallace *et al.* (2001) señalan que una identificación precisa de la actividad enzimática que provoca, en cada caso, una respuesta positiva de las enzimas sobre la fermentación ruminal permitiría un desarrollo más rápido de aditivos enzimáticos fibrolíticos eficaces.

II. 3.2.4- Efecto de las enzimas en el rendimiento productivo de animales rumiantes

La amplia mayoría de los estudios realizados para evaluar los efectos de las enzimas fibrolíticas sobre los rendimientos productivos de los animales rumiantes se han llevado a cabo en el ganado vacuno lechero y de carne. Los resultados obtenidos en los diferentes estudios han sido muy variables, y no puede considerarse que exista una respuesta consistente al uso de enzimas fibrolíticas como aditivos (Carro *et al.*, 2004).

Los resultados de varios estudios realizados para investigar el efecto de diferentes aditivos enzimáticos sobre la ingestión de alimento y la ganancia media diaria en el vacuno de carne se caracterizan por la amplia variabilidad observada en la respuesta de los animales. Sorprendentemente, las respuestas obtenidas con dietas con elevados contenidos en cereales han sido más consistentes que los obtenidos con dietas forrajeras. Así, por ejemplo, en novillos alimentados con una dieta con el 95% de cebada, un preparado con actividad xilanasa aumentó la eficiencia de utilización del alimento entre un 6% y un 12%, dependiendo del nivel de inclusión (Beauchemin *et al.*, 1997; Beauchemin *et al.*, 1999), lo que se debió fundamentalmente a un aumento en la digestibilidad de la dieta. De manera similar, un preparado con actividades xilanasa y celulasa aumentó la ganancia diaria de peso de novillos un 11% cuando estos recibieron cebada en grano (Beauchemin *et al.*, 1995), pero no se observó efecto alguno cuando los animales fueron alimentados con maíz en grano (Beauchemin y Rode, 1996). Sin embargo, el tratamiento de dietas compuestas por un 82,5% de maíz con un preparado con múltiples actividades enzimáticas provocó un

aumento de la ganancia de peso de terneros del 10%. Estos resultados ponen de manifiesto la interacción existente entre las enzimas y el substrato e indican la necesidad de elaborar productos enzimáticos específicos para los diferentes alimentos que reciben los animales.

En cuanto a los efectos de las enzimas sobre la ingestión de los animales, los resultados observados también carecen de consistencia. En algunos estudios se ha observado que la utilización de enzimas fibrolíticas como aditivos incrementó la ingestión de los animales entre 2% y 12% (Feng *et al.*, 1996; Lewis *et al.*, 1996; McAllister *et al.*, 1999), pero en otros trabajos no se ha observado efecto alguno (Beauchemin *et al.*, 1999; ZoBell *et al.*, 2000; Gómez-Vásquez *et al.*, 2003). Los efectos de las enzimas sobre la ingestión de alimento pueden variar con el tipo de enzima utilizado, su dosis y el tipo de substrato (Beauchemin *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000). Sin embargo, el hecho de que en algunos estudios se hayan observado efectos positivos de las enzimas fibrolíticas sobre la ganancia media diaria sin modificaciones significativas en la ingestión de alimento (Gómez-Vásquez *et al.*, 2003) indicaría la existencia de otros mecanismos de acción de las enzimas.

En lo que se refiere a la utilización de preparados enzimáticos en la alimentación del ganado vacuno lechero, los primeros experimentos se llevaron a cabo a mediados de los años 90, y desde entonces han sido muy numerosas las pruebas realizadas en este campo. En una revisión de 20 estudios y 40 tratamientos enzimáticos, Beauchemin *et al.* (2003) encontraron un aumento medio en la ingestión de materia seca de 1,0 kg/día y de 1,1 kg/día en la producción de leche. Es decir, con una amplia variedad de productos enzimáticos y condiciones experimentales la respuesta productiva en vacas lecheras fue positiva, pero la variabilidad también fue alta.

En algunos estudios, las respuestas a los preparados enzimáticos han sido considerables. En varios experimentos en los que las dietas administradas a las vacas lecheras contenían entre un 39% y un 50% de forraje, se observó que la utilización de preparados enzimáticos con actividades xilanas y celulasa aumentó la producción de leche entre el 4% (Rode *et al.*, 1999) y el 15% (Lewis *et al.*, 1999; ZoBell *et al.*, 2000), sin que se observaran modificaciones en la composición de la misma. Los autores de estos trabajos atribuyeron los efectos positivos de las enzimas a mejoras en la digestibilidad de las dietas, lo que aumentaría la cantidad de nutrientes disponibles para la producción de leche. La adición de enzimas fibrolíticas en la dieta de vacas lecheras (15 g/día) alimentadas con una ración mixta aumentó la producción de leche en un 4 % así

como el contenido de grasa de la leche (Shadmanesh, 2014). Sin embargo, en otros experimentos en los que también se utilizaron preparados enzimáticos con actividades xilanas y celulasas y los animales recibieron dietas con un 45-50% de forrajes, no se observó efecto alguno sobre la producción de leche. Parte de la discrepancia entre estos resultados puede deberse al tipo de forraje empleado en las dietas de los animales, pero otros factores como son la fase de lactación en la que se encuentran los animales (ZoBell *et al.*, 2000), las dosis de enzima utilizada, y el método de aplicación de los preparados enzimáticos también pueden afectar a los resultados obtenidos (Yang *et al.*, 2000; Caja *et al.*, 2003). En general, se admite que los efectos de las enzimas fibrolíticas pueden ser más marcados en las primeras fases de la lactación (Rode *et al.*, 1999; ZoBell *et al.*, 2000), en las que la ingestión de alimento se halla comprometida y las necesidades nutritivas de los animales son muy elevadas.

La información referente a los efectos de la suplementación con enzimas fibrolíticas en los pequeños rumiantes es mucho más escasa que la relativa al ganado vacuno, pero se caracteriza también por una amplia variabilidad en las respuestas obtenidas. La mayoría de los estudios realizados sobre los efectos de enzimas fibrolíticas en ovejas y cabras se han centrado en determinar sus efectos sobre la digestibilidad y algunos parámetros ruminales, y son poco numerosos los trabajos en los que se ha determinado la respuesta productiva de los animales.

En algunos trabajos se ha observado que la utilización de enzimas fibrolíticas provocó un aumento de la ingestión de MS de la dieta (Freeden y McQueen, 1993; Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002), pero en otros estudios no se ha observado este efecto (McAllister *et al.*, 1999; McAllister *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Bouattour, 2004; González, 2004; Titi y Lubbadah, 2004 y Muwalla *et al.*, 2007). Esta variabilidad en la respuesta se observa también cuando se analizan los efectos de las enzimas sobre la digestibilidad de la dieta. Lee *et al.* (2000) observaron en ovejas que el tratamiento con enzimas de una dieta con un 70% de forraje provocó aumentos del 5% en la digestibilidad de la MS y del 6% en la digestibilidad de la FND. De forma similar, Titi y Tabbaa (2003), observaron incrementos en la digestibilidad de la MS (4%), de la MO (4%), de la FND (6%) y de la FAD (8%) en corderos de raza Awassi alimentados con una dieta basada en concentrado cuando esta se suplementó con enzimas. Posteriormente, Titi y Lubbadah (2004) observaron aumentos de la digestibilidad de la dieta en ovejas y detectaron aumentos en los pesos al destete de corderos y cabritos (7% y el 2%, respectivamente), cuando la dieta de sus madres (ovejas Awassi y cabras Shami) fue suplementada con celulasas durante los dos meses previos al parto

y los dos primeros meses de lactación. En varios estudios se ha observado que la suplementación con enzimas aumentó la concentración de AGV en el rumen de ovejas (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002; González, 2004), hecho que podría deberse a la mayor digestibilidad de la dieta observada en estos trabajos.

En cuanto a los efectos de las enzimas fibrolíticas sobre la producción de leche en los pequeños rumiantes, el número de trabajos realizados sobre el tema hasta el momento es muy reducido. Titi y Lubbadah (2004), analizaron el efecto de una celulasa producida por *Trichoderma spp.* sobre la producción de leche en ovejas de raza Awassi y cabras de raza Shami, y observaron un aumento significativo de la misma en ambos casos, si bien la composición de la leche no se vio afectada en el caso de las cabras. González (2004) estudió el efecto de un preparado comercial (Promote™) con actividad celulasa y xilanasa sobre la producción de leche en cabras de raza Murciano-Granadina durante la fase media de la lactación. En estos estudios no se observó efecto del tratamiento enzimático sobre la producción de leche, aunque los animales que recibían la dieta tratada presentaron un mayor peso vivo y condición corporal; asimismo, se observó que el tratamiento con enzimas producía un aumento de la digestibilidad de la dieta. De forma similar, Flores (2004) no observó efecto de este mismo producto sobre la producción de leche de ovejas de las razas Manchega y Lacaune. Los autores de estos trabajos atribuyen la falta de efectos positivos de la suplementación enzimática a que la dosis de enzimas utilizada pudo ser demasiado baja o a que el sistema de aplicación no fuera el más adecuado, ya que el preparado enzimático se aplicaba sobre el concentrado de la dieta. En este sentido, Bouattour (2004) observó un aumento significativo de la producción de leche de ovejas de las razas Manchega y Lacaune cuando el producto comercial utilizado en los trabajos anteriores era aplicado directamente sobre el forraje de la dieta. Estos resultados variables obtenidos con un mismo producto indican la existencia de numerosos factores que pueden afectar a la efectividad de las enzimas como aditivos.

Existen también pocos estudios que hayan investigado el efecto de las enzimas sobre la composición de la leche. Flores *et al.* (2002) observaron una disminución de la grasa de la leche en ovejas lecheras cuya dieta había sido tratada con enzimas fibrolíticas con actividad celulasa y xilanasas, y atribuyeron estos resultados a un efecto positivo de las enzimas sobre la digestión de carbohidratos no fibrosos que generaría un aumento en la concentración de propionato en el rumen y/o a una reducción de la relación acetato/propionato, lo que incidiría negativamente en la síntesis de lípidos a nivel de la glándula mamaria. En cuanto a la caseína y a los sólidos totales de la leche, los resultados

son variables. González *et al.* (2002) y Bouattour (2004), observaron una tendencia a la disminución de ambos componentes de la leche en cabras y ovejas, respectivamente, cuando su dieta era suplementada con enzimas fibrolíticas. Por el contrario, Flores *et al.* (2002) no observaron efectos de la suplementación enzimática sobre el contenido en caseína y sólidos totales de la leche.

II. 4- Ganadería y agricultura ecológicas

En la actualidad, las prácticas de la agricultura convencional han hecho desaparecer muchas explotaciones agropecuarias, debido a un modelo productivo altamente dependiente del exterior, teniendo que importar la inmensa mayoría de los concentrados que consumen los animales (maíz, soja, etc.) desde países muy lejanos, con todos los impactos que ello ocasiona, como por ejemplo su competencia con la alimentación humana (cereales y leguminosas) en un mundo con más de mil millones de personas padeciendo hambre. A ello se unen las dificultades para comercializar los productos en un mercado cada vez más globalizado o el fuerte potencial contaminante sobre el suelo, agua y aire de este modelo, que ocasiona problemas en los lugares en los que se ubican las granjas con sus ineludibles consecuencias (SEAE, 2014).

Por ello, la Sociedad Española de Agricultura Ecológica (SEAE) plantea que es necesario impulsar modelos productivos sostenibles, innovadores y viables, que no sólo se basen en la producción de alimentos sanos y de calidad, sino que también se conviertan en proveedores de otros bienes y servicios a la sociedad con una clara repercusión en la calidad de vida de las personas, tales como la conservación del medio natural, la mejora del paisaje, la prevención de incendios, la adaptación al cambio climático, el empleo de mano de obra, el desarrollo rural sostenible, etc. La ganadería ecológica constituye uno de estos modelos que protegen el medio ambiente respetando su conservación. Además sus productos despiertan un interés cada vez mayor en todo el mundo y especialmente en la UE, adquiriendo los consumidores alimentos ecológicos por razones como la preocupación por el medio ambiente, el bienestar de los animales o la reducción en la ingesta de residuos de pesticidas o de organismos genéticamente modificados y de aditivos alimentarios (colorantes y conservantes artificiales, etc.) innecesarios.

II. 4.1- La ganadería ecológica: evolución y desarrollo

La ganadería ecológica surge como alternativa a la ganadería convencional, basándose en la integración y adaptación de los animales en el medio natural. En efecto, en estos sistemas agroecológicos los animales gozan de un importante régimen de libertad en pastoreo, que les permite satisfacer sus necesidades vitales y desplegar sus potencialidades genéticas y conductas sociales, que unido a la aplicación de técnicas biozootécnicas modernas, persigue los siguientes objetivos, (SEAE, 2014):

- Maximizar el bienestar animal en su más amplio sentido.
- Dignificar y humanizar la profesión ganadera, sin riesgos para la salud de los operarios de las fincas.
- Obtener productos diferenciados de alta calidad.
- Conseguir un mayor beneficio económico para el productor al agregar más valor a su producción y obtener compensaciones económicas por los servicios sociales prestados.
- Aumentar la biodiversidad biológica del medio natural, respetando los ecosistemas.

Según Reglamento (CE) 834/2007, las prácticas agrarias ecológicas más usuales para dar cumplimiento a los objetivos planteados anteriormente son:

- Rotación de cultivos como prerequisite para el uso eficiente de los recursos *in situ*.
- Límites muy estrictos en el uso de pesticidas y fertilizantes sintéticos, antibióticos para ganado, aditivos y coadyuvantes en alimentos y otros insumos.
- Prohibición del uso de organismos modificados genéticamente.
- Aprovechamiento de los recursos *in situ*, tales como el estiércol para la fertilización o alimentos para el ganado producidos en la propia granja.
- Selección de especies vegetales y animales resistentes a enfermedades y adaptadas a condiciones locales.
- Cría de ganado en zonas al aire libre y espacios abiertos, y la alimentación del ganado con productos obtenidos de manera ecológica.
- Uso de prácticas apropiadas para la cría de diferentes especies de ganado.

En la actualidad las granjas ecológicas no sólo dependen de la naturaleza para la producción de cultivos y la cría de ganado, sino que en realidad son parte

de ella. Los productores ecológicos trabajan de manera que los sistemas de producción que utilizan para la elaboración de alimentos se aproximen lo más posible a los procesos naturales.

La ganadería ecológica, se encuentra regulada a nivel europeo por primera vez por el Reglamento (CE) 1804/1999, hoy actualizado por los Reglamentos (CE) 834/2007 y 889/2008, que se ha ido desarrollando de forma paralela a la agricultura ecológica, desempeñando también un papel social doble, aportando, por un lado, productos ecológicos a un mercado específico que responde a la demanda de los consumidores y, por otro, bienes públicos que contribuyen a la protección del medio ambiente, el bienestar animal y al desarrollo rural. (Reglamento (CE) 834/2007).

Al respecto, la Junta de Castilla y León (2016) plantea que las nuevas orientaciones de la Política Agraria Comunitaria fomentan una agricultura más respetuosa con el medio ambiente en el marco de un desarrollo sostenible. En este contexto, la producción ecológica representa una alternativa clara para mantener un tejido económico en el medio rural, ofrecer viabilidad a una agricultura social y frenar la tendencia hacia una producción industrial con menor número de agricultores, a la vez que mantiene un mundo rural dinámico.

Cada vez se es más consciente de que los recursos naturales no son ilimitados y de que no pertenecen a la generación que los aprovecha, sino que deberían ser considerados como bienes universales para aprovechamiento y disfrute presente y futuro. En este contexto el modelo de producción ecológica es el que tiene integrada esa filosofía en su forma de hacer agricultura y ganadería. (Junta de Castilla y León, 2016).

II. 4.2- Situación en el mundo de la agricultura ecológica

En el año 2014, cerca de 43,7 millones de hectáreas en el mundo se cultivaban con métodos de la producción ecológica, lo que supone que casi el 1% de la superficie agraria mundial se certifica como producción ecológica. Un 40% de la superficie de tierra dedicada a la agricultura ecológica se encuentra en Oceanía, seguida de Europa con un 27% y Latinoamérica con un 16% del total mundial (FiBL/INFOAMM, 2016). Los países con mayor superficie de tierra dedicada a la agricultura ecológica son: Australia con 17,2 millones de hectáreas, Argentina con 3,1 millones, y con un poco más de 2 millones se encuentran China y Estados Unidos, seguidos muy de cerca por España con 1,7 millones de

hectáreas dedicadas a la agricultura ecológica, lo que la sitúa en el quinto país del mundo y el primero de Europa.

De la superficie de tierra ecológica arable cultivable en 2014 (unos 8 millones de hectáreas) un 40% (unos 3,4 millones de ha) está dedicada a la producción de cereales ecológicos. Esta tierra dedicada al cultivo de cereales ha ido aumentando desde el año 2004 hasta 2013, manteniéndose la superficie en 2014. España con 154 760 ha se sitúa en el octavo puesto del mundo con mayor cantidad de tierra arable dedicada al cultivo de cereales ecológicos. Dentro de estos, la avena fue el segundo más sembrado en el mundo (14%) tras el trigo, la cebada en tercer lugar (11%), seguido a distancia por el centeno (6%), según datos de 2014, presentados en las Figuras II.1, II.2 y II.3 (FiBL/INFOAM, 2016).

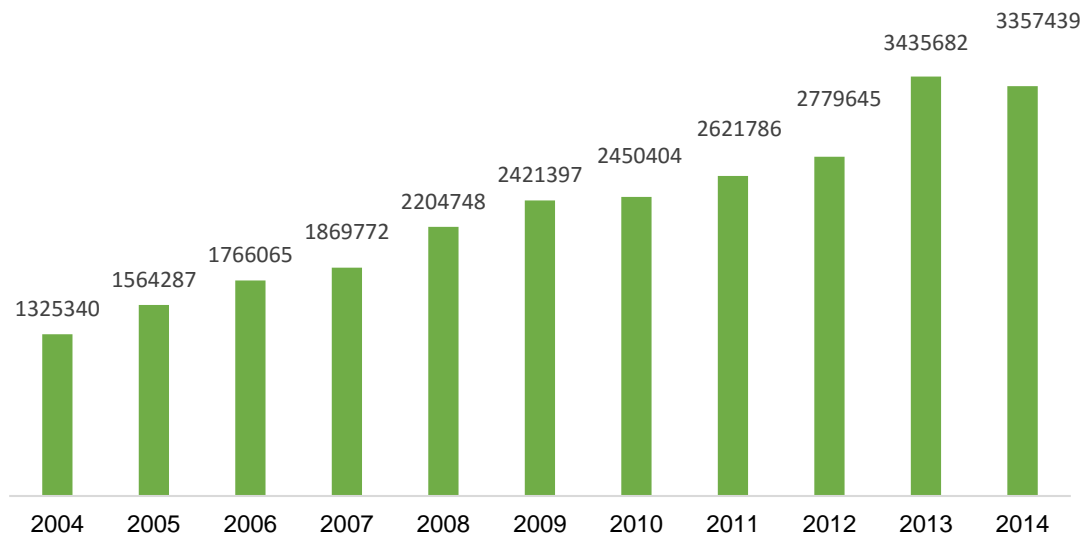


Figura II.1. Desarrollo del área de producción de cereales ecológicos desde el 2004 hasta el 2014 (ha) (FiBL/INFOAM, 2016)

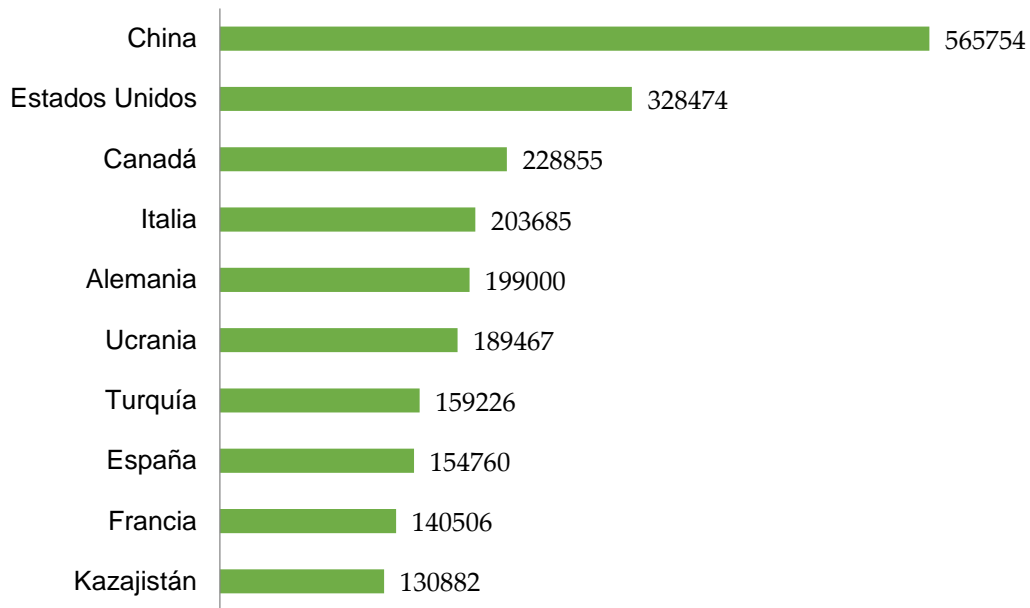


Figura II.2. Países con mayor área de producción de cereales orgánicos en 2014 (ha) (FiBL/INFOAM, 2016)

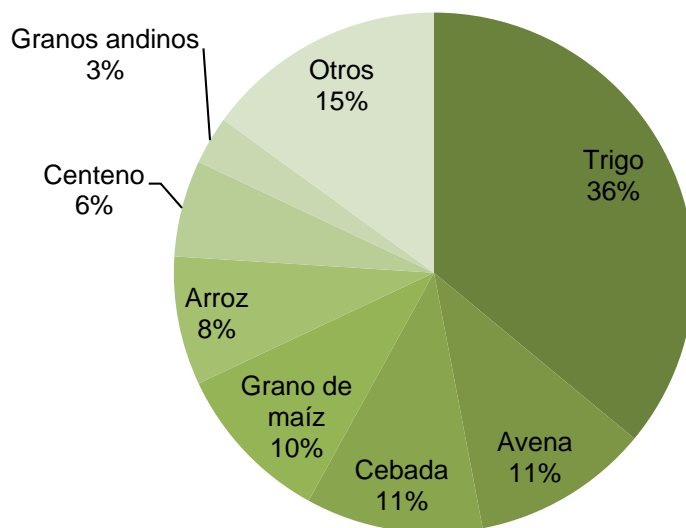


Figura II.3. Distribución de la tierra dedicada a cereales orgánicos a nivel mundial según el tipo de cereal, 2014 (Un total de 3,4 millones de hectáreas) (FiBL/INFOAM, 2016)

Respecto a la certificación de estos cultivos a nivel mundial, se ha producido un crecimiento modesto del número de certificadoras, con notables incrementos en algunos países europeos, donde diversas certificadoras internacionales han abierto sucursales tras ser acreditadas por las autoridades competentes. Según la Junta de Castilla y León (2016), un número cada vez mayor de productores ecológicos están siendo certificados para el mercado local a través de sistemas de garantía participativos en todos los continentes, con América Latina e India a la cabeza de este ranking en función del número de agricultores involucrados.

La demanda de los productos derivados de la agricultura ecológica se concentra en América del Norte y Europa, que en su conjunto representan casi el 95% de las ventas globales, siendo los países con los mercados más consistentes EE.UU., Alemania y Francia.

II. 4.3- La agricultura ecológica en Europa

En Europa, el país que cuenta con la mayor superficie dedicada a la agricultura ecológica es España (1,7 millones de ha), seguida de Italia (1,3 millones de ha) y Alemania (1 millón de ha). Paralelamente, la demanda de alimentos ecológicos ha aumentado considerablemente. El valor total del mercado de la UE-27 alcanzó los 1700 millones de euros en 2012. El mercado alemán es el que domina, con 660 millones, mientras que las ventas por habitante son especialmente altas en Dinamarca, Luxemburgo y Austria. Los nuevos Estados miembros presentan cifras relativamente más bajas tanto en valores de mercado como en consumo por habitante (Junta de Castilla y León, 2016).

II. 4.4- Situación e importancia de la ganadería ecológica en España

La Ganadería Ecológica comenzó a tener interés para los productores españoles a partir del año 1995, año en el que empezaron a utilizar el apoyo legal del Reglamento (CEE) 2092/91, y las ayudas agroalimentarias previstas en el Reglamento (CEE) 2078/92. Desde este momento la ganadería ecológica no ha dejado de crecer como sector.

El grado de implantación de las actividades de la producción ecológica de origen animal es inferior al alcanzado por la producción ecológica de origen vegetal, incluso a pesar de la gran superficie de pastos y prados permanentes calificada como ecológica. Por todo ello, son los subsectores ecológicos de vacuno de carne y ovino de carne los que han logrado un cierto grado de

posicionamiento, similar a los alcanzados por muchos sectores de la producción ecológica de origen vegetal. No obstante, hay que tomar estos datos con cierta cautela, debido a que con frecuencia los ganaderos se ven obligados a vender sus producciones como convencionales y no como ecológicas, con la consiguiente reducción de su valor económico (Junta de Castilla y León, 2016).

Esta realidad tiene sentido, ya que en ganadería ecológica la alimentación debe basarse en el pastoreo, y son precisamente los rumiantes los animales con mayor capacidad de aprovechamiento del pasto. Esto queda reforzado además, teniendo en cuenta el alto precio que muestran actualmente los piensos ecológicos concentrados y el pobre mercado que aún presentan las producciones ganaderas ecológicas, lo que lleva a los ganaderos a tomar estrategias de mínimo coste, que encuentran generalmente con los rumiantes en pastoreo (SEAE, 2014).

En la tabla II.1 podemos ver que según los datos de 2014, España contaba con 1 620191 hectáreas inscritas en agricultura ecológica de las que más de un millón se encuentran en Andalucía y Castilla-La Mancha con 853495 ha y 244600 ha, respectivamente, y la tercera comunidad autónoma con mayor superficie ecológica es Cataluña con 105806 ha.

Tabla II.1 Superficie (ha) de agricultura ecológica en 2014 (MAGRAMA, 2016)

Comunidad Autónoma	Superficie Calificada en Agricultura Ecológica (a)	Superficie Calificada en Conversión (b)	Superficie Calificada en Primer Año de Prácticas (c)	Superficie Total Inscrita en Agricultura Ecológica (a+b+c)
Andalucía	760 630	22 585	70 280	853 495
Castilla-La Mancha	226 035	11 081	7484	244 600
Cataluña	73 905	9003	22 898	105 806
Extremadura	48 548	15 635	16528	80 711
C. foral de Navarra	54 515	969	9060	64 544
Región de Murcia	53 620	1780	2140	57 540
Aragón	47 507	2123	3531	53 161
C. Valenciana	47 542	2096	1280	50 918
Castilla y León	21 850	1926	1987	25 763
Islas Baleares	23 236	1434	772	25 442
Asturias	14 832	644	687	16 163
Galicia	12 747	474	316	13 537
Canarias	8326	466	391	9183
C. de Madrid	6289	1627	430	8346
La Rioja	3905	335	200	4440
Cantabria	3446	222	0	3668
País Vasco	2061	455	358	2874
Total Nacional	1 408 994	72 855	138 342	1 620 191

Tanto en superficie inscrita como en número de operadores Andalucía es la Comunidad Autónoma con mayor peso y actividad en la agricultura ecológica española (y europea también), muy por delante del resto de Comunidades Autónomas españolas. La superficie de Castilla y León sólo representa un 2% de la superficie agrícola ecológica de España.

Respecto a la ganadería ecológica, al igual que en la agricultura, Andalucía es quien tiene mayor número de explotaciones con esta orientación productiva, representando más de la mitad de ellas.

Con respecto a la ganadería ecológica en España en 2014, la ganadería ovina, a la cual se destinan los cereales analizados en la presente tesis doctoral, es la segunda en importancia, tras la bovina, con un 28,32% de las explotaciones ganaderas ecológicas (1721 explotaciones con 467479 cabezas). Del total de explotaciones de ganado ovino de cría ecológica, 1033 se encuentran en

Andalucía, 140 en Castilla-La Mancha, 134 en Baleares y 108 en Cataluña, no superando ninguna otra comunidad autónoma las 100 explotaciones (ver Figura II.4).

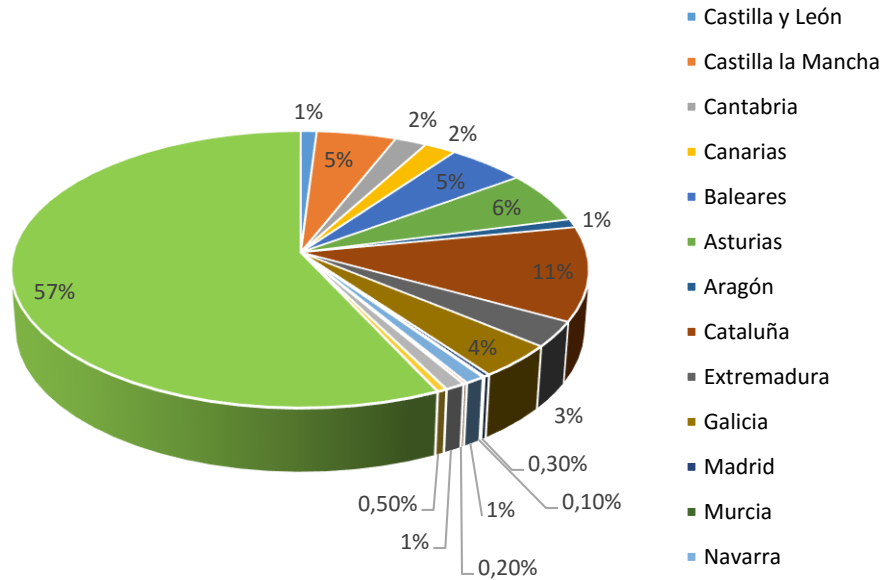


Figura II.4 Porcentaje que representa el número de explotaciones de ganadería ecológica en las comunidades autónomas dentro del total nacional (MAGRAMA, 2016)

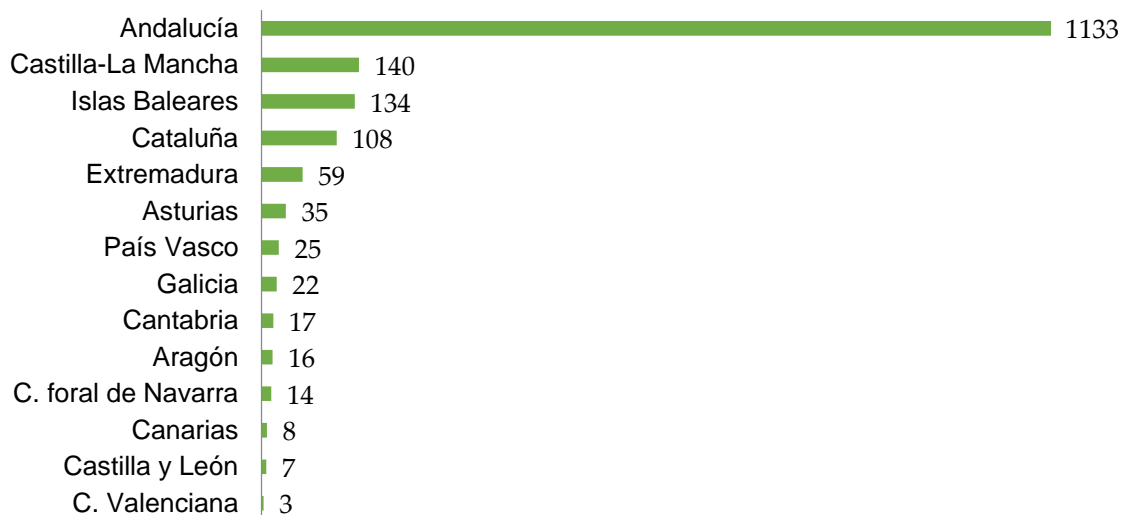


Figura II.5 Distribución en España de las explotaciones de ovino de cría ecológica en 2014 (MAGRAMA, 2016)

II. 4.5- Agricultura y ganadería ecológica en Castilla y León

Según los últimos datos oficiales, Castilla y León es la comunidad autónoma con mayor extensión de España y el tercer territorio más extenso de la Unión Europea, con una superficie de 9,4 millones de hectáreas, lo que supone casi el 21% del territorio nacional. Esta superficie se encuentra distribuida de la siguiente manera: 3,5 millones de ha son tierras de cultivo (37%), 1,7 millones de ha son prados y pastos (18%), 2,9 millones de ha son terreno forestal (31%) y 1,3 millones de ha se engloban en otras superficies (14%) (Junta de Castilla y León, 2016).

La mayoría de las tierras de cultivo se dedica a cultivos herbáceos (78%) y barbecho (19,5%) y tan sólo un 2,5% lo ocupan cultivos leñosos. Los prados y pastos, se extienden a lo largo de 1,7 millones de ha, de las que el 14% son prados y el 86% son pastos. La superficie forestal se distribuye en 2,9 millones de ha a lo largo de montes que se clasifican de la siguiente manera: monte abierto (34%), monte leñoso (22%) y monte maderable (44%).

En el año 2013 las tierras dedicadas a cultivos herbáceos en Castilla y León se extendieron a lo largo de 2,7 millones de ha, de las que el 14 % se explotaron en regadío. Los grupos de cultivo por orden de importancia según la superficie que ocupan dentro de los cultivos herbáceos son los cereales (73,5%), cultivos industriales (13%), forrajes (8%), leguminosas (4,5%), tubérculos (0,7%) y hortalizas (0,5%) (Junta de Castilla y León, 2016).

Por tanto, Castilla y León es la primera comunidad autónoma en superficie de los principales cultivos herbáceos en extensivo, tales como en cereales de invierno con 1 920000 hectáreas (35% sobre el conjunto de España), en maíz con 106000 (30%), en remolacha 32000 hectáreas (70%) y en patata con 21000 hectáreas (27%), según datos del año 2010 del MAGRAMA. Por otra parte, los datos demográficos muestran una preocupante realidad: la baja densidad de población que se registra en las zonas rurales es significativamente inferior a la media nacional. Esta baja densidad constituye una de sus principales debilidades y condiciona, en gran medida, las posibilidades de desarrollo del medio rural de Castilla y León. En Castilla y León la producción ecológica es una actividad que cada vez tiene más seguidores en los diferentes ámbitos sectoriales, tratando de cubrir la demanda de los consumidores. En el año 2015

en nuestra región se cultivaron 35 615 ha bajo los criterios de la agricultura ecológica, se registraron 17 785 cabezas de ganado que se gestionaron en 59 explotaciones ganaderas y se contabilizaron 181 operadores industriales. Esos datos representan un número aún escaso, menor que lo que representa este tipo de producción en el resto de España. En estas circunstancias influye que la demanda de dichos productos no es elevada y que en Castilla y León no hay un comercio estable y especializado en productos ecológicos.

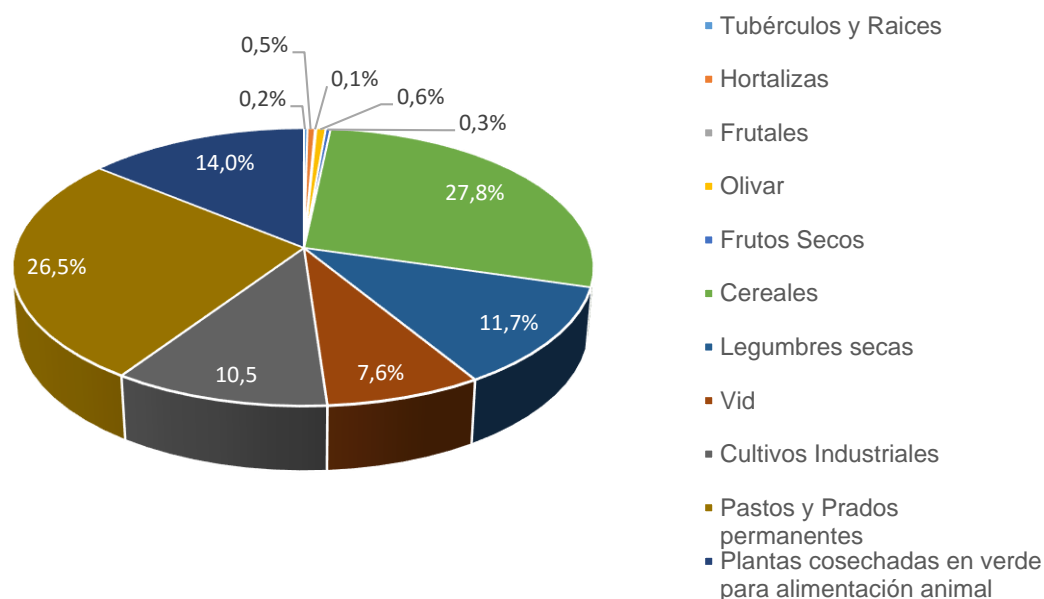


Figura II.6 Porcentaje de los principales cultivos en producción ecológica en Castilla y León (Año 2014) (MAGRAMA, 2016)

Como se aprecia en la Figura II.6, del total de la superficie sembrada, destacan los prados y pastos, los cereales, seguidos de las plantas cosechadas en verde para alimentación animal, las legumbres secas, los cultivos industriales y el viñedo. Por provincias, Zamora es la que más superficie dedica a la agricultura ecológica con un 33% de la superficie regional; Ávila es la provincia con mayor número de explotaciones ganaderas; Valladolid es la provincia con mayor número de actividades industriales relacionadas con la producción vegetal y Segovia la que registra mayor número de actividades relacionadas con la producción animal. De esas 30 621 ha de producción ecológica en Castilla y León, el 76,62% estaban inscritas, el 6,44% estaban en conversión de agricultura convencional a ecológica y el 16,93 % en el primer año de prácticas.

En cuanto al número de cabezas de ganado, en 2014 había 17 785, de las cuales: en bóvidos había 1831, siendo prácticamente el total con orientación productiva de carne; en ovino había 4615 cabezas, de las cuales 3648 tenían orientación productiva de leche; en caprino 2074 cabezas, todas para obtención de leche, y respecto a las aves de corral había 5366 gallinas de puesta y 2791 pollos para carne.

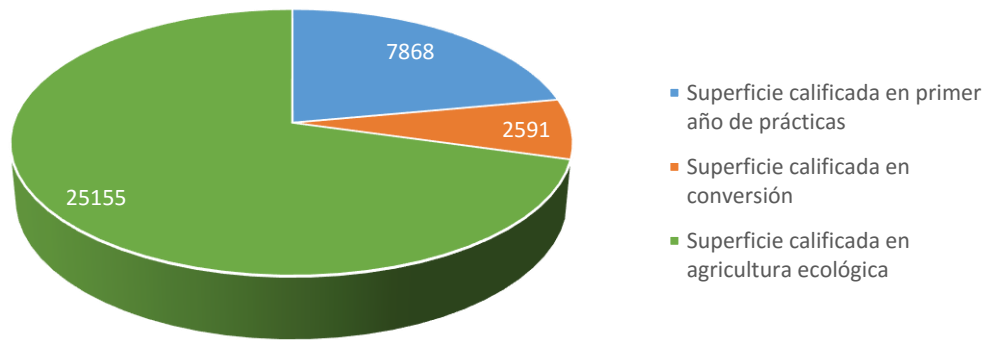


Figura II.7 Superficie en hectáreas inscrita en agricultura ecológica en Castilla y León (Año 2015) (MAGRAMA, 2016)

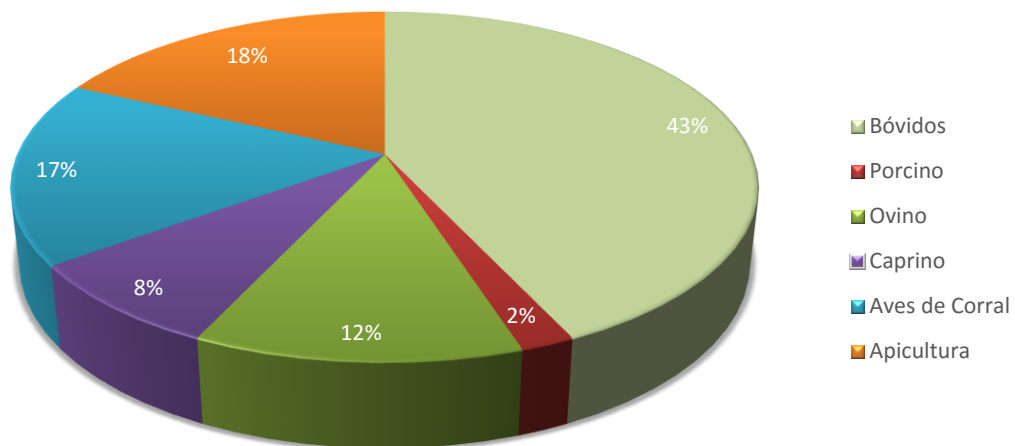


Figura II.8 Porcentaje por orientación productiva en el total de las explotaciones de ganadería ecológica en Castilla y León (Año 2014) (MAGRAMA, 2016)

II. 4.6- El cultivo ecológico de cereales para la alimentación animal

Los forrajes constituyen casi el 85% de los alimentos utilizados en las explotaciones ganaderas ecológicas, los cuales se administran mezclados con piensos compuestos o granos. Los alimentos ecológicos deben producirse a partir de semillas certificadas como ecológicas, y en su cultivo únicamente pueden utilizarse determinados tipos de abonado y tratamientos fitosanitarios relacionados en la legislación vigente. Estas características específicas del sistema de producción de los cultivos (tipo de semillas, abonos, tratamientos fitosanitarios, laboreo, etc.) ocasionan cambios en la cantidad de material vegetal que se produce y en las especies vegetales que se desarrollan en comparación con los cultivos convencionales (Doyle y Topp, 2002), por lo que puede modificarse el valor nutritivo de los alimentos producidos. El conocimiento del valor nutritivo es fundamental para elaborar dietas equilibradas que cubran las necesidades de los animales en producción ecológica.

En nuestro país se han realizado diversos estudios que comparan la producción de forraje en manejo convencional y ecológico, pero la mayoría de ellos se han centrado en la cantidad de forraje producido (Ciria *et al.*, 2000; Pardo *et al.*, 2004; Lacasta, 2006), los costes económicos (Pardo *et al.*, 2004; Lacasta y Meco, 2008) o en el rendimiento productivo de los animales en pastoreo (Mangado *et al.*, 2008). Sin embargo, son muy escasos los estudios que analizan el valor nutritivo de los alimentos ecológicos y lo comparan con sus homólogos producidos de forma convencional. Böhm *et al.* (2007) y Martínez *et al.* (2010a) analizaron el contenido en proteína y aminoácidos de diferentes granos de leguminosas y cereales producidos en condiciones ecológicas y convencionales. En algunos casos no se observaron diferencias, pero en otros, los alimentos ecológicos presentaron un menor contenido en algunos aminoácidos, observándose importantes variaciones en la composición de los granos producidos en diferentes años. Sin embargo, también hay que señalar que la composición de los alimentos se ve afectada por múltiples factores, entre los que se incluyen el tipo de suelo y su manejo, la variedad de las semillas y las condiciones climáticas.

En 2014 en España la superficie de tierra dedicada al cultivo de cebada ecológica fue la mayor dedicada a los cereales con 49 309 ha y una producción estimada respecto a la superficie de 59 804 t. La superficie total inscrita como ecológica cultivada de avena fue de unas 39 769 ha con una producción

estimada respecto a la superficie de 59 804 t. La superficie total inscrita como ecológica cultivada de avena fue de unas 39 769 ha con una producción estimada respecto de la superficie de 39 329 t. Y la superficie dedicada al cultivo de centeno fue de unas 6680 ha con una producción estimada respecto de la superficie de 5891 t. (MAGRAMA, 2016). En Castilla y León la superficie cultivada total inscrita en 2014 dedicada a la avena fue de 1645 ha con una producción estimada de 1182 t. La superficie dedicada a la cebada ecológica en esta comunidad fue de 2300 ha con una producción estimada de 2687 t, y la superficie dedicada al centeno fue de 1292 con una producción estimada de 831 t (MAGRAMA, 2016).

Uno de los problemas principales a los que se enfrentan los ganaderos en producción ecológica es conseguir alimentos con valor nutritivo conocido. Conocer el valor nutritivo de los alimentos es imprescindible para asegurar la correcta alimentación de los animales manejados en condiciones ecológicas con el fin de asegurar la salud, el bienestar y la productividad de los mismos. A pesar de la importancia de este aspecto, la mayoría de estudios que han analizado el efecto del sistema de cultivo (convencional vs. ecológico) se han realizado en alimentos producidos para el consumo humano y apenas se han publicado estudios sobre el valor nutritivo de alimentos para animales. Por ello, parte de la presente Tesis Doctoral está dedicada al estudio de la producción, composición química y valor nutritivo de forrajes, cultivados de forma convencional y de forma ecológica.

Capítulo III.- Materiales y métodos generales

A continuación, se detallan algunos de los materiales y métodos generales utilizados en el desarrollo experimental de la presente tesis. Los aspectos específicos de cada experimento aparecen reflejados en sus respectivos capítulos.

III. 1- Animales y colección de líquido ruminal para los estudios *in vitro*

El líquido ruminal utilizado para las incubaciones *in vitro* se obtuvo a partir de seis ovejas de raza Merina canuladas en el rumen. La dieta administrada a las ovejas se describe en cada uno de los trabajos experimentales. Las ovejas fueron manejadas según los protocolos aprobados por el Comité de ética de la Universidad de León, subcomité para la experimentación y bienestar animal (OEBA). El contenido ruminal se obtuvo antes de la alimentación de la mañana, fue mezclado y filtrado a través de 2 capas de gasa, se introdujo en termos aislantes con el fin de mantener la temperatura y evitar el contacto con el aire, e inmediatamente se trasladó al laboratorio, donde se mezcló con solución tampón (Goering y Van Soest, 1970; sin tripticasa) en una proporción 1:4 (vol/vol) a 39°C y bajo un gaseado continuo de CO₂ con el objetivo de mantener la anaerobiosis. Posteriormente se midió el pH y se tomó una muestra para determinar ácidos grasos volátiles (AGV) y NH₃.

III. 2- Preparación de las muestras de forraje para los estudios *in vitro*

Como sustrato de incubación en los estudios con sistemas de cultivos no renovados de microorganismos ruminales (CNRMR) y el Rusitec se utilizaron una serie de forrajes y dietas mixtas, los cuales constituyen la base de la alimentación ganadera en el trópico o son comúnmente utilizados en la alimentación de los rumiantes en España. Los forrajes utilizados fueron:

- 1-*Pennisetum purpureum* clon Cuba CT-115
- 2-*Pennisetum clandestinum* (30 días de rebrote)
- 3-*Pennisetum clandestinum* (60 días de rebrote)
- 4-*Dichantium aristatum Benth* (42 días de rebrote)
- 5-*Dichantium aristatum Benth* (48 días de rebrote)
- 6-*Acacia decurrens*
- 7-*Acacia mangium*

8-*Paja de Oriza sativa L.* (paja de arroz)

9-*Rastrojo de Zea mays* (raastrojo de maíz)

10-*Mezcla de Pennisetum purpureum clon Cuba CT-115 y*

heno de gramíneas en una proporción 75–25%

11-*Avena sativa* (avena, cultivada de forma ecológica y convencional)

12-*Secale cereale* (L) (centeno, cultivado de forma ecológica y convencional)

13- *Heno de Medicago Sativa* (heno de alfalfa)

El *Pennisetum purpureum* clon Cuba CT-115 se recolectó a los 112 d de rebrote. Se recolectaron aproximadamente 2 Kg de tallos y hojas de 25 plantas tomadas al azar, realizando el corte a 20 cm del suelo para simular lo que consumen los animales (Valenciaga *et al.*, 2009). Estas muestras se recogieron en áreas pertenecientes al Instituto de Ciencia Animal de Cuba. El resto de los forrajes fueron obtenidos en fincas con ganado vacuno destinado a la producción de leche en el Oriente del Departamento de Antioquia (Colombia). Las muestras de forrajes en producción ecológica fueron recogidas en explotaciones ecológicas de ganado ovino en la zona de Fariza de Sayago, en la provincia de Zamora (España). Las muestras de heno de alfalfa y concentrado fueron obtenidas en explotaciones ganaderas de Castilla y León, constituyendo alimentos representativos de los que forman parte de las dietas que consume el ganado ovino. El material recolectado se secó en estufa a 60°C durante 48 h y se molió a un tamaño máximo de partícula de 1 mm, utilizando un molino de martillos (Fritsch GmbH, Alemania) para los estudios en sistemas de CNRMR y un mayor tamaño de partícula para las dietas utilizadas en el sistema Rusitec, tal y como se describe en las diferentes pruebas experimentales.

III. 3- Procedimiento experimental de los estudios con CNRMR

En todas las incubaciones realizadas utilizando CNRMR se emplearon botellas de vidrio con tapón de goma y cápsula de aluminio de 120 mL de capacidad, en las que se introdujo el sustrato utilizado y el líquido ruminal diluido en un medio de cultivo no limitante para el crecimiento microbiano.

Para la preparación del medio de cultivo se añadieron sucesivamente (por L de medio): 475,0 mL de agua destilada, 237,5 mL de una disolución mineral,

1,25 mL de una disolución de oligoelementos, 237,5 mL de una disolución tampón, 1,25 mL de una disolución de resazurina y 47,5 mL de una disolución reductora. La composición de cada una de las disoluciones utilizadas fue:

- Disolución mineral (por L de disolución)

Na ₂ HPO ₄	5,7 g
KH ₂ PO ₄	6,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6 g

- Disolución de oligoelementos (por L de disolución)

CaCl ₂ .2H ₂ O	13,2 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	10,0 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,0 g
FeCl ₃ . 6H ₂ O	8,0 g

- Disolución tampón (por L de disolución)

NaHCO ₃	37,0 g
(NH ₄)HCO ₃	2,0 g

- Disolución de resazurina (por L de disolución)

Resazurina	1,0 g
------------	-------

- Disolución reductora (por L de disolución)

Cisteína-HCl	6,25 g
NaOH (1N)	40,0 mL
Na ₂ S	6,25 g

La mezcla de todos los componentes del medio de cultivo, la del medio de cultivo con el fluido ruminal y su dosificación dentro de los viales se realizó en condiciones de anaerobiosis (gaseado continuo con CO₂) y a una temperatura de 39°C. Tras la dosificación, los viales se cerraron herméticamente con un tapón de caucho, se precintaron con cápsulas de aluminio (ver Figura III.1) y se colocaron en un incubador a 39°C.

A las horas de incubación programadas en cada experimento se midió la presión dentro de la botella y el volumen de gas producido utilizando un manómetro (Widereager Wide Range Pressure Meter; Sper Scientific LTD, Scottsdale, AZ, USA) y una jeringa plástica graduada. En algunos estudios se recogió una muestra de gas (10 mL) en un tubo de vacío para determinar su contenido en metano. Inmediatamente después se abrieron las botellas, se midió el pH y se tomaron muestras para determinar la concentración de AGV y de NH₃. El procesado de las muestras se describe detalladamente en cada una

de las pruebas experimentales. En todos los casos se realizaron cuatro tandas de incubación en días no consecutivos.

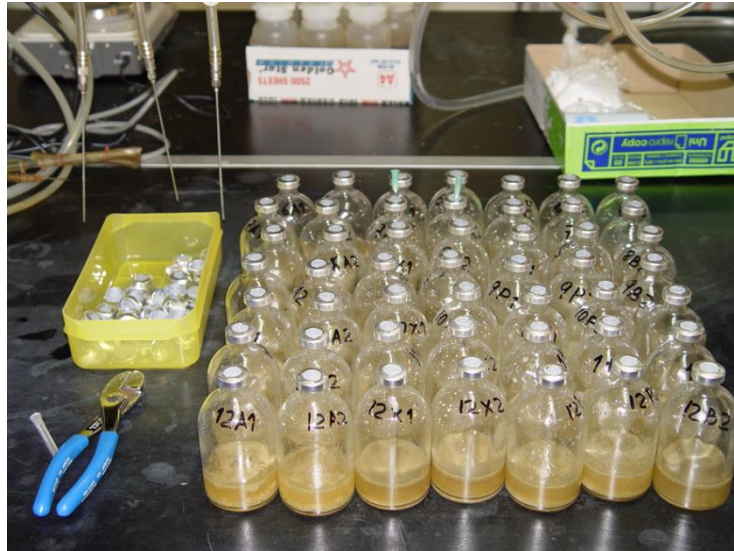


Figura III.1. Sistema de cultivos no renovados de microorganismos ruminales

III. 4- Sistema de fermentadores de flujo semicontinuo (Rusitec)

III. 4.1- Descripción del sistema

El sistema de fermentadores de flujo semicontinuo utilizado en los experimentos fue el Rusitec, construido siguiendo el modelo descrito por Czerkawski y Breckenridge (1977) y con algunas modificaciones realizadas por nuestro grupo de trabajo. El sistema consta de 8 fermentadores sumergidos en un baño de agua a 39°C (ver Figura III.2). Cada fermentador está compuesto por un recipiente de plástico rígido de 600 mL de volumen, cerrado con una tapa con tres orificios. A través de uno de ellos se infunde continuamente una solución tampón (saliva artificial, McDougall, 1948) mediante una bomba peristáltica. El segundo de los orificios está conectado a una botella donde se recoge el efluente que rebosa del fermentador, que su vez está conectada a una bolsa hermética en la que se recogen los gases producidos durante la fermentación. El tercer orificio de la tapa dispone de una válvula, a través de la cual se puede acceder directamente al fermentador para tomar muestras de su contenido. La tapa de los fermentadores es atravesada por un eje unido a un motor que hace que mantenga un movimiento cíclico ascendente y

descendente en el interior del mismo, produciéndose una agitación continua del medio de fermentación facilitando que el contenido líquido del fermentador pase a través del material sólido en cada movimiento, simulando los movimientos de contracción del rumen.

III. 4.2- Manejo del sistema

El primer día de la prueba experimental, cada fermentador se inoculó con contenido ruminal líquido y sólido. Cada vasija se llenó con una mezcla de 250 mL de líquido ruminal y 200 mL de saliva artificial (McDougall, 1948) y a continuación se introdujeron 80 g de contenido ruminal sólido en una bolsa de nailon (100 μ m de diámetro de poro). El alimento se introdujo en dos bolsas, empapadas con la mezcla de saliva y líquido ruminal para eliminar el aire de su interior, una con el forraje y otra con el concentrado. Una vez fijadas las tres bolsas al eje rígido, el fermentador se cerró, se colocó dentro del baño de agua, y se conectaron los tubos de saliva artificial y de salida del efluente. En las botellas de recogida del efluente se añadieron 20 mL de ácido sulfúrico (20%, vol:vol) con el fin de detener el proceso fermentativo. A continuación, a cada fermentador se le suministró 2 L de nitrógeno para establecer condiciones de anaerobiosis, y se conectaron las bolsas de recogida de gas correspondientes. Finalmente, y una vez que todas las conexiones fueron confirmadas, se puso en marcha el motor del sistema.

El manejo diario de los fermentadores se describe a continuación: se apagaba el motor de agitación y cada fermentador recibía 2 L de N₂ con el fin de desplazar los gases producidos que pudieran quedar en el sistema hasta la bolsa de recogida antes de que esta fuera retirada. A continuación, se desconectaban los tubos de la saliva y del efluente, se extraía la vasija y se introducía en otro baño de agua (39°C) de menor tamaño, para poder manejar el fermentador cómodamente. Antes de abrir el fermentador, se agitaba varias veces el eje con las bolsas de alimento para homogeneizar el contenido antes de recoger las muestras. Una vez abierta la vasija, se medía el pH del contenido líquido (pH-metro Basic 20, Crison Instruments, S.A. Alella, España) y se extraían las bolsas de alimento que llevaban 48 h (forraje) y 24 h (concentrado) dentro del fermentador. La bolsa de alimento extraída se sometía a dos lavados sucesivos con contenido líquido del fermentador y el líquido procedente de estos dos lavados se empleaba para impregnar las nuevas bolsas de alimento que iban a ser introducidas. Finalmente, se cerraba el fermentador y se colocaba dentro del baño de agua.



Figura III.2 Sistema de fermentadores de flujo semicontinuo Rusitec (Czerkawski y Breckenridge, 1977))

El efluente recogido en cada botella se pesaba y se descartaba, volviendo a añadirse 20 mL de ácido sulfúrico al 20% a la botella. Una vez que todos los fermentadores y tubos eran colocados correctamente, se gaseaba cada fermentador con 2 L de nitrógeno, se conectaban las bolsas de recogida de gases y se ponía en marcha el motor.

Durante los diferentes estudios se recogieron las muestras y se realizaron las medidas que se describen a continuación:

- Volumen de gas contenido en las bolsas y concentración de metano en el mismo.
- Peso del efluente y muestras para analizar su concentración de N-NH_3 , AGV y lactato. Dichas muestras se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis.
- Desaparición de MS, FND y FAD. Las bolsas de nailon con el residuo sólido de alimento no degradado se sacaron de los fermentadores, se escurrieron, se lavaron en la lavadora en programa de agua fría, y se secaron en estufa a 60°C . La desaparición de la MS se calculó por diferencia de peso con respecto a la cantidad de MS que se había introducido en el fermentador.

Para calcular la desaparición de FND y FAD se realizó el análisis de FND y FAD en el residuo previamente molido.

- Muestras para el análisis de la diversidad bacteriana mediante análisis automatizado de los espacios intergénicos ribosomales (ARISA). Se tomaron muestras de las fases sólida y líquida de la digesta de cada uno de los fermentadores y se almacenaron a -80°C .

- Muestras para análisis de actividad enzimática (amilasa, xilanasas y carboximetilcelulasa) en el contenido líquido de las vasijas. Las muestras se congelaron inmediatamente a -80°C .

- Muestras del contenido sólido y líquido de los fermentadores para el análisis de su enriquecimiento en ^{15}N y determinación de la síntesis de proteína microbiana.

III. 5- Procesado de las muestras y análisis químico

III. 5.1- Composición química

El contenido de MS se determinó mediante desecación a 60°C en una estufa de ventilación forzada hasta alcanzar un peso constante (AOAC, 1999). El contenido de cenizas se determinó por calcinación de las muestras en un horno de mufla a 550°C y el contenido de MO se calculó por diferencia. El contenido de FND y FAD se analizó siguiendo la técnica secuencial descrita por Van Soest *et al.* (1991), adoptando las modificaciones propuestas del sistema ANKOM (ANKOM, 1998). Para el análisis se utilizaron bolsas de poliéster (ANKOM Corp #57; Ankom Technology Corp., Fairport, NY, Estados Unidos) con un tamaño de poro de $30\ \mu\text{m}$ y unas dimensiones de $4,5 \times 5,5\ \text{cm}$.

El contenido en N se determinó mediante el método Kjeldahl (AOAC, 1999), utilizando un equipo de destilación Kjeldahl System 1002 (Tecator). El contenido en proteína bruta se obtuvo multiplicando el contenido en N de la muestra por el factor de conversión 6,25.

El análisis de minerales en las muestras de suelos en los estudios relacionados con el cultivo ecológico de forrajes se llevó a cabo a partir de las cenizas, tras un proceso de extracción (Ross y Wang, 1993), y se cuantificaron mediante espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) en un equipo ICP-AES Perkin Elmer Optima 2000 DV (Perkin Elmer, Uberlingen, Alemania).

III. 5.2- Parámetros ruminales (pH, amoníaco, ácidos grasos volátiles y ácido láctico)

El pH del fluido ruminal y del contenido de los CNRMR y fermentadores Rusitec se determinó utilizando un pH-metro Basic 20 (Crison Instruments, S.A. Alella, España). La concentración de NH_3 se determinó por el método colorimétrico descrito por Weatherburn (1967). Este método está basado en la reacción del amoníaco presente en la muestra con fenol e hipoclorito sódico, de tal forma que se produce indofenol. Este compuesto tiene color azul y la intensidad del color se determina en un espectrofotómetro. Para su análisis las muestras se descongelaron a 4°C y se centrifugaron ($10000 \times g$; 4°C ; 15 min). El sobrenadante se diluyó con agua destilada hasta una concentración adecuada para el análisis. Un mL de esta dilución se mezcló con 5 mL de una solución de fenol y nitroprusiato sódico y 5 mL de una solución de hipoclorito sódico e hidróxido sódico, y se introdujo en un baño a 39°C durante 15 min. Transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm. Para la realización de la recta patrón se utilizó una solución de sulfato amónico 50 mM.

Las muestras que se recogieron para analizar su concentración de AGV se descongelaron a 4°C y se centrifugaron a $13000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . A continuación se mezclaron 0,8 mL del sobrenadante con 0,5 mL de una solución acidificante y desproteinizante (100 g de ácido metafosfórico y 0,6 g de ácido crotónico, utilizado como estándar interno, por litro de HCl 0,5 N). La mezcla obtenida se dejó reposar durante 12 horas en frío (4°C) y se centrifugó a $13000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C antes de proceder a su trasvase a viales de cromatografía. La concentración de los ácidos acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico y caproico se determinó mediante cromatografía de gases, en un cromatógrafo Shimadzu GC 2010 equipado con un inyector automático, un detector de ionización de llama y una columna semicapilar TR-FFAP de 30 m x 0.53 mm x 1 μm (Supelco, Barcelona, España).

La determinación de la concentración de ácido láctico se realizó según la técnica descrita por Taylor (1996), la cual se basa en la reacción del ácido láctico presente en la muestra con parafenilfenol y sulfato de cobre en presencia de ácido sulfúrico y calor, produciéndose un compuesto que absorbe la luz a 570 nm. Las muestras se descongelaron a 4°C y se

centrifugaron a $16000 \times g$ durante 10 min a 4°C . El sobrenadante ($50 \mu\text{L}$) se mezcló con 3 mL de ácido sulfúrico (96%) y se incubó a 100°C durante 10 min. Posteriormente se añadieron $50 \mu\text{L}$ de sulfato de cobre pentahidratado al 4%, se agitaron y se añadieron $100 \mu\text{L}$ de parafenilfenol al 1,5% en etanol al 95%. Tras agitar otra vez se incubaron a 30°C durante 60 min y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Ultrospec 500 pro, Amersham- Bioscience®, Barcelona, España) a una longitud de onda de 570 nm. Para la realización de la curva patrón se utilizaron 5 soluciones de ácido láctico de concentración conocida.

III. 5.3- Producción de gas y su composición (metano)

La producción diaria de gas (L/d) en los estudios con fermentadores Rusitec se midió conectando la bolsa de recogida del gas a una bomba de vacío, la cual, a su vez, se conectó con un medidor de volumen de gas (modelo TG1; Ritter Apparatebau GmbH, Bochum, Alemania). El volumen de gas fue corregido para las condiciones normales (1 atmósfera de presión y 273°K de temperatura) en función de la temperatura y la presión atmosférica del momento, y se calcularon los moles de gas producidos. La concentración en CH_4 del gas se determinó utilizando un cromatógrafo de gases (Shimadzu GC 14B) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna empaquetada con Carboxen 1000 (malla 45-60; Supelco, Madrid, España). El cálculo de la concentración en CH_4 se realizó mediante la comparación con un estándar de concentración de CH_4 conocida (10%). En los estudios con CNRMR la concentración de CH_4 se determinó de la misma forma.

III. 5.4- Análisis del enriquecimiento en ^{15}N

El enriquecimiento en ^{15}N de los pellets microbianos de las bacterias asociadas a la fase sólida (BAS) y a la fase líquida (BAL) y de las digestas (sólida y líquida) se determinó mediante un espectrofotómetro de masas (VG PRISM II; IRSM) conectado a un analizador elemental (DUMAS-style N analyser ES 1108, Carlo Erba, Milán Italia). Las muestras sólidas fueron sometidas al proceso descrito para el análisis de N; a continuación, todas ellas se destilaron con NaOH (Kjeltec System 1002, Tecator), el destilado se recogió sobre 25 mL de una solución de ácido bórico (0,5%) y se valoró con H_2SO_4 0,2 N. Una vez valoradas las muestras, el destilado se acidificó en exceso con 0,5 mL de H_2SO_4 2 N, para prevenir pérdidas de N en forma de NH_3 y una posible

contaminación microbiana. A continuación las muestras se evaporaron a 55°C en una campana de flujo laminar y se resuspendieron en agua destilada hasta alcanzar una concentración en N de como mínimo 3 mg/mL (concentración necesaria para un adecuado análisis de su enriquecimiento en ¹⁵N).

III. 5.5- Actividad enzimática

La actividad enzimática en el contenido líquido de los fermentadores se determinó siguiendo los procedimientos descritos por Giraldo *et al.* (2008). Las determinaciones se realizaron siempre a 39°C y pH 6,5 con la finalidad de reproducir las condiciones del medio ruminal. Las muestras obtenidas en los fermentadores se descongelaron a 4°C, se tomaron 1,5 mL de muestra y se depositaron en un vial plástico de 2 mL de volumen que contenía 0,400 g de esferas de zirconio de 0,1 mm de diámetro. Los viales se sometieron a tres ciclos de tratamiento (3 min cada uno, 4°C) en un Mini Beadbeater-8 (Biospec®, USA) para romper las células y liberar las enzimas intracelulares. A continuación, se centrifugaron (10000 x g, 10 min, 4°C) y el sobrenadante se utilizó para analizar la actividad carboximetilcelulasa, xilanasas y amilasa. En cuanto a las enzimas utilizadas como aditivos, se prepararon disoluciones de las mismas en una solución tampón fosfato (1 M, pH 6,5) antes de proceder al análisis y también se analizó la actividad exoglucanasa. Las cantidades de solución enzimática y de sobrenadante utilizadas para el análisis variaron dependiendo del tipo de actividad enzimática analizada como se detalla en cada una de las pruebas experimentales.

Para la determinación de las actividades carboximetilcelulasa, exoglucanasa, xilanasas y amilasa se utilizaron como sustratos carboximetilcelulosa, celulosa microcristalina (Avicel PH-101®), xilano de avena y almidón soluble, respectivamente. Se preparó una disolución de cada uno de los sustratos a una concentración 10 g de sustrato por L de agua destilada siguiendo las indicaciones descritas por Colombatto y Beauchemin, (2003). Para el análisis de cada muestra se prepararon tres tubos de vidrio de 10 mL de volumen a los que se le añadieron el sustrato correspondiente, solución tampón y la muestra correspondiente para la determinación de la actividad enzimática. Los tubos se agitaron, se taparon y se introdujeron en un baño de agua a 39°C. La duración de la incubación fue de 15, 10 y 5 min para las actividades endoglucanasa, xilanasas y amilasa respectivamente. A continuación, se agregó a cada tubo 1,5 mL de solución DNS (ácido 3-5 dinitrosalicílico para detener la acción de las enzimas y los tubos se

introdujeron en agua hirviendo (100°C) durante 5 min. Posteriormente, los tubos se dejaron enfriar en un baño de agua fría y se leyó la absorbancia de su contenido en un espectrofotómetro (Amersham-Biosciences® Ultrospec 500 pro) a una longitud de onda de 540 nm.

Los tubos para la determinación de la actividad exoglucanasa se sometieron a un procesamiento diferente. Tras 120 min de incubación a 39°C, se hirvieron durante 10 min (100°C), se enfrió su contenido y se centrifugó (1000 x g, 10 min). A continuación, se mezcló 1 mL del sobrenadante con 1,5 mL de solución DNS y los tubos se introdujeron en agua hirviendo (100°C) durante 5 min. Posteriormente, se dejó enfriar el contenido y se leyó su absorbancia como se ha descrito anteriormente.

En cada una de las determinaciones, se añadieron tres tubos que contenían únicamente solución tampón (blanco) y otros tres que contenían únicamente la solución del sustrato correspondiente (blanco sustrato), con la finalidad de corregir los valores para la liberación de azúcares producida por la autólisis del sustrato y los azúcares presentes en las muestras. Para la realización de la recta de calibración se añadieron tubos que contenían 0,5 mL de solución tampón y 0,5 mL de disoluciones de glucosa con concentraciones de 2; 1,6; 1,2; 0,8 y 0,4 mg.mL⁻¹ para la determinación de las actividades endoglucanasa, exoglucanasa y amilasa, mientras que para la determinación de la actividad xilanasas se usaron disoluciones de xilosa con las mismas concentraciones. Todos estos tubos se sometieron al procesamiento descrito para los tubos que contenían las muestras a analizar. Al valor de absorbancia obtenido en cada caso se le restó el correspondiente al blanco sustrato y blanco muestra. Los resultados de la actividad enzimática se expresaron como nmol de azúcar (glucosa o xilosa) liberados por mL de muestra y minuto a 39°C y pH 6,5.

III. 5.6- Extracción de ADN y análisis automatizado de los espacios intergénicos ribosomales (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, ARISA*)

El ADN se extrajo de las muestras siguiendo la técnica descrita por Yu y Morrison (2004) con un paso adicional en el que las muestras se trataron con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) para eliminar inhibidores de la PCR (Saro *et al.*, 2012). El DNA extraído se cuantificó por espectrometría usando un Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, DE, Estados Unidos) a una

longitud de onda de 260 nm y su calidad se estimó a partir de la relación de absorbancias a 260 y 280 nm (A_{260}/A_{280}).

El ADN extraído se amplificó usando los cebadores bacterianos universales 16S-1392F y 23S-123R (Danovaro *et al.*, 2006; sintetizados por Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España), que amplifican la región en el operón ITS1 del ARNr. El cebador inverso fue marcado con el fluorocromo 6-FAM. Cada mezcla de PCR (25 μ L volumen final) contenía tampón de reacción de PCR 1x, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 μ M de cada cebador, cada desoxinucleótido trifosfato en una concentración de 0,2 mM y 2,5 UI de Taq polimerasa (Biotools B&M Labs S.A., Madrid, España). La reacción se inició con un ciclo de desnaturalización inicial de 4 min a 94°C seguido de 30 ciclos de desnaturalización 1 min a 94°C, anillamiento durante 1 min a 55°C y elongación a 72°C durante 2 min, con un paso final de extensión a 72°C durante 2 min. Para cada muestra, se mezclaron 5 ng de amplicón con un estándar interno de tamaño (GS 1200 LIZ, Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) en formamida desionizada, después se desnaturalizaron a 94°C durante 4 min e inmediatamente se colocaron en hielo. La detección automática de los fragmentos del ARISA se llevó a cabo usando un secuenciador ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) con un capilar de 36 cm por 50 μ m y el polímero POP-7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). El tamaño de pico y el área se estimaron por comparación con un estándar de tamaños de fragmentos utilizando el programa GeneMarker Software v1.80 (SoftGenetics, State College, PA, USA). Con el fin de incluir el máximo número de picos se utilizó un umbral de 100 unidades de fluorescencia. Se consideró que el perfil de los picos de los electroferogramas ARISA reflejó las especies o comunidades bacterianas predominantes presentes en cada muestra, teniéndose en cuenta solamente la presencia o ausencia de picos. Se calculó el índice de diversidad de Shannon tal y como lo describen Shannon y Weaver, (1949) para cada muestras y este índice fue utilizado para evaluar la diversidad de las comunidades bacterianas. Asimismo, se construyeron dendrogramas usando el coeficiente de correlación de Pearson y la opción UPGMA (*Umweight pair-group method*) y se realizó un análisis de componentes principales utilizando el software MVSP v3.12d (Kovach Computing Service, Anglesey, Gales, Reino Unido).

Capítulo IV. Pruebas experimentales

IV.1- Prueba 1: Treatment of tropical forages with exogenous fibrolytic enzymes: effects on chemical composition and in vitro rumen fermentation

Treatment of tropical forages with exogenous fibrolytic enzymes: effects on chemical composition and *in vitro* rumen fermentation

Díaz, A.¹, M.J. Ranilla^{1,2}, L.A. Giraldo³, M.L. Tejido², and M.D. Carro⁴

¹ *Departamento de Producción Animal. Universidad de León. 24071 León, Spain.*

² *Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León, Spain*

³ *Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Calle 59A No 63-20, Autopista Norte. Medellín, Colombia*

⁴ *Departamento de Producción Animal, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain*

Publicado en: *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2015

DOI: 10.1111/jpn.12175

Summary

The effects of three treatments of fibrolytic enzymes (cellulase from *Trichoderma longibrachiatum* (CEL), xylanase from rumen microorganisms (XYL) and a 1:1 mixture of CEL and XYL (MIX) on the *in vitro* fermentation of two samples of *Pennisetum clandestinum* (P1 and P2), two samples of *Dichanthium aristatum* (D1 and D2) and one sample of each *Acacia decurrens* and *Acacia mangium* (A1 and A2) were investigated. The first experiment compared the effects of two methods of applying the enzymes to forages, either at the time of incubation or 24 h before, on the *in vitro* gas production. In general, the 24 h pre-treatment resulted in higher values of gas production rate, and this application method was chosen for a second study investigating the effects of enzymes on chemical composition and *in vitro* fermentation of forages. The pre-treatment with CEL for 24 h reduced ($p < 0.05$) the content of neutral-detergent fibre (NDF) of P1, P2, D1 and D2, and that of MIX reduced the NDF content of P1 and D1, but XYL had no effect on any forage. The CEL treatment increased ($p < 0.05$) total volatile fatty acid (VFA) production for all forages (ranging from 8.6 to 22.7%), but in general no effects of MIX and XYL were observed. For both *P. clandestinum* samples, CEL treatment reduced ($p < 0.05$) the molar proportion of acetate and increased ($p < 0.05$) that of butyrate, but only subtle changes in VFA profile were observed for the rest of forages. Under the conditions of the present experiment, the treatment of tropical forages with CEL stimulated their *in vitro* ruminal fermentation but XYL did not produce any positive effect. These results showed clearly that effectiveness of enzymes varied with the incubated forage and further study is warranted to investigate specific, optimal enzyme-substrate combinations.

Keywords: fibrolytic enzymes; tropical forages; ruminal fermentation; batch cultures

IV.1.1. Introduction

In the last years many studies have explored the possibility of improving the nutritive value of forage for ruminants by using exogenous fibrolytic enzymes (recently reviewed by Beauchemin and Holtshausen, 2010), but most of them have been conducted with mixed diets for high-producing ruminants or with medium- to high-quality forages, and consequently there is little published information on how fibrolytic enzyme application can affect the digestion of low-quality forages (Dean et al., 2008; Krueger et al., 2008; Elghandour et al.,

2013). However, increasing the digestibility of low-quality forages by using exogenous enzymes could lead to significant improvements in ruminant performance in many parts of the world, mainly in the tropics and subtropics. Tropical forages intrinsically have low nutritive value, but often comprise practically the whole diet of ruminants in tropical countries, thus leading to a low productivity of ruminant livestock in these areas.

The effects of exogenous fibrolytic enzymes are influenced by many factors such as type and dose of enzyme, type of diet fed to animals and enzyme application method, among many others (Beauchemin et al., 2003; Beauchemin and Holtshausen, 2010). Regarding the factors related to the diet, the effectiveness of fibrolytic enzymes has been shown to vary with feed (Wallace et al., 2001; Colombatto et al., 2003), enzyme application method (Yang et al., 2000; Wang et al., 2001) and the component of the diet to which the enzyme is added (Beauchemin et al., 2003).

The objective of this work was to analyse the effects of three enzyme preparations on the *in vitro* ruminal fermentation of six samples of tropical forages. Our hypothesis was that enzyme treatments would improve the degradability of forages and that the extent of the improvement would vary with the chemical composition of forages. The selected enzymes were a cellulase from *Trichoderma longibrachiatum* (CEL), a xylanase from rumen microorganisms (XYL) and a 1:1 mixture of CEL and XYL (MIX). The cellulase has previously been shown to enhance *in vitro* fermentation of medium-quality forages and forage-based diets (Giraldo et al., 2007ab, 2008a), but to our knowledge the xylanase has not been previously tested.

IV.1.2. Materials and Methods

IV.1.2.1 Substrates, enzymes and characterisation of enzymatic activities

Six samples of tropical forages (4 grasses and 2 legumes) were obtained at different locations of Antioquia (Colombia) at variable regrowth stages to cover a wide range in chemical composition. Two samples of *Pennisetum clandestinum* (P1: harvested at 30-day regrowth; P2: harvested at 60-day regrowth) were harvested at two different locations in Santa Elena (2750 meters above sea level; cold climate), and two samples of *Dichanthium aristatum* (D1: harvested at 42-day regrowth; D2: harvested at 48-day regrowth) were harvested at two different places in Chigorodó (150 meters above sea level;

warm climate). In each case, about 500 g of forage were harvested by cutting with scissors at 10 cm above ground level. One sample of *Acacia decurrens* (A1) was collected at Santa Elena and one sample of *Acacia mangium* (A2) was collected at Caucasia (250 meters above sea level; warm climate). For each forage, about 500 g of leaves were collected from the low part of the shrubs. All samples were weighed, immediately transported to the laboratory, dried in a forced air oven at 60°C for 48 h and milled through a 1mm sieve before chemical analyses and in vitro incubations. Chemical composition of forages is given in Table IV.1.1.

Table IV.1.1 Chemical composition (g/kg dry matter) of forages*

	P1	P2	D1	D2	A1	A2
Dry matter content (g/kg fresh matte)	173	187	233	245	428	436
Organic matter	901	906	889	906	962	962
Crude protein	186	133	39	49	193	106
Neutral detergent fibre (NDF)	630	696	736	733	505	488
Hemicellulose [†]	366	386	336	401	212	170
Acid detergent fibre (ADF)	264	310	400	332	293	318
Cellulose [†]	258	299	366	306	110	161
Acid detergent lignin (ADL)	5.84	10.6	34.0	25.8	183	157
NDF lignification [†]	0.93	1.52	4.62	3.52	36.2	32.2

* P1 and P2: samples of *Pennisetum clandestinum*; D1 and D2: samples of *Dichanthium aristatum*, A1: *Acacia decurrens*; A2: *Acacia mangium*.

[†] Hemicellulose was calculated as the difference between NDF and ADF, cellulose as the difference between ADF and ADL, and NDF lignification as (ADL/NDF) x100

Three exogenous fibrolytic enzymes were tested: cellulase from *Trichoderma viride* (CEL; Fluka Chemicals, Seelze, Germany), xylanase from ruminal microorganisms (XYL; Xylanase M6; Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Ireland) and a 1:1 mixture of both enzymes (MIX). Enzyme preparations were assayed for carboxymethylcellulase, avicelase, xylanase and amylase activities using carboxymethylcellulose, microcrystalline cellulose

(Avicel PH-101; Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain), oat spelt xylan and soluble starch as substrates, respectively, and following the procedure described by Giraldo et al. (2008a). All activities were measured at pH 6.5 and 39°C in order to resemble optimal ruminal conditions. Analyses were done in triplicate, and tubes containing only buffer, buffer plus substrate, and buffer plus enzyme were also incubated to correct for substrate autolysis and sugars present in enzymes. At pH 6.5 and 39°C, 1 mg of CEL liberated per min 2.40, 0.385 and 0.040 μmol of glucose from carboxymethylcellulose, soluble starch and Avicel PH-101, respectively, and 1.72 μmol of xylose from oat spelt xylan. Under the same conditions, 1 mg of XYL liberated per min 30.2 μmol of xylose from oat spelt xylan, but no carboxymethylcellulase, avicelase or amylase activities were detected. One enzymatic unit was defined as the amount of enzyme required to release 1 μmol of xylose or glucose per min from the corresponding substrate at 39°C and pH 6.5. All enzyme treatments were applied at 20 enzymatic units per g substrate DM. For CEL, total enzymatic activity was calculated as the sum of individual activities.

IV.1.2.2. Effects of method of application of enzymes on *in vitro* gas production (Experiment 1)

Samples of each substrate (ground through a 1-mm screen) were fermented *in vitro* with buffered rumen fluid to compare the effects of two methods of enzyme application on gas production. Samples of 500 mg of each forage were accurately weighed into 120-mL serum bottles. Solutions of each enzyme containing 5 enzymatic units per mL were prepared daily in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH=6.5), and 2 mL of the corresponding solution were carefully applied directly onto the substrate inside the bottles either 24 h before starting the incubation (CEL, XYL and MIX) or immediately before the incubation (CEL0, XYL0 and MIX0). Substrates in non-treated bottles (control; CON) received 2 mL of buffer solution without added enzyme. All bottles were kept at room temperature (21-23°C) for 24 h until incubation with buffered rumen fluid.

Ruminal fluid was obtained from four rumen-cannulated Merino sheep fed medium-quality lucerne hay (158, 472, 301 and 65 g of crude protein (CP), neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fiber (ADF) and acid detergent lignin (ADL) per kg dry matter (DM), respectively) for *ad libitum* intake. Sheep were managed according to the protocols approved by the León University Institutional Animal Care and Use Committee and had free access to water and

mineral/vitamin block during the trial. Ruminant contents of each sheep were obtained immediately before the morning feeding, mixed and strained through four layers of cheesecloth into an Erlenmeyer flask with an O₂-free headspace. Particle-free fluid was mixed with the buffer solution of Goering and Van Soest (1970; no trypticase added) in a proportion 1:4 (vol/vol) at 39°C under continuous flushing with CO₂. Bottles were prewarmed (39°C) prior to the addition of 50 mL of buffered rumen contents under CO₂ flushing. Then, bottles were sealed with rubber stoppers and aluminium caps and incubated at 39°C. Gas production was measured using a pressure transducer (Delta Ohm DTP704-2BGI, Herter Instruments SL, Barcelona, Spain) and a calibrated syringe at 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96 and 120 h. At each measurement time, the gas in the headspace of the bottles was removed using the syringe until pressure was 0 and released.

After 120 h of incubation, the fermentation was stopped by swirling the bottles in ice, the bottles were opened and their content was transferred to previously weighed filter crucibles (pore size 100-160 µm) and filtered under vacuum. The residue of incubation was washed with 50 mL of hot distilled water, dried at 50°C for 48 h and the degradability of substrate was calculated. The residue was then analysed for ash to calculate the organic matter (OM) apparent disappearance after 120 h of incubation (OMD₁₂₀). Four incubation runs were performed on different days, so that each treatment was conducted in quadruplicate. In each incubation run, additional bottles without substrate (blanks) but with the corresponding enzyme treatments (2 mL of CON, CEL, XYL and MIX solutions) were included to correct the gas production values for gas release from endogenous substrates and enzyme treatment (Carro et al., 2005).

In order to estimate the fermentation kinetic parameters, gas production data were fitted using the exponential model (Krishnamoorthy et al., 1991): $gas = A (1 - e^{-c(t-lag)})$, where A is the asymptotic gas production (mL), c is the fractional rate of gas production (h⁻¹), lag is the initial delay in the onset of gas production (h) and t is the gas measurement time. The parameters A , c and lag were estimated by an iterative least squares procedure using the NLIN procedures of SAS (2012). Halftime of gas production ($T_{1/2}$) was the time (h) when half of the asymptotic gas volume (A) was produced and was calculated as $T_{1/2} = [(\ln 2 / c) + lag]$. The average fermentation rate (AFR; mL gas/h) was defined as the average gas production rate between the start of the incubation and $T_{1/2}$, and was calculated as $AFR = A c / [2 (\ln 2 + c lag)]$. Finally, the OM effective degradability (OMED; %) was estimated assuming a rumen particulate

outflow (Kp) of 0.035 per h, characteristic for sheep fed forages at maintenance level (Ranilla et al., 1998), according to the equation proposed by France et al. (2000): $OMED = [(OMD_{120} c)/(c + Kp)] e^{(-c \text{ lag})}$.

IV.1.2.3. Effects of enzymes on chemical composition of substrate

In order to investigate the effects of enzyme pre-treatments on substrate fibre composition, samples of each forage (250 mg) were weighed into artificial fibre bags (#F57 bags; 50 x 40 mm; $25 \pm 10 \mu\text{m}$ pore size; ANKOM Technology Corporation, Fairport, USA), and 1 mL of buffer solution containing no enzyme or 5 enzymatic units of the corresponding enzyme solution was added into each bag. Bags were heat sealed and kept at room temperature (21-23°C) for 24 h before sequential NDF, ADF and acid detergent lignin (ADL) analyses were conducted. For replication, the complete procedure was repeated four times ($n = 4$).

IV.1.2.4. Effects of enzymes on *in vitro* ruminal fermentation (Experiment 2)

The effects of enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of forages were investigated in 24 h incubations. All enzymes were applied 24 h before starting the incubation (treatments CON, CEL, XYL and MIX), and the incubation procedure was as described for the gas production trial, with the exception that no gas measurements were done until the end of incubations. After 24 h of incubation, gas production was measured in each bottle using a pressure transducer and a calibrated syringe. Bottles were uncapped, the pH was measured immediately with a pH-meter Basic 20 (Crison Instruments S.A., Alella, Spain), and the fermentation was stopped by swirling the bottles in ice. One milliliter of content was added to 1 mL of deproteinising solution (metaphosphoric acid (100 g/L) and crotonic acid (0.6 g/L)) for volatile fatty acid (VFA) determination and 1 mL were added to 1 mL 0.5 M-HCl for ammonia-N analysis. Finally, the contents of the bottles were transferred to previously weighed filter crucibles and the residue of incubation was washed with 50 mL of hot distilled water (50°C). Crucibles were dried at 50°C and weighed to calculate DM degradability (DMD). The residue of 24 h incubation was analysed for NDF to calculate fibre degradability (NDFD).

IV.1.2.5. Analytical procedures, calculations and statistical analyses

Dry matter, ash and N content of forages were determined according to the Association of Official Analytical Chemists (1999). Neutral-detergent fibre, ADF and acid detergent lignin analyses were carried out according to Van Soest et al. (1991) using an ANKOM²²⁰ Fibre Analyzer unit (ANKOM Technology Corporation, Fairport, USA). Sodium sulphite was used in the analysis, and both NDF and ADF were expressed inclusive of residual ash. Hemicellulose content was calculated as the difference between NDF and ADF. Concentrations of VFA and ammonia-N in rumen fluid were analysed as described by Carro and Miller (1999).

The amounts of VFA produced in each bottle were obtained by subtracting the amount present initially in the incubation medium from that determined at the end of the incubation period. When data from all forages were analysed together within Experiment 1 (6 substrates x 3 enzyme treatments x 2 methods of application) and within Experiment 2 (6 substrates x 3 enzyme treatments), significant interactions ($p < 0.05$) were detected for most parameters in both Experiments, and therefore data were analysed separately for each forage within each Experiment. Data from Experiment 1 were analyzed by ANOVA according to the following model:

$$Y_{ab} = \mu + i_a + E_b + e_{ab},$$

where Y_{ab} = the dependent variable; μ = the overall mean; i = the random effect of incubation day ($a = 1$ to 4); E = the fixed effect of enzyme treatment ($b = 1$ to 7; CON, CEL0, CEL, XYLO, XYL, MIX0 and MIX); and e = the residual error. Fermentation data from Experiment 2 were analysed with the same model, but there were only four enzyme treatments ($b = 1$ to 4; CON, CEL, XYL and MIX). Significance was declared at $p < 0.05$, whereas $p < 0.10$ values were considered as trends and discussed. When a significant effect of enzyme treatment was detected, differences between means were assessed by Tukey' test. All statistical analyses were conducted using the PROC MIXED of SAS (2012). Within each forage and enzyme treatment, there were four values for each of the measured variables.

IV.1.3. Results

IV.1.3.1. Effects of method of application of enzymes on in vitro gas production (Experiment 1)

As shown in Table IV.1.2, no enzyme treatment increased potential gas production of any forage compared with controls, with the exception of CEL0, CEL, MIX0 and MIX treatments, which increased *A* parameter for A1 and A2 forages ($p < 0.05$). Compared with buffer-treated substrates, the treatment with CEL0 and CEL increased ($p < 0.05$) *c* and AFR and reduced $T_{1/2}$ for P1, D1, D2 and A2 samples, but for P2 and A1 forages these effects were only observed for CEL treatment. The OMED of all forages was increased by CEL treatment ($p < 0.05$), but CEL0 was effective only for D2 forage. For all forages, the pre-treatment of forages with cellulase for 24 h increased *c*, AFR and OMED and decreased $T_{1/2}$ compared with the application of the cellulase immediately before incubation. The XYLO treatment had no effect on any parameter for P1 and A2 forages, but reduced parameter *c* when was applied to P2, D2 and A1 samples ($p < 0.05$). The pre-treatment of the two *P. clandestinum* and *Acacia* samples with xylanase for 24 h before incubation increased *c* and AFR ($p < 0.05$) and decreased $T_{1/2}$ ($p < 0.05$) compared with controls, but had no effects for *D. aristatum* samples ($p > 0.05$). For all forages, MIX treatment increased *c*, AFR and OMED and reduced $T_{1/2}$ compared with controls ($p < 0.05$), although no effects were observed when the mixture of enzymes was applied immediately before incubation for P2 and A1 samples and only subtle effects were noticed for the rest of forages.

The effects of the 24 h pre-treatment with enzymes on NDF, ADF and cellulose content of substrates are shown in Table IV.1.3. Compared to buffer-treated substrate, CEL treatment reduced NDF content of P1, P2, D1 and D2 samples ($p < 0.05$) and hemicellulose content of D1 and D2 samples ($p < 0.05$), but had no effect on A1 and A2 fibre composition. In contrast, no effects of XYL were observed for any forage, and a reduction of NDF by MIX treatment was only observed for P1 and D1. In general, no effects of enzymes on ADF and cellulose content were detected, with the exception of CEL treatment which reduced ADF content in P1 ($p < 0.05$).

Table IV.1.2 Parameters of gas production kinetics (A, c, AFR and T_{1/2}) and organic matter effective degradability (OMED) of forages incubated in batch cultures of rumen microorganisms and supplemented with enzymes at the time of incubation (CEL0, XYLO and MIX0) or 24 h before incubation (CEL, XYL and MIX)

Forage [†]	Item [‡]	Enzyme treatment [*]							SEM	p value
		CON	CEL0	CEL	XYLO	XYL	MIX0	MIX		
P1	A	149 ^{ab}	155 ^b	155 ^b	146 ^a	150 ^{ab}	152 ^b	155 ^b	1.8	0.027
	c	0.028 ^a	0.030 ^b	0.034 ^c	0.028 ^a	0.029 ^b	0.030 ^b	0.033 ^c	0.0005	<0.001
	AFR	2.06 ^a	2.36 ^b	2.62 ^c	2.02 ^a	2.22 ^b	2.26 ^b	2.54 ^c	0.05	<0.001
	T _{1/2}	25.2 ^c	23.0 ^b	20.6 ^a	25.2 ^c	23.6 ^b	23.4 ^b	21.3 ^a	0.33	<0.001
	OMED	33.1 ^a	34.7 ^{ab}	37.4 ^c	33.0 ^a	34.7 ^{ab}	33.7 ^a	36.2 ^{bc}	0.55	<0.001
P2	A	155 ^{ab}	160 ^b	150 ^a	155 ^{ab}	152 ^a	156 ^{ab}	150 ^a	1.9	0.036
	c	0.023 ^b	0.024 ^{bc}	0.027 ^d	0.021 ^a	0.025 ^c	0.023 ^b	0.027 ^d	0.0005	<0.001
	AFR	1.81 ^b	1.88 ^b	2.05 ^d	1.64 ^a	1.89 ^{bc}	1.82 ^b	2.01 ^{bc}	0.04	<0.001
	T _{1/2}	30.4 ^d	29.8 ^{cd}	25.6 ^a	33.1 ^e	28.1 ^{bc}	30.2 ^{cd}	26.2 ^{ab}	0.65	<0.001
	OMED	27.1 ^b	27.5 ^b	29.6 ^c	25.6 ^a	27.8 ^b	27.1 ^b	29.5 ^c	0.37	<0.001
D1	A	138 ^{ab}	144 ^c	133 ^a	139 ^{ab}	130 ^a	140 ^b	132 ^a	1.4	<0.001
	c	0.025 ^b	0.029 ^c	0.034 ^d	0.023 ^a	0.025 ^{ab}	0.027 ^c	0.033 ^d	0.0006	<0.001
	AFR	1.75 ^a	2.09 ^c	2.28 ^d	1.63 ^a	1.59 ^a	1.90 ^b	2.17 ^{cd}	0.05	<0.001
	T _{1/2}	28.2 ^{de}	24.2 ^{bc}	20.5 ^a	30.1 ^e	28.9 ^e	25.9 ^{cd}	21.4 ^{ab}	0.92	<0.001
	OMED	24.5 ^{ab}	26.1 ^b	28.5 ^c	23.3 ^a	23.6 ^a	25.5 ^b	28.7 ^c	0.50	<0.001

Table IV.1.2 Continued

Forage [†]	Item [‡]	Enzyme treatment [*]							SEM	p value
		CON	CELO	CEL	XYLO	XYL	MIXO	MIX		
D2	A	155 ^{ab}	160 ^{ab}	157 ^{ab}	154 ^{ab}	148 ^a	165 ^b	154 ^{ab}	4.5	0.310
	c	0.029 ^b	0.033 ^d	0.040 ^f	0.027 ^a	0.029 ^b	0.031 ^c	0.038 ^e	0.0004	<0.001
	AFR	2.24 ^a	2.61 ^b	3.13 ^c	2.12 ^a	2.16 ^a	2.51 ^b	2.94 ^c	0.06	<0.001
	T _{1/2}	24.2 ^{cd}	21.5 ^b	17.5 ^a	25.4 ^d	24.1 ^{cd}	22.9 ^c	18.3 ^a	0.45	<0.001
	OMED	28.3 ^{ab}	30.4 ^c	34.2 ^d	27.8 ^a	28.2 ^{ab}	29.5 ^{bc}	33.4 ^d	0.44	<0.001
A1	A	47.2 ^a	54.1 ^{bc}	55.4 ^c	47.4 ^a	46.8 ^a	52.1 ^b	51.2 ^b	0.92	<0.001
	c	0.048 ^b	0.048 ^b	0.062 ^d	0.044 ^a	0.054 ^c	0.047 ^{ab}	0.060 ^d	0.0009	<0.001
	AFR	1.14 ^{ab}	1.30 ^c	1.72 ^e	1.05 ^a	1.27 ^c	1.22 ^{bc}	1.47 ^d	0.02	<0.001
	T _{1/2}	14.9 ^c	14.9 ^c	11.3 ^a	16.2 ^c	13.1 ^b	15.4 ^c	11.8 ^{ab}	0.51	<0.001
	OMED	17.1 ^{ab}	16.7 ^{ab}	18.4 ^c	16.0 ^a	17.7 ^{bc}	16.8 ^{ab}	18.2 ^c	0.33	0.002
A2	A	42.8 ^{ab}	50.2 ^{cd}	52.7 ^d	40.8 ^a	44.4 ^b	47.3 ^c	49.2 ^c	0.91	<0.001
	c	0.048 ^a	0.052 ^{bc}	0.060 ^d	0.047 ^a	0.054 ^c	0.049 ^{ab}	0.058 ^d	0.0009	<0.001
	AFR	1.03 ^a	1.31 ^{bc}	1.61 ^d	0.97 ^a	1.21 ^b	1.18 ^b	1.44 ^c	0.05	<0.001
	T _{1/2}	15.4 ^e	13.6 ^{bcd}	11.7 ^a	15.0 ^{de}	13.1 ^{abc}	14.5 ^{cde}	12.1 ^{ab}	0.47	<0.001
	OMED	18.2 ^{ab}	18.9 ^{ab}	20.4 ^c	17.9 ^a	19.4 ^{bc}	18.1 ^{ab}	20.4 ^c	0.69	0.108

^{*} **CON**: control (no enzyme); **CEL**: cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*; **XYL**: xylanase from ruminal microorganisms; **MYX**: 1:1 mixture of CEL and XYL. All treatments were applied at 20 enzymatic units/g of substrate DM 24 h before incubation.

[†] P1 and P2: samples of *Pennisetum clandestinum*; D1 and D2: samples of *Dichanthium aristatum*, A1: *Acacia decurrens*; A2: *Acacia mangium*.

[‡] A: asymptotic gas production (mL/500 mg DM); c: fractional rate of fermentation (h⁻¹); AFR: average fermentation rate (mL/h); T_{1/2}: half time of gas production (h); OMED: organic matter effective degradability (%) for a fractional passage rate of 0.035 h⁻¹.

^{a, b, c} Within a row, means without a common superscript letter differ (p < 0.05; Tukey's test)

Table IV.1.3 Effect of the 24 h pre-treatment with exogenous fibrolytic enzymes on neutral detergent fibre (NDF), hemicellulose, acid detergent fibre (ADF) and cellulose content (g/kg dry matter (DM)) of forages (n = 4)

Forage [†]	Item [‡]	Enzyme treatment*				SEM	p value
		CON	CEL	XYL	MIX		
P1	NDF	630 ^c	613 ^a	625 ^{bc}	619 ^{ab}	3.3	0.012
	Hemicellulose	364	355	362	359	3.3	0.194
	ADF	264 ^b	258 ^a	263 ^b	260 ^{ab}	1.3	0.024
	Cellulose	258	253	257	259	1.9	0.202
P2	NDF	696 ^{bc}	683 ^a	700 ^c	687 ^{ab}	3.7	0.026
	Hemicellulose	386	375	390	380	3.1	0.111
	ADF	310	308	310	307	1.3	0.255
	Cellulose	299	296	298	296	1.5	0.370
D1	NDF	736 ^b	710 ^a	738 ^b	719 ^a	6.0	0.010
	Hemicellulose	336 ^{bc}	316 ^a	340 ^c	329 ^{ab}	4.3	0.010
	ADF	400	394	398	390	3.7	0.250
	Cellulose	366	365	363	356	4.2	0.343
D2	NDF	733 ^b	709 ^a	731 ^b	719 ^{ab}	4.8	0.013
	Hemicellulose	401 ^b	381 ^a	403 ^b	393 ^{ab}	4.1	0.010
	ADF	332	328	328	326	2.9	0.570
	Cellulose	305	301	302	299	2.1	0.378
A1	NDF	505	507	510	509	6.0	0.753
	Hemicellulose	212	212	209	210	4.7	0.897
	ADF	293	295	301	299	4.1	0.184
	Cellulose	110	111	109	114	1.8	0.089
A2	NDF	489	493	494	491	3.1	0.731
	Hemicellulose	171	179	174	172	4.2	0.572
	ADF	318	314	320	319	4.0	0.768
	Cellulose	161	165	167	163	2.7	0.493

* **CON**: control (no enzyme); **CEL**: cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*; **XYL**: xylanase from ruminal microorganisms; **MYX**: 1:1 mixture of CEL and XYL. All treatments were applied at 20 enzymatic units/g of substrate DM 24 h before incubation.

[†] P1 and P2: samples of *Pennisetum clandestinum*; D1 and D2: samples of *Dichanthium aristatum*, A1: *Acacia decurrens*; A2: *Acacia mangium*.

[‡] NDF and ADF are inclusive of residual ash and were assayed without amylase. Cellulose was calculated as ADF - acid detergent lignin.

^{a, b, c} Within a row, means without a common superscript letter differ (p < 0.05; Tukey's test)

IV.1.3.2. Effects of enzymes on in vitro ruminal fermentation (Experiment 2)

The effects of enzyme treatment on *in vitro* ruminal fermentation of *P. clandestinum*, *D. aristatum* and *Acacia* samples are shown in Tables IV.1.4, IV.1.5 and IV.1.6, respectively. No effects of XYL on fermentation parameters were observed for any forage. There were no effects of enzyme treatments on final pH (results not shown) or NH₃-N concentrations for any forage, with the exception of CEL and MIX that increased NH₃-N concentrations for P1 ($p < 0.05$).

Compared with controls, CEL treatment increased the production of gas, total VFA, propionate, butyrate and other minor VFA for both P1 and P2 forages ($p < 0.05$). The treatment of P1 with CEL increased both DMD and NDFD ($p < 0.05$), and no effect was observed for P2. The treatment of both *P. clandestinum* samples with MIX increased propionate and butyrate production ($p < 0.05$), but positive effects on DMD and NDFD were only observed for P1. For both *D. aristatum* samples, CEL treatment resulted in increased production of gas, total VFA, acetate, propionate and other minor VFA, and DMD ($p < 0.05$). There were no effects of MIX on fermentation of D1, but MIX increased total VFA, acetate and other VFA productions for D2.

The treatment of both A1 and A2 samples with CEL increased the production of gas, total VFA (by 4 and 6% for A1 and A2, respectively), acetate, propionate and other minor VFA ($p < 0.05$), but had no effects on DMD or NDFD. Treating A2 with MIX also increased gas, total VFA, acetate, butyrate and other minor VFA ($p < 0.05$), although no effects of MIX were observed on fermentation of A1.

IV.1.4. Discussion

The gas production technique was chosen for the first study because it is a simple screening tool to evaluate substrate degradation, as gas production rate is assumed to be directly proportional to rate of substrate degradation (Menke and Steingass, 1988). This study was designed to compare the efficacy of two methods of enzyme application, as a previous work (Yang et al., 2000; Wang et al., 2001) has shown that a pre-treatment of feed with enzymes before feeding or incubation with ruminal fluid enhanced the beneficial effects of enzymes on ruminal fermentation. In contrast, no differences between application methods have been reported (Hong et al., 2003) suggesting that the response to enzyme

pre-treatment may be influenced by the type of feed, type of enzymes or even by ruminal conditions (Hong et al., 2003). In our study, the pre-treatment of forages with XYL for 24 h increased *c*, AFR, OMED and reduced $T_{1/2}$ compared with the addition of XYL immediately before incubation for P1, P2, A1 and A2 forages, but no differences between application methods were observed for D1 and D2 forages, confirming that effects of enzyme pre-treatment may be influenced by the nature of the substrate to which enzymes are applied.

Compared with CEL0 and MIX0 treatments, the pre-treatment of forages with CEL and MIX for 24 h resulted in increased *c*, AFR, OMED and reduced $T_{1/2}$ for all forages, which indicates a stimulation of forage degradation rate. In contrast, in general there were no effects of enzymes on asymptotic gas production, supporting the general agreement that enzymes increase the rate rather than the extent of feed degradation in the rumen (Beauchemin and Holtshausen, 2010).

Some authors have suggested that the pre-treatment of feed with enzymes could create a stable enzyme-feed complex (Kung et al., 2000), but others have indicated an alteration in the fibre structure which would stimulate microbial colonization (Newbold, 1997; Nsereko et al., 2000). Giraldo et al. (2007 a, b) showed clearly that the treatment of grass hay with fibrolytic enzymes stimulated the initial phases of microbial colonization in Rusitec fermenters, resulting in greater colonization of feed particles even after 48 h of incubation, and similar results were reported by Wang et al. (2001) after treating a 50:50 lucerne hay:barley grain substrate with exogenous xylanase in Rusitec fermenters. The results of our first study clearly showed that the tested enzymes were more effective when a 24 h pre-treatment of forages was allowed, and consequently this method of enzyme application was selected for the second study.

Van de Vyver (2011) treated two tropical forages (kikuyu and weeping love grass) with a mixture of fibrolytic enzymes and observed a reduction in their metaxylem cell wall thickness at 12 h of incubation with ruminal fluid compared with distilled water treated forages, confirming the direct actions of fibrolytic enzymes on cell wall structure as part of the mode of action of exogenous enzymes. A reduction in NDF or ADF content of forages following treatment with fibrolytic enzymes has also been observed for a wide range of substrates (Giraldo et al., 2007b, 2008a; Dean et al., 2008; Krueger et al., 2008). In our study, CEL decreased NDF content of P1, P2, D1 and D2 forages

Table IV.1.4 Effect of the 24 h pre-treatment with exogenous fibrolytic enzymes on final ammonia-N concentration, gas and volatile fatty acid (VFA) production, acetate/propionate ratio (Ac/Pr), and degradability of dry matter (DMD) and neutral detergent fiber (NDFD) after 24 h *in vitro* fermentation of two samples (500 mg DM) of *Pennisetum clandestinum* with mixed rumen microorganisms (n = 4)

Forage ²	Item	Enzyme treatment*				SEM	p value
		CON	CEL	XYL	MIX		
P1	Gas (mL)	58.1 ^a	68.2 ^b	59.5 ^a	65.6 ^b	1.01	<0.001
	NH ₃ -N (mg/L)	262 ^a	289 ^b	269 ^a	286 ^b	6.5	0.049
	VFA (μmol)						
	Total	2018 ^{ab}	2214 ^b	1909 ^a	2137 ^{ab}	75.9	0.801
	Acetate	1428	1531	1334	1490	58.0	0.160
	Propionate	403 ^a	457 ^b	388 ^a	436 ^b	13.7	0.023
	Butyrate	119 ^a	146 ^b	118 ^a	139 ^b	4.0	0.002
	Others [‡]	68.5 ^a	79.6 ^b	68.7 ^a	72.5 ^{ab}	2.56	0.044
	Ac/Pr (mol/mol)	3.54 ^b	3.35 ^a	3.44 ^{ab}	3.42 ^{ab}	0.044	0.049
	DMD (%)	48.7 ^a	51.5 ^b	48.7 ^a	50.7 ^b	0.45	0.003
NDFD (%)	41.3 ^a	46.1 ^c	41.9 ^a	44.4 ^b	0.47	<0.001	
P2	Gas (mL)	53.7 ^a	60.2 ^b	53.4 ^a	57.5 ^{ab}	1.29	0.014
	NH ₃ -N (mg/L)	247	259	264	259	8.0	0.542
	VFA (μmol)						
	Total	1829 ^a	2071 ^b	1829 ^a	1932 ^{ab}	62.8	0.049
	Acetate	1306	1448	1290	1390	46.4	0.120
	Propionate	357 ^a	417 ^b	364 ^a	373 ^b	11.3	0.018
	Butyrate	111 ^a	139 ^c	115 ^{ab}	121 ^b	2.9	<0.001
	Others [‡]	54.2 ^a	66.7 ^b	53.9 ^a	55.3 ^a	2.03	0.004
	Ac/Pr (mol/mol)	3.66 ^{bc}	3.47 ^a	3.54 ^{ab}	3.73 ^c	0.052	0.038
	DMD (%)	41.1	42.1	42.0	42.4	0.70	0.636
NDFD (%)	34.8	35.4	36.3	36.8	1.04	0.496	

* **CON**: control (no enzyme); **CEL**: cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*; **XYL**: xylanase from ruminal microorganisms; **MYX**: 1:1 mixture of CEL and XYL. All treatments were applied at 20 enzymatic units/g of substrate DM 24 h before incubation.

[†] P1 and P2: samples of *Pennisetum clandestinum* obtained at different locations.

[‡] Calculated as the sum of isobutyrate, isovalerate, valerate and caproate.

^{a, b, c} Within a row, means without a common superscript letter differ (p < 0.05; Tukey's test)

Table IV.1.5 Effect of the 24 h pre-treatment with exogenous fibrolytic enzymes on final ammonia-N concentration, gas and volatile fatty acid (VFA) production, acetate/propionate ratio (Ac/Pr), and degradability of dry matter (DMD) and neutral detergent fiber (NDFD) after 24 h *in vitro* fermentation of two samples (500 mg DM) of *Dichantium aristatum Benth* with mixed rumen microorganisms (n = 4)

Forage [†]	Item	Enzyme treatment*				SEM	p value
		CON	CEL	XYL	MIX		
D1	Gas (mL)	58.8 ^a	67.8 ^b	59.7 ^a	60.9 ^a	1.32	0.004
	NH ₃ -N (mg/L)	157	171	167	163	5.6	0.353
	VFA (μmol)						
	Total	1887 ^a	2301 ^b	1756 ^a	2018 ^{ab}	101.4	0.023
	Acetate	1366 ^a	1643 ^b	1268 ^a	1456 ^{ab}	74.8	0.034
	Propionate	347 ^a	442 ^b	325 ^a	379 ^a	19.5	0.010
	Butyrate	134 ^a	159 ^b	124 ^a	139 ^{ab}	6.8	0.033
	Others [‡]	40.7 ^a	57.2 ^b	39.2 ^a	43.8 ^a	3.72	0.028
	Ac/Pr (mol/mol)	3.94 ^b	3.72 ^a	3.90 ^b	3.84 ^{ab}	0.048	0.028
	DMD (%)	37.6 ^a	40.9 ^b	37.5 ^a	38.6 ^{ab}	0.55	0.005
NDFD (%)	35.2 ^a	38.0 ^c	34.3 ^a	36.8 ^{ab}	0.72	0.002	
D2	Gas (mL)	67.4 ^a	76.9 ^b	68.2 ^a	71.6 ^a	1.31	0.002
	NH ₃ -N (mg/L)	157	164	160	165	5.4	0.699
	VFA (μmol)						
	Total	2104 ^a	2325 ^b	2064 ^a	2178 ^b	36.6	0.003
	Acetate	1482 ^a	1640 ^b	1456 ^a	1522 ^a	24.9	0.003
	Propionate	399 ^{ab}	452 ^c	389 ^a	425 ^{bc}	8.8	0.003
	Butyrate	176	178	174	179	5.1	0.925
	Others [‡]	46.8 ^a	54.7 ^b	44.4 ^a	51.6 ^b	1.23	<0.001
	Ac/Pr (mol/mol)	3.71	3.63	3.74	3.68	0.051	0.257
	DMD (%)	42.1 ^a	46.3 ^b	43.8 ^a	44.6 ^{ab}	0.81	0.031
NDFD (%)	40.8	45.7	42.7	43.7	1.16	0.082	

* **CON**: control (no enzyme); **CEL**: cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*; **XYL**: xylanase from ruminal microorganisms; **MIX**: 1:1 mixture of CEL and XYL. All treatments were applied at 20 enzymatic units/g of substrate DM 24 h before incubation.

[†] D1 and D2: samples of *Dichantium aristatum Benth* obtained at different locations.

[‡] Calculated as the sum of isobutyrate, isovalerate, valerate and caproate.

^{a, b, c} Within a row, means without a common superscript letter differ (p < 0.05; Tukey's test)

Table IV.1.6 Effect of the 24 h pre-treatment with exogenous fibrolytic enzymes on final ammonia-N concentration, gas and volatile fatty acid (VFA) production, acetate/propionate ratio (Ac/Pr), and degradability of dry matter (DMD) and neutral detergent fiber (NDFD) after 24 h *in vitro* fermentation of samples (500 mg DM) of *Acacia decurrens* (A1) and *Acacia mangium* (A2) with mixed rumen microorganisms (n = 4)

Forage	Item	Enzyme treatment*				SEM	p value
		CON	CEL	XYL	MIX		
A1	Gas (mL)	27.4 ^{ab}	33.3 ^c	25.2 ^a	30.2 ^{bc}	1.33	0.010
	NH ₃ -N	218	227	225	222	4.1	0.504
	VFA (μmol)						
	Total	1413 ^a	1534 ^b	1397 ^a	1412 ^a	26.2	0.011
	Acetate	1007 ^a	1084 ^b	997 ^a	1002 ^a	20.6	0.034
	Propionate	287 ^a	314 ^b	282 ^a	284 ^a	4.8	0.001
	Butyrate	82.0 ^a	92.5 ^b	81.3 ^a	85.4 ^a	1.65	0.003
	Others [†]	38.0 ^a	43.7 ^b	36.4 ^a	39.7 ^a	0.84	<0.001
	Ac/Pr	3.51	3.45	3.54	3.53	0.050	0.258
	DMD (%)	26.5	27.8	26.3	25.8	0.74	0.325
NDFD (%)	18.3	20.3	17.3	17.9	0.93	0.184	
A2	Gas (mL)	26.8 ^a	32.0 ^b	27.0 ^a	29.6 ^{bc}	0.78	0.003
	NH ₃ -N	192	209	196	199	6.6	0.371
	VFA (μmol)						
	Total	1220 ^a	1497 ^c	1261 ^{ab}	1427 ^{bc}	56.8	0.021
	Acetate	872 ^a	1059 ^{bc}	905 ^{ab}	1019 ^{bc}	42.0	0.034
	Propionate	237 ^a	296 ^b	239 ^a	278 ^b	19.5	0.020
	Butyrate	79.8 ^a	100 ^c	83.0 ^{ab}	91.3 ^{bc}	2.92	0.003
	Others [†]	31.8 ^a	42.2 ^c	34.1 ^a	38.8 ^{bc}	1.85	0.013
	Ac/Pr	3.68	3.58	3.79	3.67	0.078	0.112
	DMD (%)	26.0	27.0	26.2	26.1	0.33	0.198
NDFD (%)	22.7	23.4	22.3	22.1	0.40	0.179	

* **CON**: control (no enzyme); **CEL**: cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*; **XYL**: xylanase from ruminal microorganisms; **MYX**: 1:1 mixture of CEL and XYL. All treatments were applied at 20 enzymatic units/g of substrate DM 24 h before incubation.

† Calculated as the sum of isobutyrate, isovalerate, valerate and caproate.

a, b, c Within a row, means without a common superscript letter differ (p < 0.05; Tukey's test)

and hemicellulose content of D1 and D2 forages and MIX decreased NDF content of P1 and D1, but cell wall composition of A1 and A2 was not affected by any treatment.

These results clearly show that enzymes had different effects on cell wall components of forages and therefore forage characteristics influenced the response. However, other mechanisms of action of enzymes than direct effects on cell wall should be involved, since CEL was effective in increasing degradation rate of A1 and A2 forages but had no effect on their NDF, ADF or cellulose content; similarly, MIX increased degradation rate of P2, D2, A1 and A2 forages without affecting their fibre fractions content. It is possible that enzymes altered or weakened the cell wall structure, thus allowing earlier access of ruminal microorganisms to cell contents and increasing degradation rate, but these modifications were not reflected in changes in NDF, ADF or cellulose content of forages.

Volatile fatty acids constitute the main source of energy for the host animal and any increase in their production *in vitro* should reflect an increase in the amount of organic matter fermented, as batch cultures are closed systems. The CEL treatment increased VFA production by 9.7, 13.2, 21.9, 10.5, 8.6 and 22.7% for P1, P2, D1, D2, A1 and A2 forages, respectively. The response was highly variable and could not be easily related to chemical composition of forages. Thus, D1 and D2 had similar NDF content (736 and 733 g/kg DM, respectively) and cell wall lignification degree (4.6 and 3.5% of NDF), but the increase in VFA production above the levels in controls was rather different (414 and 221 μmol per culture for D1 and D2, respectively). Likewise, NDF and cell wall lignification degree was similar in A1 and A2 samples (508 g/ kg DM and 36% for A1, and 488 g/ kg DM and 32% for A2), but the observed increase in VFA production above the values in control cultures was 2.3 times greater in A2 than in A1 (277 and 121 μmol per culture, respectively). The cross-linking of lignin to cell wall carbohydrates limits the action of enzymes and cell wall digestion, but conventional fibre analyses do not account for the complexity of lignin-carbohydrates complexes in tropical forages.

Several *in vivo* (Beauchemin et al., 2000; Giraldo et al., 2008b) and *in vitro* studies (Dong et al., 1999; Wang et al., 2001; Krueger and Adesogan, 2008) have reported that treating different feeds with fibrolytic enzymes produced changes in molar proportions of VFA, but shifts in pattern of VFA seem to be influenced by the type of feed and enzyme preparations. In the present study, treating P1 and P2 with CEL and MIX increased the production of propionate

and butyrate without affecting that of acetate, thus reducing the acetate:propionate ratio and indicating a change in fermentation pattern. Similar changes have been reported by others (Yang et al., 2002; Krueger and Adesogan, 2008), indicating that fibrolytic enzymes can make the fermentation more gluconeogenic, and hence improve the energetic efficiency of the fermentation (Krueger and Adesogan, 2008). These changes in VFA profile have been attributed to fermentation of sugars released by enzymatic cell wall hydrolysis, but it has been also suggested that VFA changes may reflect a shift in the species profile of colonizing bacteria in response to pre-treatment of feed with fibrolytic enzymes (Wang et al., 2001). However, effects of enzymes on VFA profile varied with the forage incubated, as CEL and MIX did not affect the acetate:propionate ratio for D2, A1 and A2 forages, thus indicating that production of both VFA was modified in the same proportion.

The lack of effect of XYL on fermentation parameters found in experiment 2 is apparently in contrast with the increased AFR and reduced $T_{1/2}$ observed for P1, P2, A1 and A2 forages in experiment 1. However, it has to be taken into account that these gas production parameters reflect what occurs at initial stages of fermentation, whereas fermentation parameters were measured after 24 h of incubation. Giraldo et al. (2008a) analysed the effects of three fibrolytic enzymes on *in vitro* fermentation of different substrates and observed that all enzymes increased gas and VFA production at 8 h of incubation, but some of these effects were not detected after 24 h of incubation. Other studies (Colombatto et al., 2003; Giraldo et al., 2007 a, b; Ranilla et al., 2008) have also reported short-term effects of enzymes on substrate fermentation with limited or null effects later during the incubation, and there is a general agreement that enzymes can increase the rate, but not the extent of feed degradation in the rumen (Beauchemin and Holtshausen, 2010). Our results indicate that XYL could have stimulated initial fermentation of some forages (P1, P2, A1 and A2), but effects disappear after 24 h of incubation. In agreement with this hypothesis, in the first study there were no effects of XYL on OMED of any forage despite the increased gas production rates observed for P1, P2, A1 and A2 forages, and the lack of effects on OMED is consistent with the absence of effects on DMD and NDFD observed in experiment 2. Additionally, it has been noticed that feed enzymes compete with enzymes produced by fibrolytic bacteria in the rumen for available binding sites on feed (Morgavi et al., 2004), and this competition may also provide an explanation for the lack of effect of XYL, since this enzyme was produced by ruminal microorganisms.

In the present study we decided to consider all determined enzyme activities to calculate the amount of enzyme applied to substrates, though they should reflect the activity on different chemical fractions of forages. Although all enzymes were applied at the same rate, the amounts of each individual enzymatic activity were variable, because CEL presented mainly carboxymethylcellulase and xylanase activity, with low amylase and avicelase activities, but XYL presented only xylanase activity. The CEL was the most effective treatment for all forages, which would indicate that it presented the most appropriate combination of enzymatic activities for the tested forages. However, the magnitude of effects varied with the forage, indicating that limiting enzymatic activity is likely substrate dependent (Eun and Beauchemin, 2007). Because only one sample per forage and harvest date was tested in this study, no specific conclusions about the effectiveness of the tested enzymes to improve the degradation of each forage can be drawn. As pointed out by Wallace et al. (2001), a precise identification of the enzymatic activity causing a positive response in ruminal fermentation might make it possible to develop more effective fibrolytic enzyme products.

In conclusion, the results indicate that the treatment of tropical forages with a fibrolytic enzyme produced by *Trichoderma longibrachiatum* had a stimulatory effect on rumen fermentative activity, since VFA production and substrate degradability were significantly increased, but the extent of this stimulation varied with the forage used. In contrast, the use of a xylanase from ruminal microorganisms produced only subtle effects on *in vitro* gas production of certain forages, suggesting that it contributed little, if any, to ruminal fibrolytic activity. Future work is required to find the ideal combination of highly active enzymes for optimizing the degradation of tropical forages, and the challenge is to identify the key enzyme activities and dose rates required to better match the complexity of these forages, thus ensuring cost-effective use of enzymes in ruminant feeding in the tropics and subtropics.

IV.1.5. Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the financial support received from the Junta de Castilla y León (Project LE040A05), MICINN (Project AGL2008-04707-C02-02) and the MAE-AECID (Project A/4951/06). A. Díaz and L.A. Giraldo gratefully acknowledge receipt of grants from the Spanish AECID and the Fundación Carolina, respectively. M.L. Tejido gratefully acknowledges a postdoctoral contract from Spanish CSIC (JAE-doc program).

IV.1.6. References

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1999: *Official Methods of Analysis*, 16th Edition, 5th revision. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- Beauchemin K.A.; Colombatto, D.; Morgavi, D.P.; Yang, W.Z., 2003: Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science* 81, E37–E47.
- Beauchemin, K.A.; Holtshausen, L., 2010: Developments in enzyme usage in ruminants. In: Bedford, M.R.; Partridge, G.G. (ed.), *Enzymes in Farm Animal Nutrition* (2nd edition). CABI, Oxford, United Kingdom, pp, 206-230.
- Beauchemin, K.A.; Ivan, M.; McAllister, T.A.; Rode, L.M., 2000: New feed additives as alternatives to sub-therapeutic levels of antimicrobials in beef cattle diets. In: *National Beef Science Seminar. New Science for a New Century*, Lethbridge, Alberta, Canada. pp, 1-7.
- Carro M.D.; Miller E.L., 1999: Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an *in vitro* semicontinuous culture system (RUSITEC). *British Journal of Nutrition* 82, 149-157.
- Carro, M.D.; Ranilla, M.J.; Tejido, M.L., 2005: Using the *in vitro* gas production technique to test feed additives: effects of correcting values for different blanks. *Animal Feed Science and Technology* 123, 173-184.
- Colombatto, D.; Morgavi, D.P.; Furtado, A.F.; Beauchemin, K.A., 2003: Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: relationship between biochemical characteristics and *in vitro* ruminal degradation. *Journal of Animal Science* 81, 2628-2638.
- Dean, D.B.; Adesogan, A.T.; Krueger, N.A.; Littell, R.C., 2008: Effects of treatment with ammonia or fibrolytic enzymes on chemical composition and ruminal degradability of hays produced from tropical grasses. *Animal Feed Science and Technology* 145, 68–83.
- Dong, Y.; Bae, H.D.; McAllister, T.A.; Mathison, G.W.; Cheng K.J., 1999: Effects of exogenous fibrolytic enzymes, α -bromoethanesulfonate and monensin on fermentation in a rumen simulation (Rusitec) system. *Canadian Journal of Animal Science* 79, 491-498.

- Elghandour, M.M.Y.; Salem, A.Z.M.; Gonzalez-Ronquillo, M.; Bórquez, J.L.; Gado, H.M.; Odongo, N.E.; Peñuelas, C.G., 2013: Effects of exogenous enzymes on in vitro gas production kinetics and ruminal fermentation of four fibrous feeds. *Animal Feed Science and Technology* 179, 46–53.
- Eun, J.S.; Beauchemin, K.A., 2007: Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using in vitro fermentation characteristics. *Animal Feed Science and Technology* 132, 298-315.
- France, J.; Dijkstra, J.; Dhanoa, M.S.; López, S.; Bannink, A., 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in vitro: derivation of models and other mathematical considerations. *British Journal of Nutrition*, 83, 131-142.
- Giraldo, L.A.; Ranilla, M.J.; Tejido, M.L.; Carro, M.D., 2007a: Influence of exogenous fibrolytic enzyme and fumarate on methane production, microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters. *British Journal of Nutrition* 98, 753-761.
- Giraldo, L.A.; Tejido, M.L.; Ranilla, M.J.; Carro, M.D., 2007b: Effects of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in Rusitec fermenters. *Journal of Animal Science* 85, 1962-1970.
- Giraldo, L.A.; Tejido, M.L.; Ranilla, M.J. ; Carro, M.D., 2008a. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on in vitro ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratios. *Animal Feed Science and Technology* 141, 306-325.
- Giraldo, L.A.; Tejido, M.L.; Ranilla, M.J.; Ramos, S.; Carro M.D., 2008b: Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay based diet. *Journal of Animal Science* 86, 1617-1623.
- Hong, S.H.; Ong, S.H.; Lee, B.K.; Choin, N.J.; Lee, S.S.; Yun, S.G.; Ha, J.K., 2003: Effects of enzyme application method and levels and pre-treatment times on rumen fermentation, nutrient degradation and digestion in goats and steers. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 16, 389-393.
- Krishnamoorthy, U.; Soller, H.; Steingass, H.; Menke, K.H., 1991. A comparative study on rumen fermentation of energy supplements in vitro. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 65, 28-35.

- Krueger, N.A.; Adesogan, A.T., 2008: Effects of different mixtures of fibrolytic enzymes on digestion and fermentation of bahiagrass hay. *Animal Feed Science and Technology* 145, 84-94.
- Krueger, N.A.; Adesogan, A.T.; Staples, C.R.; Krueger, W.K.; Deana, D.B.; Littell R.C., 2008: The potential to increase digestibility of tropical grasses with a fungal, ferulic acid esterase enzyme preparation. *Animal Feed Science and Technology* 145, 95-108.
- Kung, L. Jr.; Treacher, R.J.; Nauman, G.A.; Smagala, A.M.; Endres, K.M.; Cohen, M.A., 2000: The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 83, 115-122.
- Menke, K.H.; Steingass, H., 1988: Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 28, 7-55.
- Morgavi, D.P.; Beauchemin, K.A.; Nsereko, V.L.; Rode, L.M.; McAllister, T.A.; Wang, Y., 2004: *Trichoderma* enzymes promote *Fibrobacter succinogenes* S85 adhesion to, and degradation of, complex substrates but not pure cellulose. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 1083–1090.
- Newbold, J., 1997: Proposed mechanisms for enzymes as modifiers of ruminal fermentation. In Proceedings of the 8th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, Gainesville, Florida, USA, pp, 146-159.
- Nsereko, V.L.; Morgavi, D.P.; Rode, L.M.; Beauchemin, K.A.; McAllister, T.A., 2000: Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology* 88, 153-170.
- Ranilla, M.J.; López, S.; Giráldez, F.J.; Valdés, C.; Carro, M.D., 1998: Comparative digestibility and digesta flow kinetics in two breeds of sheep. *Animal Science* 66, 389-396.
- Ranilla, M.J.; Tejido, M.L.; Giraldo, L.A.; Tricçarico, J.M.; Carro M.D., 2008: Effects of an exogenous fibrolytic enzyme preparation on *in vitro* ruminal fermentation of three forages and their isolated cell walls. *Animal Feed Science and Technology* 145, 109-121.
- SAS Institute Inc, 2012. SAS/STAT® 12.2 User's guide. SAS Inst Inc, Cary, NC, USA.

- Van de Vyver, W.F.J., 2011: Fibrolytic enzymes in ruminant nutrition and their effect on forage cell wall integrity. Doctoral Thesis. Stellenbosch University. South Africa.
- Van Soest, P.J.; Robertson, J.B.; Lewis, B.A., 1991: Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583-3597.
- Wallace, R.J.; Wallace, S.J.A.; McKain, N.; Nsereko, V.L.; Hartnell G.F., 2001: Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Journal of Animal Science* 79, 1905-1916.
- Wang, Y.; McAllister, T.A.; Rode, L.M.; Beauchemin, K.A.; Morgavi, D.P.; Nsereko, V.L.; Iwaasa, A.D.; Yang W., 2001: Effects of an exogenous enzyme preparation on microbial protein synthesis, enzyme activity and attachment to feed in the Rumen Simulation Technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition* 85, 325-332.
- Yang, W.Z.; Beauchemin, K.A. ; Rode, L.M., 2000 : A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. *Journal of Dairy Science* 83, 2512-2520.
- Yang, W.Z.; Beauchemin, K.A.; Vedres, D.D., 2002: Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and fermentation in continuous culture. *Animal Feed Science and Technology* 102, 137-150.

IV.2- Prueba 2: *In vitro* evaluation of commercial fibrolytic enzymes for improving the nutritive value of low-quality forages

***In vitro* evaluation of commercial fibrolytic enzymes for
improving the nutritive value of low-quality forages**

Díaz, A.¹, M.D. Carro², C. Saro¹, I. Mateos¹, E. Odongo³ and M.J. Ranilla^{1,4}

¹ *Departamento de Producción Animal. Universidad de León. 24071 León, Spain.*

² *Departamento de Producción Animal, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain.*

³ *International Atomic Energy Agency, Vienna International Centre, PO Box 100, 1400 Vienna, Austria.*

⁴ *Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León, Spain.*

Publicado en: *Animal Nutrition and Feed Technology*, 13: 461-476. 2013.

Abstract

The aim of this work was to assess the effects of four doses of three commercial fibrolytic enzymes on ruminal fermentation of rice straw, maize stover and *Pennisetum purpureum* clon Cuba CT-115 hay in batch cultures of ruminal microorganisms from sheep. One enzyme was produced by *Penicillium funiculosum* (PEN) and two were from *Trichoderma longibrachiatum* (TL1 and TL2). Each liquid enzyme was diluted 200 (D1), 100 (D2), 50 (D3) and 10 (D4) - fold and applied to each substrate in quadruplicate over time and incubated for 120 h in rumen fluid. The D4 dose of each enzyme increased ($P < 0.05$) the fractional rate of gas production and organic matter effective degradability for all substrates, and TL2 had similar effects when applied at D3. In 9 h incubations, PEN at D4, TL1 at all tested doses, and TL2 at D2, D3 and D4 increased ($P < 0.05$) volatile fatty acid production and dry matter degradability for all substrates. The commercial enzymes tested were effective at increasing *in vitro* ruminal fermentation of low-quality forages, although effective doses varied with the enzyme.

Key words: Fibrolytic enzymes; Low-quality forages; Rumen fermentation; Batch cultures

IV.2.1. Introduction

One of the main constraints for increasing ruminant production in developing countries is inadequate nutrition. Feed resources in such countries are characterized by scarcity during the winter or dry season and fluctuating quality of forage, resulting in nutrient imbalance when ruminants are grazed or fed the available pastures and crop residues. The problem is worsened by the limited usage of commercial concentrate feeds due to high costs. The situation is particularly acute in the dry season when high-quality forages are in short supply and nutrient requirements of ruminants cannot be met (Leng, 1990). Farmers usually try to counter this shortfall by conserving forages and crop residues, such as wheat and rice straw or maize stover, but most of these forages are high in fiber and low in protein, which limits animal performance. Therefore, any improvements made in their digestive utilization will be expected to increase ruminant productivity and reduce manure output.

Among the techniques available to improve the nutritive value of low-quality forages, treatment with fibrolytic enzymes (ENZ) is one of the less explored,

because most studies on fibrolytic ENZ have been conducted with medium to good-quality forages. In the last decades the cost of production of exogenous ENZ has considerably decreased (McAllister *et al.*, 2000), and currently there are different commercial products whose use at the concentrations necessary to produce a positive animal response can be economically feasible. However, the effectiveness of fibrolytic ENZ is influenced by many factors such as type and dose of ENZ and type of diet fed to animals. Therefore ENZ should be tested on different forages at different doses to identify the optimum ENZ dose for a particular forage. The aim of this study was to assess the effects of different doses of three commercial ENZ preparations on the *in vitro* ruminal fermentation of three low-quality forages. Our hypothesis was that each enzyme would increase the fermentation of the forages but effects of each commercial product would depend on the type of forage tested.

IV.2.2. Materials and methods

IV.2.2.1. Substrates and enzymes

Samples of rice straw (*Oriza sativa* L.), maize stover (*Zea mays*) and a tropical grass hay (*Pennisetum purpureum* clon Cuba CT-115) were selected as substrates to be tested, as they represent the main forage source used in ruminant production systems in many tropical countries. The chemical composition of the forages is given in Table IV.2.1.

Table IV.2.1. Chemical composition (g/kg dry matter) of forages used in the study

	<i>Organic Matter</i>	<i>Crude Protein</i>	<i>Neutral Detergent Fibre</i>	<i>Acid Detergent Fibre</i>	<i>Acid Detergent Lignin</i>
Rice straw	856	52.4	729	465	58.0
Maize stover	955	30.8	856	456	43.7
<i>Pennisetum purpureum</i> clon Cuba CT-115 hay	885	62.6	699	381	62.9

Three commercial ENZ preparations were selected: Rovabio Excel® (PEN; produced by *Penicillium funiculosum* (Adisseo, Antony, France) and Xylanase Plus (TL1) and Cellulase Plus (TL2) produced by *T. longibrachiatum* (Dyadic®, Jupiter, FL, USA). Enzyme preparations were assayed for endoglucanase, exoglucanase, xylanase and amylase activities using carboxymethylcellulose, Avicel PH-101, oat spelt xylan and soluble starch as substrates, respectively. In order to simulate ruminal conditions in forage-fed ruminants, all ENZ activities were measured at pH 6.5 and 39°C following the procedures described by Giraldo *et al.* (2008a). Determinations were done in triplicate, and tubes containing only buffer, buffer plus substrate, and buffer plus ENZ were also incubated to correct for substrate autolysis and sugars present in the ENZ preparations. Exactly, 1 mL of PEN liberated 7.5 µmol of glucose from carboxymethylcellulose and 613 µmol of xylose from oat spelt xylan per min, and TL1 and TL2 liberated 19.5 µmol of glucose from carboxymethylcellulose and 661 µmol of xylose from oat spelt xylan per min, and 16.6 µmol of glucose from carboxymethylcellulose and 690 µmol of xylose from oat spelt xylan per min. No exoglucanase or amylase activities were detected for any ENZ.

IV.2.2.2. Effects of enzymes on *in vitro* gas production kinetics, *in vitro* ruminal fermentation and forage fibre composition

Samples of forages were ground through a 1-mm screen before *in vitro* incubations. Four hundred mg of each forage were accurately weighed into 120-mL serum bottles. Enzyme preparations were supplied in liquid form and they were diluted 1/200 (D1), 1/100 (D2), 1/50 (D3) and 1/10 (D4) in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH=6.5). One mL of the corresponding solution was carefully applied directly onto the substrate inside the bottles 24 h before starting the incubation, and bottles were kept at room temperature (21-23°C) until incubation. Enzyme activities added to forages varied among the commercial products (see Table IV.2.2), but were comparable to those used in previous studies (Eun and Beauchemin, 2007; Giraldo *et al.*, 2008ab; Ranilla *et al.*, 2008).

Table IV.2.2. Endoglucanase and xylanase activity added to forage samples (400 mg of dry matter) in each experimental treatment¹

<i>Enzyme</i>	<i>Endoglucanase</i>				<i>Xylanase</i>			
	<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>	<i>D4</i>	<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>	<i>D4</i>
PEN	0.04	0.08	0.15	0.75	3.07	6.13	12.3	61.3
TL1	0.10	0.20	0.39	1.95	3.31	6.61	13.2	66.1
TL2	0.08	0.17	0.33	1.66	3.45	6.90	13.8	69.0

¹ Endoglucanase and xylanase activities are expressed as μmol of glucose and xylose, respectively, released by 1 mL of enzyme per minute at 39°C and pH 6.5

Ruminal fluid was obtained from four rumen-cannulated Merino sheep fed medium quality grass hay at energy maintenance level (NRC, 2007). Sheep were managed according to the protocols approved by the León University Institutional Animal Care and Use Committee, and had free access to water and mineral/vitamin blocks throughout the trial. Ruminal contents of each sheep were obtained immediately before the morning feeding, mixed and strained through four layers of cheesecloth into an Erlenmeyer flask with an O₂-free headspace. The fluid was mixed with the buffer solution of Goering and Van Soest (1970; no trypticase added) in a 1:4 (vol/vol) proportion at 39°C under continuous flushing with CO₂. Bottles were prewarmed (39°C) prior to the addition of 40 mL of buffered rumen contents under CO₂ flushing. Then, bottles were sealed with rubber stoppers and aluminium caps and incubated at 39°C.

Bottles used to analyze ENZ effects on gas production kinetics were incubated for 120 h. Gas production was measured at 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96 and 120 h using a pressure transducer (Delta Ohm DTP704-2BGI, Herter Instruments SL, Barcelona, Spain) and a calibrated syringe and the gas was released after each measurement. After 120 h of incubation, the fermentation was stopped by swirling the bottles in iced water, the bottles were opened and their contents were transferred to previously weighed filter crucibles (pore size 100-160 μm) and filtered under vacuum. The incubation residues were washed with 50 mL of hot distilled water, dried at 50°C for 48 h, and analysed for ash to calculate apparent organic matter (OM) disappearance after 120 h of incubation (OMD₁₂₀). The incubations were repeated 3 times, so that each treatment was evaluated in quadruplicate. In each incubation, additional bottles without substrate (blanks) but with the corresponding ENZ treatment were included to correct the gas production values for gas release from endogenous substrates and ENZ treatment (Carro *et al.*, 2005).

Bottles used to analyze ENZ effects on ruminal fermentation were incubated for 9 h. Gas production was measured as before described at 3, 6 and 9 h. Bottles were uncapped, the pH immediately measured with a pH-meter (Crison pH Meter Basic 20, Barcelona, Spain) and the fermentation was stopped by swirling the bottles in iced water. Samples were taken for volatile fatty acid (VFA) and ammonia-N analysis as described by Giraldo *et al.* (2008a), and the contents of the bottles were transferred to previously weighed filter crucibles to calculate DM degradability (DMD). Each incubation was repeated 4 times to give 4 replicates per treatment, and blanks were included in each incubation serie.

The effects of ENZ treatments on substrate fibre composition were analysed by weighing 400 mg of forage samples into artificial fibre bags (#F57 bags; 50 x 40 mm; $25 \pm 10 \mu\text{m}$ pore size; ANKOM Technology Corporation, Fairport, USA) and adding 1 mL of the different ENZ dilutions tested into each bag. Bags were heat sealed and kept at room temperature (21-23°C) for 24 h before sequential neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF) analyses were conducted. For replication, the complete procedure was repeated 3 times.

IV.2.2.3. Analytical procedures

Dry matter, ash and N were determined according to methods of the Association of Official Analytical Chemists (1999), NDF and ADF concentrations were measured as described by Giraldo *et al.* (2008a), and VFA and NH₃-N were analyzed as described by Carro and Miller (1999).

IV.2.2.4. Calculations and statistical analyses

Gas production data were fitted using the exponential model: $\text{gas} = A (1 - e^{-c(t-lag)})$, where A is the asymptotic gas production, c is the fractional rate of gas production, lag is the initial delay in the onset of gas production and t is the gas measurement time. The parameters A , c and lag were estimated by an iterative least squares procedure using the NLIN procedure of SAS (2012). Halftime of gas production ($T_{1/2}$; time when half of the asymptotic gas volume is produced) was calculated as $T_{1/2} = [(\ln 2 / c) + lag]$. The average fermentation rate (AFR; average gas production rate between the start of the incubation and $T_{1/2}$) was calculated as $AFR = A c / [2 (\ln 2 + c lag)]$ and OM effective

degradability (OMED) was estimated assuming a rumen particulate outflow rate (Kp) of 0.035 per h, which is characteristic of sheep fed forages at the maintenance level (Ranilla *et al.*, 1998), according to the following equation: $OMED = [(OMD_{120} - c)/(c + Kp)] e^{(-c \text{ lag})}$. In the *in vitro* fermentation trial, the amounts of VFA produced were obtained by subtracting the amount present initially in the incubation medium from that determined after 9 h of incubation.

Data were analyzed separately for each ENZ treatment. Five ENZ doses, three forages, and the interaction of ENZ dose x forage were included in the model as fixed effects, whereas incubation day was considered as a random effect. Each ENZ dose x forage interaction mean had four replicates. Non-orthogonal polynomial contrasts were used to test for linear, quadratic, and cubic effects of ENZ. The MIXED procedure of SAS (2012) was used for all statistical analyses. Significance was declared at $P < 0.05$, whereas $P > 0.5 < 0.10$ values were considered to be a trend. When a significant effect of ENZ or an ENZ x forage interaction was detected, each ENZ treatment mean was compared with the corresponding control using Dunnett's test.

IV.2.3. Results

The effects of different doses of PEN, TL1 and TL2 on *in vitro* gas production kinetics of forages are shown in Tables IV.2.3, IV.2.4 and IV.2.5, respectively. A cubic effect ($P < 0.001$) of ENZ levels was observed for most of determined gas production parameters, with the exception of A parameter for rice straw and maize stover and OMD_{120} for all forages, which were not affected ($P > 0.05$) by any ENZ treatment. Relative to the Control, all PEN doses increased ($P < 0.05$) parameter c and OMED and decreased ($P > 0.05$) $T_{1/2}$ for grass hay, but these effects were only observed with D4 for maize stover and rice straw.

Applied at D4, TL1 increased ($P < 0.05$) parameter c and OMED and decreased ($P > 0.05$) $T_{1/2}$ for all forages, but no effects ($P > 0.05$) of D1, D2 and D3 were observed with any forage (Table IV.2.4). With grass hay, TL2 at D2, D3 and D4 increased ($P < 0.05$) parameter c and decreased ($P > 0.05$) $T_{1/2}$, whereas only D3 and D4 doses were effective ($P < 0.05$) with maize stover and D4 with rice straw.

Treatment of forages with all ENZ had a cubic effect ($P < 0.001$) on NDF and ADF content (Table IV.2.6). When the effects of each ENZ were analyzed individually, there were no ENZ x forage interactions ($P = 0.147$ to 0.730).

Table IV.2.3. Effect of 24-h pre-treatment with increasing doses (D1, D2, D3 and D4) of PEN enzyme (Rovabio Excel®, Adisseo) on *in vitro* gas production kinetics of *Pennisetum purpureum* clon Cuba CT-115 hay, maize stover and rice straw in batch cultures of ruminal microorganisms (n=4)¹

<i>Substrate and PEN Dose</i> ²	A	c	AFR	T _{1/2}	OMD ₁₂₀	OMED
<i>P. purpureum</i> clon Cuba						
CON	158	0.019	2.19	36.4	57.8	22.4
D1	161	0.023*	2.67*	30.6*	57.2	24.6*
D2	161	0.023*	2.63*	30.8*	56.5	24.3*
D3	161	0.022*	2.57†	31.5*	56.0	24.1*
D4	172†	0.025*	3.10*	28.0*	56.7	25.7*
Maize stover						
CON	208	0.022	3.21	32.9	70.2	28.8
D1	207	0.023	3.47	30.8	71.7	30.0
D2	213	0.023	3.41	31.5	70.4	29.7
D3	211	0.023	3.39	31.4	68.2	28.8
D4	221	0.025*	3.91*	28.4*	68.3	30.7*
Rice Straw						
CON	166	0.020	2.44	35.1	52.1	20.7
D1	157	0.021	2.33	33.6	53.7	21.9
D2	156	0.021	2.33	33.6	53.3	21.7
D3	157	0.021	2.43	32.4†	52.6	21.9
D4	167	0.026*	3.13*	26.8*	52.8	24.5*
SEM ³	5.2	0.0008	0.153	0.99	0.93	0.52
P values						
Substrate	<0.001	0.008	<0.001	0.081	<0.001	<0.001
Substrate x enzyme	0.894	0.071	0.709	0.096	0.619	0.271
Enzyme:						
Linear effect	0.141	0.550	0.505	0.211	0.722	0.572
Quadratic effect	0.484	<0.001	0.005	<0.001	0.254	<0.001
Cubic effect	0.019	<0.001	<0.001	<0.001	0.188	0.003

* For each substrate and variable, means differ from control (P<0.05). † For each substrate and variable, means differ from control (P<0.10). ¹ A: asymptotic gas production (mL/0.4 g); c: fractional rate of fermentation (h⁻¹); AFR: average fermentation rate (mL/h); T_{1/2}: half time of gas production (h); OMED: organic matter effective degradability (%) for a fractional passage rate of 0.035 h⁻¹; OMED₁₂₀: organic matter degradability (%) after 120 h of incubation

² CON: control; D1, D2, D3 and D4 correspond to 1/200, 1/100, 1/50 and 1/10 dilutions of PEN.

³ Standard error of the mean

Table IV.2.4. Effect of 24-h pre-treatment with increasing doses (D1, D2, D3 and D4) of TL1 enzyme (Xylanase Plus Dyadic®) on *in vitro* gas production kinetics of *Pennisetum purpureum* clon Cuba CT-115 hay, maize stover and rice straw in batch cultures of ruminal microorganisms (n=4)¹

Substrate and TL1 Dose ²	A	c	AFR	T _{1/2}	OMD ₁₂₀	OMED
<i>P. purpureum</i> clon Cuba						
CON	158	0.019	2.19	36.4	57.8	22.4
D1	159	0.019	2.20	36.2	58.1	22.6
D2	161	0.019	2.27	35.9	57.2	22.5
D3	160	0.020	2.36	34.0	57.5	23.3
D4	164	0.024*	2.82*	29.4*	57.8	25.5*
Maize stover						
CON	208	0.022	3.21	32.9	70.2	28.8
D1	210	0.022	3.24	32.8	70.5	29.1
D2	210	0.022	3.25	32.6	70.7	29.2
D3	213	0.022	3.26	33.1	70.0	28.7
D4	219	0.025*	3.81*	29.1*	70.3	31.2*
Rice Straw						
CON	166	0.020	2.44	35.1	52.1	20.7
D1	167	0.020	2.44	34.2	52.4	21.2
D2	163	0.020	2.39	34.2	51.9	20.9
D3	167	0.020	2.44	34.2	52.0	21.0
D4	173	0.023*	2.81†	30.9*	52.5	22.5*
SEM ³	5.5	0.0008	0.150	1.05	1.06	0.63
P values						
Substrate	<0.001	<0.001	<0.001	0.005	<0.001	<0.001
Substrate x enzyme	0.999	0.665	0.994	0.674	0.999	0.927
Enzyme:						
Linear effect	0.812	0.234	0.187	0.183	0.897	0.202
Quadratic effect	0.649	0.086	0.169	0.057	0.772	0.075
Cubic effect	0.107	<0.001	<0.001	<0.001	0.811	<0.001

* For each substrate and variable, means differ from control (P<0.05)

† For each substrate and variable, means differ from control (P<0.10)

¹ A: asymptotic gas production (mL/0.4 g); c: fractional rate of fermentation (h⁻¹); AFR: average fermentation rate (mL/h); T_{1/2}: half time of gas production (h); OMED: organic matter effective degradability (%) for a fractional passage rate of 0.035 h⁻¹; OMED₁₂₀: organic matter degradability (%) after 120 h of incubation

² CON: control; D1, D2, D3 and D4 correspond to 1/200, 1/100, 1/50 and 1/10 dilutions of TL1.

³ Standard error of the mean

Table IV.2.5. Effect of 24-h pre-treatment with increasing doses (D1, D2, D3 and D4) of TL2 enzyme (Cellulase Plus Dyadic®) on *in vitro* gas production kinetics of *Pennisetum purpureum* clon Cuba CT-115 hay, maize stover and rice straw in batch cultures of ruminal microorganisms (n=4)¹

<i>Substrate and TL2 Dose</i> ²	A	c	AFR	T _{1/2}	OMD ₁₂₀	OMED
<i>P. purpureum</i> clon Cuba						
CON	158	0.019	2.19	36.4	57.8	22.4
D1	158	0.021 [†]	2.38	33.5*	57.6	23.5
D2	161	0.021*	2.47	33.0*	57.1	23.6
D3	152	0.022*	2.46	31.0*	55.9 [†]	23.9 [†]
D4	160	0.028*	3.23*	24.7*	57.1	27.6*
Maize stover						
CON	208	0.022	3.21	32.9	70.2	28.8
D1	209	0.022	3.26	32.4	70.5	29.3
D2	207	0.022	3.26	32.0	69.1	29.0
D3	205	0.024 [†]	3.50	29.7*	70.1	30.7*
D4	211	0.027*	4.10*	26.1*	69.5	32.7*
Rice Straw						
CON	166	0.020	2.44	35.1	52.1	20.7
D1	163	0.020	2.35	34.9	53.9 [†]	21.5
D2	156	0.022 [†]	2.44	32.1*	54.7*	22.9*
D3	160	0.023*	2.62	30.4*	52.9	22.8*
D4	168	0.028*	3.43*	24.6*	55.3*	26.8*
SEM ³	5.1	0.007	0.124	0.88	0.71	0.56
P values						
Substrate	<0.001	0.029	<0.001	0.125	<0.001	<0.001
Substrate x enzyme	0.964	0.075	0.918	0.201	0.094	0.403
Enzyme:						
Linear effect	0.167	0.313	0.065	0.854	0.601	0.532
Quadratic effect	0.594	0.001	0.007	<0.001	0.099	<0.001
Cubic effect	0.903	<0.001	<0.001	<0.001	0.747	<0.001

* For each substrate and variable, means differ from control (P<0.05)

† For each substrate and variable, means differ from control (P<0.10)

¹ A: asymptotic gas production (mL/0.4 g); c: fractional rate of fermentation (h⁻¹); AFR: average fermentation rate (mL/h); T_{1/2}: half time of gas production (h); OMED: organic matter effective degradability (%) for a fractional passage rate of 0.035 h⁻¹; OMED₁₂₀: organic matter degradability (%) after 120 h of incubation

² CON: control; D1, D2, D3 and D4 correspond to 1/200, 1/100, 1/50 and 1/10 dilutions of **TL2**.

³ Standard error of the mean

However, there were differences between ENZ when they were applied to the same forage. For grass hay, TL1 was the most effective, as all tested doses decreased ($P < 0.05$) NDF and ADF content, and only D4 dose of PEN and TL2 reduced ($P < 0.05$) ADF content. For rice straw, all doses of TL2 decreased ($P < 0.05$) NDF and ADF content, but only D3 and D4 doses of PEN and TL1 had similar effects. All doses of TL1 decreased ($P < 0.05$) NDF content of maize stover, but no effects ($P = 0.05$) of D1 were observed for PEN and TL2.

Tables IV.2.7, IV.2.8 and IV.2.9 show the effects of PEN, TL1 and TL2 on *in vitro* fermentation parameters of forages, respectively. There were no effects of ENZ ($P > 0.05$) on final pH and the results are not shown. For all tested ENZ, a cubic effect ($P < 0.001$) of ENZ dose was observed for gas production, DMD, total VFA production, molar proportions of acetate, propionate and butyrate, and acetate:propionate (Ac:Pr) ratio. Whereas no ENZ x forage interactions ($P > 0.05$) for $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations, DMD and VFA production were detected with PEN and TL2, ENZ x forage interactions were observed for VFA production ($P < 0.001$) with TL1. The lower dose of TL1 (D1) increased VFA production by 25, 67 and 30% for grass hay, maize stover and rice straw, respectively, and the higher dose (D4) increased VFA production by 91, 237 and 284% for the same forages. Significant ENZ x forage interactions ($P = 0.40$ to < 0.001) were also detected in molar proportions of acetate and propionate and Ac:Pr ratio with all tested ENZ.

Treatment of rice straw with PEN did not affect ($P > 0.05$) either proportions of acetate and propionate or Ac:Pr ratio only, but PEN at D4 decreased ($P < 0.05$) acetate proportion and Ac:Pr ratio and increased ($P < 0.05$) propionate proportion for maize stover. The TL1 treatment decreased ($P < 0.05$) acetate proportion and Ac:Pr ratio and increased ($P < 0.05$) propionate proportion for grass hay at D3 and D4 doses and for maize stover at all tested doses, but its effects for rice straw varied with the dose. Whereas treatment of rice straw with TL1 at D1, D2 and D3 increased ($P < 0.05$) acetate proportion and Ac:Pr ratio and decreased ($P < 0.05$) propionate proportion, D4 dose resulted in decreased ($P < 0.05$) acetate proportion and Ac:Pr ratio and increased ($P < 0.05$) proportion of propionate. Similar results were observed for TL2, as D4 dose decreased ($P < 0.05$) acetate proportion and Ac:Pr ratio and increased ($P < 0.05$) propionate proportion for all forages (a trend for rice straw), whereas applied at rice straw at D1, D2 and D3 doses increased ($P < 0.05$) acetate proportion and Ac:Pr ratio and decreased ($P < 0.05$) propionate proportion.

Table IV.2.6. Effect of 24-h pre-treatment with increasing doses (D1, D2, D3 and D4) of commercial enzymes (PEN, TL1 and TL2) on neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF) content (g/kg dry matter) of *Pennisetum purpureum* clon Cuba CT-115 hay, maize stover and rice straw (n=4)¹

	<i>P.purpureum</i> clon Cuba CT-115 hay					Maize Stover					Rice Straw					SEM ³	<i>P Values</i> ²				
	CON	D1	D2	D3	D4	CON	D1	D2	D3	D4	CON	D1	D2	D3	D4		SUB	SUB x ENZ	L	Q	C
PEN																					
NDF	699	682*	685†	679*	671*	856	850	837*	840*	815*	729	725	723	705*	705*	5.6	<0.001	0.298	0.073	0.034	<0.001
ADF	380	381	378	371†	368*	456	456	453	455	444*	465	460	458	445*	439*	4.5	<0.001	0.546	0.562	0.496	<0.001
TL1																					
NDF	699	675*	667*	674*	635*	856	820*	812*	771*	741*	729	714	707	693*	668*	12.7	<0.001	0.268	0.076	0.011	<0.001
ADF	381	374*	367*	375*	355*	456	447	445	407*	409*	465	464	450	432*	425*	12.6	<0.001	0.730	0.380	0.520	<0.001
TL2																					
NDF	699	677*	677*	672*	662*	856	837	829*	828*	788*	729	698*	700*	680*	651*	7.8	<0.001	0.229	0.029	<0.001	<0.001
ADF	380	370	371	366	359*	456	449	450	450	426*	465	437*	442*	433*	404*	6.1	<0.001	0.147	0.259	0.003	<0.001

* For each substrate and variable, means differ from control (P<0.05)

† For each substrate and variable, means differ from control (P<0.10)

¹ CON: control; D1, D2, D3 and D4 correspond to 1/200, 1/100, 1/50 and 1/10 dilutions of commercial enzymes, respectively. See text for description of enzymes.

² SUB: substrate; ENZ: enzyme; L: linear effect of ENZ dose; Q: quadratic effect of ENZ dose; C: cubic effects of ENZ dose.

³ Standard error of the mean

Table IV.2.7. Effect of increasing doses (D1, D2, D3 and D4) of PEN enzyme (Rovabio Excel®, Adisseo) on gas production after 3, 6 and 9 h, ammonia-N concentration, dry matter degradability (DMD), total volatile fatty acid (VFA) production, molar proportions of VFA, and acetate/propionate ratio (Ac/Pr) after 9 h *in vitro* fermentation of samples (400 mg DM) of *Pennisetum purpureum* clon Cuba CT-115 hay, maize stover and rice straw in batch cultures of ruminal microorganisms (n=4)

Substrate	PEN Dose	Gas (mL)			NH ₃ -N (mg/L)	DMD (%)	VFA (μmol)	Molar Proportion (mol/100 mol) ¹				Ac:Pr (mol/mol)
		3 h	6 h	9 h				Ac	Pr	But	Others	
<i>P. purpureum</i> clon Cuba CT- 115 hay	C	21.9	31.3	37.6	203	16.2	422	72.8	20.9	4.44	1.80	3.60
	D1	22.0	31.9	37.4	204	18.4	441	72.0	21.9	4.85	1.27	3.44
	D2	22.0	32.1	38.3	204	18.6	461	70.7	22.9	5.18	1.25	3.28
	D3	21.9	32.8	39.9*	197	20.9*	468	70.1	22.7	5.63	1.56	3.23
	D4	24.3*	36.2*	45.1*	196	23.5*	611*	67.7	24.2†	6.82*	1.32	2.91*
Maize stover	C	21.6	27.3	30.9	205	6.8	230	76.4	20.0	2.35	1.25	3.93
	D1	20.5	26.8	31.3	189	8.8	288†	76.9	17.3	2.73	2.98	4.53
	D2	22.1	28.9†	34.2*	186	7.8	317*	75.6	18.5	3.27	2.57	4.23
	D3	21.4	28.9†	34.3*	178†	9.1	365*	71.9	21.7	4.81*	1.64	3.58
	D4	23.3	32.8*	40.3*	171*	13.0*	437*	60.7*	28.6*	8.93*	1.77	2.28*
Rice straw	C	18.5	25.5	28.2	183	10.4	157	70.2	21.8	2.76	5.27	3.49
	D1	16.6†	22.1*	25.6*	175	11.0	175	70.5	18.8	2.48	8.25	3.97
	D2	16.7†	22.8*	26.5*	178	12.4	177	70.0	20.0	2.87	7.12	3.85
	D3	16.7†	21.5*	25.3*	167	11.9	210	70.9	21.0	4.10	3.98	3.75
	D4	17.8	24.8	30.2	134*	14.9*	327*	69.3	20.9	7.72*	2.09	3.58
	SEM ²	0.65	0.64	0.85	10.2	1.09	23.7	2.36	1.22	0.741	1.447	0.229
	P values ³											
	SUB	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.340	0.038	0.015	<0.001	0.006
	SUB x ENZ	0.445	<0.001	0.004	0.599	0.803	0.723	0.049	0.003	0.144	0.535	0.003
	L	0.004	<0.001	0.002	0.597	0.509	0.985	0.500	0.128	0.407	0.528	0.079
	Q	0.710	0.082	0.007	0.360	0.024	0.003	0.340	0.824	0.104	0.368	0.857
	C	0.004	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.054	<0.001

* For each substrate and variable, means differ from control (P<0.05)

† For each substrate and variable, means differ from control (P<0.10)

¹ Ac: acetate; Pr: propionate; But: butyrate; Others: sum of isobutyrate, isovalerate and valerate

² Standard error of the mean. ³ SUB: substrate; ENZ: enzyme; L, Q and C: linear, quadratic and cubic effect of ENZ dose, respectively

Table IV.2.8. Effect of increasing doses (D1, D2, D3 and D4) of TL1 enzyme (Xylanase Plus Dyadic®) on gas production after 3, 6, and 9 h, ammonia-N concentration, dry matter degradability (DMD), total volatile fatty acid (VFA) production, molar proportions of VFA, and acetate/propionate ratio (Ac/Pr) after 9 h *in vitro* fermentation of samples (400 mg DM) of *Pennisetum purpureum* clon Cuba CT-115 hay, maize stover and rice straw in batch cultures of ruminal microorganisms (n=4)

Substrate	TL1 Dose	Gas (mL)			NH ₃ -N (mg/L)	DMD (%)	VFA (μmol)	Molar Proportion (mol/100 mol) ¹				
		3 h	6 h	9 h				Ac	Pr	But	Others	Ac:Pr (mol/mol)
<i>P. purpureum</i> clon Cuba CT- 115 hay	C	21.9	31.3	37.6	203	16.2	422	72.8	20.9	4.44	1.80	3.60
	D1	22.6	33.9	43.3†	190	18.5	526*	72.3	21.8	4.78	1.13	3.44
	D2	24.1	35.8*	42.2*	189	20.2*	536*	71.3	22.6*	5.04	1.07	3.26†
	D3	22.9	36.3*	40.3*	191	22.6*	590*	70.0*	23.7*	5.28†	1.06	3.06*
	D4	24.3*	41.3*	51.4*	206	23.6*	808*	65.8*	25.9*	6.17*	2.16	2.62*
Maize stover	C	21.6	27.3	30.9	205	6.8	230	76.4	20.0	2.35	1.25	3.93
	D1	22.2	30.5*	35.4*	184	13.1*	383*	71.5*	22.0*	4.65*	1.79	3.37*
	D2	24.1*	33.4*	38.9*	180	14.0*	457*	70.5*	22.9*	4.97*	1.67	3.21*
	D3	24.1*	34.5*	40.9*	176	15.3*	518*	69.2*	24.5*	5.43*	0.95	2.93*
	D4	24.3*	40.9*	50.6*	183	20.0*	774*	66.2*	25.9*	6.32*	1.53	2.62*
Rice straw	C	18.5	25.5	28.2	183	10.4	157	70.2	21.8	2.76	5.27	3.49
	D1	18.1	24.5	28.5	175	13.6†	204†	73.3*	17.7*	2.80	6.26	4.35*
	D2	18.6	25.4	29.9	159	17.6*	260*	72.7*	18.8*	4.08*	4.72	4.11*
	D3	18.9	26.6	30.6	157	16.7*	311*	72.8*	19.9*	5.22*	2.09	3.85*
	D4	21.2*	33.6*	41.1*	185	17.6*	603*	67.5*	23.8*	6.21*	2.54	2.95*
	SEM ²	0.84	1.10	1.08	11.1	1.20	16.6	0.90	0.25	0.321	0.934	0.129
	P values ³	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.389	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	SUB	0.555	0.158	0.035	0.262	0.379	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.268	<0.001
	SUB x ENZ	0.909	0.918	0.658	0.202	<0.001	0.110	0.576	0.084	<0.001	0.288	0.373
	L	0.093	<0.001	<0.001	0.304	<0.001	<0.001	0.004	0.111	<0.001	0.368	0.156
	Q	<0.001	<0.001	<0.001	0.585	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.055	<0.001
	C	<0.001	<0.001	<0.001	0.585	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.055	<0.001

* For each substrate and variable, means differ from control (P<0.05). † For each substrate and variable, means differ from control (P<0.10). ¹ Ac: acetate; Pr: propionate; But: butyrate; Others: sum of isobutyrate, isovalerate and valerate. ² Standard error of the mean. ³ SUB: substrate; ENZ: enzyme; L, Q and C: linear, quadratic and cubic effect of ENZ dose, respectively

Table IV.2.9. Effect of increasing doses (D1, D2, D3 and D4) of TL2 enzyme (Cellulase Plus Dyadic®) on gas production after 3, 6, and 9 h, ammonia-N concentration, dry matter degradability (DMD), total volatile fatty acid (VFA) production, molar proportions of VFA, and acetate/propionate ratio (Ac/Pr) after 9 h *in vitro* fermentation of samples (400 mg DM) of *Pennisetum purpureum* clon Cuba CT-115 hay, maize stover and rice straw in batch cultures of ruminal microorganisms (n=4)

Substrate	TL2 Dose	Gas (mL)			NH ₃ -N (mg/L)	DMD (%)	VFA (μmol)	Molar Proportion (mol/100 mol) ¹				
		3 h	6 h	9 h				Ac	Pr	But	Others	Ac:Pr (mol/mol)
<i>P. purpureum</i> clon Cuba CT-115 hay	C	21.9	31.3	37.6	203	16.2	422	72.8	20.9	4.44	1.80	3.60
	D1	22.3	33.7*	40.3	195	18.9	464	72.3	21.8	4.77	1.10	3.44
	D2	22.7	34.7*	41.1	191†	20.5*	512*	71.5	22.4	5.05	1.10	3.30
	D3	22.7	35.2*	42.5	190*	19.6*	571*	70.7	22.9*	5.28†	1.06	3.17
	D4	23.7†	41.4*	50.9	188*	21.9*	779*	66.9*	25.5*	6.02*	1.51	2.69*
Maize stover	C	21.6	27.3	30.9	205	6.8	230	76.4	20.0	2.35	1.25	3.93
	D1	22.3	30.1*	35.0	194	10.6*	349*	75.0	19.9	4.21*	0.93	4.00
	D2	23.7*	32.5*	37.3	194	12.4*	376*	74.0	20.5	4.79*	0.75	3.75
	D3	23.5*	32.3*	38.0	191*	12.1*	444*	71.9*	22.2*	5.15*	0.75	3.38*
	D4	25.3*	39.4*	46.9	191*	13.3*	627*	66.1*	25.8*	6.30*	1.83	2.65*
Rice straw	C	18.5	25.5	28.2	183	10.4	157	70.2	21.8	2.76	5.27	3.49
	D1	19.0	25.3	29.4	174	10.9	225*	74.8*	17.3*	3.02	4.87	4.61*
	D2	18.1	25.2	29.7	178	14.2*	219*	73.8*	19.2*	3.10	3.84	4.03*
	D3	19.2	26.1*	30.7	171	15.0*	284*	73.3*	18.9*	5.08*	2.76	4.09*
	D4	20.5*	31.8*	38.1	180	15.6*	554*	68.2†	23.3†	5.94*	2.48	3.06*
	SEM ²	0.70	0.71	0.73	4.6	1.22	22.4	1.06	0.72	0.326	0.975	0.193
	P values ³	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.032	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	SUB	0.704	0.012	0.017	0.932	0.688	0.311	0.016	0.008	0.002	0.756	0.040
	SUB x ENZ	0.968	0.245	0.582	0.006	0.054	0.649	0.021	0.002	0.003	0.235	0.009
	L	0.101	<0.001	<0.001	0.247	<0.001	<0.001	0.126	0.188	0.007	0.790	0.561
	Q	<0.001	<0.001	<0.001	0.090	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.277	<0.001
	C	<0.001	<0.001	<0.001	0.090	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.277	<0.001

* For each substrate and variable, means differ from control (P<0.05). † For each substrate and variable, means differ from control (P<0.10). ¹ Ac: acetate; Pr: propionate; But: butyrate; Others: sum of isobutyrate, isovalerate and valerate. ² Standard error of the mean

³ SUB: substrate; ENZ: enzyme; L, Q and C: linear, quadratic and cubic effect of ENZ dose, respectively

IV.2.4. Discussion

The gas production technique was chosen for this study because it is a simple screening tool to evaluate substrate degradation, and therefore it has been proposed as a powerful screening tool for selecting ENZ additives that improve forage utilization (Beauchemin and Holtshausen, 2010). The lack of effect of TL1 and TL2 on asymptotic gas production and OMD₁₂₀ supports the previous idea that some enzymes increase the rate rather than the extent of feed degradation in the rumen (Beauchemin *et al.*, 2003). In contrast, other studies (Giraldo *et al.* 2008ab; Kruger *et al.* 2008ab) have reported that enzymes can also increase the extent of digestion. In our study, some ENZ treatments increased AFR and OMED and decreased T_{1/2}, thus indicating a stimulation of forage fermentation which resulted in increased OM digestion. All ENZ were effective at D4, but the efficacy of D1, D2 and D3 was highly variable depending on the ENZ and the forage tested, supporting observations from previous studies (Giraldo *et al.*, 2008b; Krueger *et al.*, 2008; Ranilla *et al.*, 2008). Thus, all doses of PEN were effective with grass hay, but only D4 had a positive effect with maize stover and rice straw. Similarly, TL2 was effective at all doses for grass hay, but only at D3 and D4 for maize stover and at D2, D3 and D4 for a rice straw. In contrast, **TL1** was only effective at D4 with all forages. These results indicate the importance of testing fibrolytic ENZ on different feeds.

Based on the positive results observed in the gas production trial, we decided to analyze the effects of ENZ treatments on forage composition and ruminal fermentation. The efficacy of fibrolytic ENZ to reduce NDF or ADF content of forages and forage-based diets has been shown in previous research (Giraldo *et al.*, 2007ab, 2008a; Dean *et al.*, 2008; Krueger *et al.*, 2008). In our study, highly significant ENZ x forage interactions were observed for the three tested ENZ, indicating that effectiveness of each ENZ varied with the forage to which it was applied. The positive effects of ENZ on fibre composition of forages were, in general, correlated with their effects on ruminal fermentation, but some results indicate that the reduction of fibre content alone cannot explain the ENZ effects. Whereas only D3 and D4 doses of TL1 decreased ADF content of maize stover and rice straw, all tested doses increased or tended to increase DMD and VFA production and modified molar proportions of the main VFA with both forages. Similarly, NDF and ADF content of rice straw was decreased by all doses of TL2, but only by TL1 at D3 and D4; nevertheless, effects of both

ENZ on rice straw fermentation were rather similar. These results indicate that other mechanisms of action of ENZ than direct effects on cell wall are probably involved in the observed response.

Previous research (Wang *et al.*, 2001; Giraldo *et al.*, 2007ab) showed clearly that treatment of forage or forage-based diets with fibrolytic ENZ stimulated the initial phases of microbial colonization in the rumen, and this is recognized as one mode of action of ENZ products (Beauchemin and Holtshausen, 2010). Because some studies (Nsereko *et al.*, 2000; Giraldo *et al.*, 2008ab; Ranilla *et al.*, 2008) have shown that the effects of enzymes became less marked as incubation time progressed, we decided to conduct 9 h-incubations to assess the effects of ENZ shortly after incubation. Low-quality forages are usually characterized by low intakes, as their slow digestion rates result in long retention times of digesta in the rumen. These problems can be overcome by applying treatments such as enzymes that stimulate the initial phases of forage degradation and thus increase rumen turnover of digesta and forage intake (Leng, 1990). The increased gas production observed at 6 and 9 h of incubation for some ENZ treatments indicates a stimulation of fermentation, as gas production is closely correlated with the amount of organic matter fermented. The stimulation of fermentation was also reflected in the augmented VFA production, which was specially marked for D4 of all ENZ, as it was increased by 1.8, 3.0 and 2.7 times (means across forages) by PEN, TL1 and TL2, respectively. Lower doses of TL1 and TL2 were also effective, as D1 increased VFA production by 1.7 and 1.1 for TL1 and TL2, respectively; D2 by 1.6 and 1.4, and D3 by 1.9 and 1.7 (means across forages). Additionally, a shift in VFA profile was observed for some doses of ENZ, although the effects varied with the forage incubated. For grass hay and maize stover, TL1 and TL2 increased propionate proportions and decreased Ac:Pr ratio. Similar changes have been reported by others (Yang *et al.*, 2002; Krueger and Adesogan, 2008), indicating that fibrolytic ENZ can make the fermentation more gluconeogenic, and hence improve the energetic efficiency of the fermentation (Krueger and Adesogan, 2008). In contrast, for rice straw TL1 and TL2 at D1, D2 and D3 decreased propionate proportions and increased Ac:Pr ratio, but at D4 both ENZ increased propionate proportions and decreased Ac:Pr ratio. This illustrates the variable effects of ENZ on the same substrate when applied at different doses. High doses of ENZ have been reported to reduce forage fermentation (Beauchemin *et al.*, 2003), but in our study this was not detected as indicated by VFA production and DMD values.

In this study we decide to use the same dilutions of all ENZ, which resulted in similar amounts of ENZ activity applied to forages for the three tested products. Nevertheless, TL1 and TL2 were more effective at stimulating ruminal fermentation compared with PEN. It should be noted that that ENZ activities were measured on pure substrates that do not represent the complexity of plant cell wall, and that these assays were based on the initial rate of reaction with the substrate, which is not related to overall enzyme persistency (Beauchemin *et al.*, 2003). Moreover, it is possible that some of the tested products had additional ENZ activities, such as esterases or proteases, which were not analyzed for in our study, thus contributing to stimulate *in vitro* rumen fermentation.

IV.2.5. Conclusions

The results of this research show that treatment of low-quality forages with commercial ENZ reduced their fiber contents and improved their ruminal degradation at short-incubation times, as indicated by the increased VFA production and forage degradability. The reduction of fibre content of forages by ENZ treatment did not fully explain the positive effects of ENZ on ruminal fermentation indicating that other mechanisms of action are involved. The ENZ dose necessary to achieve a positive effect varied with the commercial product and the tested forage, which underlines the importance of testing ENZ products with a range of forages before using them in practical feeding.

IV.2.6. Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the financial support received from the MICINN (Project AGL2008-04707-C02-02), MAE-AECID (Project A/4951/06) and IAEA (Technical Contract No. 16300). A. Díaz and C. Saro gratefully acknowledge receipt of grants from the AECID and Spanish M.E.C. (AP2006-03049), respectively.

IV.2.7. References

Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1999. Official Methods of Analysis, 16th Edition, 5th revision. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

- Beauchemin K.A., Colombatto D., Morgavi D.P., Yang W.Z., 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81, E37–E47.
- Beauchemin K.A., Holtshausen L., 2010. Developments in enzyme usage in ruminants. In: M.R. Bedford, G.G. Partridge (Editors). *Enzymes in Farm Animal Nutrition* (2nd edition). CABI, Oxford, United Kingdom, pp. 206-230.
- Carro M.D., Miller E.L., 1999. Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an *in vitro* semicontinuous culture system (RUSITEC). *Br. J. Nutr.* 82, 149-157.
- Carro M.D., Ranilla M.J., Tejido M.L., 2005. Using the *in vitro* gas production technique to test feed additives: effects of correcting values for different blanks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123, 173-184.
- Dean D.B., Adesogan A.T., Krueger N.A., Littell R.C., 2008. Effects of treatment with ammonia or fibrolytic enzymes on chemical composition and ruminal degradability of hays produced from tropical grasses. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 68–83.
- Eun, J.S., Beauchemin K.A., 2007. Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using *in vitro* fermentation characteristics. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132, 298-315.
- Giraldo L.A., Ranilla M.J., Tejido M.L., Carro M.D., 2007a. Influence of exogenous fibrolytic enzyme and fumarate on methane production, microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters. *Br. J. Nutr.* 98, 753-761.
- Giraldo L.A., Tejido M.L., Ranilla M.J., Carro M.D., 2007b. Effects of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in Rusitec fermenters. *J. Anim. Sci.* 85, 1962-1970.
- Giraldo L.A., Tejido M.L., Ranilla M.J., Ramos S., Carro M.D., 2008a. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay based diet. *J. Anim. Sci.* 86, 1617-1623.
- Giraldo L.A., Tejido M.L., Ranilla M.J., Carro M.D., 2008b. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratios. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141, 306-325.
- Goering M.K., Van Soest P.J., 1970. Forage Fiber Analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agricultural Handbook*, n° 379. Agricultural Research Services, USDA. Washington DC.

- Krueger N.A., Adesogan A.T., 2008. Effects of different mixtures of fibrolytic enzymes on digestion and fermentation of bahiagrass hay. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 84-94.
- Krueger N.A., Adesogan A.T., Staples C.R., Krueger W.K., Deana D.B., Littell R.C., 2008. The potential to increase digestibility of tropical grasses with a fungal, ferulic acid esterase enzyme preparation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 95-108.
- Leng R.A., 1990. Factors affecting the utilization of 'poor quality' forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutr. Res. Rev.* 3, 277-303.
- McAllister T.A., Hristov A.N., Beauchemin K.A., Rode L.M., Cheng K.J., 2000. Enzymes in ruminant diets. In: M.R. Bedford, G.C. Partridge (Editors). *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. CABI, Oxford, United Kingdom, pp. 273-298.
- NRC (National Research Council). Committee on the Nutrient Requirements of Small Ruminants. 2007. *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids*. The National Academies Press, Washington DC, USA.
- Nsereko V.L., Morgavi D.P., Rode L.M., Beauchemin K.A., McAllister T.A., 2000. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 88, 153-170.
- Ranilla M.J., López S., Giráldez F.J., Valdés C., Carro M.D., 1998. Comparative digestibility and digesta flow kinetics in two breeds of sheep. *Anim. Sci.* 66, 389-396.
- Ranilla M.J., Tejido M.L., Giraldo L.A., Tricçarico J.M., Carro M.D., 2008. Effects of an exogenous fibrolytic enzyme preparation on *in vitro* ruminal fermentation of three forages and their isolated cell walls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 109-121.
- SAS Institute Inc, 2012. *SAS/STAT® 12.2 User's guide*. SAS Inst Inc, Cary, NC, USA.

- Wang Y., McAllister T.A., Rode L.M., Beauchemin K.A., Morgavi D.P., Nsereko V.L., Iwaasa A.D., Yang W., 2001. Effects of an exogenous enzyme preparation on microbial protein synthesis, enzyme activity and attachment to feed in the Rumen Simulation Technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 85, 325-332.
- Yang W.Z., Beauchemin K.A., Vedres D.D., 2002. Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and fermentation in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 102, 137-15.

IV.3- Prueba 3: Effects of a yeast enzymatic hydrolyzate on *in vitro* ruminal fermentation

Effects of a yeast enzymatic hydrolyzate on *in vitro* ruminal fermentation

**A. Díaz^{1,2}, C. Saro^{2,3}, M.L. Tejido^{2,3}, A. Sosa^{1,4}, M.E. Martínez², J. Galindo⁴,
M.D. Carro^{2,3} and M.J. Ranilla^{2,3}**

¹Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”, Matanzas, Cuba

²Departamento de Producción Animal. Universidad de León, 24071 León, Spain

*³Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n. 24346
Grulleros, León, Spain*

*⁴Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, La
Habana, Cuba*

Publicado en: Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens;
n. 99. 2011. pages 181-186.

Abstract.

The incessant search of new feed additives for ruminants is one of the main objectives of nutritionists. In this sense a great number of compounds that act at ruminal level and improve forage utilization, have been studied. The objective of this study was to determine the effect of a yeast enzymatic hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* and its different fractions on ruminal fermentation under *in vitro* conditions. Forage of *Pennisetum purpureum* vc Cuba CT-115 was used as substrate for *in vitro* incubations. Four doses (0, 50, 100 and 200 μ L/50 mL incubation medium) of total hydrolyzate and two fractions of it (supernatant and gross pellet) were investigated. In all cases, best results were obtained with the higher dose (200 μ L). With all fractions, this dose increased ($P < 0.05$) total volatile fatty acids and propionate production. Also an increase on butyrate production was observed with supernatant fraction and total hydrolyzate ($P < 0.05$). Isoacids production was increased ($P < 0.05$) only with the supernatant fraction. Gas production was stimulated ($P < 0.05$) by the dose 200 μ L of the pellet fraction and by the doses 50 and 200 μ L of total hydrolyzate. The supernatant fraction did not affect ($P < 0.05$) the gas production. Ammonia-N concentration increased ($P < 0.05$) with 200 μ L of supernatant fraction and total hydrolyzate. Final pH decreased ($P < 0.05$) with doses 100 and 200 μ L of all fractions. Dry matter disappearance, neutral detergent fibre disappearance and true dry matter degradability were not affected ($P < 0.05$) by any fraction or dose. We conclude that the use of this enzymatic hydrolyzate and their different fractions are able to stimulate the *in vitro* ruminal fermentation of *Pennisetum purpureum* vc Cuba CT-115.

Key words: feed additives, *Saccharomyces cerevisiae*, forage diet

Effets d'un hydrolysat de levure sur la fermentation ruminale in vitro**Résumé:**

*La recherche incessante de nouveaux additifs pour l'alimentation des ruminants est l'un des objectifs principaux des nutritionnistes. Dans ce sens, un grand nombre de composés qui agissent au niveau ruminal et améliorent l'utilisation de fourrage ont été étudiés. L'objectif de cette étude a été de déterminer l'effet d'un hydrolysat enzymatique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et de ses différentes fractions sur la fermentation ruminale dans des*

conditions in vitro. Le fourrage de *Pennisetum purpureum* vc Cuba CT-115 a été employé comme substrat pour des incubations *in vitro*. Quatre doses (0, 50, 100 et 200 milieu d'incubation de $\mu\text{L}/50\text{ mL}$) de l'hydrolysate total et deux fractions (pellet brut et surnageant) ont été étudiées. Dans tous les cas, les meilleurs résultats ont été obtenus avec la dose plus élevée (200 μL). Avec toutes les fractions, cette dose a augmenté ($P<0.05$) la production totale d'acides gras volatiles et de propionate. Aussi, avec la fraction surnageant et l'hydrolysate total, la production de butyrate a augmenté ($P<0.05$). La production de gaz a été stimulé ($P<0.05$) avec la dose 200 μL du pellet et avec les doses 50 and 200 μL de l'hydrolysate total. La fraction surnageant n'a pas affecté ($P<0.05$) la production totale de gaz. La concentration d'azote ammoniacal a augmenté ($P<0.05$) avec 200 μL du surnageant et d'hydrolysate total. Le pH final a diminué ($P<0.05$) avec les doses 100 and 200 μL de toutes les fractions. La disparition de MS, de la NDF et la digestibilité réelle de la MS n'ont pas été affectés ($P<0.05$) par aucune fraction ou dose. On conclut que l'usage de cet hydrolysate enzymatique and leurs fractions ont été capables de stimuler la fermentation ruminale *in vitro* de *Pennisetum purpureum* vc Cuba CT-115.

Mots-clés: additives, *Saccharomyces cerevisiae*, fourrage

IV.3.1. Introduction

Microbial feed additives for ruminants are used for different purposes, but with the final aim of enhancing productivity by modifying digestion and metabolism and leading to the improvement of milk and/or meat production. In adult animals, they are intended to increase propionate and decrease methane and lactate production and deamination by modifying rumen microbial populations (Galindo and Marrero, 2005). All these changes are intended to improve energy and nitrogen metabolism in the rumen (Carro and Ranilla 2002).

A number of strategies have been used to enhance ruminal fermentation. Biological additives have included microorganisms, enzymes and plant products (Jouany, 1994; Dean *et al.*, 2005; Busquet *et al.*; 2006 y Carro *et al.*, 2006). Direct-fed microbials offer a great potential for manipulation of ruminal fermentation and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is an especially attractive organism. The objective of this study was to determine the effect of a yeast enzymatic hydrolyzate of *S. cerevisiae* and its different fractions on ruminal

fermentation under *in vitro* conditions using batch cultures of mixed rumen micro-organisms.

IV.3.2. Materials and methods

IV.3.2.1. Substrate and additives

A tropical forage, *Pennisetum purpureum* cv. CT-115, was used as substrate for the batch incubations. Samples were ground at 1 mm particle size. The substrate contained 86.55% organic matter, 5.01% crude protein, 71.16% neutral detergent fibre (aNDF), 38.96% acid detergent fibre (aADF) and 5.42% lignin.

Four fractions of a *S. cerevisiae* hydrolyzate were investigated: total hydrolyzate, supernatant, gross pellet and washed pellet. To obtain the last three fractions the quantity corresponding to each dose it centrifuged at 19000 x g, during 15 minutes at 4°C. The treatments consisted of four doses of each fraction: 0, 50, 100 and 200 µL/50 mL incubation medium.

IV.3.2.2. *In vitro* fermentation of substrates

Rumen fluid was obtained from 4 rumen-cannulated merino sheep fed a 70:30 alfalfa hay:concentrate diet, distributed in two equal portions at 09:00 and 18:00 h. Sheep were managed according to protocols approved by the León University Institutional Animal Care and Use Committee. Rumen contents were obtained immediately before the morning feeding from each sheep, mixed and strained through 2 layers of cheesecloth into stoppered flasks and transported to the laboratory within 30 min. Particle-free fluid was filtered through nylon bag of 100µm pore size and mixed with the buffer solution of Goering and Van Soest (1970; no trypticase added) in a proportion 1:4 (vol/vol) at 39°C under continuous flushing with CO₂. Fifty mL of buffered rumen fluid were added into each bottle under CO₂ flushing. Bottles were sealed with rubber stoppers and aluminium caps and incubated at 39°C.

Samples of substrate (500 mg) were weighed into 120 mL serum bottles. Additives were applied inside the bottles immediately before adding buffered rumen fluid. Four identical incubation runs were carried out, each of them with the mixed rumen fluid of the four sheep. All bottles were withdrawn 24 h after

inoculation. At the end of the incubation period, total gas production was measured in each bottle using a pressure transducer and a calibrated syringe.

Bottles were uncapped, the pH was measured immediately with a pH meter, and the fermentation was stopped by swirling the bottles in ice. One milliliter of content was added to 1 mL of deproteinising solution (i.e. metaphosphoric acid (100 g/L) and crotonic acid (0.6 g/L)) for volatile fatty acid (VFA) determination and 2 mL were added to 2 mL 0.5M HCl for ammonia-N analysis. Finally, contents of the bottles were transferred to previously weighed filter crucibles.

Crucibles were dried at 50°C, weighed and the residue was analysed for aNDF to calculate true DM degradability (TDMD; Van Soest *et al.*, 1991) and aNDF degradability (aNDFD).

IV.3.2.3. Analytical procedures

Dry matter (ID 934.01), ash (ID 942.05) and N (ID 984.13) were determined according to the Association of Official Analytical Chemists (1999). Fibre analyses were carried out according to Van Soest *et al.* (1991) using an ANKOM220 Fibre Analyzer unit (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, USA). Concentrations of VFA and ammonia-N in rumen fluid were determined as described by Carro and Miller (1999).

IV.3.2.4. Calculations and statistical analyses

Data were analyzed using the PROC MIXED procedure of SAS (2002). Four concentrations of additive (i.e. 0, 0.5, 5, 10 mg/L) and the interaction of additive x fraction were included in the model as a fixed effect, whereas incubation day was considered as a random effect. Significance was declared at $P < 0.05$, whereas $P < 0.10$ values were considered to be a trend. Within each additive treatment and inoculum, there were 4 values for each of the measured variables.

IV.3.3. Results and discussion

The effects of the hydrolyzate and its different fractions on gas production parameters are shown in Table IV.3.1. The only parameter affected by fraction

was gas production ($P < 0.001$), and therefore, only significance P values are shown in the Table. Adding the hydrolyzate and its fractions to the *in vitro* cultures linearly increased ($P = 0.001$) gas production, suggesting a improved substrate fermentation compared to the control.

Final pH decreased linearly ($P = 0.001$) as concentrations of additives increased, whereas $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations linearly increased ($P = 0.049$) for the three fractions studied. Sttater and Slyter (1974) reported that the concentration at which ammonia nitrogen became limiting for a rumen microbial population continuously cultured in an artificial rumen and maintained in steady state condition was 50 mg NH_3/L of ruminal fluid. In this sense, our data are all above this value, and also above the recommendations suggested by Leng (1991), who proposed a minimum value of 200 mg N- NH_3/L . Although the substrate incubated had a very low protein content (about 5%), the *in vitro* culture media includes N, and therefore, it could have balanced the shortage of N by providing non-protein N (Álvarez *et al.*, 1976; Boniface *et al.*, 1986; Valdés and Castillo, 1993) and the available ammonia to the microbial populations (Silva *et al.*, 1989; Leng, 1990). Also, the N supplied by the hydrolyzate and its fractions has probably, compensated the protein deficiency of substrate, stimulating its fermentation by this mechanism.

There was no significant effect ($P < 0.05$) of the different hydrolyzate fractions on VFA production, whereas VFA production increased linearly ($P < 0.05$) as doses of additives increased (15%, 16% and 19% for 200 μL dose compared to the control, for gross pellet, supernatant and total hydrolyzate, respectively). Production of acetate, propionate and butyrate also increased ($P < 0.05$) linearly with increasing doses of gross pellet, supernatant and total hydrolyzate, but there was no effect ($P > 0.05$) on others VFA production (calculated as the sum of isobutyrate, isovalerate and valerate). Adding the hydrolyzate and its fractions did not affect ($P > 0.05$) the acetate:propionate ratio, which was probably related to the proporcional increase in the production both acids.

The effects of *S. cerevisiae* on *in vitro* VFA productions reported in the literature are variable (Lila *et al.*, 2004). Chademana y Offer (1990) found modifications in total VFA and their proportions, whereas Newbold (1990) described an increase in propionate proportion at expenses of acetate and Mutsvangwa *et al.* (1992) found also increases in the production of total VFA and the proportion of acetate. Furthermore, Miller-Webster *et al.* (2002), in

studies conducted with *S. cerevisiae* in continuous cultures, observed increases in the concentration of total VFA. In any case, the increase in VFA production found in our study confirms the stimulation of in vitro ruminal fermentation of the substrate *P. purpureum* in the presence of the yeast hydrolyzate, the gross pellet and the supernatant, according to the increased gas production previously reported. The extent of stimulation seems to be dose-dependent, and, with the doses used, no negative effects on fermentation were detected.

Table IV.3.1. Effect of three fractions of a yeast hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* and doses on *in vitro* ruminal fermentation of *Pennisetum purpureum* vc Cuba CT-115

	Control	Gross pellet (µL)			Supernatant (µL)			Total hydrolyzate (µL)			Dose	
		50	100	200	50	100	200	50	100	200	Linear	SEM
Gas (mL)	25.1	25.7	24.6	24.6	26.3	26.6	27.7	28.1	27.4	27.9	0.001	0.59
pH	6.93	6.90	6.88	6.88	6.86	6.88	6.84	6.89	6.84	6.85	0.001	0.020
NH ₃ -N (mg/L)	313	317	315	320	317	315	326	317	321	329	0.049	3.9
VFA (µmol)												
Acetate	921	977	932	1005	957	970	993	960	939	1040	0.026	32.9
Propionate	329	350	357	388	336	361	378	361	347	380	0.043	16.2
Butyrate	145	165	172	189	153	188	211	179	174	208	0.039	15.4
Others ¹	76	87	91	103	76	95	109	97	90	104	0.102	10.5
Total VFA	1471	1581	1553	1689	1523	1617	1693	1599	1550	1736	0.002	48.5
A:P ² (mol:mol)	2.81	2.80	2.67	2.63	2.88	2.69	2.63	2.67	2.72	2.77	0.810	0.151

¹Calculated as the sum of isobutyrate, isovalerate and valerate; ²Acetate:propionate. SEM: standard error of the mean

Table IV.3.2. Effect of three fractions of a yeast hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* and doses on *in vitro* degradability of *Pennisetum purpureum* vc Cuba CT-115¹

	Control	Gross pellet (µL)			Supernatant (µL)			Total hydrolyzate (µL)			Dose	
		50	100	200	50	100	200	50	100	200	Linear	SEM
TDMD (%)	34.72	35.45	35.34	35.48	34.81	35.08	35.08	34.29	34.29	34.99	0.693	0.041
aNDFD (%)	8.27	9.30	9.13	9.33	8.39	8.77	8.77	7.66	7.65	8.64	0.691	0.070

¹ DM degradability (TDMD; Van Soest *et al.*, 1991) and aNDF degradability (aNDFD).

The effects of the hydrolyzate and its different fractions on *in vitro* degradability of *P. purpureum* are given in Table IV.3.2. There was no significant effect ($P>0.05$) of any dose of the additives on TDMD or aNDFD. It is remarkable the low DM digestibility values after 24 h incubation with buffered rumen fluid (mean 34.95%), which is in agreement with the low quality of the substrate, as reflected by its chemical composition (NDF above 71% and CP below 5%). Also, aNDF disappearance values are very low (mean 8.6%). Nevertheless, the increase in VFA production with the different hydrolyzate doses used suggest a stimulation of fermentation that has not been reflected in digestibility. It is possible that the gravimetric method used to estimate digestibility lacks sensitivity to detect real differences between treatments and doses with such a low quality substrate and that were expected from the information provided by VFA production. Several authors have reported beneficial effects of live yeast on ruminant nutrition and its influence in degradability. For example, Roa *et al.* (1997) found increases in DM and aNDF digestibility when yeast were added to very low quality forages. Marrero (2005) reported an increase in *in vitro* DM digestibility by including a yeasts treatment to the forage *Cynodon nlemfuensis*. Previous studies with the same hydrolyzate and its fractions (Díaz, 2008, unpublished data) found an increase in the viable populations of total and cellulolytic bacteria, which could positively influence DM degradability and VFA production.

IV.3.4. Conclusions

The yeast hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* used in this study was able to stimulate the *in vitro* ruminal fermentation of *Pennisetum purpureum* cv. Cuba CT-115. There were no significant differences between the effects observed with the total hydrolyzate, the pellet obtained by centrifugation and the supernatant, but, because its chemical composition and easy handling, the total hydrolyzate is the recommended one.

IV.3.5. Acknowledgements

Financial support from the MAE-AECID (Project PCI-Iberoamérica A/4951/06) and the scholarships from the MAE-AECID.

IV.3.6. References

- A.O.A.C. 1999. Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis, 1141 pp. 16thed. Association of Analytical Chemists, Washington, D.C.
- Álvarez, F. J.; Wilson, A.; Sutherland, T. M. & Preston, T. R. 1976. Studies in urea utilization in sugar cane diets: Effect of different methods of incorporating urea in the ratio. *Tropical Animal Production* 1: 186- 192.
- Boniface, A. M.; Murray, R. M. & Hogan, J. P. 1986. Optimum level of ammonia in the rumen liquor of cattle fed tropical pasture hay. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production* 16: 151- 154.
- Busquet, M.; Calsamiglia, S.; Ferret, A. & C. Kamel. 2006. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 89:761-771.
- Carro, M. D. & Ranilla, M. J. 2002. Los aditivos antibióticos promotores del crecimiento de los animales: Situación actual y posibles alternativas. *Nutrición. Albéitar* 56: 46-49.
- Carro, M. D. & Miller, E. L. 1999. Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an in vitro semicontinuous culture system (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 82: 149-157.
- Carro, M. D.; Ranilla, M. J.; Giráldez, F. J. & Mantecón, A. R. 2006. Effects of malate on diet digestibility, microbial protein synthesis, plasma metabolites, and performance of growing lambs fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 84:405-410.
- Chademana, I. & Offer, N. W. 1990. The effect of dietary inclusion of yeast culture on digestion in the sheep. *Anim. Prod.*; 50: 483-489.
- Dean, D. B.; Adesogan, A. T.; Krueger, N. & R. Littell, C. 2005. Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, aerobic stability, and digestibility of bermudagrass silage. *J. Dairy Sci.* 88:994-1003.
- Díaz Reyes, A. 2008. Efecto de un hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación ruminal in vitro de dietas fibrosas. Tesis presentada en opción al Título Académico de Master en Producción Animal para la zona tropical. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba.

- Galindo Blanco, J. & Marrero, Y. 2005. Modificación de la fermentación microbiana ruminal. *Rev. Cubana. Ciencias Agrícolas.* 39.:439-450.
- Goering, H. K. & Van Soest, P. J. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agriculture Handbook no. 379.* Agriculture Research Service, United States Department of Agriculture. Washington, DC, USA.
- Jouany, J. P. 1994. Methods of manipulating the microbial metabolism in the rumen. *Ann Zootech.* 43:49-62.
- Leng, R. A. 1990. Factors affecting the utilization of "poor quality" forages by ruminant animals particularly under tropical conditions. *Nutritional Research Reviews* 3: 277- 303.
- Leng, R. A. 1991. Application of biotechnology to nutrition of animals in developing countries. *FAO Animal Production and Health paper 90.* Roma, Italia: 146pp.
- Lila, Z.A.; Mohammed, N.; Yasui, T.; Kurokawa, Y.; Kanda, S. & Itabashi, H. 2004. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* twin of live cells on mixed ruminal microorganism fermentation in vitro. *J. Dairy Sci.* 82, 1847-1854.
- Marrero Rodríguez, Y. 2005. Las levaduras como mejoradoras de la fermentación ruminal de dietas con alto contenido de fibra. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba.
- Miller-Webster, T.; Hoover, W.; Holt, M. & Nocek, J.E. 2002. Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. *J.Dairy Sci.* 85, 2009-2014.
- Mutsvangwa, T.; Edwards, I.E.; Topps, J.H. & Paterson, G.F.M. 1992. The effect of dietary inclusion of yeast culture (Yea-Sacc) on patterns of rumen fermentation, food intake and growth of intensively fed bulls. *Anim. Prod.* 55, 35-41.
- Newbold, C.J. 1990. Probiotics as feed additives in ruminant diets. 51st Minnesota Nutrition Conference. p 102-118.
- Roa, M. L.; Bárcena-Gama, J. R.; González, M. S.; Mendoza, G. M.; Ortega, M. E. & García, C. B. 1997. Effect of fiber source and yeast culture (Sc1026)

on digestion and the environment in the rumen of cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.*; 64: 327-336.

Silva, A. T.; Greenhalgh, J. F. D. & Orskov, E. R. 1989. Influence of ammonia treatments and supplementation on the intake, digestibility and weight gain of sheep and cattle on barley straw diets. *Anim. Production* 48: 99- 108.

Sttater, L. D. & Slyter, L. L. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein in vitro. *Br. J. Nutr.* 32: 199-208.

Valdés, G. & Castillo, F. 1993. Sistema de manejo de machos bovinos en pastoreo I. suplementación con miel y un alto nivel de urea. *Rev. Cubana Ciencias Agrícolas.* 27: 160 – 163.

Van Soest, P. J.; Robertson, J. B. & Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*,74(10), 3583-3597.

IV.4- Prueba 4: Influence of a yeast hydrolyzate on in vitro rumen fermentation and bacterial diversity in batch cultures and Rusitec fermenters

Influence of a yeast hydrolyzate on *in vitro* rumen fermentation and bacterial diversity in batch cultures and Rusitec fermenters

A. Díaz^a, M.J. Ranilla^{ab}, C. Saro^a, M.L. Tejido^a, M. Pérez-Quintana^c, and M.D. Carro^{d1}

^a *Departamento de Producción Animal, Universidad de León, León, Spain*

^b *Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), León, Spain*

^c *Departamento de Ciencias de la Tierra, Universidad Estatal Amazónica, Puyo-Pastaza, Ecuador*

^d *Departamento de Producción Agraria, ETSI Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain.*

Enviado: Animal Feed Science and Technology (En evaluación)

¹ Abbreviations: **ADFom**, acid detergent fiber expressed exclusive of residual ash; **CP**, crude protein; **aNDFom**, neutral detergent fiber with heat-stable amylase and expressed exclusive of residual ash; **OM**, organic matter; **AFOM**, apparently fermented OM; **VFA**, volatile fatty acids; **YH**: yeast hydrolyzate
Corresponding author: M.D. Carro. Phone: +34 91 452 16 46, FAX: + 34 91 549 97 63.
E-mail address: mariadolores.carro@upm.es

Abstract

The influence of a yeast hydrolyzate (YH) from *Saccharomyces cerevisiae*, obtained after ethanol production from sugarcane, on *in vitro* rumen fermentation was investigated using both batch cultures and Rusitec fermenters inoculated with ruminal fluid from sheep. Batch cultures (300 mg dry matter (DM)) with two mixed diets (MC, 0.5:0.5 alfalfa hay:concentrate; HC, 0.15:0.85 barley straw:concentrate) as substrate were supplemented with increasing doses of YH (0, 3.3, 6.7, 10.0 and 13.3 mL/L) and incubated for 16.5 hours at 39°C. Supplementation of increasing amounts of YH to MC-cultures increased ($P < 0.05$) linearly total volatile fatty acid (VFA) production and butyrate molar proportion, and decreased ($P < 0.001$) acetate proportion and acetate/propionate ratio. In contrast, only subtle effects of YH on $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations and molar proportions of isovalerate and caproate were observed for the HC diet. Longer-term effects of YH supplementation on rumen fermentation of MC diet were investigated using four Rusitec fermenters in a cross-over experimental design with two 14-day incubation periods. Fermenters were given daily 30 g of diet DM, and in each period half of them were supplemented daily with 5 mL of YH (10.0 mL/L). Supplementing with YH did not affect ($P > 0.05$) total VFA production, lactate concentrations, DM and aNDFom disappearance or enzymatic activities (amylase, xylanase and carboxymethylcellulase). Compared with the unsupplemented fermenters, YH treatment increased ($P < 0.001$) $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations and molar proportions of propionate and butyrate at the expense of acetate, and decreased ($P < 0.001$) acetate/propionate ratio. In addition, YH supplementation tended ($P < 0.07$) to reduce $\text{CH}_4/\text{total VFA}$ ratio and to increase microbial growth in the liquid phase of the fermenters. The automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) of samples taken on days 3, 8 and 14 of incubation from solid and liquid content of fermenters revealed that YH supplementation increased ($P < 0.02$) bacterial diversity in the liquid phase and tended to increase ($P < 0.08$) it in the solid phase. The results indicate that YH may be a useful dietary additive for ruminants, because it promoted a shift in fermentation toward propionate production, reduced the $\text{CH}_4/\text{total VFA}$ ratio and increased microbial growth.

Key words: yeasts hydrolyzate, Rusitec, batch cultures, rumen fermentation, ARISA.

IV.4.1. Introduction

The identification of substances that modify rumen fermentation to increase its efficiency and decrease the polluting emissions to the environment is a key objective of ruminant nutrition research. Live yeast cultures from *Saccharomyces cerevisiae* have been shown to modify ruminal fermentation parameters and to have beneficial effects on ruminant performance, but such effects can be influenced by both the yeast culture and the diet, among other factors (Carro et al., 1992; Chaucheyras-Durand et al., 2012). Most of the studies on yeast as feed additives have been conducted with live yeast cultures, and the potential of yeast hydrolyzates (YH) as ruminal fermentation modifiers has received much less attention. Rossi et al. (2004) reported that the peptidic fractions of *S. cerevisiae* stimulated the growth of *Megasphaera elsdenii*, the major lactate utilizer in the rumen, and Meissner et al. (2014) reported that a *S. cerevisiae* YH increased the growth of *Megasphaera elsdenii* and stimulated the *in vitro* ruminal fermentation of a high-fermentable substrate. More recently, Kettunen et al. (2016) and Oeztuerk et al. (2016) have reported the efficacy of a patented *S. cerevisiae* YH product to stimulate the *in vitro* fermentation of different substrates in batch cultures and Rusitec fermenters, respectively.

S. cerevisiae is also the most commonly used microorganisms to ferment sugarcane juice and molasses for bioethanol production (Laluce et al., 2016), and the residue generated in this process (yeast cream) has been reported to contain about 60-70% of yeast cells (Pérez et al., 2000; Laluce et al., 2016). The yeast cream can be enzymatically hydrolysed, and the obtained product has shown to have a prebiotic effect in broilers (Pérez et al., 2005), to increase *in vitro* growth of ruminal bacteria (Galindo et al., 2010) and to stimulate *in vitro* fermentation of *Pennisetum purpureum* (Díaz et al., 2009). However, to our best knowledge the influence of this YH on ruminal fermentation of mixed diets has not yet been tested. Our hypothesis was that the YH could be effective in modifying rumen fermentation by stimulating the growth of ruminal microbes. Therefore, the objective of this study was to investigate the effects of different doses of YH on *in vitro* rumen fermentation of two mixed diets in batch cultures and Rusitec fermenters.

4.4.2. Materials and Methods

IV.4.2.1. Animals and diet

Six rumen-cannulated Merino sheep were used as ruminal fluid donors for the *in vitro* incubations and Rusitec fermenters. Three sheep were fed a 0.5:0.5 alfalfa hay:concentrate diet (medium-concentrate; MC) and the other three received a 15:85 barley straw:concentrate diet (high-concentrate; HC). The diets were fed at a fixed rate of 42 g of dry matter (DM) per kg of body weight^{0.75} distributed in two equal meals at 09:00 and 18:00 h for two weeks before starting the *in vitro* incubations in batch cultures. Ingredient and chemical composition of the diets are shown in Table IV.4.1. Sheep were cared and handled by trained personnel in accordance with the Spanish guidelines for experimental animal protection (Royal Decree 53/2013 of February 1st on the protection of animals used for experimentation or other scientific purposes). The experimental protocols were approved by the León University Institutional Animal Care and Use Committee.

Table IV.4.1. Ingredient composition and chemical analysis of medium- (MC) and high-concentrate (HC) diets fed to donor sheep and used as substrates for the *in vitro* fermentations in batch cultures

Ingredient (g/kg of DM)	Diet	
	MC	HC
Alfalfa hay	500	-
Barley straw	-	150
Barley	199	425
Corn	96.0	255
Soybean meal	71.0	150
Lupin	60.0	-
Oat	31.5	-
Fullfat soybean	15.0	-
Calcium carbonate	6.9	6.7
Sugarcane molasses	5.0	-
NaCl	3.5	3.7
Dicalcium phosphate	2.1	-
Mineral/vitamin premix ¹	10.0	10.0
Chemical analyses (g/kg of DM)		
OM	935	942
CP	186	150
aNDFom	394	357
ADFom	179	126

¹ Declared composition (g/kg mineral/vitamin premix): Vitamin A, 600,000 IU; Vitamin D3, 120,000 IU; Vitamin E, 1 g; Vitamin B1, 33 mg; Niacine, 1.5 g; S, 5 g; IK, 300 mg; SO₄Fe, 1 g; ZnO, 4 g; MnO, 2 g; CoSO₄, 60 mg; Na₂SeO₃, 30 mg; Ethoxyquin, 30 mg.

IV.4.2.2. Yeast hydrolyzate (YH), substrates, and *in vitro* fermentations in batch cultures

The YH was obtained by enzymatic hydrolysis of the yeast cream resulting from bioethanol production from sugarcane juice and molasses using *S. cerevisiae*. The enzymatic hydrolysis was produced by *Bacillus subtilis* E-44 at 45°C and pH = 6.0, as described in detail by Pérez (2000). The YH was a brown fluid that contained 0.21 g DM per g fresh matter. One ml of YH supplied 8.3 mg of nitrogen, 314 µmol of total VFA (158, 52.2, 72.9, 0.34, 1.35, 11.9 and 17.9 µmol of acetate, propionate, butyrate, isobutyrate, isovalerate and caproate, respectively) and 291 µg of lactate. According to Pérez (2000), the YH is stable up to six months regardless of storage temperature, and it was stored at 4°C in our study.

Samples of the forages and concentrates fed to sheep were ground through a 1 mm screen and mixed in the corresponding proportion to be used as substrate for *in vitro* fermentations. Concentrations of the YH were selected from previous studies (Díaz et al., 2011) and were: 0 (control: CON), 100 (YH1), 200 (YH2), 300 (YH3) and 400 µL (YH4) per culture (3.3, 6.7, 10.0 and 13.3 mL/L, respectively). Samples of each substrate (300 mg DM) were weighed into 120 mL serum bottles, and the YH was applied inside the bottles immediately before adding the buffered rumen fluid. In order to achieve the same volume in all the cultures, CON, YH1, YH2 and YH3 bottles received 400, 300, 200 and 100 µL of distilled water, respectively.

Ruminal contents were obtained immediately before the morning feeding from each sheep, pooled by diet (three sheep per diet), and strained through four layers of cheesecloth into pre-warmed thermal flasks with an O₂-free headspace. The fluid was mixed with the buffer solution of Goering and Van Soest (1970; no trypticase added) in a proportion 1:4 (vol/vol) at 39°C under continuous flushing with CO₂. Bottles of each substrate were filled with buffered ruminal fluid (30 mL) from sheep fed the same diet. Bottles were sealed with rubber stoppers and incubated at 39°C. Samples of ruminal fluid were taken as described below for VFA and NH₃-N analysis.

After 16.5 h of incubation (corresponding to a passage rate from the rumen of 0.06 per h), gas production was measured using a pressure transducer (Delta Ohm DTP704-2BGI, Herter Instruments SL, Barcelona, Spain) and a plastic syringe, and a gas sample (10 mL) was stored in an

evacuated tube (Terumo Europe N.V., Leuven, Belgium) for analysis of CH₄. Bottles were then uncapped, pH was measured immediately (Crison Basic 20 pH-meter, Crisson Instruments, Barcelona, Spain) and bottles were placed in iced water to slow down fermentation. One mL of content was added to 0.625 mL of deproteinising solution (20 g metaphosphoric acid g/L and 4 g crotonic acid /L) for VFA determination, 1 mL was added to 1 mL 0.5 M HCl for NH₃-N analysis, and 1 mL was immediately frozen for lactate analysis. The experiment was repeated in four non-consecutive days to get four replicates per experimental treatment.

IV.4.2.3. Rusitec trial

IV.4.2.3.1. Experimental design and sampling

Two identical 14-d incubation runs were carried out using four Rusitec fermenters in a cross-over design. The general incubation procedure was as described by Martinez et al. (2010a), and in each run, two fermenters received one of the experimental treatments: control (CON) and supplemented daily with 5 mL of YH (YH). The YH dose was selected from the results of the batch cultures trial and the supply of YH started on day 2 of incubation.

On the first day of each incubation run, each fermenter was inoculated with 250 ml of strained rumen fluid, 200 ml of artificial saliva, and 80 g of solid rumen content supplied into a nylon bag. Ruminant contents (liquid and solid) from three sheep fed a 0.5:0.5 alfalfa hay:concentrate diet were collected immediately before the morning feeding, mixed, strained through two layers of cheesecloth, and transferred to the corresponding fermenters within 30 min of collection. The liquid flow through fermenters was maintained by continuous infusion of artificial saliva (McDougall, 1948) at a rate of 650 mL/d (dilution rate of 5.42%/h). Each fermenter received daily 30 g of DM of the MC substrate (15 g of alfalfa hay and 15 g of concentrate). Alfalfa hay was chopped (about 0.5-cm pieces) and concentrate was ground through a 3-mm sieve. Forage and concentrate were fed once daily (10:00 h) into separate nylon bags (100 µm pore; 8 x 15 cm), which were incubated for 48 and 24 h, respectively. Dilution rate and solids retention time were chosen to resemble values previously observed *in vivo* in sheep (Ranilla et al., 1997, 1998). Liquid effluent was collected daily in flasks containing 20 mL of H₂SO₄ (20%; vol/vol) to maintain pH below 2. On day 13 a water solution saturated with HgCl₂ (5 mL) was added (replacing the H₂SO₄ solution that could cause bacterial lysis) to the effluent containers, which were held in an iced water bath to impede microbial growth.

After 8 d of adaptation, on days 9, 10, 11 and 12, samples for gas and for VFA, $\text{NH}_3\text{-N}$ and lactate determination in the effluents were collected, and apparent disappearance of diet was measured following the procedures described by Martínez et al. (2010a). In addition, three mL of fermenters' fluid were frozen (-80°C) for determination of amylase, xylanase and carboxymethylcellulase activities. On days 3, 8 and 14 of incubation, three mL of fluid from each fermenter were taken into a sterile container and immediately frozen at -80°C for DNA extraction. In addition, the two nylon bags (one with forage and one with concentrate) collected from each fermenter were washed twice with 40 mL of fermenter liquid and the washing fluid was returned to the fermenter. Bags were then opened, their contents were transferred to a sterile container, thoroughly mixed and, about 5 g were frozen at -80°C for DNA extraction.

From day 10 to 14, a solution of $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ was added to the artificial saliva at a rate of 4.0 mg of ^{15}N per g of dietary N for measuring microbial growth. On days 13 and 14, both effluent and the solid digesta were sampled to determine microbial protein synthesis as described by Carro and Miller (1999). Briefly, about 500 mL of effluent were used for liquid-associated bacteria isolation as described by Martínez et al. (2010a) and the rest of the effluent was freeze-dried for DM determination and ^{15}N enrichment analysis. The contents of nylon bags were thoroughly mixed and used for DM determination, ^{15}N enrichment analysis and isolation of solid-digesta associated bacteria as detailed by Martínez et al. (2010a).

IV.4.2.3.2. DNA extraction and Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA)

DNA was isolated in triplicate from pellets of centrifuged liquid samples (1 mL, 20,000 x g, 5 min, 4°C) and lyophilized solid digesta samples (200 mg DM) after mechanical disruption of microorganisms with a MiniBead-beater (3 min; Biospec Products, Bartlesville, OK, USA). The DNA was extracted following the procedure described by Yu and Morrison (2004) with the exception that an additional step involving the treatment of samples with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was included to remove PCR inhibitors (Saro et al., 2012), and the QIAamp DNA Stool Mini Kit columns (QIAGEN, Valencia, CA, USA) were used to purify the DNA. Absorbance ratios (A260:A280) of eluted DNA were measured in a Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) to assess the purity of DNA.

For ARISA analyses, the internal transcribed spacer of DNA was amplified using universal bacterial primers 16S-1392F and 23S-125R as described by Saro et al. (2012). Thermocycling and ARISA technique were conducted in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) and a MegaBACE 500 (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Bucks, United Kingdom), respectively. Peaks were identified by comparison with an internal size standard using the GeneMarker Software v1.80 (SoftGenetics, State College, PA, USA) and the presence/absence of the different peaks was considered to compare the electropherograms profiles by using a similarity matrix. The Shannon's diversity index was calculated to evaluate the diversity of bacterial communities, and dendrograms were constructed using the Pearson coefficient and the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) options in the MVSP v3.12d software (Kovach Computing Service, Anglesey, Wales, UK).

IV.4.2.4. Analytical procedures

Dry matter (ID 934.01), ash (ID 942.05) and N (ID 984.13) were determined according to the Association of Official Analytical Chemists (1999). Analyses of aNDFom and ADFom were carried out according to Van Soest et al. (1991) using an ANKOM²²⁰ Fibre Analyzer unit (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, USA). Sodium sulphite and heat-stable amylase were used in analysis of aNDFom and ADFom, and they were expressed exclusive of residual ash.

Concentrations of VFA, NH₃-N and total lactate were determined as described by García-Martínez et al. (2005), and methane was analysed by gas chromatography following the procedure described by Martínez et al. (2010b). Preparation and analysis of samples for ¹⁵N followed the procedures described by Carro and Miller (1999). Amylase, xylanase and carboxymethylcellulase activities in fermenters' content were determined as described by Giraldo et al. (2007) using soluble starch, oat spelt xylan and carboxymethylcellulose as substrates, respectively.

IV.4.2.5. Calculations and statistical analyses

The amounts of VFA produced in each bottle were calculated by subtracting the amount present initially in the incubation medium from that determined at the end of the incubation period. The amount of organic matter apparently fermented (AFOM) in each culture was estimated from VFA production using the equation proposed by Demeyer (1991).

Effects of YH supplementation and incubated diet in the experiment in batch cultures were assessed by ANOVA as a mixed model using the PROC MIXED of SAS (version 9.4; SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Five concentrations of YH (0, 100, 200, 300 and 400 μL per culture), substrate (MC and HC) and the YH x substrate interaction were included in the model as a fixed effects, whereas incubation day was considered as a random effect. Orthogonal polynomial contrasts were used to test for linear and quadratic effects of YH. Significance was declared at $P < 0.05$, whereas $P < 0.10$ values were considered to be a trend. When a significant effect of YH dose was detected, treatment means were compared using the Tukey's test ($P < 0.05$).

Fermentation and bacterial diversity data from Rusitec fermenters were analyzed as a mixed model with repeated measures using the MIXED procedure of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). The statistical model used included the YH treatment, incubation run, time and diet x time as fixed effects, and fermenter as a random effect. Data on microbial growth were analyzed independently for each digesta phase as a mixed model which YH treatment, incubation run, and YH treatment x incubation run as fixed effects, and fermenter as a random effect. Effects were declared significant at $P < 0.05$, and $P < 0.10$ was considered a trend.

IV.4.3. Results

The two types of inoculum used in this experiment differed in fermentation characteristics. The fluid from MC-fed sheep had greater ($P < 0.05$) pH (6.68 vs. 6.13), $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations (132 vs. 115 mg/l), acetate proportions (64.9 vs. 57.8 mol/100 mol) and acetate/propionate ratio (3.71 vs. 2.70), but lower ($P < 0.05$) propionate proportion (17.5 vs. 21.4 mol/100 mol), compared with the HC-inoculum.

IV.4.3.1. Batch cultures fermentations

Effects of supplementing batch cultures with YH on rumen fermentation parameters are shown in Tables IV.4.2 and IV.4.3. Yeast hydrolyzate x substrate interactions ($P < 0.001$ to 0.007) were detected for molar proportions of acetate, propionate and caproate and acetate/propionate ratio, and a trend ($P = 0.063$) to interaction was observed for final pH. Increasing levels of YH linearly augmented total VFA production ($P = 0.031$), butyrate ($P = 0.007$) and valerate ($P = 0.023$) proportions, and $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations ($P = 0.040$) but decreased ($P < 0.001$) acetate proportions and acetate/propionate ratio. Effects of YH on total VFA production, proportions of acetate, butyrate,

isovalerate, valerate and acetate/propionate were only observed for the MC substrate, whereas those on $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations and isovalerate proportions were only detected for the HC substrate. Neither linear nor quadratic effects ($P = 0.127$ to 0.855) of YH supplementation were observed for final pH, total lactate concentrations, or production of gas and CH_4 for any substrate. The amount of OMAF increased ($P = 0.029$) linearly with increasing doses of YH for MC substrate, but no effect was observed for the HC substrate. The incubated substrate affected ($P < 0.001$ to 0.026) all parameters measured, with the exception of total lactate concentrations ($P = 0.740$).

IV.4.3.2. Fermentation in the Rusitec system

Effects of YH on fermentation parameters and bacterial diversity in Rusitec fermenters are shown in Tables IV.4.4 and IV.4.5, respectively. The addition of YH did not affect ($P \geq 0.536$), pH before feeding, total VFA production, enzymatic activities or substrate disappearance, but modified VFA profile. Compared with the control, the addition of YH increased ($P \leq 0.003$) the proportion of propionate, butyrate, isobutyrate and valerate, and decreased ($P < 0.001$) acetate, isovalerate and caproate proportions, and tended to decrease ($P = 0.059$) CH_4 production. As a consequence of these changes, YH-supplemented fermenters had lower ($P < 0.001$) acetate/propionate ratios and tended to lower ($P = 0.064$) CH_4 /total VFA ratios. Supplementation with YH did not affect ($P = 0.899$) microbial growth in the solid phase of fermenters, but tended to increase ($P = 0.065$) microbial growth in the liquid digesta. Efficiency of microbial growth was not affected by YH supplementation.

As shown in Table IV.4.5, both the number of peaks and Shannon index values in the ARISA electropherograms of samples from the liquid digesta were greater ($P = 0.002$ and 0.019 , respectively) in the YH-supplemented fermenters compared with those unsupplemented. A similar trend ($P \leq 0.077$) was observed in the solid digesta. Bacterial diversity in the liquid digesta increased ($P < 0.001$) with incubation time for both treatments (control and YH), and that in the solid digesta also tended ($P \leq 0.061$) to increase as time progressed. In addition, the similarity index between the solid and liquid digesta was greater ($P = 0.036$) in YH-supplemented fermenters than in control ones.

Table IV.4.2. Effects of five doses of a yeasts hydrolyzate (0, 100, 200, 300 and 400 μ L/30 mL for CON, YT1, YT2, YT3 and YT4, respectively) on volatile fatty acids (VFA) production after *in vitro* fermentation of diets (300 mg) with medium (MC) and high (HC) concentrate content by mixed rumen micro-organisms for 16 h (n=4)

Item	Diet	Treatment					SEM	P value			
		CON	YH1	YH2	YH3	YH4		L ¹	Q ¹	Diet	YH x Diet
Total VFA (μ mol)	MC	2090 ^a	2075 ^a	2086 ^{ab}	2133 ^{ab}	2162 ^b	24.7	0.031	0.267	<0.001	0.407
	HC	2239	2203	2259	2230	2250					
Molar proportion (mol/100 mol) of:											
Acetate	MC	65.8 ^b	64.8 ^b	63.3 ^a	63.4 ^a	63.2 ^a	0.37	<0.001	0.147	<0.001	0.007
	HC	51.8	51.9	52.0	51.5	51.7					
Propionate	MC	19.1	19.8	20.2	20.7	20.8	0.31	0.078	0.222	<0.001	0.002
	HC	31.5	30.4	30.0	30.5	30.6					
Butyrate	MC	10.3 ^a	10.5 ^a	11.4 ^b	11.4 ^b	11.2 ^b	0.23	0.007	0.006	<0.001	0.161
	HC	14.3	14.9	14.9	14.8	14.6					
Isobutyrate	MC	1.19	1.65	1.58	1.16	1.20	0.20	0.804	0.109	0.026	0.691
	HC	0.28	0.44	0.51	0.45	0.42					
Isovalerate	MC	1.33	1.36	1.40	1.34	1.36	0.03	0.075	0.024	<0.001	0.429
	HC	0.62 ^a	0.73 ^b	0.77 ^b	0.76 ^b	0.73 ^b					
Valerate	MC	1.61 ^a	1.66 ^{ab}	1.74 ^b	1.61 ^a	1.88 ^b	0.07	0.023	0.682	<0.001	0.390
	HC	1.35	1.39	1.48	1.51	1.45					
Caproate	MC	0.66 ^c	0.27 ^a	0.41 ^b	0.44 ^b	0.46 ^b	0.03	<0.001	<0.00	<0.001	<0.001
	HC	0.23 ^a	0.30 ^{ab}	0.37 ^b	0.49 ^c	0.50 ^c					
Acetate/propionate (mol/mol)	MC	3.48 ^c	3.30 ^b	3.19 ^a	3.13 ^a	3.10 ^a	0.04	<0.001	0.378	<0.001	<0.001
	HC	1.66	1.71	1.73	1.69	1.69					

^{a,b,c} For each diet and variable, values not sharing a common different superscript differ ($P < 0.05$).

¹ L¹: linear effect of YH dose; Q: quadratic effect of YH dose.

Table IV.4.3. Effects of five doses of a yeasts hydrolyzate (0, 100, 200, 300 and 400 μ L/30 mL for CON, YH1, YH2, YH3 and YH4, respectively) on final pH, concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$ and total lactate, production of gas and methane, methane/volatile fatty acid (VFA) ratio and apparently fermented organic matter (AFOM) after *in vitro* fermentation of diets (300 mg) with a medium (MC) and high (HC) concentrate content by mixed rumen micro-organisms for 16 h (n = 4)

Item	Diet	Treatment					SEM	P value			
		CON	YH1	YH2	YH3	YH4		L ¹	Q ¹	Diet	YH x Diet
pH	MC	6.63	6.62	6.61	6.59	6.58	0.01	0.127	0.370	<0.001	0.063
	HC	6.50	6.48	6.48	6.50	6.51					
$\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/L)	MC	224	221	213	212	238	12.1	0.040	0.843	<0.001	0.145
	HC	99.7 ^a	139 ^b	142 ^b	147 ^b	146 ^b					
Total lactate (mg/L)	MC	10.5	9.71	8.55	10.1	9.26	0.64	0.542	0.217	0.740	0.808
	HC	9.22	9.21	8.47	9.12	9.36					
Gas (μ mol)	MC	3246	3243	3271	3312	3301	29.9	0.202	0.641	<0.001	0.561
	HC	3431	3459	3456	3441	3438					
Methane (μ mol)	MC	565	550	551	535	551	15.6	0.505	0.816	0.17	0.907
	HC	460	463	475	455	461					
Methane/VFA (mol/mol)	MC	0.270	0.266	0.265	0.251	0.255	0.0079	0.170	0.828	0.002	0.825
	HC	0.205	0.210	0.211	0.204	0.206					
AFOM (mg) ²	MC	179 ^a	178 ^a	180 ^a	185 ^b	186 ^b	2.34	0.029	0.459	<0.001	0.254
	HC	203	200	205	202	203					

^{a,b} For each diet and variable, values not sharing a common different superscript differ ($P < 0.05$).

¹ L: linear effect of YH dose; Q: quadratic effect of YH dose.

² Apparently fermented organic matter estimated from volatile fatty acids production according to Demeyer (1991).

Table IV.4.4. Effects of a yeasts hydrolyzate (YH) supplementation on fermentation parameters, diet digestibility, enzymatic activity and microbial protein synthesis in Rusitec fermenters fed a 50:50 forage:concentrate diet (n = 4)

Item	Treatment		SEM	P =
	CON	YH		
pH	6.50	6.52	0.051	0.817
NH ₃ (mg/L)	339	405	12.3	<0.001
Total VFA (mmol/d)	105	106	3.3	0.801
Molar proportions (mol/100)				
Acetate	54.5	51.1	0.48	<0.001
Propionate	14.9	17.7	0.28	<0.001
Butyrate	17.2	18.6	0.30	<0.001
Isobutyrate	1.22	1.35	0.041	0.002
Isovalerate	4.30	3.56	0.188	<0.001
Valerate	4.85	5.31	0.154	0.003
Caproate	3.06	2.35	0.138	<0.001
Acetate/Propionate (mol/mol)	3.67	2.89	0.085	<0.001
Methane (mmol/d)	29.5	28.3	0.75	0.059
Methane/Total VFA (mol/mol)	0.281	0.267	0.0090	0.064
Lactate (g/L)	6.25	6.69	0.907	0.559
Enzymatic activity ¹				
Amylase	0.269	0.270	0.0330	0.973
Xylanase	0.627	0.641	0.0361	0.616
Carboxymethylcellulase	0.078	0.083	0.0092	0.536
Diet disappearance (g/g)				
Dry matter	0.629	0.641	0.0096	0.158
aNDFom	0.468	0.474	0.0139	0.636
ADFom	0.282	0.293	0.0211	0.556
Microbial growth (mg N/d)				
Solid phase	128	129	7.1	0.899
Liquid phase	110	129	3.6	0.065
Total	237	258	6.8	0.165
Efficiency of microbial growth (mg N/g organic matter apparently fermented)	24.2	23.6	0.61	0.589

¹ Amylase activity is expressed as nanomoles of glucose released from soluble starch by 1 mL of liquid fermenters' content in 1 min at 39°C and pH 6.5. Xylanase activity is expressed as nanomoles of xylose liberated from oat spelt xylan by 1 mL of liquid fermenters' content in 1 min at 39°C and pH 6.5.

Table IV.4.5. Effects of a yeasts hydrolyzate (YH) supplementation on the evolution through the incubation period of number of peaks and Shannon index values detected in the automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) electropherograms in solid and liquid contents of Rusitec fermenters, and similarity index of ARISA profiles between solid and liquid contents

Sample	Item	Treatment	Incubation day			SEM	<i>P</i> -value		
			3	8	14		Treatment	Time	Treatment x time
Solid content	Number of peaks	CON	38.0	40.0	41.8	1.81	0.056	0.057	0.213
		YH	40.0	46.5	41.5				
	Shannon index	CON	3.60	3.69	3.73	0.048	0.077	0.061	0.270
		YH	3.68	3.84	3.72				
Liquid content	Number of peaks	CON	36.0 ^a	44.3 ^b	43.0 ^b	0.98	0.002	<0.001	0.399
		YH	37.8 ^a	47.5 ^b	46.8 ^b				
	Shannon index	CON	3.58 ^a	3.79 ^b	3.74 ^b	0.023	0.019	<0.001	0.493
		YH	3.63 ^a	3.86 ^b	3.84 ^b				
Solid-Liquid	Similarity index, %	CON	64.9 ^a	78.3 ^c	73.4 ^b	1.893	0.036	<0.001	0.181
		YH	71.5 ^a	77.6 ^b	79.2 ^b				

^{a, b} Within each row, means without a common superscripts differ ($P < 0.05$). Superscripts are only shown when a significant ($P < 0.05$) effect of time was detected.

The dendrograms in Figure IV.4.1 clearly show changes in bacterial diversity over the incubation period in our study. It is worth to notice that all samples from day 3 clustered together, for both liquid and solid digesta, although no further subclustering according treatment or incubation run was observed. In contrast, no clear pattern of clustering according to YH treatment, sampling day or incubation run was observed for samples taken on days 8 and 14. In general, fermenters 1 and 2 were more similar to each other than to the rest of fermenters, and the same was observed for fermenters 3 and 4.

IV.4.4. Discussion

The study with batch cultures was designed to investigate the effects of increasing doses of YH on *in vitro* ruminal fermentation as influenced by the type of diet fed to donor sheep and incubated as substrate. The observed values for the fermentation parameters in the two inocula were in accordance with those previously reported in sheep fed similar diets (Carro et al., 2000; Ramos et al., 2009), and seem to indicate the existence of different microbial communities in each of them. Overall, YH supplementation had only slight effects on the fermentation of HC substrate. In contrast, YH stimulated the fermentation of MC substrate, as indicated by the increased amount of both total VFA and AFOM. The VFA represent the main supply of metabolizable energy for ruminants, and therefore an increase in their production would be nutritionally favorable for the host animal.

In addition, YH supplementation of MC-cultures shifted the rumen VFA profile to less acetate and more propionate (only a trend was observed for propionate), indicating that YH resulted in more efficient rumen fermentation. Differences in the response to YH supplementation to batch cultures containing substrates varying in grass silage to concentrate ratio (0.75:0.25 to 0.25:0.75) have also been reported by Kettunen et al. (2016). These authors observed a maximum increase of microbial cell density (20%) with the substrate containing 0.75 grass silage, whereas lower increases (9-12%) were detected for the substrates containing lower silage proportions. Similarly, Ospí et al. (2012) reported that the effects of inactivated cells of *S. cerevisiae* on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage to concentrate ratio were more noticeable with a high-fibre substrate and only subtle effects were detected with a high-concentrate substrate. These results agree with the higher effects of YH observed in our study for the MC compared with the HC substrate. Based on these results we decided to investigate the long-term effects of YH on *in vitro* fermentation of MC substrate using Rusitec fermenters.

Pruebas experimentales. Prueba 4

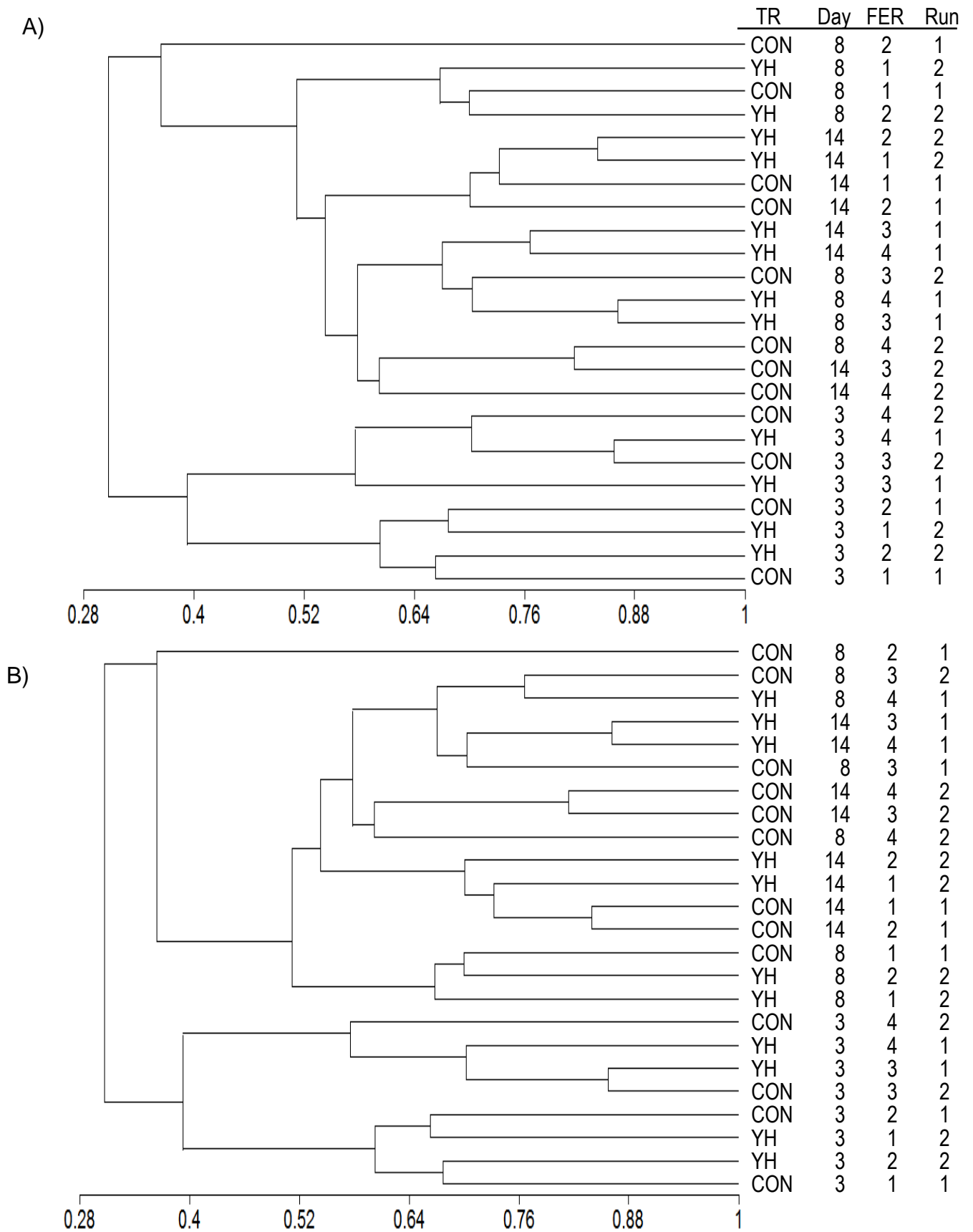


Figure 2. Dendrograms of ARISA profiles of bacterial communities in solid (A) and liquid (B) phase from Rusitec fermenters on days 3, 8 and 14 of incubation and either supplemented with a yeast hydrolyzate (YH) or not (CON). Numbers 1 to 4 correspond to individual fermenters (FER). Two identical incubation runs (1, 2) were performed.

Our results from batch cultures agree with previous studies (Gómez et al., 2005; Martínez et al., 2010b) showing that CH₄ production *in vitro* was affected by forage to concentrate ratio in the incubated substrate. Production of CH₄ was lower in HC-cultures than in those containing MC substrate, but it has to be noticed that batch cultures are heavily buffered, and the pH decrease usually observed in HC-fed animals diets could not be simulated; therefore, the influence of YH on rumen pH could have not been properly tested. Although *in vitro* studies have some limitations, they constitute a useful tool to test a high number of experimental treatments before performing *in vivo* trials (Mateos et al., 2014). The higher NH₃-N concentrations in the MC-cultures are in accordance with the higher crude protein content of MC-substrate compared with HC-substrate (Table IV.4.1).

Because no differences among the three highest doses used in the batch cultures (6.7, 10.0 and 13.3 mL/L) were detected in most of the measured parameters, a daily dose of 10.0 mL/L of YH was chosen for the Rusitec trial (5 mL per day for an effective fermenters' volume of 500 mL). As observed in the batch cultures, YH supplementation did not influence fermenters pH. However, the increase in total VFA production observed in the batch cultures supplemented with YH was not observed in the fermenters. Although YH was used at a concentration of 10.0 mL/L in both YH3-cultures and Rusitec fermenters, differences in solid/liquid ratio between the two *in vitro* systems originated marked differences in the YH dose expressed as mL/g substrate DM (1.00 and 0.17 mL/g substrate DM for YH3-cultures and fermenters, respectively). As a consequence, the amount of DM from YH supplied to the cultures accounted for 21.0% of the DM incubated in the YH3-cultures (300 mg DM substrate), but only for 3.5% in the fermenters (30 g DM substrate). The increase in VFA production observed in the YH3-cultures might have been due to the fermentation of the DM added with YH more than to a stimulation of microbial activity. As discussed by Ospí et al. (2012), yeast do not induce prompt changes in the ruminal microbial population, and thus short-term shifts in fermentation pattern cannot be expected in response to yeast products. However, the observed response could have been mediated by a prebiotic effect of yeast cells, as the YH used in this study has been reported to contain glucan and mannan oligosaccharide that can be easily fermented by ruminal microbes (Pérez et al., 2016). The increased NH₃-N concentrations observed in both *in vitro* systems might also have been due to

the microbial degradation of yeast cells because of their high protein content (Oeztuerk, 2009). In fact, daily $\text{NH}_3\text{-N}$ outflow was 220 and 263 mg for control and YH-fermenters, respectively, and the difference between treatments (43 mg $\text{NH}_3\text{-N}$) is consistent with the 41.5 mg of N supplied daily by YH (1 ml of YH contained 8.3 mg of N). This hypothesis is also supported by the greater isovalerate and valerate proportions in YH-fermenters compared with control ones, as both VFA are produced mainly from degradation of amino acids by rumen microorganisms. Oeztuerk (2009) observed that the increase in $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration in Rusitec fermenters produced by a live yeast culture from *S. cerevisiae* was higher than that caused by the same cultures autoclaved, and concluded that the difference between both yeast preparations might have been associated with a stimulation of proteolytic activity of rumen bacteria by live yeast culture, as reported by others (Yoon and Stern, 1996). The increased amounts of $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations in our study seem to be due to the N supply by YH, and suggest that this YH would be especially useful to improve ruminal fermentation of low-nitrogen diets.

In addition to N, yeasts can provide growth factors, such as amino acids, peptides, vitamins, and organic acids essential for some ruminal bacteria and fungi (Chaucheyras-Durand et al., 2012; Newbold et al., 1996), whose growth can be stimulated. This idea is consistent with the trend to increased microbial growth observed in the liquid phase of the YH-fermenters compared with control ones. A stimulation of the growth of ruminal bacteria by live (Newbold et al., 1996; Miller-Webster et al., 2002) and dead (Kettunen et al., 2016) yeast cultures has been shown in some studies, but others have reported no effect (Carro et al., 1992). Moreover, YH supplementation promoted a greater bacterial diversity in both digesta phases of YH-fermenters (Table 5). This could indicate that YH promoted the growth of bacteria that could not be detected in the control-fermenters due to their low abundance. The ARISA is a qualitative technique and does not allow identification of bacterial species, but it is assumed that each peak in the electropherograms reflects the predominant bacterial species or populations present in the samples. However, no clear grouping of samples according YH treatment was observed in the dendrograms of ARISA profiles, suggesting the existence of only subtle differences in the structure of bacterial populations between YH and control fermenters.

Differences in bacterial populations and/or in their activity in response to YH supplementation could explain the change in VFA profile observed in the

fermenters. Supplementation with YH shifted VFA profile from acetate to propionate, reducing the acetate/propionate ratio. Similar results have been recently reported by supplementing YH to batch cultures (Kettunen et al., 2016) and Rusitec fermenters (Oeztuerk et al., 2016). The trend to reduced CH₄ production observed in YH-fermenters in our study is consistent with the increased propionate proportions, as production of propionate serves as a competitive pathway for hydrogen. As a result, CH₄/total VFA tended to be lower in YH-fermenters, which would indicate a more efficient fermentation.

Finally, the lack of effect of YH on lactate concentrations in both *in vitro* experiments is consistent with the idea that dead yeast cells had no effect on lactate production (Miller-Webster et al. 2002; Chaucheyras-Durand et al., 2012), although live yeasts have been reported to stimulate the growth of rumen lactate-utilizers and to reduce lactate concentrations (Chaucheyras et al., 1996; Callaway and Martin, 1997).

IV.4.5. Conclusions

The effectiveness of the yeast hydrolysate used in this study to modify rumen fermentation was diet-dependent, being more effective with a medium-concentrate than with a high-concentrate substrate in short-term *in vitro* incubations. In long-term *in vitro* experiments, the yeast hydrolysate stimulated rumen fermentation of a medium-concentrate substrate and increased microbial growth. These results would have important practical implications if they are confirmed *in vivo*, especially in sugarcane-producing countries, as the yeast hydrolysate was obtained from a residue from bioethanol production from sugarcane. This residue is produced in large amounts and has a high pollution potential, and therefore its use in ruminant feeding would be a viable alternative that could also contribute to a more sustainable livestock production.

IV.4.6. Acknowledgements

Funding was provided by the Spanish C.I.C.Y.T. (Project AGL2008-04707-C02-02 and Acción Integrada AIB2010NZ-00190). A. Díaz gratefully acknowledges the receipt of grants from the Spanish AECID and the Junta de Castilla y León. C. Saro gratefully acknowledges the receipt of scholarship from the Spanish Ministry of Education and Science (AP2006-03049).

IV.4.7. References

- Association of Official Analytical Chemists. AOAC, 1999. Official Methods of Analysis, 16th Ed., 5th revision. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- Callaway E.S., Martin S.A. 1997. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. J. Dairy Sci. 80, 2035-2044.
- Carro, M.D., Lebzien, P., Rohr, K., 1992. Influence of yeast culture on the *in vitro* fermentation (Rusitec) of diets containing variable portions of concentrates. Anim. Feed Sci. Technol. 37, 209-220.
- Carro, M.D., Miller, E.L., 1999. Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an *in vitro* semi continuous culture system (RUSITEC). Br. J. Nutr. 2, 149-157.
- Carro, M.D., Valdés, C., Ranilla, M.J., González, J.S., 2000. Effect of forage to concentrate ratio in the diet on ruminal fermentation and digesta flor kinetics in sheep. Anim. Sci. 70, 127-134.
- Chaucheyras F., Fonty G., Bertin G., Salmon J.M., Gouet P. 1996. Effects of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell SC1), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism *in vitro*. Can. J. Microbiol. 42, 927-933.
- Chaucheyras-Durand, F., Chevaux, E., Martin, C., Forano, E., 2012. Use of yeast probiotics in ruminants: effects and mechanisms of action on rumen pH, fibre degradation, and microbiota according to the diet. In: Rigobelo E. (Ed.), Probiotic in Animals, In Tech Editions, Rijeka, Croatia, pp. 119-152.
- Demeyer, D.I., 1991. Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. In: Jouany, J.P. (Ed.), Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion, INRA Editions, Paris, France; pp. 217-237.
- Díaz, A., Galindo, J., Bocourt, R., Aldana, A.I., Moreira, O., Sarduy, L., 2009. Efecto de un hidrolizado enzimático de *saccharomyces cerevisiae* y sus diferentes fracciones en la dinámica fermentativa ruminal del pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) en condiciones *in vitro*. Rev. Cub. Cienc. Agric. 43, 251-257.

- Díaz, A., Saro, C., Tejido, M.L., Sosa, A., Martínez, M.E., Galindo, J., Carro, M.D., Ranilla, M.J. 2011. Effects of a yeast enzymatic hydrolyzate on *in vitro* ruminal fermentation. *Options Méditerranéennes A* 99, 181-185.
- Galindo, J., Díaz, A., González, N., Sosa, A., Marrero, Y., Aldana, A.I., Moreira, O., Bocourt, R., Torres, V., Sarduy, L., Noda, A., 2010. Efecto de un hidrolizado enzimático de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en la población microbiana ruminal con sustrato de *Pennisetum purpureum*, vc. Cuba CT- 115 en condiciones *in vitro*. *Rev. Cub. Ciencia Agr.* 44, 281-286.
- García-Martínez, R.; Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Carro, M.D., 2005. Effects of disodium fumarate on *in vitro* rumen microbial growth, methane production and fermentation of diets differing in their forage:concentrate ratio. *Br. J. Nutr.* 94, 71-77.
- Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Carro, M.D., 2007. Effects of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in rusitec fermenters. *J. Anim. Sci.* 85, 1962-1970.
- Goering, M.K., Van Soest, P.J., 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). In: *Agricultural Handbook*, No. 379. Agricultural Research Services, USDA, Washington DC.
- Gómez J.A., Tejido, M.L., Carro, M.D. 2005. Mixed rumen micro-organisms growth and rumen fermentation of two diets in RUSITEC fermenters: influence of disodium malate supplementation. *Br. J. Ntr.* 93, 479-484.
- Kettunen, K., Vuorenmaa, J., Gaffney, D., Apajalahti, J., 2016. Yeast hydrolysate product enhances ruminal fermentation *in vitro*. *Journal of Applied Animal Nutrition*. 4, edoi: 10.1017/jan.2015.14.1-7.
- McDougall, E.I., 1948. Studies on ruminant saliva 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43, 99-109.
- Laluce, C., Leite, G.R., Zavitoski, B.Z, Zamai, T.T., Ventura, R., 2016. Fermentation of sugarcane juice and molasses for ethanol production. In: O'Hara I.A., Mundree, S.G. (Eds.), *Sugarcane-based biofuels and bioproducts*. John Willey & Sons, Hoboken, New York, pp. 55-86.

- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Ramos, S., Tejido, M.L., Carro, M.D. 2009. Effects of dilution rate and retention time of concentrate on efficiency of microbial growth, methane production, and ruminal fermentation in Rusitec fermenters. *J. Dairy Science* 92, 3930–3938.
- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Ramos, S., Carro, M.D., 2010b. The effect of the diet fed to donor sheep on *in vitro* methane production and ruminal fermentation of diets of variable composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 158, 126-135.
- Meissner, H.H., Henning, P.H., Leeuw, K.J., Hagg, F.M., Horn, C.H., Kettunen, A., Apajalahti J.H.A., 2014. Efficacy and mode of action of selected non-ionophore antibiotics and direct-fed microbials in relation to *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 during *in vitro* fermentation of an acidosis-causing substrate. *Livest. Sci.* 162, 115-125.
- Miller-Webster T., Hoover W.H., Holt M., Nocek, J.E. 2002. Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 85, 2009–2014.
- Newbold, C. J., Wallace, R. J., Mcintosh, F.M. 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *Brit. J. Nutr.* 76, 249–261.
- Oeztuerk, H. 2009. Effects of live and autoclaved yeast cultures on ruminal fermentation *in vitro*. *J. Anim. Feed Sci.* 18, 2009, 142–150.
- Oeztuerk, H., Emre, B., Breves, G., 2016. Effects of hydrolysed yeasts on ruminal fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec). *Vet. Med.* 61, 195-203.
- Opsi, F., Fortina, R., Tassone, S., Bodas, R., López, S. 2012. Effects of inactivated and live cells of *Saccharomyces cerevisiae* on *in vitro* ruminal fermentation of diets with different forage:concentrate ratio. *J. Agric. Sci.* 150, 271–283.
- Pérez, M., 2000. Obtención de un hidrolizado de crema de levadura de destilería y evaluación de su actividad probiótica (Obtaining a yeast hydrolyzate from yeast cream and evaluation of its probiotic effects). PhD Thesis, Universidad Agraria de La Habana. La Habana, Cuba.

- Pérez, M., Piad, R., Bocourt, R., Milian, G., Medina-Medina, E., Savon, L., Sarduy, L., Laurencio, M., 2005. Actividad prebiótica y probiótica de un hidrolizado enzimático de crema de destilería en pollos de cebo (Prebiotic and probiotic activity of an enzymatically hydrolyzate of yeast cream in broilers). *Cien. Tecnol. Alim.* 5, 42-47.
- Pérez, M., Milian, G., Bocourt, R., Alemán, R. 2016. Evaluación *in vitro* de prebióticos en hidrolizados de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) preparados por diferentes métodos (*In vitro* evaluation of prebiotics in hydrolysates of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) prepared by different methods). *Cien. Vida* 16, 64-75.
- Ramos, S., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Martínez, M.E., Saro, C., Carro, M. D., 2009. Influence of detachment procedure and diet on recovery of solid-associated bacteria from sheep ruminal digesta and representativeness of bacterial isolates as assessed by automated ribosomal intergenic spacer analysis-polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* 11, 5659-5668.
- Ranilla, M.J., Carro, M.D., Valdés, C., Giráldez, F.J., López, S., 1997. A comparative study of ruminal activity in Churra and Merino sheep offered alfalfa hay. *Anim. Sci.* 65, 121-128.
- Ranilla, M.J., López, S., Giráldez, F.J., Valdés, C., Carro, M.D., 1998. Comparative digestibility and digesta flow kinetics in two breeds of sheep. *Anim. Sci.* 66, 389-396.
- Rossi, F., Di Luccia, A., Vincenti, D., Cocconcelli, P.S., 2004. Effects of peptidic fractions of *Saccharomyces cerevisiae* culture on growth and metabolism of the ruminal bacteria *Megasphaera elsdenii*. *Anim. Res.* 53, 177-186.
- Saro, C., Ranilla, M.J., Carro, M.D., 2012. Postprandial changes of fiber-degrading microbes in the rumen of sheep fed diets varying in type of forage as monitored by real time PCR and automated ribosomal intergenic spacer analysis. *J. Anim. Sci.* 12, 4487-4494.
- SAS (Statistical Analysis Systems), 2004. SAS Procedures Guide Release 9.1 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597.

- Yoon I.K., Stern M.D. 1996. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on ruminal fermentation in dairy cows. J. Dairy Sci. 79, 411-417.
- Yu, Z., Morrison M., 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. Biotech. 36, 808-812.

IV.5- Prueba 5: Estudio comparativo de la producción y el valor nutritivo de dos cereales forrajeros (avena y centeno) cultivados en condiciones convencionales y ecológicas

Estudio comparativo de la producción y el valor nutritivo de dos cereales forrajeros (avena y centeno) cultivados en condiciones convencionales y ecológicas

Tejido ML^{1,2}, Ranilla MJ^{1,2}, Saro C^{1,2}, **Díaz A**¹, Mateos I¹, Palacios C¹ y Carro MD^{1,2*}

¹ *Departamento de Producción Animal, Universidad de León, 24071 León.*

² *Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León.*

* Carro MD; mdcart@unileon.es

Publicado en: Actas IX Congreso SEAE "Calidad y seguridad alimentaria".
Lleida 2010.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue comparar la producción de materia seca (MS) y el valor nutritivo de avena y centeno forrajeros cultivados en condiciones convencionales y ecológicas durante un año en la zona de Fariza de Sayago (Zamora). Se dispuso de 6 parcelas de cada cereal, de las cuales tres se cultivaron en condiciones convencionales y tres según la normativa vigente para cultivos ecológicos. En mayo y julio de 2009 se tomaron muestras del material vegetal y se analizó su composición química y valor nutritivo. La producción de MS en las parcelas ecológicas fue menor ($P < 0,05$) en los dos cortes, representando el 65 y 61% de la producción en las parcelas convencionales para la avena y el centeno, respectivamente. Los forrajes ecológicos presentaron menores ($P < 0,05$) contenidos en proteína bruta y mayores ($P < 0,05$) contenidos en fibra neutro-detergente (FND) que los convencionales, excepto la avena ecológica obtenida en mayo, que presentó un menor ($P < 0,05$) contenido en FND que la convencional. No se observaron diferencias debidas al tipo de cultivo en la digestibilidad *in vitro* de la MS (DMS) de la avena, pero el centeno ecológico presentó una menor ($P < 0,05$) DMS que el convencional. Las diferencias observadas en la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) tras la incubación de las muestras con líquido ruminal estuvieron en concordancia con las diferencias observadas en la composición química, pero las proporciones molares de los principales AGV fueron similares ($P > 0,05$) en los dos tipos de cultivo, lo que indicaría un patrón fermentativo semejante.

Palabras clave: proteína bruta, fibra, digestibilidad *in vitro*, fermentación ruminal

IV.5.1. Introducción

El consumo de productos de origen animal criados de manera ecológica está aumentando de forma progresiva en los últimos años (González, 2007). La producción y comercialización de estos productos están reguladas por el Reglamento CE No 834/2007 de la Comisión de 28 de Junio de 2007 (Diario Oficial de la Unión Europea, 2007), que establece que “*los animales deben ser alimentados con piensos ecológicos que cubran sus necesidades nutricionales en las diversas etapas de su desarrollo*”. Por ello, a la hora de formular dietas para alimentar a estos animales se deben sustituir los alimentos obtenidos de manera convencional por los obtenidos de manera ecológica. Sin embargo, para poder formular dietas equilibradas es necesario conocer el valor nutritivo

de los alimentos que las componen. A pesar de la importancia de este aspecto, la mayoría de estudios que analizan el efecto del sistema de cultivo (convencional vs. ecológico) se han realizado en alimentos para el consumo humano y apenas existen estudios comparativos en los que se haya analizado el valor nutritivo de alimentos para el consumo animal producidos en condiciones convencionales y ecológicas.

Por otra parte, la interpretación de estos estudios resulta difícil en numerosas ocasiones, ya que en muchos de los estudios las parcelas cultivadas de forma convencional y ecológica no se encuentran en la misma finca, sino en fincas relativamente separadas, lo que implica que las características del suelo, e incluso las condiciones climatológicas en las que se desarrollan ambos tipos de cultivo, no son similares. Además, en algunos estudios los tipos de semillas utilizados son diferentes, hecho que también afecta a la comparación directa de los resultados. Por ello, el objetivo de este trabajo fue comparar la producción de materia seca (MS), la composición química y la digestibilidad *in vitro* de avena y centeno forrajeros, cultivados de forma convencional y ecológica en dos épocas diferentes de recolección (preespigado y maduración).

IV.5.2. Material y métodos

IV.5.2.1. Cultivos y manejo

El estudio se llevó a cabo en la localidad de Fariza de Sayago (Zamora) y duró desde el verano de 2008 hasta julio de 2009. Esta zona se caracteriza por la escasa fertilidad del suelo y el pequeño tamaño de las fincas de cultivo. Durante el período de estudio, las temperaturas más bajas se registraron en los meses de diciembre y enero (-6,1 y - 3,1°C, respectivamente), y las más altas en julio y agosto (33,7 y 35,5°C). En cuanto a la pluviosidad, osciló entre los 88 mm registrados en marzo y los 1044 mm registrados en enero. El invierno fue largo y frío, ya que se registraron temperaturas mínimas inferiores a 0°C desde octubre hasta abril.

Para el cultivo de cada cereal se dispuso de seis parcelas de 10 x 20 m cada una de ellas, con una distancia entre parcelas de 10 m en todos los lados. Tres de las parcelas se cultivaron en régimen convencional y las otras tres en régimen ecológico. Todas las parcelas habían sido cultivadas en régimen ecológico durante un período de 3 años antes del inicio de la prueba experimental. Las labores de cultivo y recolección se describen a continuación.

Las parcelas se dedicaron a barbecho el año anterior al comienzo de esta prueba, y en abril de 2008 se araron y se añadió estiércol de ovino a todas ellas. En el mes de septiembre de 2008 se preparó la tierra para sembrar, utilizando un arado de media vertedera y un cultivador. En octubre de 2008 se realizó la siembra del trigo (200 kg/ha), utilizando un sistema "a voleo" para una distribución uniforme de las semillas. En todas las parcelas se utilizaron semillas ecológicas, para analizar las posibles diferencias debidas exclusivamente al método de cultivo.

En las parcelas convencionales, después de la siembra, se aplicó un tratamiento mineral N-P-K (8-15-15) a una dosis de 100 kg/ha y a continuación se pasó el cultivador nuevamente. En enero de 2009, en las parcelas convencionales se aplicó un tratamiento fitosanitario con clorsulfuron (Belure®; 16 g/ha) y un abono de cobertera con un 27% de N (13,5% amoniacal, 13,5% nítrico y 3,5% óxido de magnesio) a una dosis de 80 kg/ha. Las parcelas cultivadas de forma ecológica no recibieron tratamientos fitosanitarios ni de abonado.

La recolección de las muestras se realizó en los meses de mayo y julio, con el fin de recoger los cereales en dos épocas distintas de su ciclo productivo, preespigado y maduración, que coinciden con dos formas de aprovechamiento del cereal: a diente por parte de los animales y con la cosecha cuando el cereal está maduro, respectivamente. En la recolección realizada en julio se pretendía obtener grano y paja, pero las condiciones climatológicas adversas que se produjeron en el invierno de 2009 hicieron que el crecimiento de los cereales fuera muy bajo y el tamaño de los granos demasiado pequeño para su separación. Por ello, en ambos muestreos se analizó únicamente la producción, composición química y valor nutritivo del forraje producido.

Para la recogida de muestras, en los dos muestreos se utilizó un cuadrado de 1 m de lado, el cual se lanzó al azar en cada parcela tres veces y se cortó todo el material vegetal que se encontraba en el interior del mismo. El material vegetal se pesó y se trasladó al laboratorio, donde se secó en una estufa provista de ventilación forzada a 50°C hasta peso constante. A continuación se pesó de nuevo para determinar su contenido en MS y la producción de MS en cada una de las muestras obtenidas. Posteriormente, las tres muestras de cada parcela se mezclaron para obtener una muestra representativa que se utilizó para las pruebas de valoración nutritiva.

En el mes de julio de 2009 se tomaron cinco muestras (100 g) del suelo de cada parcela, las cuales se mezclaron para formar una muestra representativa. Las muestras se secaron a temperatura ambiente durante 72 h y a continuación se tamizaron utilizando un tamiz de 2 mm de poro antes de realizar los análisis que se describen a continuación. El pH del suelo se determinó en agua y en una solución KCl 1 N, utilizando en ambos casos una relación 1:2 (25 g de suelo en 50 mL de líquido). El contenido en N se determinó mediante el método Kjeldahl (AOAC, 1999) utilizando un equipo de destilación Kjeltex System 1002 (Tecator, AB, Suecia). El contenido en fósforo se analizó según el método descrito por Olsen *et al.* (1954). El análisis de minerales se llevó a cabo tras un proceso de extracción (Ross y Wang, 1993) y se cuantificaron mediante espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) en un equipo ICP-AES Perkin Elmer Optima 2000 DV (Perkin Elmer, Uberlingen, Alemania).

IV.5.2.2. Composición química y digestibilidad *in vitro*

El contenido en cenizas de las muestras se determinó por calcinación de las muestras en un horno de mufla a 550°C durante 12 horas, y el contenido en materia orgánica (MO) se calculó por diferencia. El contenido en N se determinó mediante el método Kjeldahl (AOAC, 1999) utilizando un equipo de destilación Kjeltex System 1002 (Tecator, AB, Suecia) y el contenido en proteína bruta (PB) se calculó como $N \times 6,25$. El contenido en fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD) se analizó siguiendo la técnica secuencial descrita por Van Soest *et al.* (1991) adoptando las modificaciones propuestas por ANKOM (1998). El análisis del contenido en lignina ácido detergente se realizó según la técnica de Goering y Van Soest (1970).

Para determinar la digestibilidad *in vitro* se pesaron aproximadamente 400 mg de muestra en bolsas de poliéster (Ankom Corp #57) con un tamaño de poro de 30 μm (4,5 x 5,5 cm) que habían sido previamente pesadas. Una vez llenas, las bolsas se sellaron y se introdujeron en botellas de 2,5 L de capacidad con una mezcla 1:4 de líquido ruminal y del medio de cultivo descrito por Goering y Van Soest (1970). Una vez cerradas las botellas se introdujeron en un incubador (Ankom Daisy II; Ankom Technology Corp., Fairport, NY, Estados Unidos) a 39°C y con rotación continua. Tras 48 h de incubación, las botellas se abrieron y las bolsas se lavaron con agua fría y se dejaron secar en una estufa a 60°C. Una vez secas, se pesaron para calcular la digestibilidad *in vitro* de la MS (DMS). Finalmente, se analizó el contenido en FND para calcular

la digestibilidad *in vitro* verdadera de la MS (DVMS) y la digestibilidad *in vitro* de la FND (DFND).

IV.5.2.3. Fermentación ruminal

Para valorar la fermentación ruminal de las muestras obtenidas se utilizó un sistema *in vitro* de de cultivos discontinuos de microorganismos ruminales (CDMR). Las incubaciones en los CDMR se llevaron a cabo en viales de vidrio de 120 mL de capacidad, en cada uno de los cuales se pesaron 500 mg de MS de la muestra correspondiente. Todas las muestras se molieron previamente a un tamaño máximo de partícula de 1 mm, utilizando un molino de martillos tipo Culatti. Para las incubaciones se utilizó fluido ruminal diluido en el medio de cultivo descrito por Goering y Van Soest (1970). El contenido ruminal se extrajo de 4 ovejas fistuladas en el rumen antes de la administración diaria del alimento, se introdujo en termos aislantes e inmediatamente se trasladó al laboratorio, con el fin de mantener la temperatura y evitar el contacto con el aire. Una vez en el laboratorio, se mezcló el contenido ruminal de las 4 ovejas, se filtró a través de una doble capa de gasa, y el líquido recogido se mezcló con el medio de cultivo en proporción 1:4 (vol:vol). La mezcla de todos los componentes del medio de cultivo, la del medio de cultivo con el fluido ruminal, y su dosificación dentro de los viales (50 mL) se realizó en condiciones de anaerobiosis (gaseado continuo con CO₂) y a una temperatura de 39°C. Tras la dosificación, los viales se cerraron herméticamente con un tapón de caucho, se precintaron con cápsulas de aluminio y se introdujeron en un incubador a 39°C. En cada tanda de incubación se utilizaron dos viales por cada muestra. Se realizaron cuatro tandas de incubación, en cuatro días diferentes, para obtener cuatro valores por muestra.

La mitad de los viales permanecieron en la estufa 144 h, y en ellos se midió la producción de gas a las 3, 6, 9, 12, 16, 21, 26, 31, 36, 48, 60, 72, 96, 120 y 144 h, dejando salir el gas después de cada medida. La medida del gas producido se realizó utilizando un medidor de presión y una jeringa calibrada. Tras 144 h de incubación se abrieron los viales y se filtró su contenido en crisoles de placa porosa para determinar la desaparición de MS. En el residuo de incubación se determinó su contenido en cenizas para calcular la desaparición de MO tras 144 h de incubación (DMO144).

La otra mitad de los viales permanecieron dentro del incubador durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, se abrieron los viales y se determinó el pH de su contenido. Posteriormente, se tomaron muestras para analizar la

concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y amoníaco. Para el análisis de la concentración de AGV se tomaron 0,8 mL del contenido de cada vial y se mezclaron con 0,5 mL de una solución acidificante y desproteinizante (1 g de ácido metafosfórico y 5 g de ácido crotonico en 250 mL de HCl 0,5 M). La mezcla obtenida se dejó reposar durante 12 h a 4°C y se centrifugó a 16.000 x g durante 15 minutos a 4°C antes de proceder al trasvase del sobrenadante a viales de cromatografía. La concentración de AGV (ácetico, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico y valérico) se determinó mediante cromatografía de gases, utilizando un cromatógrafo Shimadzu GC-14B provisto de un inyector automático, un detector de ionización de llama y de una columna GP 60/80 Carbowax C/0.3% Carbowax 20M/0.1% H3PO4 (Supelco, Madrid, España). Las temperaturas de la columna, inyector y detector fueron 140°C, 150°C y 150°C, respectivamente. El análisis de la concentración de amoníaco se llevó a cabo siguiendo la técnica colorimétrica descrita por Weatherburn (1967).

IV.5.2.4. Cálculos y análisis estadístico

Los datos de producción de gas medidos en cada vial en cada tiempo de muestreo se ajustaron al modelo: $y = A (1 - e^{-c(t-lag)})$, en el que c representa el ritmo de producción de gas, A es la producción potencial de gas, lag es el tiempo necesario para que comience la producción de gas, y t es el tiempo de muestreo. El ajuste de los datos se llevó a cabo utilizando el procedimiento NLIN del paquete estadístico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, Estados Unidos). La degradabilidad efectiva de la MO (DEMO) se estimó a partir de la desaparición de MO medida a las 144 h (DMO144), del ritmo de producción de gas, del valor de lag y de un ritmo de paso (k) de 0,040 h⁻¹ de acuerdo con la siguiente fórmula: $DEMO = DMO144 (c / c + k) e^{(-k \times lag)}$. El ritmo medio de producción de gas (RMPG; mL / h) se definió como el ritmo de producción de gas entre el inicio de la incubación y el tiempo al que se alcanzó el 50% de la producción potencial de gas y se calculó según la siguiente fórmula: $RMPG = (A c) / 2 [\ln(2) + (c \times lag)]$.

El análisis estadístico de los resultados se realizó de forma independiente para cereal y tiempo de recolección. Los datos se sometieron a un análisis de varianza en el que se incluyeron como efectos principales el sistema de cultivo (convencional vs. ecológico) y el día de incubación. En el caso de la producción de MS y la composición química el único efecto considerado en el análisis de varianza fue el sistema de cultivo. El nivel de significación estadística se estableció en $P \leq 0,05$.

IV.5.3. Resultados y discusión

En la Tabla IV.5.1 figuran la producción de MS y la composición química de los forrajes obtenidos en los dos cortes realizados para los dos tipos de cultivo. En todos los casos, las parcelas cultivadas de forma ecológica produjeron una menor ($P < 0,001$ a $0,019$) cantidad de MS (t/ha) que las parcelas cultivadas de forma convencional. La producción de avena en las parcelas cultivadas de forma ecológica representó el 53,6 y 73,3 % de la producción alcanzada en las parcelas convencionales en los cortes de mayo y julio, respectivamente. En el caso del centeno, la producción ecológica representó el 58,6 y 66,9 % de la producción convencional en mayo y julio, respectivamente. Resultados similares han sido hallados por otros autores (Mazzoncini *et al.*, 2007; Cavigelli *et al.*, 2008) con diferentes cultivos. Tamm *et al.* (2007) realizaron una revisión de los resultados disponibles sobre la producción de trigo en condiciones convencionales y ecológicas, y observaron que la producción en condiciones ecológicas oscilaba entre el 20 y 40% de la producción obtenida en condiciones convencionales. Ingver *et al.* (2008) observaron que la producción de avena grano en condiciones ecológicas representó el 78,9% de la obtenida en parcelas convencionales en un año de climatología adversa, pero no observaron diferencias debidas al tipo de cultivo en otros dos años en los que las condiciones climáticas fueron más favorables para el cultivo de este cereal. Kirchmann *et al.* (2007) compararon la producción de cebada y trigo en las dos condiciones de cultivo y observaron que la producción en condiciones ecológicas representó el 56,2 y 69,1%, respectivamente, de la obtenida en condiciones convencionales.

Kirchmann *et al.* (2007) atribuyeron la menor producción observada en condiciones ecológicas a cuatro circunstancias que suelen darse en este tipo de cultivos: menor aporte de N, mayor competencia por los nutrientes provocada por una mayor abundancia de plantas adventicias, menor eficiencia del uso de los nutrientes, y peor control de las enfermedades de las plantas. En nuestro estudio, se observó visualmente una mayor abundancia de plantas adventicias en las parcelas cultivadas ecológicamente que la apreciada en las parcelas convencionales, pero no se cuantificó su porcentaje. La mayor producción de MS observada en las parcelas convencionales podría estar relacionada con el mayor aporte de abono mineral que recibieron estas parcelas.

Tabla IV.5.1. Producción de materia seca (MS; t MS/ha) y composición química (g/100 g MS) de avena y centeno cultivados en sistemas de producción convencional y ecológica

Cereal	Época de corte	Sistema de cultivo	Producción de MS	Composición química ¹				
				MO	PB	FND	FAD	LFND
Avena	Mayo	Convencional	2,63	94,3	7,11	56,4	25,1	5,73
		Ecológico	1,41	92,0	6,63	51,3	24,8	10,5
		EEM ²	0,208	0,630	0,075	1,25	0,696	0,643
		<i>P</i> =	0,014	0,057	0,011	0,045	0,776	0,006
	Julio	Convencional	1,95	93,3	8,08	63,9	30,8	5,68
		Ecológico	1,43	92,6	6,43	66,4	33,3	6,98
		EEM ²	0,067	0,31	0,320	0,44	0,31	0,368
		<i>P</i> =	0,019	0,186	0,022	0,017	0,004	0,067
Centeno	Mayo	Convencional	4,97	95,3	6,34	58,9	29,4	6,37
		Ecológico	2,91	93,7	3,71	64,9	35,4	8,46
		EEM ²	0,043	0,38	0,170	0,588	0,632	0,270
		<i>P</i> =	< 0,001	0,040	< 0,001	0,002	0,003	0,006
	Julio	Convencional	5,43	95,2	7,06	62,3	32,1	6,09
		Ecológico	3,63	95,2	4,29	67,7	36,2	6,01
		EEM ²	0,210	0,17	0,187	0,74	0,56	0,326
		<i>P</i> =	0,001	0,851	< 0,001	0,007	0,007	0,319

¹ MO: materia orgánica. PB: proteína bruta. FND: fibra neutro detergente. FAD: fibra ácido detergente. LFND: (lignina/FND) x 100.

² EEM: error estándar de la media.

De hecho, el suelo de las parcelas en las que se cultivó avena de forma convencional presentó un mayor contenido en N ($P = 0,015$) y tendió ($P = 0,096$) a presentar un mayor contenido en fósforo que el de las parcelas orgánicas (Tabla IV.5.2). Sin embargo, en las parcelas en las que se cultivó centeno no se observaron diferencias ($P = 0,112$ a $0,794$) en la composición química del suelo debidas al tipo de cultivo (Tabla IV.5.2). Los efectos del tipo de cultivo sobre la composición química del suelo son variables, ya que algunos autores no han encontrado efectos (Kirchmann *et al.*, 2007) y otros han observado mayores contenidos en N y K en parcelas cultivadas de forma convencional que en las cultivadas de forma ecológica (Abu-Zahra y Tahboub, 2008). El efecto final del tipo de cultivo puede verse afectado por múltiples

factores, entre ellos por el tipo y cantidad de abonado aplicado, así como por las características del suelo.

Tabla IV.5.2. Características del suelo de las parcelas experimentales cultivadas de forma convencional (CON) y ecológica (ECO) tras la recolección de los cultivos de avena y centeno en julio de 2009

Item	Avena				Centeno			
	CON	ECO	EEM ¹	P	CON	ECO	EEM ¹	P
pH en agua	5,83	5,79	0,121	0,827	5,88	5,50	0,099	0,112
pH en KCl	5,16	4,88	0,131	0,206	4,64	4,48	0,141	0,467
Nitrógeno (g/kg)	1,80	1,16	0,110	0,015	1,33	1,22	0,095	0,447
Fósforo (mg/kg)	45,3	36,8	2,75	0,096	59,0	46,9	4,82	0,151
Contenido en cationes(cmol+)/kg)								
Sodio	0,033	0,013	0,0109	0,252	0,010	0,013	0,0019	0,288
Calcio	2,96	2,17	0,291	0,128	2,20	1,78	0,243	0,289
Magnesio	0,687	0,523	0,0682	0,166	0,510	0,380	0,0502	0,141
Potasio	0,433	0,440	0,035	0,899	0,500	0,377	0,0549	0,187
Contenido en oligoelementos (mg/kg)								
Hierro	138	44,5	14,0	0,009	127	131	11,9	0,794
Manganeso	9,03	8,50	0,497	0,488	7,86	9,28	1,56	0,555
Cobre	0,327	0,257	0,0159	0,036	0,203	0,350	0,115	0,418
Zinc	1,46	1,01	0,165	0,126	1,18	1,28	0,217	0,768

¹ EEM: error estándar de la media.

Las muestras de avena y centeno cultivadas de forma convencional mostraron un mayor ($P < 0,001$ a $0,022$) contenido en PB que las cultivadas de forma ecológica en los dos muestreos realizados (Tabla IV.5.1). Los forrajes de cultivo convencional presentaron también un menor ($P = 0,007$ a $0,017$) contenido en FND y FAD que los de cultivo ecológico, con la excepción de la avena producida en mayo de 2009. En este caso, se observó un mayor ($P = 0,045$) contenido en FND en las muestras convencionales que en las ecológicas y no existieron diferencias ($P = 0,776$) en el contenido en FAD. Los forrajes de cultivo convencional recogidos en mayo presentaron una menor ($P < 0,05$) lignificación de la pared celular (relación lignina/FND) que los ecológicos, pero no se observaron diferencias ($P > 0,05$) en los forrajes recogidos en julio. De acuerdo con nuestros resultados, numerosos autores

(Mazzoncini *et al.*, 2007; Mäder *et al.*, 2007; Ingver *et al.*, 2008) han observado menores contenidos en PB en diferentes cultivos ecológicos comparados con sus homólogos convencionales, y este efecto se ha atribuido a un menor contenido en N en el suelo de los cultivos ecológicos (Berry *et al.*, 2002; Casagrande *et al.*, 2009). Las diferencias en el contenido en FND y FAD podrían deberse a la mayor presencia de plantas adventicias en los cultivos ecológicos, ya que éstos no recibieron tratamiento con herbicida.

Como puede observarse en la Tabla IV.5.3, no se observaron diferencias ($P = 0,141$ a $0,885$) debidas al tipo de cultivo en la digestibilidad *in vitro* de las muestras de avena. Por el contrario, las muestras de centeno de cultivo convencional del corte de julio presentaron mayores ($P < 0,05$) valores de DMS, DVMS y DFND que las de cultivo ecológico, y las muestras del corte de mayo tendieron ($P < 0,10$) a mostrar mayores valores de DMS y DVMS. Estos resultados concuerdan con los obtenidos al analizar la DEMO estimada a partir de la cinética de producción de gas (Tabla IV.5.4), ya que se obtuvieron mayores valores ($P < 0,001$ a $0,002$) para las muestras convencionales que para las ecológicas, con la excepción de las muestras de avena recogidas en mayo en las que no se observaron diferencias ($P = 0,192$).

Tabla IV.5.3. Digestibilidad *in vitro* (%) de avena y centeno cultivados en sistemas de producción convencional y ecológica

Cereal	Época de corte	Sistema de cultivo	Digestibilidad <i>in vitro</i> ¹		
			DMS	DVMS	DFND
Avena	Mayo	Convencional	69,1	75,5	52,4
		Ecológico	70,3	73,4	52,4
		EEM ²	2,66	2,53	3,04
		<i>P</i> =	0,760	0,576	0,986
	Julio	Convencional	57,3	64,1	47,2
		Ecológico	56,5	64,4	46,4
		EEM ²	1,71	1,49	1,50
		<i>P</i> =	0,801	0,886	0,708
Centeno	Mayo	Convencional	56,3	61,7	34,9
		Ecológico	52,8	58,2	35,5
		EEM ²	0,95	0,94	1,62
		<i>P</i> =	0,057	0,058	0,799
	Julio	Convencional	54,4	61,2	37,8
		Ecológico	47,7	54,0	32,0
		EEM ²	1,25	0,85	1,78
		<i>P</i> =	0,020	0,004	0,082

¹ DMS: digestibilidad *in vitro* de la materia seca. DVMS: digestibilidad *in vitro* verdadera de la materia seca. DFND: digestibilidad *in vitro* de la fibra neutro detergente.

² EEM: error estándar de la media.

Tabla IV.5.4. Parámetros de la cinética de producción de gas de avena y centeno cultivados en sistemas de producción convencional y ecológica

Cereal	Época de corte	Sistema de cultivo	Parámetros ¹				
			A	c	lag	RMPG	DEMO
Avena	Mayo	Convencional	333	0,0331	0,50	7,77	35,6
		Ecológico	324	0,0355	0,34	8,16	36,6
		EEM ²	5,0	0,00065	0,089	0,169	0,52
		P =	0,232	0,021	0,225	0,112	0,192
	Julio	Convencional	326	0,0269	0,96	6,09	28,3
		Ecológico	315	0,0241	0,85	5,33	25,7
		EEM ²	3,1	0,00058	0,114	0,119	0,500
		P =	0,002	0,003	0,523	< 0,001	0,002
Centeno	Mayo	Convencional	300	0,0298	0,004	6,46	30,2
		Ecológico	303	0,0252	0,003	5,49	26,7
		EEM ²	6,7	0,00048	0,0031	0,184	0,356
		P =	0,778	< 0,001	0,709	< 0,001	< 0,001
	Julio	Convencional	327	0,0307	0,75	7,03	30,0
		Ecológico	323	0,0247	0,40	5,67	25,4
		EEM ²	3,2	0,00042	0,062	0,131	0,421
		P =	0,370	< 0,001	0,001	< 0,001	< 0,001

¹ A: producción potencial de gas (mL); c: ritmo de producción de gas (h⁻¹); lag: tiempo de retraso (h); RMPG: ritmo medio de producción de gas (mL/h); DEMO: degradabilidad efectiva de la materia orgánica para un ritmo de paso de 0,040 h⁻¹ (%).

² EEM: error estándar de la media.

Las muestras producidas de forma convencional presentaron un mayor ($P < 0,05$) ritmo de producción de gas (c) y RMPG que las ecológicas, con la excepción de la avena recogida en mayo. El mayor ritmo de producción de gas indicaría un mayor ritmo de fermentación ruminal, ya que existe una relación positiva entre ambos parámetros (Menke y Steingass, 1988).

Tabla IV.5.5. Concentración de N amoniacal (NH₃-N; mg/L), pH final, producción de ácidos grasos volátiles (AGV; μmol), proporción molar de los principales AGV (mol/ 100 mol) y relación acético/propiónico (Ac/Pr; mol/mol) tras la incubación de muestras de avena y centeno cultivadas en sistemas de producción convencional (CON) y ecológica (ECO)

Cereal	Época de corte	Sistema de cultivo	NH ₃ -N	pH	Total AGV	Proporción molar ¹				
						Ac	Pr	But	Otros	Ac/Pr
Avena	Mayo	CON	251	6,71	2359	63,6	25,3	9,70	1,44	2,51
		ECO	248	6,70	2564	64,7	24,7	9,22	1,36	2,62
		EEM ²	3,6	0,006	38,6	0,43	0,23	0,189	0,083	0,069
		<i>P</i> =	0,526	0,317	0,001	0,068	0,104	0,086	0,399	0,062
	Julio	CON	287	6,58	1812	68,1	20,9	7,95	3,07	3,26
		ECO	267	6,48	1768	67,8	21,4	7,76	3,14	3,17
		EEM ²	3,9	0,013	39,9	0,17	0,15	0,094	0,060	0,049
		<i>P</i> =	0,002	0,123	0,445	0,144	0,182	0,244	0,369	0,001
Centeno	Mayo	CON	268	6,74	2277	64,0	25,5	8,86	1,60	2,51
		ECO	250	6,77	2034	64,4	25,9	8,83	0,87	2,49
		EEM ²	3,4	0,006	39,6	0,53	0,28	0,214	0,097	0,078
		<i>P</i> =	0,002	0,110	< 0,001	0,621	0,363	0,935	< 0,001	0,787
	Julio	CON	271	6,52	1823	64,6	21,5	10,5	3,43	3,00
		ECO	268	6,57	1730	65,0	21,3	10,8	2,91	3,05
		EEM ²	3,5	0,004	40,7	0,19	0,15	0,09	0,042	0,043
		<i>P</i> =	0,517	0,132	0,126	0,197	0,482	0,331	< 0,001	0,181

¹ Ac: acético; Pr: propiónico; Bt: butírico; Otros: suma de los ácidos isobutírico, isovalérico y valérico.

² EEM: error estándar de la media.

No se observaron diferencias en la producción total de AGV (Tabla IV.5.5) en los forrajes recogidos en julio, pero la producción de AGV fue mayor ($P < 0,001$) en las muestras de centeno recogidas en mayo cultivadas de forma convencional que en las ecológicas. Por el contrario, cuando se incubaron las muestras de avena convencional obtenidas en mayo se observó una menor ($P = 0,001$) producción de AGV que la obtenida con las muestras ecológicas. Estos resultados reflejan una mayor producción de AGV en las muestras que presentaban un menor contenido en FND. En general, no se detectaron diferencias ($P > 0,05$) debidas al sistema de cultivo en las proporciones molares de los principales AGV (acético, propiónico y butírico), lo que indicaría

que los patrones de fermentación fueron similares para ambos tipos de cultivos. Las mayores ($P < 0,001$) proporciones de otros AGV (calculados como la suma de los ácidos isobutírico, isovalérico y valérico) observadas para el centeno convencional en comparación con el ecológico se deberían al mayor contenido en PB de las muestras convencionales, ya que algunos de estos AGV minoritarios se producen como consecuencia de la degradación de algunos aminoácidos de cadena ramificada. El mayor contenido en PB en las muestras convencionales justificaría también el hecho de que la concentración de N amoniacal fuera mayor en los cultivos *in vitro* de las muestras convencionales que en las ecológicas para la avena recogida en julio y el centeno recogido en mayo (Tabla IV.5.5).

IV.5.4. Conclusiones

Los resultados de este estudio indican que el cultivo ecológico produjo una reducción de la producción de MS de avena y centeno en comparación con el cultivo convencional, así como una disminución del contenido en PB del forraje y un aumento de su contenido en FND y FAD. Estos cambios en la composición química se reflejaron en cambios en el ritmo de fermentación, que fue menor para los forrajes ecológicos que para los convencionales, pero apenas existieron modificaciones en el patrón de fermentación debidas al tipo de cultivo de los forrajes. Mejoras en el aporte de N en el abonado de las parcelas ecológicas podrían producir un aumento de la producción y del contenido proteico de los cereales forrajeros producidos en condiciones ecológicas, tal y como ha sido sugerido por otros autores.

IV.5.5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Castilla y León (Proyecto LE19A08). Deseamos expresar nuestro más sincero agradecimiento a D. Alonso Santos de Pedro por ceder las parcelas experimentales para este estudio y por su inestimable ayuda en el desarrollo de este trabajo.

IV.5.6. Referencias bibliográficas

Abu-Zahra TR, Tahboub AB. 2008. Effect of organic matter sources on chemical properties of the soil and yield of strawberry under organic farming conditions. World Applied Sciences Journal 5, 383-388.

- ANKOM. 1998. Procedures for fibre and *in vitro* analysis. Accesible en www.ankom.com.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1999. Official Methods of Analysis. 16th Edition, 5th revision. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- Berry PM, Sylvester-Bradley R, Philipps L, Hatch DJ, Cuttle SP, Rayns FW, Goslin P, 2002. Is the productivity of organic farms restricted by the supply available nitrogen?. *Soil Use and Management* 18, 248–255.
- Casagrande M, David C, Valantin-Morison M, Makowski D, Jeuffroy MH. 2009. Factors limiting the grain protein content of organic winter wheat in south-eastern France: a mixed-model approach. *Agronomy for Sustainable Development* 29, 565–574.
- Cavigelli MA, Teasdale JR, Conklin AE. 2008. Long-term agronomic performance of organic and conventional field crops in the mid-atlantic region. *Agronomic Journal* 100, 785-794.
- Diario Oficial de la Unión Europea. 2007. Reglamento (CE) No 834/2007 del Consejo de 28 de junio de 2007 sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CEE) no 2092/91.
- Goering HK, Van Soest PJ. 1970. Forage Fiber Analyses: Apparatus, Reagents, Procedures, and some Applications. In: *Agriculture Handbook*. Agricultural Research Service, U.S. Dept. of Agriculture, Washintong, DC, USA.
- González V. 2007. Organic Farming in Spain. 2007. In: *The Organic Europe Homepage* www.organic-europe.net, FiBL, CH-Frick. Accesible en http://www.organic-europe.net/country_reports/spain/default.asp.
- Ingver A, Tamm I, Tamm Ü. 2008. Effect of organic and convencional production on yield and the quality of spring cereals. *Latvian Journal of Agronomy* 11, 61-67.
- Kirchmann H., Bergström L, Kätterer T, Mattsson L, Gesslein S. 2007. Comparison of long-term organic and conventional crop–livestock systems on a previously nutrient-depleted soil in Sweden. *Agronomic Journal* 99, 960-972.
- Mäder P, Hahn D, Dubois D, Gunst L, Alföldi T, Bergmann H, Oehme M, Amado R, Schneider H, Graf U, Velimirov A, Fließbach A, Niggli U. 2007.

- Wheat quality in organic and conventional farming: results of a 21 year field experiment. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87,1826 –1835.
- Mazzoncini M, Belloni P, Risaliti R, Antichi D. 2007. Organic Vs Conventional winter wheat quality and organoleptic bread test. In: Proceedings of the 3rd QLIF Congress. Hohenheim, Germany, 135 – 138.
- Menke KH, Steingass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 28, 7 - 55.
- Olsen SR, Cole CV, Watanabe FS, Dean LA. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. U.S. Department of Agriculture Circular 939. U.S. Govt. Printing Office, Washington, DC, USA.
- Ross GJ, Wang C. 1993. Extractable Al, Fe, Mn, and Si. In: M.R. Carter (ed.) *Soil sampling and methods of analysis*. Lewis Publ., Boca Raton, FL, USA, 239 - 246.
- Tamm L, Köpke U, Cohen Y, Tamm CL. 2007. Development of strategies to improve quality and safety and reduce cost of production in organic and 'low input' crop production systems. In: Proceedings of the 3rd QLIF Congress. Hohenheim, Germany, 151 – 154..
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583-3597.
- Weatherburn MW. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry* 39, 971-974.

**IV.6- Prueba 6: Nutritive value for ruminants of
winter oats–legume intercrops in organic
cultivation**

Nutritive value for ruminants of winter oats–legume intercrops in organic cultivation

Alexey Díaz^{AD}, María Dolores Carro^{BE}, Carlos Palacios^C, Iván Mateos^{AD},
Cristina Saro^A, María Luisa Tejido^D and María José Ranilla^{AD}

^A*Dept Producción Animal, Universidad de León. 24007 León, Spain*

^B*Dept Producción Animal, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria,
28040 Madrid, Spain*

^C*Dept Construcción y Agronomía, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca,
Spain*

^D*Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas, 24346 Grulleros,
León, Spain*

^E*Corresponding author. Email: mariadolores.carro@upm.es*

Short title: Organic cultivation of cereal-legume intercrops

Publicado en: *Animal Production Science*, 2014, **54**, 1791–1795

<http://dx.doi.org/10.1071/AN14385>

Abstract

Winter oats was grown according to European organic farming regulations in monoculture (oats) and in intercropping with bard vetch (BAV), bitter vetch (BIV) or both legumes (MIX) to evaluate the effects of intercropping on forage yield and nutritive value for ruminants. The experiment was carried out as a randomized complete block design with four replications, and whole forage samples were obtained at two harvest dates (June and July). For both harvest times, all intercrops increased ($P < 0.05$) forage yield compared with oats, but forage crude protein content was only increased ($P < 0.05$) for BAV and MIX. Compared with oats, intercropping with BAV increased ($P < 0.05$) *in vitro* rate of gas production and total volatile fatty acid production, indicating a higher rate and extent of rumen degradation of BAV forage. In contrast, BIV forage harvested in June had lower ($P < 0.05$) rate of gas production and total volatile fatty acid production than June-oats, but in general no differences in the *in vitro* rumen fermentation were detected between oats and BIV samples harvested in July. The results indicate that forage yield and quality can be enhanced by intercropping oats with bard vetch; however, intercropping with bitter vetch increased yield but decreased nutritive value of the forage.

IV.6.1. Introduction

In the European countries organic livestock must be fed with organic feed to meet the EU regulations on organic farming (Council Regulation (EC) No. 834/2007). Moreover, the EU regulation establishes that rearing systems for herbivores have to be based on maximum utilization of grazing pasture according to the availability of pastures in the different periods of the year, and that at least 60 % of the dry matter in their daily rations shall consist of roughage. Organic farming in Spain has increased considerably over the past decade, and cereals and legumes are the main crops (MAGRAMA, 2013). However, the productivity of crops in organic farming has frequently been shown to be lower compared to conventional farming (Kitchen *et al.*, 2003; Tejido *et al.* 2010, 2011). In addition, previous results indicate that organic cultivation of winter cereals reduced forage crude protein (CP) content compared with conventional cultivation system (Tejido *et al.* 2010, 2011).

Intercropping of winter cereals with legumes can provide higher forage yield and quality than a winter cereal monoculture, but the choice of legume species affects the yield and quality advantages (Mariotti *et al.* 2006). In addition, the

features of intercropping systems differ with soil, local climate and preferences of the local farmers (Steiner, 1982). Another major problem with intercropping is determining the optimal harvest time because the growth cycle of consociated species is often not synchronized (Mariotti et al. 2006). The objective of this study was to assess the potential of winter oats (*Avena sativa* L.)-legume intercropping to enhance forage yield and quality as compared with oats as a monoculture when crops were grown according to European organic farming regulations. The legumes chosen were bard vetch (*Vicia articulata* Hormen) and bitter vetch (*Vicia ervilia*) as they are widely cultivated in the study area, and two harvest times (June and July) were investigated.

IV.6.2. Material and methods

IV.6.2.1. Experimental design and cultivars

The study was carried out in the province of Zamora, located in the north-west of Spain (41° 25' N, 6° 16' W). The climate is semi-arid, with cold winters, hot summers and low rainfall. The experimental plots were established on a sandy loam, acid and low fertility soil that had been organically cultivated for 2 years and was fallow for one year prior to the commencement of the study. The study area was divided in 16 subplots (60 m² each) with four treatments and four replicates in a RCBD. Winter oats was grown in monoculture (oats) and in intercropping with bard vetch (BAV), bitter vetch (BIV) or both legumes (MIX) to evaluate the effects of intercropping on forage yield and nutritive value for ruminants. On 8 October 2012 organic seeds were sown in all plots using a seed drill at a rate of 230 kg/ha. The proportions of oat seeds:bard vetch seeds:bitter vetch seeds in the cultivars in intercropping were 85:15:0 for BAV, 90:0:10 for BIV and 80:10:10 for MIX. These proportions were selected to be representative of those used by local farmers. No herbicide or fertilizer treatment was applied to the cultivars in accordance with European organic farming regulations.

Whole-plant yield was determined on 7 June 2013 (vegetative state) and 10 July 2013 (reproductive stage) by manually cutting four x 1 m² areas in each plot at a height of three centimeters above ground level. Samples were dried in the laboratory to estimate forage dry matter (DM) production before being bulked and ground through a 1mm sieve for determination of chemical composition and *in vitro* incubations.

IV.6.2.2. In vitro incubations

Ruminal fluid was obtained from four rumen-cannulated Merino sheep fed 800 g of grass hay and 200 g of concentrate per day administered in two equal portions at 08:00 and 20:00 h. Sheep were managed according to the protocols approved by the León University Institutional Animal Care and Use Committee. Ruminal contents of each sheep were obtained immediately before the morning feeding, mixed and strained through four layers of cheesecloth into an Erlenmeyer flask with an O₂-free headspace. Particle-free fluid was mixed with the buffer solution of Goering and Van Soest (1970; no trypticase added) in a proportion 1:4 (vol/vol) at 39°C under continuous flushing with CO₂.

To estimate the fermentation kinetic parameters, samples of 500 mg of dry matter (DM) of each forage were accurately weighed into 120-mL serum bottles. Bottles were prewarmed (39°C) prior to the addition of 50 mL of buffered rumen fluid into each one under CO₂ flushing, sealed with butyl rubber stoppers and aluminium caps and incubated at 39°C. A total of 32 bottles with substrate (one bottle per forage) and 2 without substrate (blanks) were incubated for 144 hours. Gas production was measured at 3, 6, 9, 12, 16, 21, 26, 31, 36, 48, 60, 72, 96, 120 and 144 hours using a pressure transducer and a calibrated syringe and the gas produced was released after each measurement. After 144 hours of incubation, the fermentation was stopped by swirling the bottles in ice and the bottles were opened and their content was transferred to previously weighed filter crucibles. The residue of incubation was washed with 50 mL of hot distilled water (50°C), dried at 50°C for 48 hours and the apparent disappearance of substrate was calculated. The residue was then analysed for ash to calculate the organic matter (OM) apparent disappearance after 144 hours of incubation (OMD₁₄₄). Incubations were repeated four times on different days.

In vitro fermentation characteristics of forages were assessed in 24 hours incubations. A total of 32 bottles containing 400 mg of forage (one bottle per each forage) and 2 bottles without substrate (blanks) were filled with 40 mL of buffered rumen fluid, sealed and incubated at 39°C. After 24 hours of incubation, bottles were uncapped, the pH was measured immediately with a pH-meter, 0.5 mL of fluid were added to 0.8 mL of deproteinizing solution (100 g of metaphosphoric acid and 0.6 g of crotonic acid per L) for volatile fatty acid (VFA) analysis and 0.5 mL were added to 0.5 mL 0.5 M HCl for NH₃-N determination. Incubations were repeated four times on different days.

In order to determine *in vitro* digestibility, samples of each forage (400 mg) were weighed into artificial fibre bags (#F57 bags; 50 x 40 mm; $25 \pm 10 \mu\text{m}$ pore size; ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, USA). Bags were heat sealed and incubated with buffered rumen fluid in the ANKOM *in vitro* fermentation system Daisy II (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, USA) for 48 hours. Bags were then washed in cold tap water for 5 minutes and extracted with boiling neutral detergent solution for 1 h (Van Soest et al. 1991) using an ANKOM²²⁰ Fibre Analyser unit. Finally, the bags were washed with distilled water and dried at 60°C to determine true *in vitro* dry matter degradability TMD, ; Van Soest et al. 1966) and NDF degradability (NDFD). For replication, the complete procedure was repeated three times ($n = 3$).

IV.6.2.3. Calculations, analytical procedures and statistical analyses

Gas production values were corrected for the amount of gas produced in the blanks and the values were fitted with time to the exponential model $y = A (1 - e^{-c(t-lag)})$, where A is the asymptotic gas production (mL/g), c is the fractional rate of gas production (%/hour), lag is the initial delay in the onset of gas production (hour) and t is the gas reading time. The parameters A, c and lag were estimated by an iterative least squares procedure using the NLIN procedure of SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA). The effective degradability of diet organic matter (OMED; %) was estimated assuming a rumen particulate outflow (Kp) of 0.035 per hour, characteristic for sheep fed forages at maintenance level (Ranilla et al. 1998), according to the equation proposed by France et al. (2000): $OMED = [(OMD_{144} - c)/(c + Kp)] e^{-c \cdot lag}$. The average gas production rate (AGPR; mL gas/hour) was defined as the average gas production rate between the start of the incubation and the time at which the cumulative gas production was half of its asymptotic value, and was calculated as $AGPR = A c / [2 (\ln 2 + c \cdot lag)]$.

Dry matter, ash and nitrogen (N) were determined according to the Association of Official Analytical Chemists (1999). Analyses of VFA and ammonia-N have been described by Carro and Miller (1999). Neutral-detergent fibre, acid-detergent fibre (ADF) and acid-detergent lignin analyses were carried out according to Van Soest et al. (1991) and Goering and Van Soest (1970), respectively.

When data were analyzed across harvest times, cultivar x harvest time interactions ($P < 0.05$) were detected for some parameters. Therefore, data were analysed independently for each harvest time by ANOVA using the MIXED

Procedure of SAS. The effect of cultivar was considered fixed and the effect of rumen inocula (replicates) was considered random. When a significant ($P < 0.05$) difference between cultivars was detected, means were separated by Tukey's test.

IV.6.3. Results

Intercropping of oats with BAV, BIV and MIX resulted in significantly greater forage DM yield at both harvest times, but differences between intercrops were not significant (Table IV.6.1). No significant differences ($P > 0.05$) between cultivars were detected in organic matter (OM) and lignin content, but intercropping of oats with BAV and MIX significantly increased the CP content of forage in both harvest times. Whereas no significant effects of intercropping on NDF and ADF content of the forage were detected in July, forage harvested in June from oats had greater NDF content than that harvested from BAV and lower NDF and ADF content than that from BIV. Compared with oats, both BIV and MIX intercrops decreased TDMD and NDFD of the forage harvested in June. In contrast, no differences among cultivars in TDMD and NDFD were detected in July.

The parameters of gas production kinetics for each cultivar are shown in Table IV.6.2. Intercropping of oats with BAV increased the rate of gas production, AGPR and OMED in both harvest times and decreased lag time in June. Intercropping of oats with BIV decreased the rate of gas production, AGPR and OMED in June, but had no effect on gas production kinetics of the forage cut in July. Intercropping of oats with MIX showed little effects, as only increased the rate of gas production and the AGPR in the forage harvested in June.

Table IV.6.1. Dry matter (DM) yield, chemical composition, true *in vitro* DM degradability (TDMD) and neutral detergent fibre degradability (NDFD) of forage from winter oats as sole crop (oats) and in intercropping with bard vetch (BAV), bitter vetch (BIV) or both legumes (MIX) and harvested in June or July

Harvest time	Item	Oats	BAV	BIV	MIX	SEM	P value
June	DM yield (t/ha)	1.80 ^A	2.52 ^B	2.61 ^B	2.53 ^B	0.153	0.009
	Chemical composition (g/100 g DM)						
	Organic matter	93.7	94.1	93.3	94.0	0.53	0.735
	Crude protein	3.69 ^A	6.91 ^B	3.78 ^A	6.34 ^B	0.331	<0.001
	Neutral detergent fibre	58.0 ^B	52.2 ^A	61.6 ^C	57.5 ^B	0.70	<0.001
	Acid detergent fibre	31.6 ^A	30.3 ^A	35.1 ^B	32.4 ^A	0.58	<0.001
	Lignin	5.04	5.91	6.59	6.67	0.587	0.230
	TDMD (%)	71.8 ^C	72.1 ^C	64.0 ^A	68.1 ^B	1.04	<0.001
	NDFD (%)	51.4 ^C	46.6 ^{BC}	41.6 ^A	43.1 ^{AB}	1.80	<0.001
July	DM yield (t/ha)	1.60 ^A	2.27 ^B	2.39 ^B	2.53 ^B	0.150	0.009
	Chemical composition (g/100 g DM)						
	Organic matter	93.8	94.4	94.3	95.4	0.52	0.264
	Crude protein	3.62 ^A	6.57 ^B	3.86 ^A	5.18 ^B	0.357	<0.001
	Neutral detergent fibre	59.3	56.3	60.3	57.9	1.19	0.146
	Acid detergent fibre	33.6	33.7	33.9	33.2	0.95	0.964
	Lignin	5.67	6.62	5.82	5.27	0.527	0.364
	TDMD (%)	68.6	69.5	66.9	67.2	1.37	0.207
	NDFD (%)	47.1	45.8	45.1	43.3	2.35	0.545

A, B, C means in the same row not sharing a common superscript differ (P<0.05)

Table IV.6.2. Parameters of gas production kinetics and organic matter effective degradability (OMED) of winter oats as sole crop (oats) and in intercropping with bard vetch (BAV), bitter vetch (BIV) or both legumes (MIX), harvested in June or July, and incubated *in vitro* in batch cultures of rumen micro-organisms

Harvest time	Item*	oats	BAV	BIV	MIX	SEM	P value
June	A (mL/g DM)	210 ^C	190 ^A	205 ^{BC}	198 ^{AB}	5.91	<0.001
	c (%/hour)	0.019 ^B	0.025 ^D	0.016 ^A	0.022 ^C	0.0011	<0.001
	Lag (hours)	0.85 ^{AB}	0.42 ^A	1.51 ^B	1.09 ^{AB}	0.435	<0.001
	AGPR (mL/hour)	2.75 ^B	3.42 ^D	2.28 ^A	3.13 ^C	0.152	<0.001
	OMED (%)	23.4 ^B	27.9 ^C	19.5 ^A	24.5 ^B	0.95	<0.001
July	A (mL/g DM)	211 ^B	190 ^A	207 ^B	205 ^B	6.38	<0.001
	c (%/hour)	0.017 ^A	0.021 ^B	0.018 ^A	0.018 ^A	0.0011	<0.001
	Lag (hours)	2.40	1.89	2.53	2.57	0.521	0.231
	AGPR (mL/hour)	2.38 ^A	2.75 ^B	2.44 ^A	2.43 ^A	0.133	<0.001
	OMED (%)	19.9 ^A	22.8 ^B	19.9 ^A	20.0 ^A	0.95	<0.001

* see text for significance of parameters

A, B, C means in the same row not sharing a common superscript differ (P<0.05)

Table IV.6.3 shows the rumen fermentation parameters after *in vitro* incubation of samples from each cultivar with buffered rumen fluid from sheep. Final pH in the *in vitro* cultures ranged from 6.80 to 6.91 in June and from 6.89 to 6.94 in July (results not shown), and differences between oats and intercrops were only observed in June, when *in vitro* cultures with BIV showed greater pH values than those with oats. Total VFA production of BAV was 11 and 13% greater than that of oats for June and July samples, respectively. In addition, propionate and butyrate production for June-BAV was greater than that for June-oats, and acetate, butyrate and others (isobutyrate, isovalerate and valerate)

production for July-BAV was greater than that for July-oats. Both acetate/propionate ratio and ammonia-N concentrations were greater for BAV than for oats in July. Compared with oats, BIV produced lower amounts of both total VFA and propionate in June, but no differences were detected in July. *In vitro* fermentation of MIX harvested in June resulted in lower amounts of total VFA, acetate and propionate compared with June-oats, but fermentation of MIX harvested in July produced more butyrate and other VFA (sum of isobutyrate, isovalerate and valerate) than fermentation of July-oats.

Table IV.6.3. Production of volatile fatty acid (VFA), acetate:propionate ratio (Ac/Pr) and ammonia-N concentrations of winter oats as sole crop (oats) and in intercropping with bard vetch (BAV), bitter vetch (BIV) or both legumes (MIX), harvested in June or July, and incubated *in vitro* in batch cultures of rumen micro-organisms

Harvest time	Item	oats	BAV	BIV	MIX	SEM	P value
June	VFA production (μmol)						
	Total VFA	1510 ^B	1678 ^C	1355 ^A	1372 ^A	79.5	<0.001
	Acetate	1020 ^{bC}	1104 ^c	939 ^{AB}	917 ^A	70.9	<0.001
	Propionate	362 ^B	408 ^C	288 ^A	321 ^A	20.6	0.002
	Butyrate	85.8 ^{AB}	126.0 ^c	81.8 ^A	98.6 ^B	8.12	<0.001
	Others*	42.1 ^{AB}	39.9 ^{AB}	45.6 ^B	36.3 ^A	4.69	0.049
	Ac/Pr (mol/mol)	2.86 ^A	2.72 ^A	3.33 ^B	2.86 ^A	0.155	<0.001
Ammonia-N (mg/L)	181.8	177.8	169.5	171.9	8.51	0.171	
July	VFA production (μmol)						
	Total VFA	1275 ^A	1441 ^B	1241 ^{AB}	1348 ^{AB}	55.2	<0.001
	Acetate	887 ^{AB}	1007 ^C	863 ^A	935 ^B	38.0	<0.001
	Propionate	272 ^{AB}	291 ^B	257 ^A	273 ^{AB}	11.6	<0.001
	Butyrate	81.4 ^A	96.3 ^C	85.8 ^{AB}	96.0 ^{BC}	5.61	<0.001
	Others*	35.3 ^A	47.8 ^B	35.1 ^A	44.7 ^B	2.35	<0.001
	Ac/Pr (mol/mol)	3.33 ^A	3.51 ^B	3.42 ^{AB}	3.49 ^B	0.065	<0.001
Ammonia-N (mg/L)	201.6 ^A	221.7 ^B	197.7 ^A	207.8 ^A	6.07	<0.001	

* calculated as the sum of isobutyrate, isovalerate and valerate

A, B, C means in the same row not sharing a common superscript differ ($P < 0.05$)

IV.6.4. Discussion

Oat is a popular cereal forage in cool semiarid regions and the legumes chosen for the study are widely cultivated in the study area. Different seeding ratios of oats:legume were used for each cultivar (85:15:0 for BAV, 90:0:10 for BIV and 80:10:10 for MIX) to replicate the seeding ratios traditionally used by local farmers. The forage produced from these cultivars is being used in practical sheep feeding without having actual research-based information about its nutritive value. Therefore, this study was conducted to analyse the nutritive value of the forage produced under farmers' conditions at two harvest times. It should be noted, however, that seeding ratio may affect yield and quality of forage produced by cereal-legume mixtures (Caballero *et al.* 1995; Lithourgidis *et al.* 2006) and results of this study therefore need to be interpreted with caution.

Forage DM yield was increased by 39, 45 and 41% in June for BAV, BIV and MIX, respectively, and by 42, 49 and 58% in July, compared with oats as monoculture. These results confirm previous findings that intercropping winter cereals with legumes can increase forage yield (Moreira, 1989; Carr *et al.*, 2004; Mariotti *et al.* 2006). Carr *et al.* (2004) found that intercropping barley and oats with peas increased forage DM yield by 21 and 19%, respectively, compared with the corresponding cereal as monoculture, and Mariotti *et al.* (2006) reported that intercropping of wheat and barley with vetch increased forage DM yield by 85 and 60%, respectively.

However, other studies (Anil *et al.* 1998; Lauriault and Kirsey, 2004) have reported a lack of effects of winter cereals:legume intercropping on forage yield, indicating that the effects of intercropping are influenced by many factors, with soil characteristics and cultivar selection being two of the most important. Moreira (1989) observed that under N-deficient conditions intercropping oats with vetch increased forage DM yield and CP and mineral content, but when crop N nutrition was adequate, there was only a small increase in yield and nutritive value of forage. In the current study there were no differences between the three intercropped cultivars in forage DM yield at any harvest date.

Forage CP content was greater in BAV and MIX than in BIV and oats at both harvest times. The greater oats:legume seeding ratio used in BIV (90:10) compared with BAV (85:15) and MIX (80:20) may have contributed to the low CP content of BIV forage, which was similar to that in oats. In addition, BIV forage in June had the greatest NDF and ADF content and the lowest TDMD, indicating low quality. The lower gas production rate, AGDR and OMED observed for BIV compared with oats would indicate that June BIV forage may be degraded in the

rumen at a lower rate than oats forage. This was confirmed by *in vitro* total VFA production, which was 10.3% lower for BIV compared with oats forage. In contrast, no differences between oats and BIV forage in chemical composition and *in vitro* degradability were observed in July. The lack of effects of intercropping oats with BIV on chemical composition of July-harvested forage agrees well with the similar parameters of gas production kinetics and VFA production observed for both forages when they were incubated *in vitro* with buffered ruminal fluid. These results indicate that quality of BIV forage was higher in July than in June when compared with oats forage harvested at the same dates; other studies (Lauriault and Kirsey, 2004; Dear *et al.* 2005) have also reported the influence of harvesting times on the comparison of forage quality in cereal monocultures and cereal:legume mixtures.

Concentrations of CP in oats forage in monoculture in our study were similar to the 37 - 54 g of CP/kg DM reported by Moreira (1989) for the same species under low N inputs and low available soil N. As expected, forage CP concentrations were greater in BAV and MIX than in oats forage. Many studies (Moreira, 1989; Carr *et al.*, 2004; Dear *et al.* 2005; Mariotti *et al.* 2006) have shown that CP content of forage is enhanced by intercropping cereals with legumes compared with cereal monocrops, which is attributed to the ability of legumes to fix atmospheric nitrogen. The effects of intercropping cereals with legumes are expected to be greater under N-deficient conditions (Moreira, 1989), such as those in organic farming due to N fertilization limitations imposed by EU regulations. In addition, the gas production kinetics parameters measured in our study indicate that BAV forage from both harvest times had greater degradation rates than oats forage. This was confirmed by the greater production of total VFA compared with oats (11 and 13% greater in June and July, respectively), indicating a better quality of BAV forage. Moreover, the greater gas production rate observed for BAV compared with oats would indicate a higher degradation rate in the rumen, which may result in higher intake rate for this forage as degradation rate is directly related to passage rate and voluntary DM intake (Carro *et al.* 1991). Chemical composition, parameters of gas production kinetics and *in vitro* fermentation parameters of MIX forage were in general intermediate between those for BIV and BAV. The results indicate that MIX forage quality was similar or even slightly lower than that of BAV, despite a oats:legume seeding ratio greater than BAV (80:20 vs. 85:15).

In conclusion, under the seeding ratios and cultivation conditions of our study and the restrictions imposed by the EU organic farming regulations, intercropping of oats with BAV was the best choice of the intercrops tested to increase forage

yield and CP content. Furthermore, the results indicate that rate and extent of rumen degradation were highest for BAV forage at both harvest times. Our results also indicate that the effects of intercropping can be affected by harvest time, as quality was lower for forage harvested in June compared to July. These results should be confirmed in multi-year studies before drawing up guidelines for organic farmers. In addition, lower oats:legume seeding ratios should be investigated to find the optimal ratio to achieve both better forage yield and quality.

IV.6.5. Acknowledgments

This work was funded by Junta de Castilla y León (Project LE129A12-1). Special thanks are due to Mr Alonso Santos de Pedro for hosting the experimental trial in his farm. M.L. Tejido gratefully acknowledges a postdoctoral contract from Spanish CSIC (JAE-doc program).

IV.6.6. References

- Anil L, Park J, Phipps RH, Miller FA (1998) Temperate intercropping of cereals for forage: A review of the potential for growth and utilization with particular reference to the UK. *Forage Science* 53, 301–317.
- AOAC (1999) 'Official methods of analysis' 16th edn. 5th revision. (Association of Official Analytical Chemists International: Gaithersburg, MD).
- Caballero R, Goicoechea EL, Hernaiz PJ (1995) Forage yields and quality of common vetch and oat sown at varying seeding ratios and seeding rates of vetch. *Field Crops Research* 41, 135-140.
- Carr PM, Horsley RD, Poland WW (2004) Forages. Barley, oat, and cereal-pea mixtures as dryland forages in the northern great plains. *Agronomy Journal* 96, 677-684.
- Carro MD, López S, González JS, Ovejero FJ (1991) The use of the rumen degradation characteristics of hay as predictors of its voluntary intake by sheep. *Animal Production* 52, 133-139.
- Carro MD, Miller EL (1999) Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an *in vitro* semicontinuous culture system (Rusitec). *British Journal Nutrition* 82, 149-157.

- Dear B, Kaiser A, Piltz J (2005) Yield and digestibility of legume and oat forages. *Primefacts* 52, 1-6.
- European Communities (2007). Council Regulation (EC) No 834/2007 of 28 June 2007 on organic production and labelling of organic products and repealing Regulation (EEC) No 2092/91. *Official Journal of the European Communities*, L189 (20.7.2007), 1-23.
- France J, Dijkstra J, Dhanoa MS, Lopez S, Bannink A (2000) Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. *British Journal Nutrition* 83, 131–142.
- Goering MK, Van Soest PJ (1970) Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). In 'Agricultural Handbook, n° 379'. (Agricultural Research Services, USDA, Washington DC).
- Kitchen JL, McDonald GK, Shepherd KW, Lorimer MF, Graham RD (2003) Comparing wheat grown in South Australian organic and conventional farming systems. 1. Growth and grain yield. *Australian Journal of Agriculture Research* 54, 889–901.
- Lauriault LM, Kirsey RE (2004) Yield and nutritive value of irrigated winter cereal forage grass-legume intercrops in the sothern high plains, USA. *Agronomy Journal* 96, 352-358.
- Lithourgidis AS, Vasilakoglou IB, Dhima KV, Dordas CA, Yiakoulaki MD (2006) Forage yield and quality of common vetch mixtures with oat and triticale in two seeding ratios. *Field Crops Research* 99, 106–113.
- MAGRAMA (2013) *Agricultura Ecológica. Estadísticas 2012* (Organic Farming. Statistics 2012). Ed. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), Madrid, Spain. Available at http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/laagriculturaecologica/Estadisticas_AE_2012_ok_tcm7-297880.pdf (verified 10 March 2014).
- Mariotti M, Masoni A, Ercoli L, Arduini I (2006) Forge potential of winter cereal/legume intercrops in organic farming. *Italian Journal of Agronomy* 3, 402-412.
- Moreira N (1989) The effect of seed rate and nitrogen fertilizer on the yield and nutritive value of oat-vetch mixtures. *Journal of Agricultural Science* 112, 57-66.

- Ranilla MJ, López S, Giráldez FJ, Valdés C, Carro MD (1998) Comparative digestibility and digesta flow kinetics in two breeds of sheep. *Animal Science* 66, 389-396.
- Steiner KG (1982) *Intercropping in tropical smallholder agriculture with special reference to West Africa*. Schriftenreihe der GT2, N. 137, Eischbon, Germany.
- Tejido ML, Ranilla MJ, Palacios C, Saro C, Sosa A, Díaz A, Carro MD (2011) A comparison of the yield and nutritive value of organically and conventionally grown barley and wheat crops. *Options méditerranéennes, Serie A*. 99, 53-61.
- Tejido ML, Ranilla MJ, Saro C, Díaz A, Mateos I, Palacios C, Carro MD (2010) Estudio comparativo de la producción y valor nutritivo de dos cereales forrajeros (avena y centeno) cultivados en condiciones convencionales y ecológicas. In 'Proceedings of the IX Congress of the Spanish Society of Organic Farming'. pp. 107 (Spanish Society of Organic Farming).
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583-3597.
- Van Soest PJ, Wine RH, Moore LA (1966) Estimation of the true digestibility of forages by the *in vitro* digestion of cell walls. In 'Proceedings of the X International Grassland Congress' (Ed. A. Hill) pp. 438-441 Helsinki, Finland.

Capítulo V.- Discusión general

Debido al rápido y constante aumento de la población mundial y al aumento del poder adquisitivo en numerosos países emergentes, la demanda de alimentos de origen animal está aumentando de forma exponencial. Los animales rumiantes proporcionan una fuente importante de alimentos de elevado valor nutritivo y además son capaces de satisfacer sus necesidades nutritivas a través de la utilización de forrajes, aspecto que les confiere un alto interés zootécnico. Adicionalmente, la alimentación de los rumiantes se basa únicamente en los recursos forrajeros en un elevado número de países. Por ello, el objetivo general de esta Tesis Doctoral fue analizar estrategias para mejorar el valor nutritivo de los forrajes para la alimentación de los rumiantes. Estas estrategias se han centrado en la utilización de dos tipos de aditivos (enzimas fibrolíticas y un hidrolizado enzimático de la levadura *S. cerevisiae*) y en la mejora de la productividad y valor nutritivo de cultivos forrajeros ecológicos. En la Tesis Doctoral se llevaron a cabo seis pruebas experimentales, dos de ellas dedicadas a cada una de las estrategias analizadas.

Las dos primeras pruebas se centraron en el estudio de las enzimas fibrolíticas como aditivos para mejorar el valor nutritivo de los forrajes. En las dos pruebas se utilizaron forrajes tropicales, debido a su amplia utilización en la alimentación de rumiantes en numerosos países. En la primera prueba se usaron dos enzimas puras (XYL y CEL) y una mezcla de ambas a partes iguales (MIX), que fueron añadidas a los sustratos incubados en cultivos no renovados de microorganismos ruminales (CNRMR). La elección de la enzima CEL y la dosis (20 unidades enzimáticas/g MS) se basó en estudios anteriores de nuestro grupo (Giraldo *et al.*, 2007ab, 2008a), pero la enzima XYL no había sido probada previamente. Para el estudio se usaron cuatro forrajes tropicales de calidad diferente, dos de ellos recogidos en distinto estado fenológico. El primer objetivo de esta prueba fue comparar la eficacia de dos métodos de aplicación de las enzimas, consistentes en su aplicación 24 h antes de su incubación *in vitro* o en el momento de la incubación. El pretratamiento de los forrajes con XYL durante 24 h aumentó el ritmo fraccional de producción de gas y la degradabilidad efectiva de la materia orgánica de cuatro de los sustratos incubados en comparación con la aplicación de la enzima en el momento de la incubación, lo que indicaría una mayor eficacia de este tratamiento. Sin embargo, en dos de los forrajes no se observaron diferencias debido al método de aplicación, lo que confirma que los efectos del pretratamiento con enzimas pueden ser influenciados por la naturaleza del sustrato al que se aplican y contribuiría a explicar los resultados variables que se han obtenido en diferentes estudios (Yang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2003). En el caso de las

enzimas CEL y MIX, el pretratamiento de los forrajes durante 24 h produjo un aumento del ritmo fraccional de producción de gas y de la degradabilidad efectiva de la materia orgánica para todos los forrajes, indicando un aumento de su degradación. Los resultados obtenidos con MIX se atribuyeron fundamentalmente al efecto de CEL. En general, no hubo efectos de las enzimas en la producción asintótica de gas, lo que concuerda con la idea de que los efectos de las enzimas se producen en las primeras horas de permanencia en el rumen (Beauchemin y Holtshausen, 2010).

Algunos autores han sugerido que el pretratamiento de los alimentos con enzimas podría crear un complejo enzima-alimento estable (Kung *et al.*, 2000.), pero otros sugieren que se produce una alteración en la estructura de la fibra que estimularía la colonización microbiana (Newbold, 1997; Nsereko *et al.*, 2000). Nuestros resultados mostraron que las enzimas CEL y MIX redujeron la cantidad de FND en cuatro de las muestras incubadas, pero la XYL no ejerció efecto alguno. Estos resultados están de acuerdo con otros obtenidos previamente (Giraldo *et al.*, 2007b, 2008a; Dean *et al.*, 2008; Krueger *et al.*, 2008) y confirman una acción directa de las enzimas fibrolíticas sobre la estructura de la pared celular como parte del modo de acción de las enzimas exógenas.

Las enzimas CEL y MIX aumentaron la producción de AGV y provocaron modificaciones en su perfil, pero estos efectos variaron con el forraje incubado, y en tres de los sustratos no se observó un cambio en el perfil de AGV. Además, no se observó una relación directa entre estas modificaciones y la composición química de los forrajes. Los cambios en el perfil de AGV parecen estar influenciados tanto por el tipo de forraje como por el preparado enzimático utilizado y podrían ser debidos a la fermentación de los azúcares liberados por la hidrólisis enzimática de la pared celular o también a cambios en las poblaciones de las bacterias fibrolíticas (Wang *et al.*, 2001). De las tres enzimas analizadas, XYL fue la menos efectiva, ya que únicamente provocó un aumento del ritmo de producción de gas en cuatro de los sustratos incubados, pero no modificó los parámetros ruminales a las 24 horas de incubación en ningún forraje. Estos resultados indican que la XYL pudo estimular ligeramente la fermentación al inicio de la incubación, pero sus efectos fueron indetectables en fases posteriores. El hecho de que el tratamiento MIX no presentara ninguna ventaja adicional respecto al uso de CEL se atribuyó al escaso efecto de XYL.

Para la segunda prueba se seleccionaron tres preparaciones enzimáticas comerciales con varias actividades enzimáticas: Rovabio Excel® (PEN) producida por *Penicillium funiculosum* y Dyadic® Xylanase Plus (TL1) y Dyadic®

Celulase Plus (TL2), ambas producidas por *T. longibrachiatum*. Las tres enzimas tenían actividad endoglucanasa y xilanasas, en diferente proporción. Como sustratos se utilizaron recursos forrajeros de amplia utilización en países tropicales (*P. purpureum*, rastrojo de maíz y paja de arroz) y las enzimas se aplicaron en cuatro dosis diferentes, diluciones 1/200 (D1), 1/100 (D2), 1/50 (D3) y 1/10 (D4) de la preparación comercial. Basándonos en los resultados de la prueba anterior, las enzimas se aplicaron a los sustratos 24 horas antes de la incubación. Debido a que estudios previos han demostrado que los efectos de las enzimas se reducen a medida que aumenta el tiempo de incubación (Nsereko *et al.*, 2000a; Giraldo *et al.*, 2008ab; Ranilla *et al.*, 2008), en este estudio se decidió realizar incubaciones de 9 horas de duración, con la finalidad de evaluar los efectos de las enzimas a cortos tiempos de incubación.

Todos los tratamientos enzimáticos fueron eficaces con la dosis D4, pero la eficacia de D1, D2 y D3 fue muy variable dependiendo de la enzima y el forraje evaluado, apoyando las observaciones de estudios anteriores (Giraldo, *et al.*, 2008b; Krueger *et al.*, 2008; Ranilla *et al.*, 2008). Además, existieron marcadas diferencias entre sustratos. Todas las dosis de PEN fueron eficaces con el heno de *P. purpureum*, pero sólo la dosis D4 tuvo un efecto positivo con el rastrojo de maíz y la paja de arroz. En cuanto a TL2, todas las dosis fueron eficaces con el heno de *P. purpureum*, pero sólo las dosis D3 y D4 mostraron un efecto sobre el rastrojo de maíz y las dosis D2, D3 y D4 sobre la paja de arroz. En contraste, TL1 solamente fue eficaz con la dosis D4 en todos los forrajes estudiados. Estos resultados indican la importancia de probar las enzimas fibrolíticas en los forrajes antes de ser utilizadas en la práctica.

En esta prueba también se confirmó la eficacia de las enzimas fibrolíticas para reducir el contenido en FND de los forrajes observada en el estudio anterior, pero se observaron interacciones enzima x forraje significativas. Los efectos positivos de las enzimas sobre la composición de la fibra de los forrajes estuvieron, en general, relacionados con sus efectos sobre la fermentación ruminal, pero algunos resultados indican que la reducción del contenido de fibra por sí sola no puede explicar los efectos de las enzimas.

Los forrajes de baja calidad se caracterizan por un bajo consumo por parte de los animales, ya que su lenta digestión provoca largos tiempos de retención de la digesta en el rumen. Estos problemas se podrían reducir mediante la utilización de enzimas que estimulen las fases iniciales de la degradación de los forrajes y por lo tanto aumenten la velocidad de digestión y tránsito de los forrajes a través del rumen y la ingestión de forraje. El aumento de la producción de gas

que se observó en esta prueba a las 6 y 9 h de incubación para algunos tratamientos enzimáticos indica una estimulación de las fases iniciales de la fermentación, ya que la producción de gas está estrechamente correlacionada con la cantidad de materia orgánica fermentada (Menke *et al.*, 1979). La estimulación de la fermentación se reflejó también en el aumento observado en la producción de AGV, especialmente marcado para la dosis más alta (D4) en todos los preparados enzimáticos. Adicionalmente, se observó un cambio en el perfil de AGV para algunas dosis de enzimas, aunque los efectos variaron con el forraje incubado. Estos resultados ponen de manifiesto los efectos variables de las enzimas sobre el mismo sustrato cuando se aplica a diferentes dosis.

Los resultados de los dos estudios realizados con enzimas fibrolíticas sugieren que éstas podrían ser utilizadas para mejorar el valor nutritivo de forrajes de baja calidad, pero hay que tener en cuenta que el resultado se puede ver afectado por la composición del forraje, la enzima y la dosis utilizada. Nuestros resultados indican que un pretratamiento de los forrajes con las enzimas durante 24 h antes de su administración a los animales mejoraría los resultados obtenidos. Adicionalmente, el coste del producto enzimático es un punto que debe ser evaluado antes de su utilización en la práctica ganadera.

La segunda fase experimental de la presente Tesis Doctoral se centró en la evaluación de un hidrolizado enzimático (YH) de la levadura *S. cerevisiae* obtenido a partir de la hidrólisis enzimática de la levadura presente en el residuo de la destilación de alcohol de la caña de azúcar en Cuba. Este residuo es altamente contaminante para el medio ambiente, por lo que su utilización en alimentación animal proporcionaría un beneficio medioambiental añadido. Este hidrolizado había mostrado efectos probióticos en aves, con buenos resultados en los indicadores fisiológicos, inmunológicos y productivos (Pérez, 2000). Además, Galindo (2010) observó que el hidrolizado estimulaba el crecimiento de los microorganismos ruminales en condiciones *in vitro*, pero no se habían realizado estudios para analizar sus posibles efectos sobre la fermentación ruminal. Por ello, el objetivo de la tercera prueba experimental fue evaluar el efecto del YH y sus diferentes fracciones sobre la fermentación y la digestibilidad ruminal *in vitro* de *P. purpureum* clon Cuba CT-115. Este forraje es ampliamente utilizado en la ganadería cubana actual. El análisis de diferentes fracciones del YH se planteó porque estudios con cultivos de levaduras han mostrado diferentes efectos de la levadura y de su medio de cultivo (Wallace and Newbold, 1993a; Newbold, 1996). Para la preparación de las diferentes fracciones del YH se recogió una muestra homogénea a partir de un lote de producción de YH y se

procesó como se muestra en la Figura V.1. para obtener el hidrolizado completo (YH), el pellet bruto y el sobrenadante.

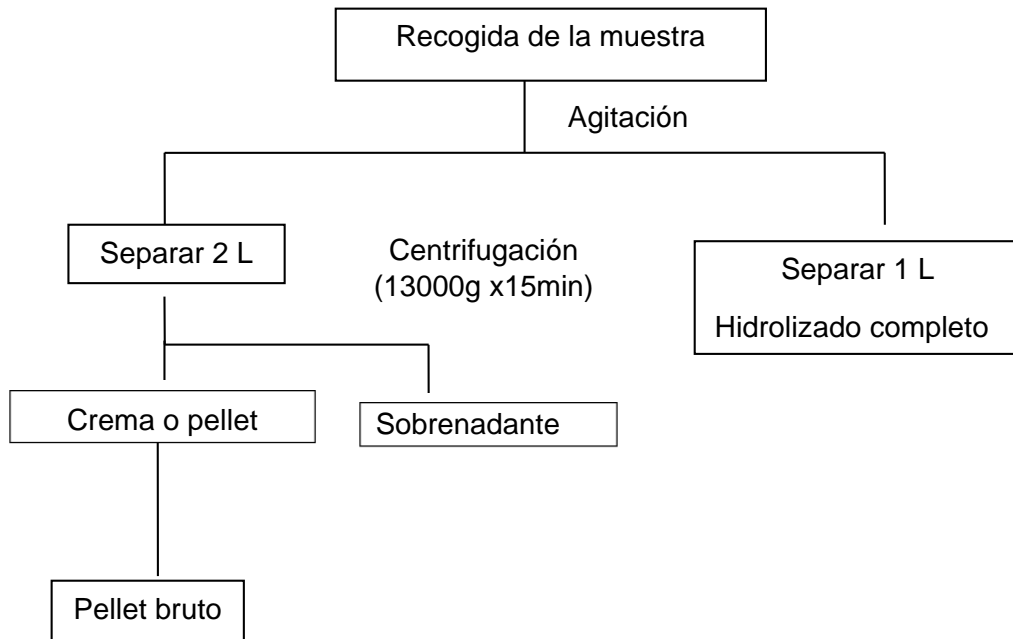


Figura V.1. Procedimiento seguido para la obtención de las diferentes fracciones del hidrolizado enzimático de levadura *S. cerevisiae*.

El YH y las dos fracciones se evaluaron *in vitro* utilizando un sistema de CNRMR a dosis de 0, 50, 100 y 200 μl /50 mL de medio de incubación (equivalentes a 0, 1, 2 y 4 mL por litro) y se administraron inmediatamente antes de la incubación. La fracción utilizada no tuvo efecto significativo en ninguno de los parámetros de la fermentación ruminal *in vitro* analizados, excepto en la producción de gas a las 24 h de incubación, que fue mayor con el YH que con el pellet y el sobrenadante. La adición de dosis crecientes del YH o de sus dos fracciones a los cultivos *in vitro* produjo un aumento lineal de la producción de gas, sugiriendo una mayor fermentación del sustrato que en el tratamiento control. Este hecho se comprobó en la producción de AGV, que aumentó de forma lineal al hacerlo la dosis de las tres fracciones, con incrementos del 15, 16 y 19% para la dosis más alta (200 μl) respecto al control para el pellet bruto, el sobrenadante y el YH, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los de otros estudios en los que también se observaron aumentos de la producción de AGV al utilizar levaduras del género *S. cerevisiae* y sus derivados, aunque los resultados existentes en la bibliografía son variables y pueden depender de la cepa de *S. cerevisiae* y del tipo de sustrato incubado, además de otros factores (Newbold, 1990; Carro *et al.*, 1992a; Lila *et al.*, 2004).

El aumento lineal en la producción individual de los ácidos acético, propiónico y butírico observado al administrar dosis crecientes de las tres fracciones analizadas está en línea con la idea de una estimulación de la fermentación ruminal. Sin embargo, la producción de isoácidos no se vio aumentada significativamente (se observaron aumentos numéricos). Tampoco se vio afectada la relación acético:propiónico, lo que se debió a un aumento proporcional en la producción de ambos ácidos por las tres fracciones del hidrolizado. Los efectos de los cultivos de *S. cerevisiae* en el perfil de AGV obtenidos en otros estudios son muy variables y no se pueden relacionar fácilmente con el tipo de sustrato incubado. En cualquier caso, el aumento de la producción de AGV encontrada en este estudio confirma una estimulación en la fermentación ruminal *in vitro* del sustrato *P. purpureum* clon Cuba CT-115 en presencia de las tres fracciones del hidrolizado analizadas. La magnitud de la estimulación fue dosis-dependiente y a las dosis empleadas no se observó ningún efecto negativo sobre la fermentación. Sin embargo, no se detectó ningún efecto significativo del YH o de sus fracciones YH a ninguna de las dosis empleadas sobre la degradabilidad de la MS o de la FND del sustrato, lo que contrasta con los aumentos observados en la producción de AGV. Es posible que el método gravimétrico utilizado para la determinación de la degradabilidad no fuera lo suficientemente sensible como para detectar diferencias reales entre tratamientos y dosis con un sustrato de baja calidad como el utilizado.

En resumen, tanto el YH de la levadura *S. cerevisiae* como sus dos fracciones estimularon la fermentación ruminal *in vitro* de *P. purpureum* clon Cuba CT-115 a las tres dosis estudiadas, por lo que se planteó analizar sus posibles efectos sobre la fermentación de dietas mixtas utilizadas en la práctica ganadera. Debido a la mayor estabilidad y facilidad de manejo del hidrolizado completo y a la falta de efectos significativos entre las tres fracciones analizadas, el YH (hidrolizado completo) fue el elegido para el siguiente estudio. Adicionalmente, se planteó el uso de fermentadores Rusitec, ya que permiten una mejor simulación de la fermentación ruminal que los CNRMR debido a la adaptación de los microorganismos durante el período de incubación (Martínez *et al.*, 2010). En esta prueba se realizó en primer lugar una incubación *in vitro* con CNRMR para determinar la dosis efectiva de YH con dietas mixtas. Un estudio previo de nuestro grupo (Mateos *et al.*, 2013) mostró que el efecto de algunos aditivos sobre la fermentación ruminal *in vitro* varía con el tipo de sustrato incubado, por lo que se decidió investigar el efecto de diferentes dosis del YH en la fermentación de dos sustratos representativos de las dietas que reciben los rumiantes en cebo (HC) y en lactación (MC). Debido a que en el

estudio anterior no se observaron efectos negativos del YH se analizaron dosis más altas, en concreto 100, 200, 300 y 400 μ l/30 mL de medio de incubación, equivalentes a 3,3, 6,7, 10 y 13,3 mL/L. Los resultados obtenidos confirmaron la estimulación de la fermentación ruminal observada en el estudio anterior, aunque en este caso la dosis de 3,3 mL/L no afectó a la mayoría de los parámetros fermentativos, lo que se atribuyó a que en esta prueba se usaron sustratos altamente fermentables. La administración del YH a dosis de 6,7, 10 y 13,3 mL/L provocó modificaciones del perfil de AGV con el sustrato MC, provocando un aumento del butírico a expensas del acético y una reducción de la relación acético/propiónico, pero no se observó efecto en los principales AGV con el sustrato HC, lo que provocó interacciones YH x sustrato significativas. Los resultados pusieron de manifiesto una mayor efectividad del YH con el sustrato MC que con el sustrato HC.

A partir de los resultados obtenidos con los CNRMR, se decidió evaluar el efecto del YH con el sustrato MC en fermentadores RUSITEC. Se eligió la dosis de 10 mL/L (5 mL diarios por fermentador) porque apenas se habían detectado diferencias significativas entre las dosis 6,7, 10 y 13,3 mL/L, pero la dosis 10 mL/L aumentó significativamente la materia orgánica fermentada en comparación con la dosis 6,7 mL/L. Como se puede observar en las figuras V.2, V.3 y V.4, la adición de YH a los fermentadores no afectó ($P > 0,05$) a la producción diaria de AGV durante el período de incubación, pero provocó una reducción de la relación acético/propiónico y un aumento de la cantidad diaria de $\text{NH}_3\text{-N}$ en los efluentes de los fermentadores. Los resultados relativos al perfil de AGV están de acuerdo con los observados en los CNRMR para el sustrato MC, con la excepción del aumento de la producción de propiónico observado al administrar YH a los fermentadores, que no fue detectado en los CNRMR. Adicionalmente, se observaron mayores efectos del YH en las proporciones molares de los AGV minoritarios (isobutírico, isovalérico, valérico y caproico) en los fermentadores que en los CNRMR.

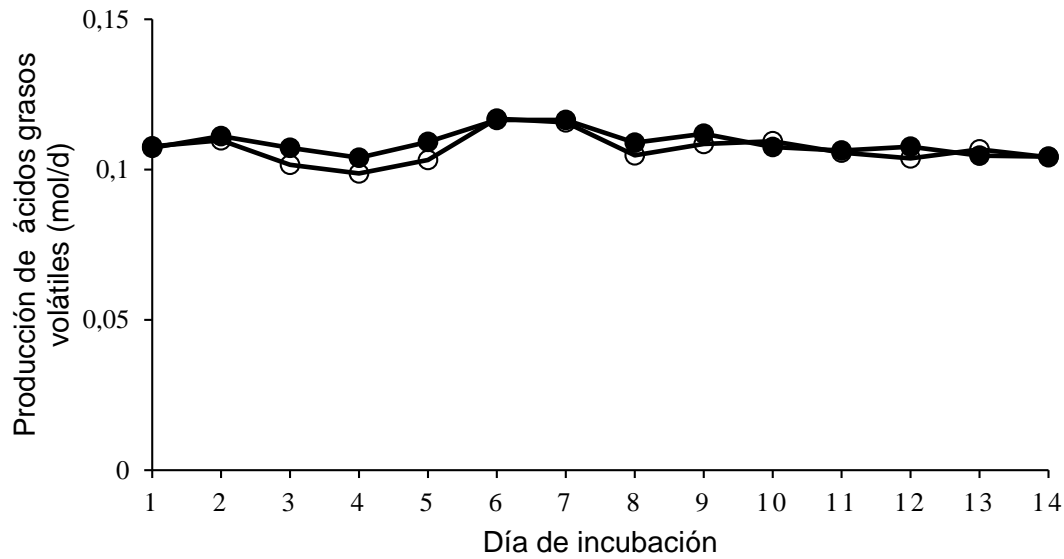


Figura V.2. Evolución de la producción diaria de ácidos grasos volátiles en fermentadores Rusitec que recibían un sustrato 50:50 de heno de alfalfa:concentrado y suplementados con un hidrolizado de levadura (—●—) o sin suplementar (—○—). Error estándar de la media: 4,03. $P = 0,469$, $0,008$ y $0,987$ para el efecto de la suplementación, tiempo y la interacción suplementación x tiempo, respectivamente.

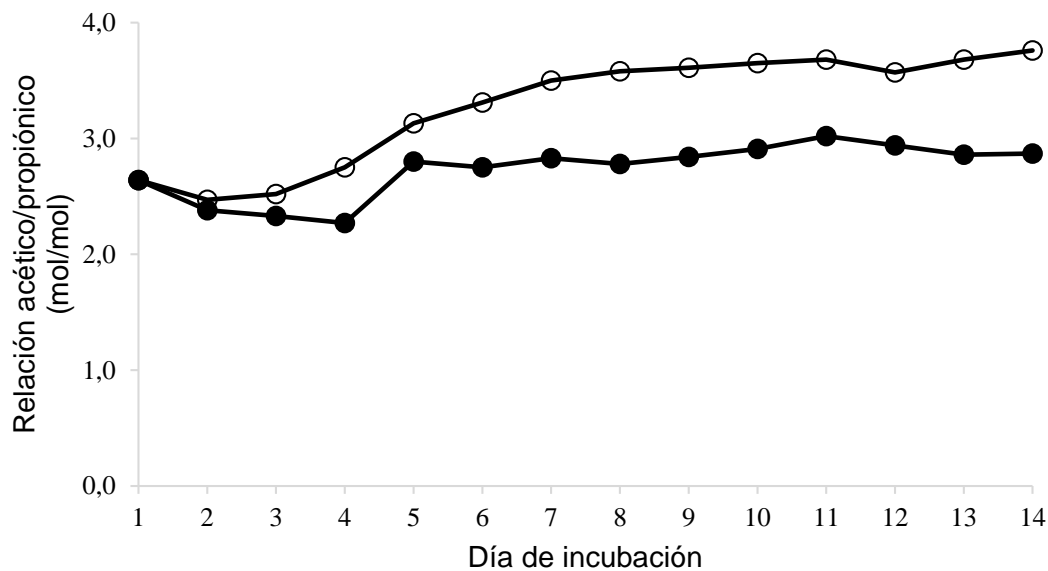


Figura V.3. Evolución de la relación acético/propiónico en fermentadores Rusitec que recibían un sustrato 50:50 de heno de alfalfa:concentrado y suplementados con un hidrolizado de levadura (—●—) o sin suplementar (—○—). Error estándar de la media: 0,076. $P < 0,001$ para el efecto de la suplementación, tiempo y la interacción suplementación x tiempo.

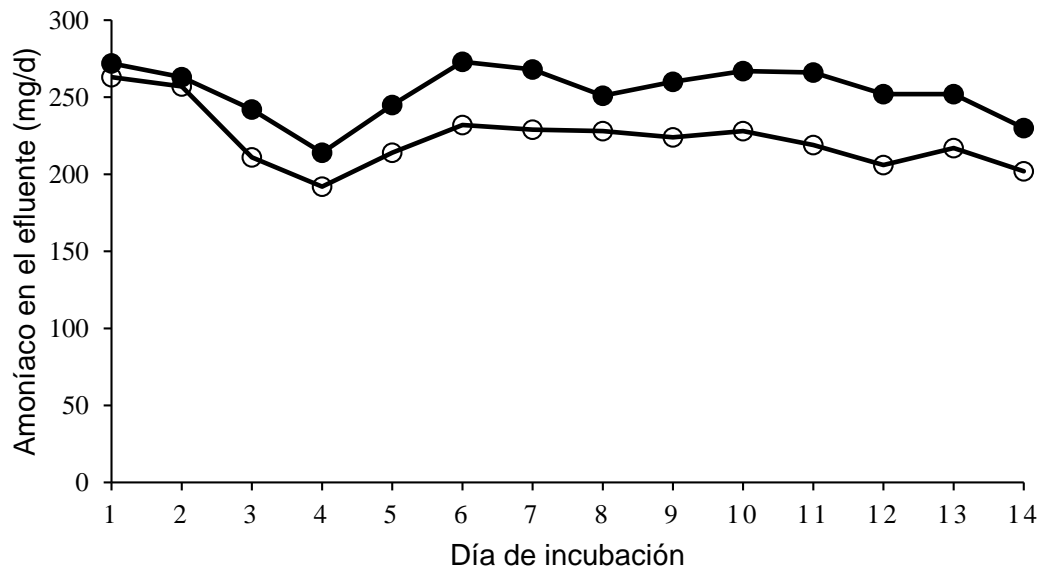


Figura V.4. Evolución de la cantidad de amoníaco en el efluente de fermentadores Rusitec que recibían un sustrato 50:50 de heno de alfalfa:concentrado y suplementados con un hidrolizado de levadura (—●—) o sin suplementar (—○—). Error estándar de la media: 11.0. $P \leq 0,001$ para el efecto de la suplementación, tiempo y la interacción suplementación x tiempo.

Los resultados indican que la adición de YH a los fermentadores provocó cambios en la fermentación del sustrato, los cuales se mantuvieron durante todo el período de incubación. Las variaciones en el perfil de AGV sugieren cambios en las poblaciones microbianas y/o en su actividad, así como el aumento de la cantidad de $\text{NH}_3\text{-N}$ recogida diariamente en los efluentes. Sin embargo, no se vieron afectadas las actividades enzimáticas fibrolíticas determinadas, lo que concuerda con la ausencia de efectos en la degradabilidad de la FND y la FAD. La tendencia hacia una mayor cantidad de bacterias en la fase líquida observada en los fermentadores que recibieron YH indicaría una estimulación del crecimiento microbiano, posiblemente por factores de crecimiento aportados por el YH. Los resultados del ARISA indican que la administración del YH aumentó la diversidad bacteriana en la fase líquida de la digesta y tendió a aumentarla en la fase sólida. Sin embargo, la eficiencia del crecimiento microbiano, expresada como mg de N microbiano por g de materia orgánica aparentemente fermentada, no se vio afectada.

Los resultados de los dos estudios realizados con el hidrolizado enzimático de *S. cerevisiae* muestran su potencial como aditivo alimentario para los

animales rumiantes, ya que modificó el perfil de AGV hacia un aumento del propiónico, redujo la relación CH₄/total AGV y estimuló el crecimiento bacteriano. Los resultados también indican que el hidrolizado sería más efectivo con dietas de calidad media-baja y especialmente en aquellas deficientes en nitrógeno, ya que la suplementación provocó un aumento de las concentraciones de NH₃-N.

La última fase de esta Tesis Doctoral se centró en el estudio de la influencia del cultivo ecológico de cereales forrajeros destinados a la alimentación animal y en la mejora de su valor nutritivo. En las ganaderías ecológicas los animales deben ser alimentados con materias primas producidas siguiendo las normativas de la agricultura ecológica, pero existe poca información sobre cómo el cultivo ecológico puede afectar a su valor nutritivo. Por ello, el objetivo de la quinta prueba experimental fue comparar la producción de materia seca, la composición química y la digestibilidad *in vitro* de avena y centeno forrajeros, cultivados de forma convencional y ecológica. El estudio se llevó a cabo en la localidad de Fariza de Sayago (Zamora), debido a que en esta zona existen varias explotaciones ganaderas ecológicas y los resultados obtenidos podrían ser aplicados en la práctica. En las dos pruebas realizadas, la recogida de las muestras se realizó en dos épocas distintas del ciclo productivo de los cereales (preespigado y maduración), que coinciden con las dos formas de aprovechamiento del cereal en la práctica, a diente por parte de los animales (preespigado) y con la cosecha cuando el cereal está maduro (maduración).

De acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores (Kirchmann *et al.*, 2007; Mazzoncini *et al.*, 2007; Cavigelli *et al.*, 2008) con diferentes cultivos, en nuestro estudio las parcelas cultivadas de forma ecológica produjeron una menor cantidad de MS que las parcelas cultivadas de forma convencional. La producción de avena en las parcelas cultivadas de forma ecológica representó el 53,6 y 73,3% de la producción alcanzada en las parcelas convencionales en los cortes de mayo y julio, respectivamente, mientras que para el centeno la producción ecológica fue el 58,6 y 66,9% de la producción convencional en mayo y julio, respectivamente. La menor producción observada en condiciones ecológicas se ha atribuido a varios factores, pero fundamentalmente al menor aporte de N, mayor competición por los nutrientes provocada por una mayor abundancia de plantas adventicias, menor eficiencia del uso de los nutrientes, y peor control de las enfermedades de las plantas. En nuestro estudio la mayor producción de MS en las parcelas convencionales podría ser debida al mayor aporte de abono mineral que recibieron estas parcelas, ya que el suelo de las parcelas en las que se cultivó avena de forma convencional presentó un mayor contenido en nitrógeno y fósforo que el de las parcelas orgánicas. Sin embargo,

en las parcelas en las que se cultivó centeno no se observaron diferencias significativas en la composición química del suelo debidas al tipo de cultivo. Para los dos forrajes, las muestras cultivadas de forma convencional mostraron un mayor contenido en proteína bruta y un menor contenido en FND y FAD que las de cultivo ecológico, con la excepción de la avena producida en mayo de 2009. El menor contenido en proteína bruta en los cultivos ecológicos ha sido observado previamente por numerosos autores (Mazzoncini *et al.*, 2007; Mäder *et al.*, 2007; Ingver *et al.*, 2008) y suele atribuirse a un menor contenido en N en el suelo de los cultivos ecológicos (Berry *et al.*, 2002; Casagrande *et al.*, 2009).

El sistema de cultivo no afectó a la digestibilidad *in vitro* de las muestras de avena, pero las muestras de centeno de cultivo convencional tuvieron una mayor digestibilidad *in vitro* que las de cultivo ecológico. Estos resultados muestran que el sistema de cultivo puede ejercer una influencia diferente en función del forraje cultivado, incluso cuando los cultivos se llevan a cabo en la misma zona y con las mismas condiciones climáticas. De forma similar, la producción de AGV fue mayor en las muestras de centeno recogidas en mayo cultivadas de forma convencional que en las ecológicas, mientras que en la avena se observó la situación contraria. En general, no se detectaron diferencias debidas al sistema de cultivo en las proporciones molares de los principales AGV (acético, propiónico y butírico), lo que indicaría que los patrones de fermentación fueron similares para ambos tipos de cultivos. Los resultados de este estudio indicaron que el cultivo ecológico produjo una reducción de la producción de MS de avena y centeno forrajeros en comparación con el cultivo convencional, así como una disminución del contenido en proteína bruta del forraje y un aumento de su contenido en FND y FAD. El intercalado de diversos cultivos podría producir un aumento de la producción y del contenido proteico de los cereales forrajeros producidos en condiciones ecológicas, tal y como ha sido sugerido por otros autores.

Teniendo en cuenta los resultados de la prueba anterior se decidió llevar a cabo una sexta prueba experimental para analizar el potencial del cultivo intercalado de avena de invierno con leguminosas para mejorar el rendimiento y la calidad del forraje en cultivo ecológico. Para ello se cultivó avena en monocultivo e intercalada con dos leguminosas (algarroba y yeros) en las proporciones utilizadas tradicionalmente por los agricultores de la zona. Tanto la avena como la algarroba y los yeros se eligieron por ser cultivos frecuentes en el área en la que se llevó a cabo el estudio. Los cuatro tratamientos experimentales fueron avena en monocultivo y avena intercalada con algarroba (85:15; BAV), yeros (90:10; BIV) o algarroba y yeros (80:10:10; MIX). Al igual

que en la prueba anterior el estudio se llevó a cabo en la localidad de Fariza de Sayago (Zamora) y se realizaron dos muestreos, el primero en el mes de junio correspondiente al estado vegetativo de las plantas y segundo en el mes de julio (etapa reproductiva). En comparación con la avena cultivada en monocultivo, la producción de MS de los forrajes en junio aumentó en un 39, 45 y 41% para BAV, BIV y MIX, respectivamente, y en un 42, 49 y 58% en julio. Estos resultados confirman los de otros estudios en los que se observó que el cultivo intercalado de avena y otros cereales de invierno con leguminosas aumentaba el rendimiento forrajero (Moreira, 1989; Carr *et al.*, 2004; Mariotti *et al.*, 2006). Como era de esperar, el contenido en proteína bruta fue mayor en los cultivos BAV y MIX (entre 5,18 y 6,91%) que en el monocultivo de avena (3,69 y 3,62% en junio y julio, respectivamente) en las dos épocas de recogida de muestras, lo que fue atribuido a la capacidad de las leguminosas para fijar el nitrógeno atmosférico.

El forraje BIV presentó un contenido bajo en proteína bruta (3,78 y 3,86% en junio y julio, respectivamente), similar al de la avena, que se atribuyó a la menor proporción de leguminosas en esta mezcla (10%) que en BAV (15%) y MIX (20%). El alto contenido en FDN y FAD de este forraje y los bajos valores de degradabilidad de la MS y producción de AGV indican la baja calidad de este forraje, especialmente en el corte de junio. Por el contrario, los parámetros de la cinética de producción de gas y la producción de AGV indican mayor degradabilidad ruminal y calidad nutritiva del BAV que de la avena en monocultivo en los dos momentos de muestreo. La composición química, los parámetros de la cinética de producción de gas y los parámetros de fermentación *in vitro* del cultivo MIX fueron, en general, intermedios entre los de BIV y BAV. Los resultados indican que la calidad del forraje MIX fue similar o incluso ligeramente inferior a la del BAV, a pesar de presentar una proporción de siembra de avena:leguminosa mayor que BAV (80:20 vs. 85:15).

Los resultados de esta prueba indican que el cultivo BAV sería la mejor elección de los cultivos intercalados analizados para aumentar el rendimiento forrajero y el contenido en proteína. Además, el ritmo y extensión de la degradación ruminal fueron mayores para este forraje que para el resto en los dos tiempos de muestreo. Los resultados también indican que los efectos del cultivo intercalado pueden verse afectados por el tiempo de muestreo, ya que forraje BAV recogidos en junio tuvo mejor calidad nutritiva que el recogido en julio, pero no se observaron estas diferencias entre tiempos de muestreo en el forraje BIV. Los resultados deben confirmarse en estudios plurianuales antes de elaborar recomendaciones prácticas para los ganaderos y agricultores

ecológicos. Además, sería recomendable analizar otras opciones de intercalado que pudieran mejorar la producción y calidad nutritiva del forraje obtenido.

Capítulo VI.- Conclusiones / Conclusions

Primera: El tratamiento de varios forrajes tropicales con una celulasa producida por el hongo *Trichoderma longibrachiatum* redujo su contenido en pared celular y, en incubaciones *in vitro*, aumentó su degradabilidad y la producción de ácidos grasos volátiles, aunque los efectos variaron con el forraje incubado. La utilización de una xilanasa producida por microorganismos ruminales apenas mostró efectos positivos sobre la degradación ruminal de los mismos forrajes.

Segunda: El tratamiento de forrajes de baja calidad nutritiva (paja de arroz, cañote de maíz y *Pennisetum purpureum*) con diferentes dosis de preparaciones enzimáticas comerciales con actividad fibrolítica redujo su contenido en pared celular y aumentó su degradación ruminal *in vitro* a cortos tiempos de incubación. La dosis necesaria de cada preparación enzimática para conseguir un efecto positivo varió según el producto comercial y el forraje evaluado.

Tercera: La suplementación de *Pennisetum purpureum* con un hidrolizado de *Saccharomyces cerevisiae* (procedente del tratamiento enzimático del residuo de la fermentación alcohólica de la caña de azúcar) y sus fracciones obtenidas por centrifugación (pellet y sobrenadante) estimuló la fermentación ruminal *in vitro* del forraje. Debido a que los efectos observados con el hidrolizado completo y las dos fracciones fueron similares, el hidrolizado completo sería la forma de elección para su uso en la práctica por su facilidad de manejo.

Cuarta: La suplementación de una dieta compuesta en partes iguales por heno de alfalfa y concentrado con el hidrolizado completo de *Saccharomyces cerevisiae* modificó el perfil ácidos grasos volátiles, aumentó las concentraciones de amoníaco y tendió a estimular el crecimiento microbiano en fermentadores Rusitec. En cultivos no renovados de microorganismos ruminales, este hidrolizado fue más efectivo con dietas de calidad media que con dietas de alta calidad y los resultados indican que podría ser especialmente efectivo en dietas deficientes en nitrógeno.

Quinta: El cultivo ecológico de avena y centeno forrajeros redujo la producción de materia seca y modificó la composición química del forraje, reduciendo el contenido en proteína bruta y aumentando el contenido en fibra neutro detergente y fibra ácido detergente, en comparación con el cultivo convencional. Los forrajes ecológicos presentaron ritmos de fermentación *in vitro* más lentos, pero apenas se observaron modificaciones en el patrón fermentativo. Un aumento del aporte nitrogenado a las parcelas ecológicas podría aumentar

la producción y el contenido proteico de los cereales forrajeros producidos en condiciones ecológicas.

Sexta: El cultivo intercalado de avena forrajera con algarroba en proporciones de siembra 85:15 aumentó la producción de forraje, su contenido en proteína bruta y el ritmo y extensión de su fermentación ruminal en comparación con la avena en monocultivo. Los resultados de este intercalado fueron mejores que los obtenidos con el intercalado de la avena con yeros en proporción 90:10 o con una mezcla de algarroba y yeros en proporción 80:10:10. Los efectos de intercalar cultivos variaron con la época de recogida del forraje, siendo la calidad nutritiva de los forrajes de junio menor que la de los de julio.

First: Treatment of different tropical forages with a fibrolytic enzyme produced by *Trichoderma longibrachiatum* reduced their cell wall content and increased their degradability and volatile fatty acid (VFA) production in *in vitro* fermentations, although the effects varied with the forage. The use of a xylanase from ruminal microorganisms produced only subtle positive effects on *in vitro* ruminal degradation of the same forages.

Second: Treatment of low nutritive value forages (rice straw, maize stover, and *Pennisetum purpureum*) with different doses of fibrolytic commercial enzymes reduced their fiber content and improved their ruminal *in vitro* degradation at short incubation times. The necessary dose of each commercial enzyme to achieve a positive effect varied with both the commercial product and the tested forage.

Third: Supplementation of *Pennisetum purpureum* with a yeast hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* (from sugarcane distillery industry) and its fractions obtained by centrifugation (supernatant and gross pellet) stimulated *in vitro* ruminal fermentation of the forage. Because the total hydrolyzate and its fractions had similar effects, the total hydrolyzate is recommended for practical purposes due to greater stability and easy handling.

Forth: Supplementation of a diet composed by alfalfa hay and concentrate (50:50) with the total hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* modified VFA profile, increased ammonia concentrations and tended to stimulate microbial growth on Rusitec fermenters. In batch cultures of ruminal microorganisms, hydrolyzate supplementation had greater effects on medium-quality diets compared to high-quality ones, indicating that it could be especially effective for nitrogen deficient diets.

Fifth: Compared to conventional forages, organic cultivation of winter oats and rye forages reduced dry matter yield and modified chemical composition of the harvested forages by reducing their protein content and increasing their neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) content. Organic forages had slower *in vitro* fermentation rate than conventional ones, although there were only minor differences on fermentation profile. Improving nitrogen supply to organic plots would be an effective strategy to improve yield and protein content of organic cereal forage crops.

Sixth: Intercropping of oats with bard vetch at 85:15 ratio increased forage yield, crude protein content, and rate and extent of *in vitro* ruminal fermentation compared with oats in monoculture. Intercropping of oats with bard produced better results than intercropping oats with bitter vetch (90:10) or with a mix of both legumes (80:10:10). Effects of intercropping practices varied according to harvest time, having forages harvested in June a lower nutritive value than those harvested in July.

Capítulo VII.- Resumen / summary

Uno de los principales retos de la época moderna es alimentar una población mundial en rápido y constante aumento. Los animales rumiantes tienen una capacidad única de aprovechar los componentes fibrosos que les permite satisfacer sus necesidades nutritivas a través de la utilización de los forrajes, proporcionando alimentos de elevado valor nutritivo (carne y leche). Sin embargo, la dieta de los rumiantes en países en desarrollo se basa a menudo en recursos forrajeros de baja calidad, lo cual no permite un elevado rendimiento. Por ello, el primer objetivo de esta Tesis Doctoral fue analizar los efectos de aditivos (enzimas fibrolíticas y un hidrolizado de levadura) para mejorar la digestibilidad ruminal de forrajes de baja calidad. Por otro lado, en países desarrollados se observa una creciente demanda de productos ecológicos obtenidos siguiendo prácticas basadas en la sostenibilidad medioambiental. Sin embargo, el rendimiento de los cultivos ecológicos es usualmente menor en comparación con los cultivos convencionales. Así que el segundo objetivo de esta Tesis Doctoral fue establecer posibles diferencias en el rendimiento y valor nutritivo de cereales forrajeros cultivados tanto de manera ecológica, como convencional.

En la Tesis Doctoral se llevaron a cabo un total de 6 pruebas experimentales para centrar los dos objetivos propuestos.

En la primera prueba se investigó el efecto de tres enzimas fibrolíticas (Celulasa producida por *Trichoderma longibrachiatum* (CEL), Xilanasas producidas por microorganismos ruminales (XYL) y una mezcla de ambas al 50% (MIX) en la fermentación *in vitro* de dos muestras de *Pennisetum clandestinum* (P1 y P2), dos muestras de *Dichanthium aristatum* (D1 y D2), una muestra de *Acacia decurrens* y una de *Acacia mangium* (A1 y A2). En primer lugar, se comparó la eficacia en la producción de gas *in vitro* de dos métodos de aplicación de las enzimas: 24 h antes de la incubación y en el momento de comenzarla. En general, el pretratamiento de los forrajes durante 24 h aumentó el ritmo fraccional de producción de gas, así que este tratamiento fue elegido para investigar los efectos de las enzimas en la composición química y en la fermentación *in vitro* de los forrajes mediante el método de cultivos no renovados de microorganismos ruminales utilizando ovejas como animales donantes del líquido ruminal. El pretratamiento con CEL durante 24 h redujo el contenido en fibra neutro detergente (FND) de P1, P2, D1 y D2; el pretratamiento con MIX redujo el contenido en FND de P1 y D1, mientras que XYL no tuvo efectos en ninguno de los forrajes analizados. El tratamiento CEL aumentó la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) en todos los forrajes (desde 8,6 hasta 22,7%), mientras que no se observaron efectos debidos tanto a MIX, como a XYL. En ambas

muestras de *P. clandestinum*, el tratamiento CEL redujo la proporción molar de acetato y aumentó la de butirato, si bien se observaron solamente ligeros cambios en el perfil de AGV para los otros forrajes. En las condiciones experimentales de la primera prueba, la fermentación ruminal *in vitro* de forrajes tropicales fue estimulada por el tratamiento CEL, mientras que XYL no produjo efectos positivos. Dichos resultados indican claramente que la eficacia de las enzimas varía según el forraje incubado y que se necesita más información para encontrar la combinación específica e ideal enzima-sustrato.

En la segunda prueba se investigó el efecto de cuatro dosis de tres preparaciones enzimáticas comerciales en la fermentación ruminal de paja de arroz, rastrojo de maíz y *Pennisetum purpureum* clon Cuba CT-115 en cultivos no renovados de microorganismos ruminales, de manera similar a la prueba anterior. Una enzima fue producida por *Penicillium funiculosum* (PEN) y las otras dos por *Trichoderma longibrachiatum* (TL1 y TL2). Cada enzima en forma líquida fue diluida 200 (D1), 100 (D2), 50 (D3) y 10 (D4) veces, aplicada a cada sustrato por cuadruplicado e incubada durante 120 h en líquido ruminal. La producción de gas se midió tras 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96 y 120 h de incubación. Los datos de producción de gas se ajustaron al modelo $\text{gas} = A (1 - e^{(-c(t-\text{lag}))})$. La dosis D4 de cada enzima aumentó el ritmo fraccional de producción de gas (c) y la degradabilidad efectiva de la materia orgánica en todos los sustratos. Resultados similares se obtuvieron con TL2 a la dosis D3. Tras 9 h de incubación, PEN a la dosis D4, TL1 a todas las dosis, y TL2 a las dosis D2, D3 y D4 aumentaron la producción de AGV y la degradabilidad de la materia seca (MS) en todos los sustratos. Las preparaciones enzimáticas comerciales evaluadas fueron, por lo tanto, eficaces en aumentar la fermentación ruminal *in vitro* de forrajes de baja calidad, si bien la dosis más efectiva varió según la enzima. Los resultados de la segunda prueba sugieren claramente una interacción forraje-enzima que puede afectar los efectos de las enzimas fibrolíticas exógenas en la fermentación ruminal.

El tercer estudio analizó los efectos de un hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, obtenido tras la producción de etanol a partir de biomasa de caña de azúcar, y sus diferentes fracciones sobre la fermentación ruminal *in vitro*. Como sustrato para las incubaciones *in vitro* se utilizó el forraje *P. purpureum* vc Cuba CT-115. Cuatro dosis (0, 50, 100 y 200 $\mu\text{L}/50 \text{ mL}$ de medio de incubación) de hidrolizado total (YH) y dos fracciones (sobrenadante y pellet bruto) se evaluaron utilizando un sistema de cultivos no renovados de microorganismos ruminales. En todos los casos, los mejores resultados se observaron con la dosis más alta (200 μL), ya que tanto YH, como sus fracciones

a esta dosis aumentaron la producción de AGV totales y de propionato. Un aumento en la producción de butirato se observó con el YH y con la fracción sobrenadante, mientras que la producción de AGV menores (calculados como la suma de isovalerato, isobutirato y valerato) se vio aumentada solo por la fracción sobrenadante. La producción de gas fue estimulada por la dosis 200 μ L de la fracción pellet y por dos dosis (50 y 200 μ L) de YH. La fracción sobrenadante no afectó la producción de gas. La concentración de amoníaco aumentó con la dosis 200 μ L tanto de la fracción sobrenadante como del hidrolizado completo, mientras que el pH final disminuyó con las dosis 100 y 200 μ L de todas las fracciones. La desaparición de MS y de FND, y la degradabilidad real de MS no se vieron afectadas por ninguna fracción o dosis. En conclusión, el uso de este hidrolizado de levadura y sus fracciones permite estimular la fermentación ruminal *in vitro* de *P. purpureum* vc Cuba CT-115. No habiéndose observado diferencias significativas entre YH y sus dos fracciones y debido a su mejor estabilidad y practicidad de manejo, el hidrolizado total fue seleccionado para la cuarta prueba.

La influencia de YH en la fermentación *in vitro* de dos sustratos mezclados se investigó usando el método de los cultivos no renovados de microorganismos ruminales y los fermentadores Rusitec inoculados con líquido ruminal de ovejas. Los no renovados (300 mg de MS), con dos sustratos diferentes (MC, 50:50 heno de alfalfa:concentrado y HC, 15:85 paja de cebada:concentrado), fueron suplementados con dosis crecientes de YH (0; 3,3; 6,7; 10,0; y 13,3 mL/L) e incubados durante 16,5 h a 39°C. La suplementación con dosis crecientes de YH a los cultivos MC aumentó linealmente la producción de AGV totales y la proporción molar de butirato, y disminuyó la proporción de acetato y la relación acético/propiónico. Por otro lado, solamente se observaron efectos muy moderados del YH en la concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$ y en la proporción molar de isovalérico y caproico con el sustrato HC. Los efectos a más largo plazo de la suplementación con YH en la fermentación ruminal del sustrato MC fueron investigados usando los fermentadores Rusitec. Ocho fermentadores fueron alimentados diariamente con 30 g en MS del sustrato MC y cuatro de ellos fueron suplementados con 5 g de YH/día siendo el diseño experimental en cuadrado latino con dos periodos de incubación de 14 días. La suplementación con YH no afectó a la producción de AGV, la concentración de lactato, la degradabilidad de MS y de la FND, ni la actividad enzimática del contenido ruminal (amilasa, xilanasas y carboximetilcelulasas). En comparación con los fermentadores sin suplementar, el tratamiento YH aumentó la concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$ y la proporción molar de propionato y butirato, disminuyendo al mismo tiempo la proporción molar de acetato y la relación acético/propiónico. Además, la

suplementación con YH tendió a disminuir la relación CH₄/AGV totales y a aumentar el crecimiento microbiano en la fase líquida de los fermentadores. El análisis automatizado del espaciador intergénico ribosomal (ARISA) de las muestras tomadas al día 3, 8 y 14 de incubación del contenido sólido y líquido de los fermentadores indicó que la suplementación con YH incrementó la diversidad microbiana en la fase líquida y tuvo una tendencia al aumento en la fase sólida. Los resultados de la prueba indican que YH podría constituir un aditivo para suplementar la dieta de los rumiantes estimulando la fermentación y la producción de propionato, disminuyendo la relación CH₄/AGV totales y aumentando el crecimiento microbiano.

La quinta prueba experimental se llevó a cabo para comparar el rendimiento y el valor nutritivo de dos cereales forrajeros de invierno (avena y centeno), cultivados de forma convencional y ecológica. Para el cultivo de cada cereal se dispuso de seis parcelas: tres cultivadas en régimen convencional y las otras tres en régimen ecológico, contiguas, para asegurar características del suelo muy similares. Ambos cereales fueron recolectados en mayo y julio y la planta entera fue utilizada para el análisis de la composición química y del valor nutritivo. La digestibilidad *in vitro* de la MS, la producción de AGV y la concentración de amoníaco fueron medidas tras 24 h de incubación en cultivos no renovados de microorganismos ruminales. El cultivo ecológico disminuyó el rendimiento en MS de avena y centeno, alcanzando un 65 y 61%, respectivamente, del cultivo convencional. Ambos forrajes ecológicos tuvieron un menor contenido en PB y mayor de FND, con la excepción de la avena ecológica recolectada en mayo, cuyo contenido en FND resultó menor del correspondiente forraje cultivado de forma convencional. No se observaron diferencias en la digestibilidad *in vitro* de la MS debidas al método de cultivo para la avena, mientras que el centeno ecológico tuvo una menor degradabilidad de la MS *in vitro* que el centeno convencional. Para ambos cereales no hubo diferencias debidas al método de cultivo en la producción de AGV totales, ni en la proporción molar de los AGV mayoritarios en las muestras de julio, lo cual indicaría que el patrón de fermentación fue similar para las muestras de las parcelas ecológicas y convencionales. Sin embargo, la producción de AGV de las muestras ecológicas recolectadas en mayo fue mayor para la avena y menor para el centeno en comparación con las muestras de los forrajes convencionales. Esos resultados indican que el cultivo ecológico, por lo menos a corto plazo, no reduce necesariamente el valor nutritivo de los forrajes, si bien disminuye su rendimiento y su contenido en PB en ambos casos.

Teniendo en cuenta los resultados previos, la última prueba experimental se llevó a cabo para evaluar el valor nutritivo de la avena de invierno cultivada como monocultivo o intercalada con otras leguminosas con el objetivo de mejorar el rendimiento y la calidad de los cultivos orgánicos de este cereal. Durante la prueba, la avena fue cultivada de acuerdo con las regulaciones europeas de agricultura ecológica como monocultivo (avena), intercalada con algarroba (BAV), con yeros (BIV) o ambas leguminosas (MIX) para evaluar los efectos de los cultivos intercalados en la producción de forraje y en su valor nutritivo para rumiantes. El experimento se diseñó como bloques aleatorizados completos con cuatro réplicas y se recolectaron muestras de la planta entera de cada forraje en dos períodos: junio y julio. Las muestras fueron incubadas *in vitro* con líquido ruminal de ovejas para establecer los parámetros de producción de gas tras 144 h de incubación y para medir los parámetros ruminales tras 24 h de fermentación. La producción de gas se ajustó al modelo $gas = A (1 - e^{-c(t-lag)})$. Para ambos muestreos, todos los cultivos intercalados aumentaron el rendimiento forrajero respecto a la avena cultivada en monocultivo, si bien el contenido en PB aumentó solo para BAV y MIX. En relación al monocultivo de avena, BAV aumentó el ritmo de producción de gas (c) y la producción de AGV totales, indicando un mayor ritmo y tasa de degradación ruminal del forraje BAV. Por el contrario, el forraje BIV recolectado en junio tuvo un menor ritmo de producción de gas y una menor producción de AGV totales respecto al monocultivo de avena cosechado en junio, aunque, en general, no se detectaron diferencias en la fermentación ruminal *in vitro* entre muestras de avena y BIV recolectadas en julio. Los resultados del experimento indican que el rendimiento y la calidad del forraje en cultivos ecológicos puede ser incrementada con el método de los cultivos intercalados en el caso de la avena con algarroba, mientras que intercalar avena con yeros puede aumentar el rendimiento pero disminuir el valor nutritivo del forraje.

One of the biggest challenges for the modern world is to ensure a food safe supply to a constantly and rapidly growing human population. Ruminants have the unique capacity to utilize fibre and are able to meet their nutrient requirements through the utilization of forages, producing high-quality food (milk and meat) for humans. However, ruminant diets in developing countries are often limited to low-quality forages, which is an obstacle for optimal animal performance. Therefore, the first objective of this Doctoral Thesis was to evaluate the effects of feed additives (fibrolytic enzymes and a yeast hydrolyzate) to improve ruminal digestion of low-quality forages. On the other hand, in developed countries there is an increasing demand for organic animal products from sustainable farming practices. However, crops productivity in organic farming is usually lower compared to that in conventional farming. Thus, the second objective of this Doctoral Thesis was to investigate the possible differences in yield and nutritive value of organically and conventionally grown cereal forages. A total of six studies were conducted to meet the two objectives of the Doctoral Thesis.

In the first study, the effects of three treatments of fibrolytic enzymes (cellulase from *Trichoderma longibrachiatum* (CEL), xylanase from rumen microorganisms (XYL) and a 1:1 mixture of both enzymes (MIX)) on the *in vitro* fermentation of two samples of *Pennisetum clandestinum* (P1 and P2), two samples of *Dichanthium aristatum* (D1 and D2) and one sample of each *Acacia decurrens* and *Acacia mangium* (A1 and A2) were investigated. Initially, the effects of two methods of applying the enzymes to forages, either at the time of incubation or 24 h before, on the *in vitro* gas production were compared. In general, the 24 h pre-treatment resulted in higher values of gas production rate, and this application method was subsequently chosen to investigate the effects of enzymes on chemical composition and *in vitro* fermentation of forages in batch cultures of ruminal microorganisms from sheep. The pre-treatment with CEL for 24 h reduced the content of neutral-detergent fibre (NDF) of P1, P2, D1 and D2, and that of MIX reduced the NDF content of P1 and D1, but XYL had no effect on any forage. The CEL treatment increased total volatile fatty acid (VFA) production for all forages (ranging from 8.6 to 22.7%), but in general no effects of MIX and XYL were observed. For both *P. clandestinum* samples, CEL treatment reduced the molar proportion of acetate and increased that of butyrate, but only subtle changes in VFA profile were observed for the rest of forages. Under the conditions of this experiment, the *in vitro* ruminal fermentation treatment of

tropical forages was stimulated by CEL, whereas XYL did not produce any positive effect. These results showed clearly that effectiveness of enzymes varied with the incubated forage and further study is warranted to investigate specific, optimal enzyme-substrate combinations.

In the second study, the effects of four doses of three commercial fibrolytic enzymes on ruminal fermentation of rice straw, maize stover and *Pennisetum purpureum* clon vc CT-115 hay was assessed in batch cultures of ruminal microorganisms from sheep. One enzyme was produced by *Penicillium funiculosum* (PEN) and two were produced by *Trichoderma longibrachiatum* (TL1 and TL2). Each liquid enzyme was diluted 200 (D1), 100 (D2), 50 (D3) and 10 (D4) – fold, applied to each substrate in quadruplicate and incubated for 120 h in rumen fluid. Gas production was measured at 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96 and 120 h. Gas production values were fitted to the exponential model: $\text{gas} = A (1 - e^{-(c(t-lag))})$. D4 dose of each enzyme increased the fractional rate of gas production (c) and the organic matter effective degradability for all substrates, and TL2 had similar effects when applied at D3. When incubated for 9 h, PEN at D4, TL1 at all tested doses, and TL2 at D2, D3 and D4 increased VFA production and dry matter degradability for all substrates. The commercial enzymes tested were effective at increasing *in vitro* ruminal fermentation of low-quality forages, although effective doses varied with the enzyme. These results clearly show a forage-enzyme interaction that can influence the effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation.

The third study analyzed the effects of a yeast enzymatic hydrolyzate (YH) of *Saccharomyces cerevisiae*, obtained after ethanol production from sugarcane biomass, and its different fractions, on *in vitro* ruminal fermentation. Forage of *Pennisetum purpureum* vc Cuba CT-115 was used as substrate for *in vitro* incubations. Four doses (0, 50, 100 and 200 $\mu\text{L}/50\text{ mL}$ incubation medium) of total hydrolyzate (YH) and two fractions (supernatant and gross pellet) were investigated using batch cultures of ruminal microorganisms from sheep. In all cases, the best results were obtained with the higher dose (200 μL), as the YH and the two fractions at this dose increased total VFA and propionate production. An increase on butyrate production was observed with YH and the supernatant fraction, whereas minor VFA (calculated as the sum of isovalerate, isobutyrate and valerate) production was increased only with the supernatant fraction. Gas production was stimulated by the 200 μL dose of the pellet fraction and by both 50 and 200 μL doses of YH. The supernatant fraction did not affect gas production. Ammonia-N concentrations increased with the 200 μL dose of both supernatant fraction and YH, whereas final pH decreased with 100 and 200 μL

doses of all fractions. Dry matter (DM) disappearance, neutral detergent fibre (NDF) disappearance and true DM degradability were not affected by any fraction or dose. In conclusion, the use of this enzymatic hydrolyzate and their different fractions were able to stimulate the *in vitro* ruminal fermentation of *Pennisetum purpureum* cv Cuba CT-115. Due to the lack of significant differences among the YH and its two fractions and the greater stability and easily handling of YH, this product was selected for the next study.

The influence of YH on *in vitro* rumen fermentation of two mixed substrates was investigated using batch cultures and Rusitec fermenters inoculated with rumen micro-organisms from sheep. Batch cultures (300 mg dry matter (DM)) containing two different substrates (MC, 0.5:0.5 alfalfa hay:concentrate, and HC, 0.15:0.85 barley straw:concentrate) were supplemented with increasing doses of YH (0, 3.3, 6.7, 10.0 and 13.3 mL/L) and incubated for 16.5 hours at 39°C. Supplementation of increasing amounts of YH to MC-cultures increased linearly total volatile fatty acid (VFA) production and butyrate molar proportion, and decreased acetate proportion and acetate/propionate ratio. In contrast, only subtle effects of YH on NH₃-N concentrations and molar proportions of isovalerate and caproate were observed for the HC substrate. Longer-term effects of YH supplementation on rumen fermentation of MC substrate were investigated using Rusitec fermenters. Eight fermenters were given daily 30 g of MC substrate DM, and half of them were supplemented with 5 g of YH/d in a cross-over experimental design with two 14-day incubation periods. Supplementing with YH did not affect VFA production, lactate concentrations, DM and NDF degradability or enzymatic activities (amylase, xylanase and carboxymethylcellulase). Compared with the unsupplemented fermenters, YH treatment increased NH₃-N concentrations and molar proportions of propionate and butyrate at the expense of acetate, and decreased acetate/propionate ratio. In addition, YH supplementation tended to reduce CH₄/total VFA ratio and to increase microbial growth in the liquid phase of the fermenters. The automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) of samples taken on days 3, 8 and 14 of incubation from solid and liquid contents of fermenters revealed that YH supplementation increased bacterial diversity in the liquid phase and tended to increase it in the solid phase. The results indicate that YH may be a useful dietary additive for ruminants, because it promoted a shift in fermentation toward propionate production, reduced the CH₄/total VFA ratio and increased microbial growth.

The fifth study was carried out to compare the yield and nutritive value of two winter cereal forages (oat and rye) cultivated in conventional and organic

conditions. Each cultivation system was carried out in three plots of each crop next to each other to assure similar soil properties. Both crops were harvested in May and July, and the whole plants were used for the analyses of chemical composition and nutritive value. *In vitro* digestibility of DM of the samples, as well as VFA production and ammonia-N concentrations after 24 h in batch cultures of ruminal microorganisms from sheep, were determined. Organic farming decreased the DM yield of oat and rye to 65 and 61%, respectively, of that in the conventional farming. Both organic forages had significantly lower content of crude protein and higher content of NDF, with the exception of organic oat harvested in May, which showed a lower content in NDF than the conventional one. No differences on *in vitro* DM digestibility were observed due to the farming method for oat, whereas organic rye showed lower *in vitro* DM degradability than conventional rye. For both cereal forages, there were no significant differences between farming systems in total VFA production or molar proportions of the main VFA in July-samples, which would indicate a similar fermentation pattern of conventional and ecological cultivars. In contrast, VFA production of organic samples harvested in May was greater for oat and lower for rye compared with the conventional samples. The results indicate that organic farming, at least in the short term, does not necessarily result in reduced nutritive value, although it decreased the yield of both crops tested in this study and the crude protein content of the forage.

Based on the results of the previous study, a trial was conducted to evaluate the nutritive value of winter oats cultivated alone or intercropped with other legumes with the aim of improving performance and quality of organic cultures. During the trial, winter oat was grown according to European organic farming regulations in monoculture (oats) and in intercropping with bard vetch (BAV), bitter vetch (BIV) or both legumes (MIX) to evaluate the effects of intercropping on forage yield and nutritive value for ruminants. The experiment was carried out as a completely randomized block design with four replications, and whole forage samples were obtained at two harvest dates (June and July). Samples were incubated *in vitro* with ruminal fluid from sheep for assessing gas production parameters in 144 h incubations and ruminal parameters were measured after 24 h fermentations. Gas production values were fitted to the exponential model: $\text{gas} = A (1 - e^{-c(t-\text{lag})})$. For both harvest times, all intercrops increased forage yield compared with oats, but forage crude protein content was only increased for BAV and MIX. Compared with oats, intercropping with BAV increased *in vitro* rate of gas production (c) and total VFA production, indicating a higher rate and extent of rumen degradation of BAV forage. In contrast, BIV forage harvested in June had lower rate of gas production and total VFA production than June-oats, but in

general no differences in the *in vitro* rumen fermentation were detected between oats and BIV samples harvested in July. The results indicate that forage yield and quality in organic farming can be enhanced by intercropping oats with bard vetch; however, intercropping with bitter vetch increased yield but decreased nutritive value of the forage.

apítulo VIII.- Referencias bibliográficas

- Abd El-Ggani, A. A. 2004. Influence of diet supplementation with yeast culture (*saccharomyces cerevisiae*) on performance of zarabi goats. *Small Rum. Res.* 52:223-229.
- Adams, C. A. 2004. Nutricines in poultry production: Focus on bioactive feed ingredients. *Nutrition Abstracts and Reviews. Series B.* 74:1N-12N.
- Aguilar-Uscanga, B. and J. M. François. 2003. A Study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol.* 37:268-274.
- Ana, I.; Mireles-Arriaga, A; Espinosa-Ayala, E; Hernández-García, P; Márquez-Molina, O. 2015. Use of Exogenous Enzyme in Animal Feed. *Life Science Journal* 2015; 12(2s): 23-32.
- Alsersy, H.; Salem, AZM; Borhami, B.E.; Olivares, J.G.; Ado, H.M.; Mariezcurrena, M.D.; Yacuot, M.H.K.; Holif, A.E.; El-Adawy, M.; Hernandez, S.R. 2015. Effect of Mediterranean saltbush (*Atriplex halimus*) ensilaging with two developed enzyme cocktails on feed intake, nutrient digestibility and ruminal fermentation in sheep. *Animal Science Journal*; 86: 51–58.
- Andrighetto, I.; Bailoni, L.; Cozzi, G and Berzaghi, P.. 1993. Effects of yeas culture addition on digestion in sheep fed a higt concentrate diet. *Small Ruminan Research.* 12:27-34.
- ANKOM. 1998. Procedures for fibre and *in vitro* analysis. Accesed at www.ankom.com.
- Anon. 2007. La actividad microbiana en la fermentación ruminal y el efecto de la adición de *saccharomyces cerevisiae*. *Temas De Ciencia y Tecnología.* 11:51-62.
- AOAC. 1999. Official methods of analysis. Vol. 16th ed., 5th rev. Assoc. Off. Anal. Chem., Gaithersburg, MD, USA. Official methods of analysis.
- Arelovich, H. M. 2008. Elementos minerales. Su impacto en la fermentación ruminal. *Revista Argentina De Producción Animal.* 28:235-253.
- Auclair, E. 2003. Las levaduras como un ejemplo del modo de acción de los probióticos en especies monogástricas y en rumiantes. *Prod. Aanimal.* 185:32-42.

- Azzaz, H.H.; Aziz, H.A.; Farahat, E.S.A. and Murad, H.A. 2015. Impact of microbial feed supplements on the productive performance of lactating nubian goats. *Global Vet.*, 14: 567-575.
- Azzaz, H.H; Morsy, T.A. and Murad, H.U. 2016. Microbial Feed Supplements for Ruminant's Performance Enhancement. *Asian Journal of Agricultural Research* 10 (1): 1-14.
- Bach, A.; Iglesias, C. Ràfols, N. 2005. Efectos de la suplementación de levaduras vivas sobre el pH ruminal de vacas lecheras en estabulación libre. [Http://www. Aida-Itea. org/jornada37/3_nutricion/5_RVNI/rvni-6_bach2005. Pdf](http://www.Aida-Itea.org/jornada37/3_nutricion/5_RVNI/rvni-6_bach2005.Pdf). 2012.
- Beauchemin, K. A.; Colombatto, D.; Morgavi, D.P. and Yang, W. Z. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81 (E. Suppl. 2):E37-47.
- Beauchemin, K.A.; Holtshausen, L. 2010. Developments in enzyme usage in ruminants. In: Bedford, M.R.; Partridge, G.G. (ed.), *Enzymes in Farm Animal Nutrition* (2nd edition). CABI, Oxford, United Kingdom, pp, 206-230.
- Beauchemin, K. A.; Ivan, M.; McAllister, T. A. and Rode, L. M. 2000. New feed additives as alternatives to sub-therapeutic levels of antimicrobials in beef cattle diets. *New Science for a New Century. Natl. Beef Sci. Semin.* , Lethbridge, Alberta, Canada. Agriculture and Agric Food Canada. 1-7.
- Beauchemin, K. A.; Jones, S. D. M.; Rode, L. M. and Sewalt, V. J. H. 1997. Effects of fibrolytic enzymes in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 77:645-653.
- Beauchemin, K. A. and L. M. Rode. 1996. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. *Animal Science Research and Development—Meeting Future Challenges*. L. M. Rode, Ed. Ministry of Supply and Services Canada, Ottawa, ON. 103-130.
- Beauchemin, K. A.; Rode, L. M. and Sewalt, V. J. 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestility and growth rate of steers fed dry forages. *Can. J. Anim. Sci.* 75:641-644.
- Beauchemin, K. A.; W. Z. Yang and L. M. Rode. 1999. Effects of grain source and enzyme additive or grain source on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:378-390.

- Beauchemin, K. A.; Yang, W. Z. and Rode, L. M.. 1998. Effects of fibrolytic enzyme additive on extent of digestion and milk production of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 81 (Suppl.1):358.
- Bera-Maillet, C.; Devillard, E.; Cezette, M.; Jouany J. P. and Forano, E. 2005. Xylanases and carboxymethylcellulases of the rumen protozoa *polyplastron multivesiculatum*, *eudiplodinium maggii* and *entodinium sp.* *FEMS Microbiol. Lett.* 244:149-156.
- Bernardeau, M. and F. Guillier. 2003. Efficacy of two lactobacilli on animal health y zootechnical performances. XXII Congresso Brasileiro De Microbiología, Florianópolis, Brasil.
- Berry, P.M; Sylvester-Bradley, R.; Philipps, L.; Hatch, D.J.; Cuttle, S.P.; Rayns, F.W.; Goslin, P. 2002. Is the productivity of organic farms restricted by the supply available nitrogen?. *Soil Use and Management* 18, 248–255.
- Böhm, H.; Aulrich, K. and Berk, A. 2007. Rohprotein- und Aminosäuregehalten in Körnerleguminosen und Getreide. En “Zwischen Tradition und Globalisierung - 9. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau”. Ed. S. Zikeli *et al.* (Eds.). pp: 1824-1825. Universidad de Hohenheim, Stuttgart. Alemania.
- Bouattour, M. A. 2004. Efectos de la utilización de enzimas fibrolíticas y de aceite de soja en la alimentación de ovejas lecheras. Thesis Master of Science. CIHEAM. Instituto Agromediterráneo de Zaragoza, España
- Brashears, M. M., Galyean, M. L.; Loneragan, G. H.; Mann, J. E. and Killinger-Mann, K. 2003. Prevalence of *escherichia coli* O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given *lactobacillus* direct-fed microbials. *J. Food Prot.* 66:748-754.
- Caja, G.; Garín, D. and Mesía, J. 2000. Stimulating rumen fermentation: Organic acids salt as growth promoters. *Feed Intr.* 21:23-25.
- Caja, G.; González, E.; Flores, C.; Carro M. D. y Albanell, E.. 2003. Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: Prebióticos, enzimas y ácidos orgánicos. XIX Curso De Especialización FEDNA. Madrid, España. 183-212.
- Callaway, E. S. and Martin, S. A. 1997. Effect of *saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacterial that utilizes lactato and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* 80:2035-2044.

- Carr, P.M.; Horsley, R.D.; Poland, W.W. 2004. Forages. Barley, oat, and cereal-pea mixtures as dryland forages in the northern great plains. *Agronomy Journal* 96, 677-684.
- Carro, M. D.; Ranilla, M. J.; Mohamed, A. H. and Tejido, M. L. 2003. *In vitro* fermentation of cereal straws as affected by the treatment with exogenous fibrolytic enzymes. *Trop. Subtrop. Agroecosys.* 3:433-436.
- Carro, M. D.; Lebzien, P. and Rohr, K. 1992. Effects of yeast culture on rumen fermentation digestibility and duodenal flow in dairy cows fed a silage-based diet. *Liv. Prod. Sci.* 32:219-229.
- Carro, M.D.; Lebzien, P. and Rohr, K. 1992a. Influence of yeast culture on the "in vitro" fermentation (Rusitec) of diets containing variable portions of concentrates. *Animal Feed Science and Technology*, 37: 209-220.
- Carro, M. D. y Ranilla, M. J. 2002. Los aditivos antibióticos promotores del crecimiento de los animales: Situación actual y posibles alternativas. *Albéitar*. 56: 46-49.
- Carro, M. D.; Ranilla, M. J. y Tejido, M. L. 2006. Utilización de aditivos en la alimentación del ganado ovino y caprino. *Sitio Argentino De Producción Animal*. 7:26-37.
- Carro, M. D.; Ranilla, M. J. y Tejido, M. L. 2004. Uso de aditivos enzimáticos para mejorar la digestión ruminal de los forrajes. *Albéitar*. 72:34-37.
- Carro, M.D.; Saro, C.; Mateos, I.; Díaz, A. y Ranilla, M. J. 2014. Empleo de probióticos en la alimentación de rumiantes. *Ganadería*. 93, pp. 42 - 49. Editorial Agrícola Española S.A.
- Carro, M.D.; Saro, C.; Mateos, I.; Díaz, A. y Ranilla, M.J. 2014. Perspectivas y retos de los extractos vegetales como aditivos alimentarios en rumiantes. *Albéitar*, octubre: 4-6.
- Carro, M.D. and Ungerfeld, E. 2015. Utilization of Organic Acids to Manipulate Ruminant Fermentation and Improve Ruminant Productivity. En: Puniya, A.K., Singh, R., Kamra, D.N. (Eds.) *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Ed. Springer. New Delhi, India. pp. 177-197.
- Castro-Madrigal, T. y Jimeno-Vinatea, V. 2001. Probióticos en la alimentación del ganado vacuno lechero. *Bovis*. 98:27-32.

- Casagrande, M.; David, C.; Valantin-Morison, M.; Makowski, D.; Jeuffroy M.H. 2009. Factors limiting the grain protein content of organic winter wheat in south-eastern France: a mixed-model approach. *Agronomy for Sustainable Development* 29, 565–574.
- Carter, H. E. and Phillips, G. E. 1944. The nutritive value of yeast proteins. *Fed. Proc.* 3:123-128.
- Cavigelli, M.A.; Teasdale, J.R.; Conklin, A.E. 2008. Long-term agronomic performance of organic and conventional field crops in the mid-atlantic region. *Agronomic Journal* 100, 785-794.
- Chademana, I. and Offer, N. W. 1990. The effect of dietary inclusion of yeast culture on digestion in the sheep. *Anim. Prod.* 50:483-489.
- Chaucheyras, F.; Fonty, G.; Bertin, G. and Gouet, P. 1995. *In vitro* H₂ utilization by ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an archaea methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3466-3467.
- Chaucheyras, F.; Chevaux, E.; Martin, C.; Forano, E. 2012. Use of Yeast Probiotics in Ruminants: Effects and Mechanisms of Action on Rumen pH, Fibre Degradation, and Microbiota According to the Diet. En: *Probiotic in Animals* (Rigobelo E, Ed.). Chapter 7. Accesible en: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/39623.pdf> (acceso en noviembre de 2016).
- Ciria, M.P.; Martín, N. y Moyano, A. 2000. Producción de cereal ecológico en rotación con barbecho y leguminosa. *Actas del IV Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica*. Ed. Universidad de Córdoba. Disponible en http://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones_online/2000/IV%20congreso%20cordoba/produccion/barbecho.html.
- Colombatto, D.; Beauchemin, K. A. and Owen, E.. 2003a. Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentation of pure cellulose and xylan by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 81:1040-1050.
- Colombatto, D. and Beauchemin, K. A. 2003. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. *Can. J. Anim. Sci.* 85:559-568.
- Colombatto, D.; Hervás, G.; Yang, W. Z. and Beauchemin, K. A. 2003b. Effects of enzyme supplementation of a total mixed ration on microbial fermentation

- in continuous culture, maintained at high and low pH. *J. Anim. Sci.* 81:2617-2627.
- Colombatto, D.; Morgavi, D. P.; Furtado, A. F. and Beauchemin, K. A. 2003c. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: Relationships between biochemical characteristics and *in vitro* degradation. *J. Anim. Sci.* 81:2628-2638.
- Cunningham, J. G. 1997. *Fisiología veterinaria*. Fisiología veterinaria. Ed. Interamericana McGraw-Hill.
- Czerkawski, J. W. and Breckenridge, G. 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (RUSITEC). *Br. J. Nutr.* 38:371-384.
- Danovaro, R.; Luna, G. M.; Dell'Anno, A. and Pietrangeli, B. 2006. Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5982-5989.
- Dawson, K. A. M. 1987. Mode of action of culture, yea-sacc, in the rumen: A natural fermentation modifier. *Biotechnology in the Feed Industry*. T.P. Lyons Ed. Alltech Technical Publication. Nicholasville, KY. 119.
- Dawson, K. A. M. and Tricarico, J. M. 1999. The exogenous fibrolytic enzymes to enhance microbial activities in the rumen and the performance of ruminant animals. *Biotechnology in the Feed Industry*. Lyond, T. P.; Jacques, K. A. (Eds). Proceedings of the Fifteenth Annual Symposium. Nottingham University Press, Loughborough. 303-312.
- De Ondarzá, M. and Silvano-Jones, J. 2000. Intake and milk production of dairy cows fed lactic acid bacteria and mannan oligosaccharides. Report by F. A. R. M. E. Institute; Homer, New York, USA.
- Dean, D.B.; Adesogan, A.T.; Krueger, N.A.; Littell, R.C. 2008. Effects of treatment with ammonia or fibrolytic enzymes on chemical composition and ruminal degradability of hays produced from tropical grasses. *Animal Feed Science and Technology* 145, 68–83.
- Díaz, A.; Galindo, J.; Bocourt, R.; Aldana, A. I.; Moreira, O. y Sarduy, L. 2009. Efecto de un hidrolizado enzimático de *saccharomyces cerevisiae* y sus

- diferentes fracciones en la dinámica fermentativa ruminal del pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) en condiciones *in vitro*. Rev. Cub. Cienc. Agric. 43:251-257.
- Dildey, D.; Sellars, K.; Burrill, M.; Tree, J.; Newman, K. and Jacques, K. 1997. Effect of mannan oligosaccharide supplementation on performance and health of holstein calves. J Dairy Sci. 80 (Suppl. 1):188 (abstr.).
- Doyle, C.J. and Topp, C.F.E. 2002. Potential economic gains from using forage legumes in organic livestock systems in northern Europe. En: *Proceedings of the UK Organic Research 2002 Conference*. Ed. J. Powell *et al.* (Eds.). pp.195-196. Organic Centre Wales, Institute of Rural Studies, University of Wales Aberystwyth, Reino Unido.
- Dong, Y.; Bae, T. H. D.; McAllister, A.; Mathison, G. W. and Cheng, K. J. 1999. Effects of exogenous fibrolytic enzymes, α -bromoethanesulfonate and monensin on fermentation in a rumen simulation (rusitec) system. Can. J. Anim. Sci. 79:491-498.
- Dvorak, R.; Newman, K.; Jacques, K. and Waterman, D. 1997. Effects of bio-mos added to calf starter and an all-milk milk replacer on performance and health. J Dairy Sci. 80 (Suppl.1):281 (abstr.).
- Eckles, C. H.; Williams, V. M.; Wilbur, J. W.; Palmer, L. S. and Harshaw, H. M. 1925. Yeast as a supplementary feed for calves. J. Dairy Sci. 7:421-439.
- El Hassan, S. M.; Newbold, C. J.; Edwards, I. E.; Topps, J. H. and Wallace, R. J. 1996. Effect of yeast culture on rumen fermentation, microbial protein flow from the rumen and live-weight gain in bulls given high cereal diets. Anim. Sci. 62:43-48.
- Enjalbert, F.; Garrett, J. E.; Moncoulon, R.; Bayourthe, C. and Chicoteau, P. 1999. Effects of yeast culture (*saccharomyces cerevisiae*) on ruminal digestion in non-lactating dairy cows. Anim. Feed. Sci. Technol. 76:195-206.
- Erasmus, L. J.; Botha, P. M. and Kistner, A. 1992. Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. J. Dairy. Sci. 75:3056-3065.

- Eun, J. S.; Beauchemin, K. A. and Schulzet, H. 2007. Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance *in vitro* fermentation of alfalfa hay and corn silage. J. Dairy Sci. 90:1440-1451.
- FAO, 2016. Crecimiento demográfico y crisis alimentaria. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/U3550T/U3550T04.htm>. Consultado: Diciembre, 2016.
- Feng, P.; Hunt, C.; Pritchard, G. T. and Julien, W. E. 1996. Effect of enzyme preparations on *in situ* and *in vitro* degradation and *in vivo* digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. J. Anim. Sci. 74:1349-1357.
- Feng, P.; Hunt, C. W.; Julien, W. E.; Dickinson, K. and Moen, T. 1992. Effect of enzyme addition on *in situ* and *in vitro* degradation of mature cool-season grass forage. J. Anim. Sci. 70 (Suppl.1):309.
- FiBL/IFOAMM. 2016. Accesible en <http://www.organic-world.net/>. Consultado en octubre de 2016.
- Fiems, L. 1993. The use of yeast in practical diets for ruminants. Micro-Organisms and Enzyme Preparations in Animal Nutrition. J. I. R. Castanon (Eds). Commission of the European Communities, Brussels. 159.
- Firkins, J. L.; Weiss, W. P. and Piwonka, E. J. 1992. Quantification of intraruminal recycling of microbial nitrogen using ¹⁵N. J. Anim. Sci. 70:3223-3233.
- Flores, C. 2004. Mejora de la producción de ganado ovino mediante enzimas fibrolíticas en ovejas lecheras y malato en corderos de engorde. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma De Barcelona.
- Flores, C.; Caja, G.; Casals, R.; Albanell, E.; Such, X.; Vera, G.; González, E.; Bach, A. and Torres, C. 2002. Supplementation of a fibrolytic enzyme complex in the concentrate of dairy ewes during lactation. J. Anim. Sci. 80 (Suppl.1):357.
- Fondevila, M. 1998. Procesos implicados en la digestión microbiana de los forrajes de baja calidad. Rev. Fac. Agron. (LUZ). Departamento De Producción Animal y Ciencia De Los Alimentos, Universidad De Zaragoza. España. 15:87-106.

- Fonty, G. and Joblin, K. N. 1991. Rumen Anaerobic Fungi: Their Role and Interactions with Other Rumen Microorganisms in Relation to Fiber Digestion.
- Forsberg, C. W.; Forano, E. and Chesson, A. 2000. Microbial adherence to the plant cell and enzymatic hydrolysis. *Ruminal Fisiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*. Cronjé, P. B. Ed. CAB. Internacional. UK. 79-97.
- Frater, P. 2014. Feed additives in ruminant nutrition. Ed. Agriculture and Horticulture Development Board, Londres, Reino Unido. Accesible en: <http://beefandlamb.ahdb.org.uk/wp/wp-content/uploads/2013/04/Feed-additives-in-ruminant-nutrition-FINAL.pdf>
- Freedon, A. H. and McQueen, R. E. 1993. Effect of enzyme additives on quality of alfalfa/grass silage and dairy cow performance. *Can. J. Anim. Sci.* 73:581-591.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66:365-378.
- Gado H.M.; Salem, A.Z.M.; Camacho, L.M.; Elghandour, M.M.Y.; Salazar M.C. 2013. Influence of exogenous enzyme on *in vitro* ruminal degradation of ensiled rice straw with DDGS. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 13, 569–574.
- Galindo, J.; Díaz, A.; González, N.; Sosa, A.; Marrero, Y.; Aldana, A. I.; Moreira, O.; Bocourt, R.; Torres, V.; Sarduy, L. y Noda, A. 2010. Efecto de un hidrolizado enzimático de levaduras *saccharomyces cerevisiae* en la población microbiana ruminal con sustrato de *pennisetum purpureum*, cv. Cuba CT- 115 en condiciones *in vitro*. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 44:281-286.
- Gashe, B. A. 1992. Cellulase production and activity by *trichoderma sp.* A-001. *J. Appl. Bact.* 73:79-82.
- Ghorbani, G. R.; Morgavi, D. P.; Beauchemin, K. A. and Leedle, J. A. Z. 2002. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 80:1977-1985.
- Giger-Reverdin, S.; Bezault, N.; Sauvant, D. and Bertin, G. 1996. Effects of a probiotic yeast in lactating ruminants. Interaction with dietary nitrogen level. *Anim. Feed Sci. Technol.* 63:149-162.

- Giraldo, L. A.; Ranilla, M. J.; Tejido, M. L. and Carro, M. D. 2004a. Effect of enzyme application method on *in vitro* rumen fermentation of tropical forages. *J. Anim. Feed Sci.* 13:63-66.
- Giraldo, L. A.; Ranilla, M. J.; Tejido, M. L. and Carro, M. D. 2004b. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* rumen fermentation of tropical forages. *J. Anim. Feed Sci.* 13:67-70.
- Giraldo, L.A.; Ranilla, M.J.; Tejido, M.L. and Carro, M.D. 2007a. Influence of exogenous fibrolytic enzyme and fumarate on methane production, microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters. *British Journal of Nutrition* 98, 753-761.
- Giraldo, L.A.; Tejido, M.L.; Ranilla, M.J. and Carro, M.D. 2007b. Effects of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in Rusitec fermenters. *Journal of Animal Science* 85, 1962-1970.
- Giraldo, L.A.; Tejido, M.L.; Ranilla, M.J. and Carro, M.D. 2008a. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratios. *Animal Feed Science and Technology* 141, 306-325.
- Giraldo, L. A.; Tejido, M. L.; Ranilla, M. J.; Ramos, S. and Carro, M. D. 2008b. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay-based diet. *J. Anim. Sci.* 86:1617-1623.
- Girard, I. D. and Dawson, K. A. 1995. Stimulation of ruminal bacteria by different fractions derived from cultures of *saccharomyces cerevisiae* strain 1026. *J. Anim. Sci.* 73:264 (abstr.).
- Goering, H. K. and Van Soest, P. J. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Agriculture Handbook No. 379. Agriculture Research Service, United States Department of Agriculture. Washington, DC, USA.
- Gómez-Vásquez, A.; Pérez, J.; Mendoza, G. D.; Aranda, E. and Hernández, A.. 2003. Fibrolytic exogenous enzymes improve performance in steers fed sugar cane and stargrass. *Livest. Prod. Sci.* 76:234-241.

- González, E. 2004. Utilización de enzimas fibrolíticas en cabra lecheras. Evaluación de su actividad y características fermentativas *in vitro*. . Tesis Doctoral. Universidad Autónoma De Barcelona.
- González, E.; Caja, G.; Albanell, E.; Flores, C.; Casals, R.; Duch, X.; Castro, A.; Bach, A. and Torres, C. 2002. Effects of fibrolytic enzyme supplementation for dairy goats in mid lactation. *J. Dairy Sci.* 85 (Suppl.1):355.
- Grenet, E.; Breton, A.; Barry, P. and Fonty, G. 1989. Rumen anaerobic fungi and plant substrates colonization as affected by diet composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 26:55-70.
- Günther, K. D. 1990. Yeast culture. Yea-sacc1026 success under german conditions. *Feed Compounder*.
- Haddad, S. G. and Goussous, S. N. 2005. Effect of yeast culture supplementation on nutrient intake, digestibility and growth performance of awassi lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 118:343-348.
- Hadjipanayiotou, M.; Antoniou, I. and Photiou, A. 1997. Effects of the inclusion of yeast culture on the performance of dairy ewes and goats and the degradation of feedstuffs. *Livestock Prod. Sci.* 48:129-134.
- Harrison, G. A.; Hemken, R. W.; Dawson, K. A. M.; Harmon, R. J. and Barker, K. B. 1988. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. *J. Dairy Sci.* 71:2967-2975.
- Heinrichs, A. J.; Jones, C. M. and Heinrichs, B. S. 2003. Effects of mannan oligosaccharide or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 86 (12):4064-4069.
- Hooge, D. M. 2004. Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharide, 1993-2003. *Int. J. Poult. Sci.* 3:163-174.
- Hong, S.H.; Ong, S.H.; Lee, B.K.; Choin, N.J.; Lee, S.S.; Yun, S.G.; Ha, J.K. 2003. Effects of enzyme application method and levels and pre-treatment times on rumen fermentation, nutrient degradation and digestion in goats and steers. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 16, 389-393.

- Hristov, A. N.; McAllister, T. A. and Cheng, K. J. 1998. Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharide-degrading enzymes on rumen fermentation and nutrient digestibility. *J. Anim. Sci.* 76:3146-3156.
- Hristov, A. N.; McAllister, T. A. and Cheng, K. 2000. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: Effects on nutrient digestion in cattle fed a barley grain diet. *J. Anim. Sci.* 78:477-487.
- Hristov, A. N.; Rode, L. M.; Beauchemin, K. A. and Wuerfe, R. L. 1996. Effect of a commercial enzyme preparation on barley silage *in vitro* and *in sacco* dry matter degradability. *Proceeding of the Western Section, ASAC.* 47:282-284.
- Hungate, P. E. 1970. A roll tube method for cultivation in microbiology (J.B. Morris, D.B. Ribbons, eds) New York, Academic Press, Inc. 117.
- Hungate, R. E. 1966. *The Rumen and its Microbes.* Academic Press Inc. New York.
- Ingver, A.; Tamm, I.; Tamm, Ü. 2008. Effect of organic and conventional production on yield and the quality of spring cereals. *Latvian Journal of Agronomy* 11, 61-67.
- Joblin, K. N. and Naylor, G. E. 1989. Fermentation of woods by rumen anaerobic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 65:111-122.
- Johnson, D. E. and Remillard, R. L. 1983. Nutrient digestibility of brewers single cell protein. *J. Anim. Sci.* 56:735-739.
- Jouany, J. P. and Ushida, K. 1994. Plant cell-wall degradation by rumen protozoa. *Microorganisms in Ruminant Nutrition.* R. A. Prins y C. S. Stewart (Eds.), Nottingham University Press, Nottingham. 69-78.
- Junta de Castilla y León, 2016. *Plan Estratégico de Producción Ecológica de Castilla y León (2016-2020).* Consejo Económico y Social de Castilla y León. Valladolid. España.
- Kamalamma, U.; Krishnamoorthy and Krishnappa, P. 1996. Effect of feeding yeast culture (yea-sacc1026) on rumen fermentation *in vitro* and production performance in cross-bred dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 57:247-256.

- Kamra, D. N. and Agawal, N. 2004. Bacteria and fungi of non-rumen origin. Probiotics as Feed Additives for the Ruminants. Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar 243 122. India. 36.
- Kettunen, K.; Vuorenmaa, J.; Gaffney, D. and Apajalahti, J. 2016. Yeast hydrolysate product enhances ruminal fermentation *in vitro*. Journal of Applied Animal Nutrition. V 4: 7.
- Khuntia, A. 1997. Performance of crossbred male cattle calves as influenced by grain and lactic acid producing bacteria in diet. M. V. Sc. Thesis, IVRI Deemed to be University, Izatnagar, India.
- Klis, F. M.; Mol, P.; Hellingwerf, K. and Brul, S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Rev. 26:239-256.
- Kholif, A.E.; Khattab, H.M.; El-Shewy, A.A.; Salem, A.Z.M.; Kholif, A.M.; El-Sayed; M.M.; Gado, H.M.; Mariezcurrena, M.D. 2014. Nutrient digestibility, ruminal fermentation activities, serum parameters and milk production and composition of lactating goats fed diets containing rice straw treated with *Pleurotus ostreatus*. Asian Austral. J. Anim. Sci., 27: 357–364.
- Kirchmann, H.; Bergström, L.; Kätterer, T.; Mattsson, L.; Gesslein, S. 2007. Comparison of long-term organic and conventional crop–livestock systems on a previously nutrient-depleted soil in Sweden. Agronomic Journal 99, 960-972.
- Koul, V.; Kumar, U.; Sareen, V. K. and Singh, S. 1998. Mode of action of yeast culture (yea-sacc 1026) for stimulation of rumen fermentation in buffalo calves. J. Sci. Food. Agric. 77:407-413.
- Krueger, N.A.; Adesogan, A.T. 2008. Effects of different mixtures of fibrolytic enzymes on digestion and fermentation of bahiagrass hay. *Animal Feed Science and Technology* 145, 84-94.
- Krueger, N.A.; Adesogan, A.T.; Staples, C.R.; Krueger, W.K.; Deana, D.B.; Littell R.C. 2008. The potential to increase digestibility of tropical grasses with a fungal, ferulic acid esterase enzyme preparation. *Animal Feed Science and Technology* 145, 95-108.
- Kumar, U.; Sareen, V. K. and Singh, S. 1994. Effect of *saccharomyces cerevisiae* yeast culture supplement on ruminal metabolism in buffalo calves given a high concentrate diet. Anim. Prod. 59:209-215.

- Kumar, B.; Sirohi, S.K. 2013. Effect of isolate of ruminal fibrolytic bacterial culture supplementation on fibrolytic bacterial population and survivability of inoculated bacterial strain in lactating Murrah buffaloes. *Vet. World* 6:14-17.
- Kung, L. Jr.; Treacher, R.J.; Nauman, G.A.; Smagala, A.M.; Endres, K.M.; Cohen, M.A. 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 83, 115-122.
- Lacasta, C. 2006. Agricultura Ecológica en Cereales de Secano. Ed. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. 36 pp.
- Lacasta, C. y Meco, R. 2008. Productividad energética de cultivos herbáceos, estudio comparativo de manejos de agriculturas convencional, de conservación y ecológica. *Actas del VIII Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica: Cambio climático, biodiversidad y desarrollo rural sostenible*. Murcia. Disponible en <http://digital.csic.es/bitstream/10261/16517/1/2008%20AE%20Productividad%20energetica.pdf>.
- Lee, S. S.; Ha, J. K. and Cheng, K. J. 2000. Influence of an anaerobic fungal culture administration on in vivo ruminal fermentation and nutrient digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.* 88:201-217.
- Lewis, G. E.; Hunt, C. W.; Sanchez, W. K.; Treacher, R.; Pritchard, G. T. and Feng, P. 1996. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. *J. Anim. Sci.* 74:3020-3028.
- Lewis, G. E.; Sánchez, W. K.; Hunt, C. W.; Guy, M. A.; Pritchard, G. T.; Swanson, B. I. and Treacher, R. J. 1999. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:611-630.
- Lila, Z.A.; Mohammed, N.; Yasui, T.; Kurokawa, Y.; Kanda, S. & Itabashi, H. 2004. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* twin of live cells on mixed ruminal microorganism fermentation in vitro. *J. Dairy Sci.* 82, 1847-1854.
- Liu, J.; G de Ye, Zhou Y; Liu, Y.; Zhao, L.; Chen, X.; Huang, D.; Liao, S.F.; Huang, K. 2015. Feeding glycerol-enriched yeast culture improves performance, energy status, and heat shock protein gene expression of lactating Holstein cows under heat stress. *J Anim Sci*; 92: 2494-2502.

- Luchini, N. D.; Broderick, G. A.; Hefner, D. L.; Derosa, R.; Reynal, S. and Treacher, R. 1997. Production response to treating forage with fibrolytic enzymes prior to feeding to lactating cows. *J. Dairy Sci.* 80 (Suppl.1):262.
- Mäder, P.; Hahn, D.; Dubois, D.; Gunst, L.; Alföldi, T.; Bergmann, H.; Oehme, M.; Amado, R.; Schneider, H.; Graf, U.; Velimirov, A.; Fließbach, A.; Niggli U. 2007. Wheat quality in organic and conventional farming: results of a 21 year field experiment. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87,1826 – 1835.
- MAGRAMA. 2016. La agricultura ecológica en España 2016. Accesible en www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/la-agricultura-ecologica/default.aspx. Consultado en octubre de 2016.
- Malcolm, K. J. and Kiesling, H. E. 1990. Effects of whole cottonseed and live yeast culture on ruminal fermentation and fluid passage rate in steers. *J. Anim. Sci.* 68:1965-1970.
- Malik, R. and Sharma, D. D. 1998. *In vitro* evaluation of different probiotics as feed supplement. *J. Dairy Sci.* 51:357-362.
- Mangado, J.M.; Barbería, A. y Oiarbide, J. 2008. Pastoreo de ovino en ecológico en los secanos semiáridos de la Ribera de Navarra. *Navarra Agraria, Noviembre-Diciembre 2008*: 39-46. Disponible en <http://www.navarraagraria.com/n171/arovieco.pdf>.
- Mariotti, M.; Masoni, A.; Ercoli, L.; Arduini, I. 2006. Forge potential of winter cereal/legume intercrops in organic farming. *Italian Journal of Agronomy* 3, 402-412.
- Martínez, P.; Tejido, M.L.; Saro, C.; Díaz, A.; Carro, M.D.; Fernández-Figares, I. y Ranilla, M.J. 2010. Composición química y aminoacídica de tres variedades de maíz de cultivo convencional y ecológico. *Actas del IX Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica. "Calidad y Seguridad Alimentaria"*. Comunicación 9.8.
- Martínez, M.E.; Ranilla, M.J.; Tejido, M.L.; Ramos, S. and Carro, M.D. 2010. Comparison of Fermentation of Diets of Variable Composition in the Rumen of Sheep and Rusitec Fermenters: I. Digestibility, Fermentation Parameters and Efficiency of Microbial Protein Synthesis. *J. Dairy Sci.* 93: 3684-3698.
- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Tejido, M.L. Saro, C. and Carro, M.D. 2010. Comparison of Fermentation of Diets of Variable Composition in the Rumen

- of Sheep and Rusitec Fermenters: II. Protozoa Populations and Diversity of Bacterial Communities. *Journal of Dairy Science* 93: 3699-3712.
- Martínez-Vaz, B.M.; Fink, R.C.; Diez-Gonzalez, F.; Sadowsky, M.J. 2014. Enteric pathogen-plant interactions: Molecular connections leading to colonization and growth and implications for food safety. *Microbes Environ.* 29:123-135.
- Mateos, I.; Ranilla, M.J.; Tejido, M.L.; Saro, C.; Kamel, C. and Carro, M.D. 2013. The influence of diet on the effectiveness of garlic oil and cinnamaldehyde to manipulate *in vitro* ruminal fermentation and methane production. *Anim. Prod. Sci.* 53: 299-307.
- Matte, A. and Forsberg, C. W. 1992. Purification, characterization, and mode of action of endoxylanases 1 and 2 from *fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Environm. Microbiol.* 58:157-168.
- Mazzoncini, M.; Belloni, P.; Risaliti, R.; Antichi, D. 2007. Organic Vs Conventional winter wheat quality and organoleptic bread test. In: Proceedings of the 3rd QLIF Congress. Hohenheim, Germany, 135 – 138.
- McAllister, T. A.; Hristov, A. N.; Beauchemin, K. A.; Rode, L. M. and Cheng, K. 2001. Enzymes in ruminant diets. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. M. R. Bedford and G. G. Partridge (Eds). CABI Publishing, Wallingford, Oxon, U. K. 273-298.
- McAllister, T. A.; Oosting, S. J.; Popp, J. D.; Mir, Z.; Yanke, L. J.; Hristov, A. N.; Treacher, R. J. and Cheng, K. 1999. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 79:353-360.
- McAllister, T. A.; Stanford, K.; Bae, H. D.; Treacher, R.; Baah, J.; Shelford, J. and Cheng, K. J. 2000. Effect of a surfactant and exogenous enzymes on digestibility, growth performance and carcass traits of lambs. *Can. J. Anim. Sci.* 80:35-44.
- McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva 1. the composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43:99-109.
- Meale, S. J.; Chaves, A. V.; He, M. L. and McAllister, T. A. 2014. Dose–response of supplementing marine algae (*Schizochytrium* spp.) on production performance, fatty acid profiles, and wool parameters of growing lambs. *J. Anim. Sci.* 92:2202–2213.

- Michalet-Doreau, B. and Morand, D. 1996. Effect of yeast culture, *saccharomyces cerevisiae*, on ruminal fermentation during adaptation to high concentrate feeding. *Ann. Zootech.* 45(suppl 1):337.
- Michalowski, T.; Rybicka, K. and Kasperowicz, A. 2001. Ability of the rumen ciliate *epidinium ecaudatum* to digest and use crystalline cellulose and xylan for in vitro growth. *Acta Protozoologica.* 40:203-210.
- Moallem, U.; Lehrer, H.; Livshitz, L.; Zachut, M. and Yakoby, S. 2009. The effects of live yeast supplementation to dairy cows during the hot season on production, feed efficiency, and digestibility. *J Dairy Sci.* 92:343-351.
- Molisa, F.; Van Eerden, E.; Parmentier, H.K.; Vuorenmaa, J. 2014. Effects of inclusion of hydrolyzed yeast on the immune response and performance of piglets after weaning. *Anim Feed Sci Technol*; 195: 136–141.
- Moreira, N. 1989. The effect of seed rate and nitrogen fertilizer on the yield and nutritive value of oat-vetch mixtures. *Journal of Agricultural Science* 112, 57-66.
- Morgavi, D. P.; Beauchemin, K. A.; Nsereko, V. L.; Rode, L. M.; Iwaasa, A. D.; Yang, W. Z.; McAllister, T. A. and Wang, Y. 2000a. Synergy between the ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *trichoderma longibrachiatum*. *J. Dairy Sci.* 83:1310-1321.
- Morgavi, D. P.; Beauchemin, K. A.; Nsereko, V. L.; Rode, L. M.; Iwaasa, A. D.; Yang, W. Z.; McAllister, T. A. and Wang, Y. 2000b. A *trichoderma* feed enzyme preparation enhances adhesion of *fibrobacter succinogenes* to complex substrates but not to pure cellulase. *Proceeding of the XXV Conference on Rumen Function.* Chicago, USA. 33.
- Muirhead, S. 2001. *Direct Fed Microbial, Enzyme and Forage Additive Compendium.* The Miller Publishing Co., Minnetonka, MN. ed.
- Mutsvangwa, T.; Edwards, I. E.; Topps, J. H. and Paterson, G. F. M. 1992. The effect of dietary inclusion of yeast culture (YEA-SACC) on patterns of rumen fermentation, food intake and growth of intensively fed bulls. *Br. Society Anim. Prod.* 55:35-40.

- Muwalla, M. M.; Haddad, S. G. and Hijazeen, M. A. 2007. Effect of fibrolytic enzyme inclusion in high concentrate fattening diets on nutrient digestibility and growth performance of awassi lambs. *Livest. Sci.* 125-137.
- Newbold, C. J. 2003. Role of probiotics in animal nutrition and their link to the demands of european consumers. International One-Day Seminar. Lelystad.
- Newbold, C. J.; McIntosh, F. M. and Wallace, R. J. 1998. Changes in the microbial population of a rumen-simulating fermenter in response to yeast culture. *Can. J. Anim. Sci.* 78:241-244.
- Newbold, C. J.; Wallace, R. J.; Chen, X. B. and McIntosh, F. M. 1995. Different strains of *saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. *J. Anim. Sci.* 73:1811-1818.
- Newbold, C. J.; Wallace, R. J. and McIntosh, F. M. 1996. Mode of action of the yeast *saccharomyces cerevisiae* as feed additive for ruminants. *Br. J. of Nut.* 76:249-261.
- Newbold, J. 1997. Proposed mechanisms for enzymes as modifiers of ruminal fermentation. Proceedings of the 8th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, (AFRNS`97), Gainesville, Florida, USA. 146-159.
- Newbold, C.J. 1990. Probiotics as feed additives in ruminant diets. 51st Minnesota Nutrition Conference. p 102-118.
- Newman, K.; Jacques, K. and Buede, R. 1993. Effect of mannan oligosaccharide on performance of calves fed acidified and non-acidified milk replacers. *J Dairy Sci.* 71(Suppl. 1): 271 .(Abstr.).
- Nguyen, T. H.; Fleet, G. H. and Rogers, P. L. 1998. Composition of the cell wall of several yeast species. *App. Microbiol. Biotechnol.* 50:206-212.
- Nilson, A. J.; Peralta, M. F. and Miazzi, R. D. 2004. Use of brewer's (*S. cerevisiae*) to replace part of the vitamin mineral premix in finisher broiler diets. En XXII World's Poultry Congress. Sesión Food Additives. Istanbul Turkey. 495.
- Nocek, J. E.; Kautz, W. P.; Leedle, J. A. Z. and Allman, J. G. 2002. Ruminal supplementation of direct-fed microbials on diurnal pH variation and in situ digestion in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 85:429-433.

- Nocek, J. E.; Kautz, W. P.; Leedle, J. A. Z. and Block, E. 2003. Direct-fed microbial supplementation on the performance of dairy cattle during the transition period. *J. Dairy Sci.* 86:331-335.
- Nocek, J.E.; Holt, M.G.; Oppy, J. 2011. Effects of supplementation with yeast culture and enzymatically hydrolyzed yeast on performance of early lactation dairy cattle. *J Dairy Sci.*; 94: 4046-4056.
- Nsereko, V. L.; Morgavi, D. P.; Rode, L. M.; Beauchemin, K. A. and McAllister, T. A. 2000a. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 88:153-170.
- Nsereko, V. L.; Morgavi, D. P.; Beauchemin, K. A. and Rode, L. M. 2000b. Inhibition of ruminant fed enzymes polysaccharides activities by extracts from silages. *Can. J. Anim. Sci.* 80:523-526.
- Nussio, L. G.; Huber, J. T.; Theurer, C. B.; Nussio, C. B.; Santos, J.; Tarazon, M.; Lima-Filho, R. O.; Riggs, B.; Lamoreaux, M. and Treacher, R. J. 1997. Influence of a cellulase/xylanase complex (C/X) on lactational performance of dairy cows fed alfalfa hay based diets. *J. Dairy Sci.* 80 (Suppl.1):220.
- Oeztuerk, H.; Emre, B.; Breves, G. 2016. Effects of hydrolysed yeasts on ruminal fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec). *Veterinarni Medicina*, 61, (4): 195–203
- Opsi, F.; Fortina, R.; Tassone, S.; Bodas, R.; Lopez, S. 2012. Effects of inactivated and live cells of *Saccharomyces cerevisiae* on *in vitro* ruminal fermentation of diets with different forage:concentrate ratio. *Journal of Agricultural Science.* 150, 271–283.
- Oriol, E. 2004. SAF-mannan: Origen, producción y análisis. Presentado en el VI seminario internacional de microbiología aplicada a la nutrición animal. *Bio Springer.* 4.
- Öztürk, H.; Salgirli, Y.; Gönül, A.; Pişkin, J.; Ünler, f.; Emre, M. 2015. Effects of hydrolyzed and live yeasts on rumen microbial fermentation in a semicontinuous culture system (Rusitec). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.* 39: 556-559.

- Pacheco, M.T.; Caballero-Cordoba, G.M.; Sgarbieri, V.C. 1997. Composition and nutritive value of yeast biomass and yeast protein concentrates. *J Nutr Sci Vitaminol*; 43: 601–612.
- Pardo, G.; Villa, F.; Aibar, J.; Fernández-Cavada, S. y Zaragoza, C. 2004. Producción ecológica de cereales en secano semiárido. Ed. Gobierno de Aragón. 8 pp.
- Pérez, M. 2000. Obtención de un hidrolizado de crema de levadura de destilería y evaluación de su actividad probiótica. Tesis Presentada En Opción Al Grado Científico De Doctor En Ciencias Veterinarias. Universidad Agraria De La Habana. Cuba.
- Pettigrew, J. 2000. Mannan oligosaccharides' effects on performance reviewed. *Feedstuffs*. 25:12-14.
- Phipps, R. H.; Sutton, J. D. and Bhat, M. K. 2002. Are enzymes useful in ruminant diets? *Proc. Brit. Soc. Anim. Sci.* 247-248.
- Pinos-Rodríguez, J. M.; González, M.; Mendoza, G.; Bárcena, R. y Cobos, M. 2002. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la digestibilidad in vitro de la pared celular de heno de alfalfa (*medicago sativa*) o de ballico (*lolium perenne*). *Interciencia*. 27:28-32.
- Pinos-Rodríguez, J. M.; González, M.; Mendoza, G.; Bárcena, R. y Cobos, M. 2001. Efecto de enzimas fibrolíticas glucosiladas en la digestibilidad in vitro de MS y MO de alfalfa (*medicago sativa*) y ballico (*lolium perenne*). *Revista Científica, FCV-LUZ*. 11:505-509.
- Pinos-Rodríguez, J. M. y González, S. S. 2001. Uso de enzimas fibrolíticas glucosiladas en la alimentación de rumiantes. *Biotecnología en la industria de la alimentación animal*. Gutiérrez, M. L.; Hoyos, L. G. (Eds) Volumen VIII. Alltech, México. D. F. 57-73.
- Piva, G.; Belladonna, S.; Fusconi, G. and Sicbaldi, F. 1993. Effects of yeast on dairy cows performance, ruminal fermentation, blood components and milk manufacturing properties. *J. Dairy Sci.* 76:2717-2722.
- Præsteng, K.E.; Pope, P.B.; Cann, I.K.O.; Mackie, R.I.; Mathiesen, S.D.; Folkow, L.P. 2013. Probiotic dosing of *Ruminococcus flavefaciens* affects rumen microbiome structure and function in reindeer. *Microb. Ecol.* 66:840-849.

- Prahalada, H. K.; Kamra, D. N. and Pathak, N. N. 2001. Effect of feeding *saccharomyces cerevisiae* and *lactobacillus acidophilus* on nutrient utilization and performance of crossbred cattle calves. *J. Anim. Sci.* 16:103-107.
- Putnam, D. E.; Schwab, C. G.; Socha, M. T.; Whitehouse, N. L.; Kierstead, N. A. and Grathwaite, D. B. 1997. Effect of yeast culture in the diets of early lactation dairy cows on ruminal fermentation and passage of nitrogen fractions and amino acids to the small intestine. *J. Dairy Sci.* 80:374-384.
- Ramaswami, N. 2000. Performance of crossbred male calves fed on diet supplemented with *lactobacillus acidophilus*. M. V. Sc. Thesis, IVRI Deemed to be University, Izatnagar, India.
- Ranilla, M.J.; Tejido, M.L.; Giraldo, L.A.; Triccarico, J.M.; Carro M.D. 2008. Effects of an exogenous fibrolytic enzyme preparation on *in vitro* ruminal fermentation of three forages and their isolated cell walls. *Animal Feed Science and Technology* 145, 109-121.
- Reglamento (CE) 834/2007 del Consejo, sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el R(CEE)2029/91. DO L189/1 de 20.7.2007.
- Reglamento (CEE) No 2092/91 del Consejo, de 24 de junio de 1991, sobre la producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios. DO L 198 de 22.7.1991.
- Retta, K. 2016. Role of probiotics in rumen fermentation and animal performance: A review. *International Journal of Livestock Production*. Vol 7(5): 24-32.
- Reyes, J.; Alfonso, F.; Rey, S.; Legarda, Y.; Noda, A. y Rodríguez, Y. 2005. Resultado de la evaluación del probiótico sorbital en vacas lecheras en pastoreo. I Congreso Internacional De Producción Animal. Ciudad De La Habana, Cuba. 1216-1219.
- Rezaeian, M.; Beakes, G. W. and Chaudhry, A. S. 2005. Relative fibrolytic activities of anaerobic rumen fungi on untreated and sodium hydroxide treated barley straw in vitro culture. *Anaerobe*. 11:163-175.
- Roa, M. L.; Bárcena-Gama, J. R.; González, M. S.; Mendoza, G. M.; Ortega, M. E. and García, C. B. 1997. Effect of fiber source and yeast culture (Sc1026)

- on digestion and the environment in the rumen of cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64:327-336.
- Robinson, P. H. and Garret, J. E. 1999. Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on adaptation of cows to postpartum diets and on lactational performance. *J. Anim. Sci.* 77:988-999.
- Rode, L. M.; Yang, W. Z. and Beauchemin, K. A. 1999. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 82:2121-2126.
- Rojo-Rubio, R.; Mendoza, G. D.; Montañez, O. D.; Rebollar, S.; Cardoso, D.; Hernández, J y González, F. J. 2007. Enzimas amilolíticas exógenas en la alimentación de rumiantes. *Universidad y Ciencia.* 23:173-182.
- Rojo, R.; Kholif, A.E.; Salem, A.Z.M.; Elghandour, M.M.Y.; Odongo, N.E.; Montes De Oca, R.; Rivera, N.; Alonso, M.U. 2015. Influence of cellulase addition to dairy goat diets on digestion and fermentation milk production and fatty acid content. *J. Agr. Sci. (Cambridge)*, 153: 1514–1523.
- Rosen, G. D. 2005. Halo-analysis of the effects of genetic, managemental, chronological and dietary variables on the efficacy of a pronutrient mannanoligosaccharide in broilers. *Br. Poult. Sci. Abstracts.* 1:27-29.
- Ross, G. J. and Wang, C. 1993. Extractable Al, Fe, Mn, and Si. *Soil Sampling and Methods of Analysis.* M. R. Carter (Ed.). Lewis Publ., Boca Raton, FL. 239-246.
- Rossi, F.; Cocconcelli, P. S. and Masoero, F. 1994. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on growth and lactate utilization by the ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii*. *Ann. Zootech.* 44:403-409.
- Rotger, A. 2005. Fermentación ruminal, degradación proteica y sincronización energía - proteína en terneras en cebo intensivo. Tesis (En Opción Al Grado Científico De Doctor En Producción Animal) Facultad De Ciencias Veterinarias. Universidad De Barcelona. España. 208.
- Roy, J. H. B. 1980. The digestive system of the calf. Pages 201-219. *The digestive system of the calf.*
- Salama, A. A. K.; Caja, G.; Garin, D.; Albanell, E.; Such, X. and Casals, R. 2002. Effects of adding a mixture of malate and yeast culture (*Saccharomyces*

- cerevisiae*) on milk production of murciano-granadina dairy goats. Anim. Res. 51:295-303.
- Salem, A.Z.M.; Buendia-Rodríguez, G.; Elghandour, M.M.M.; Mariezcurrena, M.M.A.; Peña, J.F.; Pliego, A.B.; Chagoyan, J.C.V.; Cerrillo, A.M.; Rodríguez, M.A. 2015. Effects of cellulase and xylanase enzymes mixed with increasing doses of *Salix babylonica* extract on *in vitro* rumen gas production kinetics of a mixture of corn silage with concentrate. Journal of Integrative Agriculture; 14(1): 131–139.
- Salem, A.Z.M.; Gado, H.M.; Colombatto, D.; Eghandour, M.M.Y. 2013. Effect of exogenous enzymes on nutrient digestibility, ruminal fermentation and growth performance in beef steers. Livest. Sci.; 154: 69–73.
- Salinas-Chavira, j.; Arzola, C.; González-Vizcarra, V.; Manríquez-Núñez, O.M.; Montaña-Gómez, M.F.; Navarrete-Reyes, J.D.; Raymundo, C. and Zinn, R.A. 2015. Influence of feeding enzymatically hydrolyzed yeast cell wall on growth performance and digestive function of feedlot cattle during periods of elevated ambient temperature. Asian Australas. J. Anim. Sci. Vol. 28, No. 9: 1288-1295
- Sánchez, B.C.; Joven, T.R.; Carroll, J.A.; Corley, J.R.; Rathmann, R.J.; Johnson, B.J. 2014. Yeast cell wall supplementation alters the metabolic responses of crossbred heifers to an endotoxin challenge. Innate Immun; 20: 104-112.
- Sánchez, B.C.; Joven, T.R.; Carroll, J.A.; Corley, J.R.; Rathmann, R.J.; Johnson, B.J. 2013. Yeast cell wall supplementation alters aspects of the physiological and acute phase responses of crossbred heifers to an endotoxin challenge. Innate Immun. 19:411-419.
- Santra, A. and Karim, S. A. 2002. Influence of ciliate protozoa on biochemical changes and hydrolitic enzyme profile in the rumen ecosystem. J. Appl. Microbiol. 92:801-811.
- Saro, C.; Ranilla, M. J. and Carro, M. D., 2012. Postprandial changes of fiber-degrading microbes in the rumen of sheep fed diets varying in type of forage as monitored by real time PCR and automated ribosomal intergenic spacer analysis. J. Anim. Sci., n. 12, pp. 4487-4494.
- Schingoethe, D. J.; Stegeman, G. A. and Treacher, R. J. 1999. Response of lactating dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding. J. Dairy Sci. 82:996-1003.

- Shannon, C. E. and Weaver, W. 1949. The mathematical theory of communication. Urbana, IL, USA, University of Illinois Press.
- Shadmanesh A., 2014. Effect of Dietary Supplement With Fibrolytic Enzymes on The Productive Performance of Early Lactating Dairy Cows Indian Journal Of Fundamental And Applied Life Sciences ISSN: 2231-6345 (Online) Vol. 4 (2) April-June, Pp. 396-401.
- SEAE, 2014. Dossier informativo ganadería ecológica en España. Campaña de sensibilización del proyecto Ganaeco. Sociedad Española de Agricultura Ecológica, Sociedad Española de Agroecología). Madrid. España.
- Sodiy Arce, D.; González Martínez, R. and Martínez Rangel, S. 2004. Efectos de la defaunación sobre la fermentación. [Http://www.Produccionbovinadecarne.Com](http://www.Produccionbovinadecarne.Com). 2011.
- Spark, M.; Paschertz, H. and Kamphues, J. 2005. Yeast (different sources and levels) as protein source in diets of reared piglets: Effects on protein digestibility and N-metabolism. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 89:184-188.
- Srinivasan, K.; Murakami, M.; Nakashimada, Y. and Nishio, N. 2001. Efficient production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis*, in a repeated batch culture. Journal of Bioscience and Bioengineering. 91:153-158.
- Steckley, J. D.; Grieve, D. G.; Macleod, G. K. and Moran, E. T. 1979. Brewer's yeast slurry, 1. Composition as affected by length of storage, temperature and chemical treatment. J. Dairy Sci. 62:947-953.
- Stone, C. W. 2006. Yeast products in the feed industry: A practical guide for feed professionals. [Http://en.Engormix.com/MA-Feed-machinery/formulation/articles/yeast-Products-Feed-Industry-t243/800-p0.Htm](http://en.Engormix.com/MA-Feed-machinery/formulation/articles/yeast-Products-Feed-Industry-t243/800-p0.Htm). 2011.
- Sullivan, H. M. and Martin, S. A. 1999. Effect of *saccharomyces cerevisiae* yeast culture on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. J. Dairy Sci. 77:3073- 3079.
- Sun, P.; Wang, J.Q.; Zhang, H.T. 2010. Effects of *Bacillus subtilis natto* on performance and immune function of preweaning calves. J. Dairy Sci. 93:5851-5855.

- Tadele, Y.; Animut, G. 2015. Effect of exogenous enzymes on ruminal degradation of feed and animal performance: A review. *Advances in Life Science and Technology*. Vol.28, 60-69.
- Tarek A., M.; Ahmed E., K; Sobhy M., K; Abdelkader M., K; Xuezhao, S; Salem, A.Z. 2016. Effects of two enzyme feed additives on digestion and milk production in lactating Egyptian buffalo. *Annals of Animal Science*. 16, 1. 209-222.
- Taylor, K. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 56:49-58.
- Titi, H. H. and Lubbadah, W. F. 2004. Effect of feeding cellulase enzyme on productive responses of pregnant and lactating ewes and goats. *Small Rum. Res*. 52:137-142.
- Titi, H. H.; Richardson, C. R. and Cobb, C. W. 1998. Effects of fibrolytic enzyme treatment on forage dry matter and organic matter disappearance. *J. Anim. Sci*. 76 (Suppl.1):293.
- Titi, H. H. and Tabbaa, M. J. 2003. Replacing soybean meal with sunflower meal with or without fibrolytic enzymes in fattening diets of goat kids. *Small Rum. Res*. 48:45-50.
- Togtokhbayar, N.; Cerrillo, S.M.A.; Jigjidpurev, S.; Shinekhuu, J.; Urantulkhuur, D.; Nergui, D.; Elghandour, M.M.Y.; Odongo, N.E.; Kholif, A.E. 2015. Effect of exogenous xylanase on rumen *in vitro* gas production and degradability of wheat straw. *Anim Sci J*; doi: 10.1111/asj.12364.
- Tricarico, J. M.; Dawson, K. A. and Newman, K. E. 1998. Effects of a microbial enzyme preparation (fibrozyme) on ruminal digestion of fescue hay. *J. Anim. Sci*. 76 (Suppl.1):286.
- Uyeno, Y.; Shigemori, S.; Shimosato, T. 2015. Effect of Probiotics/ Prebiotics on Cattle Health and Productivity: Mini review. *Microbs. Environ*. 30(2):126-132.
- Valdes, K.I.; Salem, A.Z.M.; Lopez, S.; Alonso, M.U.; Rivero, N.; Elghandour, M.M.Y.; Domínguez, I.A.; Ronquillo, M.G. and Kholif, A.E. 2015. Influence of exogenous enzymes in presence of *Salix babylonica* extract on digestibility, microbial protein synthesis and performance of lambs fed maize silage. *J Agr Sci*.; 153:732-742.

- Valenciaga, D.; Chongo, B.; Herrera, R. S.; Torres, V.; Oramas, A.; Cairo, J. G. y Herrera, M. 2009. Efecto de la edad de rebrote en la composición química de *pennisetum purpureum* vc. CUBA CT-115. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 43:73-79.
- Van Vuuren, A. M. 2003. Role of probiotics in animal nutrition and their link to the demands of european consumers. International One-Day Seminar. Lelystad.
- Vanbelle, M.; Teller, E. and Focant, M. 1990. Probiotics in animal nutrition: A review. Arch. Anim. Nutr. 40:543-567.
- Varga, G. A. and Kolver, E. S. 1997. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. J. Nutr. 819S- 823S.
- Vyas, D.; Uwizeye, A.; Mohammed, R.; Yang, W.Z.; Walker, N.D.; Beauchemin, K.A. 2014 The effects of active dried and killed dried yeast on subacute ruminal acidosis, ruminal fermentation, and nutrient digestibility in beef heifers. J Anim Sci.; 92: 724–732.
- Wallace, R. J. and Newbold, C. J. 1993. Probiotics for ruminants. Probiotics: The Scientific Basis. Fuller, R. (Eds). Chapman and Hall, London. 317-325.
- Wallace, R.J.; Newbold, C.J. 1993a. Rumen fermentation and its manipulation: the development of yeast cultures as feed additives. En: Biotechnology in the Feed Industry (Lyons TP, Ed.). Alltech Technical Publications, Nicholasville, Kentucky. pp- 173-192.
- Wallace, R. J.; Wallace, S. J. A.; McKain, N.; Nsereko, V. L. and Hartnell, G. F. 2001. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. J. Anim. Sci. 79:1905-1916.
- Wang, Y.; McAllister, T. A.; Yanke, L. J.; Beauchemin, K. A.; Morgavi, D. P.; Rode, L. M. and Yang, W. Z. 2001. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on the digestión of alfalfa hay and barley straw by cellulolytic ruminal bacteria. J. Anim. Sci. 79 (Suppl.1):285.
- Wang, Y.; McAllister, T. A.; Rode, L. M.; Beauchemin, K. A.; Morgavi, D. P.; Nsereko, V. L.; Iwaasa, A. D. and Yang, W. 2001. Effects of an exogenous enzyme preparation on microbial protein synthesis, enzyme activity and attachment to feed in the rumen simulation technique (RUSITEC). Br. J. Nutr. 85:325-332.

- Wattiaux, M. A. y Armentano, L. E. 2000. Metabolismo de carbohidratos en vacas lecheras. Esenciales Lecheras. Instituto Babcock Para La Investigación y Desarrollo Internacional De La Industria Lechera. Universidad De Wisconsin – Madison. 9-12.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol hypochlorite reaction for determination of ammonia. Analytical Chemistry. American Chemical Society. 39:971-974.
- Williams, A. G. and Coleman, G. S. 1988. The rumen protozoa. Pages 77-128
- Williams, A. G.; Withers, S. E. and Coleman, G. S. 1984. Glycoside hydrolases of rumen bacteria and protozoa. Curr. Microbiol. 10:287-294.
- Williams, P. E. V.; Tait, C. A. G.; Innes, G. M. and Newbold, C. J. 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. J. Anim. Sci. 69:3016-3026.
- Williams, P. E. V. and Newbold, C. J. 1990. Rumen probiosis: The effects of novel microorganisms on rumen fermentation and ruminant productivity. Haresing, W. and Cole, D. J., (Eds). Recent Advances in Animal Nutrition 3. Cornwall. 14:211-227.
- Windisch, W.; Schedle, K.; Plitzner, C.; Kroismayr, A. 2008. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. J. Anim. Sci. 86(14):Suppl. E140-E148.
- Yamamoto, S.; Nakano, M.; Kitagawa, W.; Tanaka, M.; Sone, T.; Hirai, K.; Asano, K. 2014. Characterization of multi-antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from beef cattle in Japan. Microbes Environ. 29:136-144.
- Yang, W. Z.; Beauchemin, K. A. and Rode, L. M. 2000. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. J. Dairy Sci. 83:2512-2520.
- Yang, W. Z.; Beauchemin, K. A. and Rode, L. M. 1999. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 82:391-403.
- Yang, W. Z.; Rode, L. M and Beauchemin, K. A. 1998. Effects of fibrolytic enzyme additives on milk production of dairy cows. J. Dairy Sci. 81 (Suppl.1):320.
- Yanke, L. J.; Selinger, L. B. and Cheng, K. 1995. Comparison of cellulolytic and xylanolytic activities of anaerobic rumen fungi. Proceedings of the 23 Biennial Conferences on Rumen Function. Chicago. USA. 32.

- Zheng, W.; Schingoethe, D. J.; Stegeman, G. A.; Hippen, A. R. and Treacher, R. J. 2000. Determination of when during the lactation cycle to start feeding a cellulose and xylanase enzyme mixture to dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:2319-2325.
- Zinn, R. A. and Salinas, J. 1999. Influence of fibrozyme on digestive function and growth performance of feedlot steers fed a 78% concentrate growing diet. *Biotechnology in the Feed Industry*. Lyons, T. P.; Jacques, K. A. (Eds). Proceedings of the Fifteenth Annual Symposium. Nottingham University Press. Loughborough. 313-319.
- ZoBell, D. R.; Wiedmeier, R. D.; Olson, K. C. and Treacher, R. 2000. The effect of an exogenous enzyme treatment on production and carcass characteristics of growing and finishing steers. 87: 279-285. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87:279-285.