



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

EVALUACIÓN DE LA ADICIÓN DE LEVADURA CON  
XILANASA SOBRE LA RESPUESTA PRODUCTIVA, EL  
ESTADO DE SALUD Y LA DIGESTIBILIDAD DEL  
ALIMENTO EN BECERROS LACTANTES AL DESTETE

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS  
NATURALES

P R E S E N T A

AGUSTÍN HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México; junio de 2018.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

EVALUACIÓN DE LA ADICIÓN DE LEVADURA CON  
XILANASA SOBRE LA RESPUESTA PRODUCTIVA, EL  
ESTADO DE SALUD Y LA DIGESTIBILIDAD DEL  
ALIMENTO EN BECERROS LACTANTES AL DESTETE

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS  
NATURALES

P R E S E N T A

AGUSTÍN HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

COMITÉ TUTORIAL  
TUTOR ACADÉMICO.  
DR. ABDELFATTAH ZEIDAN MOHAMED SALEM

TUTORES ADJUNTOS.  
DRA. MARIA ANTONIA MARIEZCURRENA BERASAIN  
DR. LUIS MIGUEL CAMACHO DÍAZ.

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México; junio de 2018.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado durante el periodo del doctorado.

A la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales por permitirme ser parte de su comunidad y brindarme, a través de su plantilla de profesores y personal administrativo, enseñanzas académicas, profesionales y de vida.

Al Dr. Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem, por su disposición, apoyo, su atinada dirección y sus invaluable consejos.

Al Dr. Luis Miguel Camacho Díaz por su disposición para formar parte del comité tutorial.

A la Dra. María Antonia Mariezcurrena Berasain por su disposición, amabilidad y comentarios puntuales que me han formado como mejor profesionista.

Al personal técnico y administrativo del Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México por las facilidades otorgadas para la realización de la presente.

Al gran equipo de trabajo liderado por el Dr. Salem: Dra. Mona, compañeros Olga, Juan, Laura, Alex, Armando.

## DEDICATORIA

A mi familia, que han representado una fuente de aliento para los momentos de desesperanza; que han celebrado y compartido mis logros.

## RESUMEN

Los nutriólogos y microbiólogos de los animales han desarrollado recientemente un gran interés en el uso de aditivos alimentarios para modificar la fermentación ruminal y reducir la producción de gases de efecto invernadero (GEI) en el rumen, con el uso de enzimas exógenas y levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). La presente tesis de investigación, en tres experimentos, tuvo como objetivo evaluar el impacto de *Saccharomyces cerevisiae* y la enzima xilanasa sobre parámetros productivos, el estado de salud y la digestibilidad del alimento en becerros lactantes al destete, así como las producciones de metano (CH<sub>4</sub>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

**Del primer experimento**, sus resultados fueron publicados como un trabajo de investigación original en el **Journal of Cleaner Production 148(2017): 616-623** y tuvo como objetivo evaluar el potencial de suplementar las dietas de becerros con enzimas exógenas (xilanasa, XYL) y levadura (*Saccharomyces cerevisiae* [SC]) en el control sostenible de las producciones de metano (CH<sub>4</sub>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en la crianza de becerros. Tres niveles diferentes de dietas suplementadas de XYL (0, 3 y 6 µl / g de materia seca (MS)), SC (0, 2 y 4 mg / g de MS) y mezcla de XYL y SC (0, 2 µl de XYL) + 2 mg SC, 6 µl XYL + 4 mg SC / g de MS). La producción de gas asintótico (GP) disminuyó consistentemente por cada uno de los aditivos con el valor más bajo a la dosis alta de la mezcla XYL + SC (P <0.05) en comparación con el control y la baja dosis de la mezcla XYL + SC. La producción de metano se redujo mediante la inclusión de aditivos (P <0.05) en comparación con el tratamiento control, sin aditivo. Xylanasa + SC en todas las dosis incrementó la producción de CO<sub>2</sub> (P <0.05) mientras que la dosis alta tuvo la reducción más significativa estadísticamente (P <0.05) en la producción de GP y CH<sub>4</sub> en comparación con los tratamientos: control, XYL y SC en diferentes dosis. La interacción entre el líquido ruminal y aditivo se observó para la tasa de GP (P = 0.027) y el retraso inicial antes de GP (P <0.001). La inclusión de las mezclas XYL, SC y XYL + SC tuvo menos GP asintótica mientras que la mezcla XYL + SC tuvo la menor demora inicial (39%) antes de que comenzara GP. El XYL + SC tuvo la tasa más baja de producción de CH<sub>4</sub> (9%) y la producción más alta de CO<sub>2</sub> asintótico (81%). Los hallazgos de este estudio indican que la inclusión de aditivos XYL o SC puede mejorar la fermentación ruminal y reducir la producción de gases de efecto invernadero. El

estudio también estableció que la mezcla de XYL y SC es más eficiente en la reducción de emisiones de gas y CH<sub>4</sub> para condiciones de producción ambiental más limpias en la cría de becerros.

**Los resultados del segundo experimento** fueron publicados en **Journal of Cleaner Production 142(2017): 2384-2392**, este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del aceite de ajo, la enzima xilanasa y la levadura en la producción de biogás *in vitro* de becerros lecheros alimentados con una dieta alta en concentrados. Se usaron los contenidos de rumen de terneros Holstein de 60 días alimentados con una dieta concentrada como fuente de inóculo. El aceite de ajo se incluyó a 30, 120, 250 y 500 µl / g de materia seca (MS), mientras que la xilanasa se incluyó a 3 y 6 µl / g de MS y la levadura a 2 y 4 mg / g de MS. El sustrato utilizado fue el mismo que la dieta proporcionada a los terneros. El aceite de ajo disminuyó linealmente (P <0.05) la digestibilidad *in vitro* de MS y no hubo diferencias entre los niveles de xilanasa o levadura. El aceite de ajo disminuyó (P <0.05) la degradabilidad de la MS mientras que la xilanasa y la levadura no tuvieron efecto. La fase de latencia se incrementó linealmente (P <0.05) con un nivel creciente de aceite de ajo. El aceite de ajo redujo cuadráticamente la producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. El tratamiento de control tuvo la mayor producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> seguido de xilanasa, levadura y aceite de ajo. El aumento en el nivel de xilanasa y levadura aumentó la producción de CO<sub>2</sub> (P <0.05). Se puede concluir que el aceite de ajo seguido de levadura y luego la xilanasa puede usarse para mitigar la producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> *in vitro* de becerros lecheros alimentados con una dieta alta en concentrados. Sin embargo, se requiere más investigación para establecer la eficacia de dichos aditivos en ensayos *in vivo*.

**El tercer experimento de investigación** (se están trabajando los datos actualmente, para su publicación), su objetivo fue evaluar la adición de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y la enzima xilanasa sobre parámetros productivos, estado de salud y digestibilidad del alimento en becerros lactantes al destete donde se utilizaron 40 becerros raza Holstein, sin problemas congénitos ni adquiridos, con un

peso de  $40.0 \pm 5.0$  kg y sin signos clínicos evidentes, se distribuyeron en 4 tratamientos: 1).-Control (Alimento Comercial + leche entera (4kg en dos veces/día); 2).-Xilanasa (Alimento Comercial + leche entera (4kg en dos veces/día)+4 ml del producto con xilanasa (Dyadic®Xilanase PLUS, País de origen: USA); 3).-Levadura (Alimento Comercial + leche entera (4kg en dos veces/día)+4 g de levadura (BIOCELL,  $2.0 \times 10^{10}$  cfu/g Min, País de origen México); 4).-Xilanasa con levadura (Alimento Comercial + leche entera (4kg en dos veces/día)+ 4 ml xilanasa + 4 g levadura), bajo un diseño completamente aleatorizado con mediciones repetidas. Los parámetros productivos, se relacionan los valores promedios de los resultados obtenidos de los parámetros productivos que se evaluaron durante los 60 días que duró el experimento, dichos parámetros presentaron variación estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ), en el peso el grupo que recibió enzimas y la mezcla de levadura más enzimas fueron estadísticamente iguales no así para los grupo levadura y control, siendo el control quien tuvo el mayor peso, para talla los grupos que de forma estadística son similares fueron: control, levadura y levadura más enzimas, de forma contraria a enzimas, el consumo de leche solo mostró diferencias en el grupo control ya que estadísticamente los otros tres grupos son iguales, el consumo del alimento iniciador no presentó diferencias ( $P > 0,05$ ), grupo control, enzimas y levadura más enzimas, no así para el grupo levadura que además fue el grupo que menor consumo de materia seca presentó, este mismo comportamiento lo tuvieron la circunferencia y el consumo de agua, para condición de la heces el grupo control levadura y mezcla de levadura más enzimas fueron estadísticamente similares no así el grupo enzimas que fue diferente, en la ganancia diaria de peso el grupo control y enzimas más levadura son similares y diferentes al grupo de enzimas y levadura, presentando mayor ganancia diaria de peso el grupo de becerros que recibió las enzimas.

**Conclusión general:** El metano y el CO<sub>2</sub> de la fermentación entérica en el sistema digestivo de los rumiantes son dos de los principales contribuyentes de las emisiones de gases de efecto invernadero en el mundo. La mitigación de la pérdida de estos gases a partir de la producción de rumiantes no solo reducirá la producción

de gases de efecto invernadero a partir de los desechos agrícolas, sino que también reducirá la pérdida de energía neta de alimentación del animal. La levadura, la xilanasas y el aceite de ajo, en diferentes niveles no afectaron las extensiones de GP; sin embargo, el aceite de ajo aumentó la tasa de digestión y la fase de latencia. Además, el aceite de ajo disminuyó la producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, seguido de levadura y xilanasas. Se puede concluir que el aceite de ajo seguido de levadura y luego la xilanasas puede usarse para mitigar la producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> *in vitro* de terneros lecheros alimentados con una dieta alta en concentrados. Sin embargo, se requiere más investigación para establecer la eficacia de dichos aditivos en ensayos *in vivo*.

En el experimento *in vivo* los aditivos (*Saccharomyces cerevisiae*) y la enzima xilanasas no afectaron los parámetros de ingestión del alimento, el agua o leche en becerros lactantes del día 4 al día 60. Sin embargo, la adición de la xilanasas mejoró la ganancia de peso de los becerros, pero no hubo diferencia con respecto al control o a la combinación de levadura con xilanasas.

## ABSTRACT

Animal nutritionists and microbiologists have recently developed a great interest in the use of food additives to modify ruminal fermentation and reduce the production of greenhouse gases (GHG) in the rumen, with the use of exogenous enzymes of xylanase (XYL) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae* [SC]). This current research thesis is of three experiments, aimed to evaluate the impact of SC and XYL on productive parameters, health status and nutrient digestibility of diet in young lactating calves at weaning, as well as the *in vitro* production of methane (CH<sub>4</sub>) and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>).

In the first experiment, the results were published as a research paper in the Journal of Cleaner Production 148 (2017): 616-623 and aimed to evaluate the potential of supplementing calf diets with XYL and yeast SC in the sustainable control of the production of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> in calves. Three different levels of XYL supplemented diets (0, 3 and 6 µl / g of dry matter (DM)), SC (0, 2 and 4 mg / g of DM) and mixture of XYL and SC (0, 2 µl of XYL) + 2 mg SC, 6 µl XYL + 4 mg SC / g of DM). The asymptotic gas production (GP) consistently decreased with each one of the feed additives and the lowest value was at the high dose of the XYL + SC mixture (P <0.05) versus control, as well as the low dose of XYL + mixture SC. The CH<sub>4</sub> production was reduced by the inclusion of additives (P <0.05) versus control. The addition of XYL + SC in all doses increased CO<sub>2</sub> production (P <0.05) while the high dose had the most significant reduction (P <0.05) in GP and CH<sub>4</sub> production compared to other treatments of control, XYL and SC at different doses. The interaction between ruminal fluid and additive was observed for the GP rate (P = 0.027) and the initial delay before GP (P <0.001). The inclusion of the XYL, SC and XYL + SC mixtures had less asymptotic GPs while the XYL + SC mixture had the lowest initial delay (39%) before GP began. The XYL + SC had the lowest rate of CH<sub>4</sub> production (9%) and the highest production of asymptotic CO<sub>2</sub> (81%). The findings of this study indicate that the inclusion of XYL or SC additives can improve ruminal fermentation and reduce the production of greenhouse gases. The study also established that the mixture of XYL and SC is more efficient in reducing gas emissions and CH<sub>4</sub> for cleaner environmental production conditions in calf rearing.

The results of the second experiment were published in Journal of Cleaner Production 142 (2017): 2384-2392, this study aimed to evaluate the effect of garlic oil, xylanase enzyme and yeast in the production of *in vitro* biogas from dairy calves fed a diet of high concentrates. The rumen content as source of inoculum was collected at 60-day from Holstein calves. Garlic oil was included at 30,120, 250 and 500 µl / g dry matter (DM), while xylanase was included at 3 and 6 µl / g DM and yeast at 2 and 4 mg / g DM. The substrate used was the same as the diet provided

to the calves. Garlic oil linearly decreased ( $P < 0.05$ ) the *in vitro* DM digestibility, and there was no difference between the levels of xylanase or yeast. Garlic oil decreased ( $P < 0.05$ ) DM degradability while xylanase and yeast had no effect. The delay phase was linearly increased ( $P < 0.05$ ) with an increasing level of garlic oil. Garlic oil reduced the production of  $\text{CH}_4$  and  $\text{CO}_2$  quadratically. The control treatment had the highest  $\text{CH}_4$  and  $\text{CO}_2$  production followed by xylanase, yeast and garlic oil. The increase in the level of xylanase and yeast increased the production of  $\text{CO}_2$  ( $P < 0.05$ ). It can be concluded that the garlic oil followed by yeast and then the xylanase can be used to mitigate the production of  $\text{CH}_4$  and  $\text{CO}_2$  *in vitro* of dairy calves fed a diet high in concentrates. However, more research is required to establish the efficacy of said additives in *in vivo* assays.

The third research experiment (under publication), aimed to evaluate the addition of yeast SC and the xylanase enzyme on productive parameters, health status and digestibility of the feed in lactating calves at weaning where 40 Holstein breed calves were used, without congenital or acquired problems, with a weight of  $40.0 \pm 5.0$  kg and without evident clinical signs, they were distributed in 4 treatments: 1) .- Control (Commercial ration + whole milk (4kg twice daily) / day); 2) .- Xylanase (Commercial ration + whole milk (4kg twice daily/ day) +4 ml of the product with xylanase (Dyadic®Xilanase PLUS, Country of origin: USA); 3) Yeast (Commercial ration + whole milk (4kg in two times / day) +4g of yeast (BIOCELL,  $2.0 \times 10^{10}$  cfu / g Min, Country of origin Mexico); 4) .- Xylanase with yeast (Commercial Food + whole milk (4kg in twice / day) + 4 ml xylanase + 4 g yeast), under a di completely randomized with repeated measurements.

The productive parameters, relate the average values of the results obtained from the productive parameters that were evaluated during the 60 days that lasted the experiment, these parameters showed statistically significant variation ( $P < 0.05$ ), in calves weight of the group that received enzymes and mixture of yeast plus enzymes which were statistically differences among treatments. The control being the one that had the most weight gain, and it was statistically similar with yeast and yeast plus enzymes groups. In contrary with the enzymes group, milk consumption only showed differences in control group since statistically the other three groups are equal, the starter food consumption did not present differences ( $P > 0.05$ ), control group, enzymes and yeast plus enzymes, no Thus, for the yeast group, which was also the group with the lowest consumption of dry matter, this same behavior was observed by the circumference and water consumption, for stool condition the yeast control group and yeast mixture plus enzymes were statistically similar not so the group enzymes that was different, in the daily weight gain the control group and enzymes plus yeast are similar and different from the group of enzymes and yeast, the group of calves that received the enzymes presented the greatest daily weight gain.

Overall conclusion: CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> from enteric fermentation in the digestive system of ruminants are the two main contributors of greenhouse gas emissions. Mitigating the loss of these gases from the production of ruminants will not only reduce the production of greenhouse gases from agricultural waste, but will also reduce the net energy loss of animal feed. Yeast, xylanase and garlic oil, at different levels did not affect GP extensions. However, garlic oil increased the digestion rate and the latency phase. In addition, garlic oil decreased the production of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>, followed by yeast and xylanase. It can be concluded that the garlic oil followed by yeast and then the xylanase can be used to mitigate the production of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> *in vitro* from dairy calves fed a diet high in concentrates. However, more research is required to establish the efficacy of said additives in *in vivo* assays.

In the *in vivo* experiment the additives (*Saccharomyces cerevisiae*) and the xylanase enzyme did not affect the ingestion parameters of food, water or milk in lactating calves from day 4 to day 60. However, the addition of xylanase improved the gain of calves weight, but there was no difference with respect to the control or combination of yeast with xylanase.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	I
DEDICATORIA.....	II
RESUMEN .....	III
ABSTRACT .....	VII
ÍNDICE DE CUADROS .....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XII
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
III. JUSTIFICACIÓN .....	21
IV. HIPÓTESIS.....	22
V. OBJETIVOS.....	23
5.1 Objetivo general.....	23
5.2 Objetivos específicos .....	23
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
VII. RESULTADOS.....	32
ARTÍCULOS PUBLICADOS .....	35
VIII. DISCUSIÓN GENERAL .....	52
IX. CONCLUSIONES .....	56
X. LITERATURA CITADA.....	58

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Componentes de la pared celular y enzimas que los hidrolizan .....	19
<b>Cuadro 2.</b> Organismos celulolíticos utilizados en dietas para rumiantes .....	20
<b>Cuadro 3.</b> Parámetros productivos por variables en becerros Holstein lactantes tratados en enzima, levadura o la combinación de ambas .....	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Consumo de agua ml/día de becerros Holstein lactantes tratados en enzima, levadura o la combinación de ambas .....	33
<b>Figura 2.</b> Consumo de alimento gr/día de becerros Holstein lactantes tratados en enzima, levadura o la combinación de ambas .....	34

## I. INTRODUCCIÓN

El estudio del ecosistema ruminal implica analizar el funcionamiento de una compleja variedad de bacterias anaerobias obligadas, hongos y protozoarios (Forsberg y Cheng, 1992).

Debido a la alimentación de los rumiantes el trabajo de las enzimas ruminales debe dirigirse estrictamente a la digestión de compuestos fibrosos que una vez fermentados se transforman en productos como ácidos grasos volátiles que posteriormente serán absorbidos e implementados como fuente de energía (Chesson y Forsberg, 1997).

Así pues, la composición de la pared celular de las plantas está formada por una diversidad de polisacáridos de los que destacan la celulosa, hemicelulosa y la lignina (Jung *et al.*, 1991).

La lignina es particularmente una barrera que dificulta que exista una adecuada hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa (Cheng *et al.*, 1999). Por lo que el ingreso de las enzimas degradantes a la planta se ve limitado.

Aún bajo esta limitación, la alimentación de los rumiantes continúa basándose en una gran cantidad de unidades de producción particularmente en pequeña escala en subproductos del sector agrícola con un elevado contenido lignocelulósico, el cual es de baja calidad nutricional por la dificultad que guarda para ser digerido.

Por lo tanto si la dieta se basa en residuos agrícolas, la degradabilidad de los polisacáridos traspolado al beneficio nutricional debe ser redituable (Hamer, 2003; Angenent *et al.*, 2004, Das y Singh, 2004, Haight, 2005).

Tras años de investigación se ha logrado adaptar a las dietas animales enzimas exógenas que eficienticen la degradación y por ende aumenten los valores nutritivos de los forrajes, ganancia de peso (El-Adawy *et al.*, 2008; Rodriguez *et al.*, 2008), incremento en la producción de leche en bovinos (Lewis *et al.*, 1996; Tricarico *et al.*, 2005; Stella *et al.*, 2007) así como en pequeños rumiantes (Stella *et al.*, 2007, Murad *et al.*, 2009).

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 FISIOLÓGÍA DIGESTIVA DEL RUMIANTE**

La particularidad de estos animales se basa en que son capaces de alimentarse de pradera, ensilado y forraje debido a que pueden digerir los componentes de estos forrajes como celulosa y hemicelulosa, condición que los demás animales con un estómago simple no pueden realizar (Relling y Mattioli, 2003).

Según Weimer (1998), se debe apresurar el trabajo de la microbiota ruminal para la digestión de la fibra.

Cualquier alimento y agua que el animal consume es fermentado dando lugar a las células microbianas, ácidos grasos volátiles y gases como dióxido de carbono y metano (McDonald *et al.*, 1995).

El animal y el rumen trabajan en conjunto ya que el primero suministra el alimento y el medio adecuado como anaerobiosis y pH para el desarrollo de bacterias que le darán a él la energía para su desarrollo y ciclo productivo (Hamada, 1976, citado por Angeles, 2000).

### **2.2. ECOSISTEMA RUMINAL**

### **2.3. DESARROLLO PRENATAL DE LOS BOVINOS**

El desarrollo fetal del estómago del bovino es relativamente rápido, pudiendo distinguirse los distintos comportamientos a los 56 días (Church, 1974). Los divertículos gástricos se desarrollan a partir de una dilatación fusiforme del intestino primitivo (Church, 1974). En los embriones bovinos se presentan a los 28 días un estómago primitivo similar al de otros embriones mamíferos (9.5 mm), mientras que a los 36 días ya se manifiestan algunas diferencias en el tejido epitelial y a los 56 días se distinguen bolsas definitivas (50 mm), (Warner, 1958). Una vez

diferenciados los departamentos gástricos hasta el punto de hacerse evidente los cuatro, se observa que se encuentran alineados uno tras otro, ocupando una posición caudal con respecto al hígado y al diafragma; después se dispone en forma de herradura, desplazándose el esbozo del rumen y el retículo hacia la izquierda y arriba, el omaso hacia la derecha y abajo, y el abomaso más hacia la izquierda (Warner, 1958). El rumen se halla entonces entre el diafragma y el riñón primitivo, aumentando de tamaño y desarrollando sus sacos ciegos; girando en dirección caudal para alcanzar su posición definitiva; el abomaso cambia a la vez de posición hacia el lado derecho, debido a un desplazamiento del hígado; los movimientos descritos permiten a los divertículos gástricos adoptar su forma típica de herradura. El tamaño relativo de los distintos departamentos gástricos varía mucho en el curso del desarrollo prenatal; al principio presentan los cuatro las mismas dimensiones, luego predomina el tamaño del rumen cuando este verifica su giro, observándose más adelante un incremento notable del abomaso hasta el punto de superar el volumen del rumen al nacimiento (Warner, 1958). Conjuntamente con el desarrollo externo, se produce el desarrollo de la mucosa de los compartimentos gástricos, observándose primero el esbozo de las hojas del omaso, después los pliegues del abomaso, a continuación las crestas del retículo y finalmente las vellosidades del rumen (Wardrop, 1961). La superficie epitelial se desarrolla más lentamente, siendo la superficie interna del rumen lisa durante la etapa fetal, sin papilas visibles (Wardrop, 1961). El desarrollo fetal es relativamente uniforme en cada espacio, ya que el ambiente intrauterino es bastante constante, no disponiéndose de datos suficientes para demostrar cualquier tipo de influencia por parte de la raza, el tamaño, el plano nutricional, entre otros (Church, 1974).

## **2.4 DESARROLLO POSTNATAL DE LOS BOVINOS**

El desarrollo postnatal del estómago de los rumiantes guarda relación con el tamaño y/o la edad y con la dieta. Una dieta líquida retrasa el desarrollo del rumen-retículo, tanto en el grosor y peso de los tejidos como en el desarrollo papilar. El desarrollo

normal determina un crecimiento rápido del rumen-retículo después que el animal comienza a ingerir alimentos sólidos. El consumo de alimentos toscos e inertes estimula el crecimiento; esto se aprecia por el aumento de grosor de los tejidos, aunque la presencia de productos o alimentos capaces de fermentarse originando los ácidos grasos volátiles (AGV) parece un factor necesario para la maduración de las papilas. El tamaño adulto relativo del estómago de los bovinos se alcanza a los 5 o 6 meses (Church, 1974). Durante el nacimiento y en las tres primeras semanas de vida, el ternero no utiliza los tres primeros compartimentos gástricos (rumen, retículo y omaso); su desarrollo demora algún tiempo y está en dependencia de que el animal ingiera un concentrado seco adecuado; entre tanto es necesario suministrarle leche o un sucedáneo lácteo líquido apropiado. Durante la primera fase de vida el alimento líquido se dirige directamente al cuarto compartimiento gástrico (abomaso), aquí se coagula y la digestión prosigue, como en los monogástricos. Es imponderable la necesidad en la dieta del becerro recién nacido de un concentrado adecuado y especialmente durante las tres primeras semanas de nacido, porque el aparato enzimático del becerro no está bien adaptado a digerir a no ser una cantidad bastante pequeña de ingredientes alimenticios (Church, 1974).

## **2.5 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO RUMINAL:**

La edad:

A pesar del desarrollo lento con una dieta de leche, el estómago tiene un crecimiento innato potencial, pues un gran número de investigadores han demostrado un absoluto incremento en el volumen y el peso del tejido sobre tales tratamientos (Warner, 1956).

La dieta:

El aumento en peso y volumen de los pre estómagos está en dependencia del régimen alimenticio. El desarrollo máximo de la pared y la mucosa ruminal se obtienen con los alimentos sólidos y secos que puedan dar lugar a la formación de AGV. El peso del contenido del rumen en relación con el contenido total del tracto digestivo da la progresión siguiente: (Craplet, 1970). 1 mes 40 %, 2 meses 65 %, 3-

4 meses 75 %. Experimentos de Perón y Ruiz (1992), concluyen que la dieta es el factor fundamental o determinante en la morfología de la pared ruminal. Las dietas basadas en miel tienen un desarrollo más pobre que las dietas de concentrados, y el peso y el volumen de la ingestión son factores determinantes del volumen del rumen y no la composición del mismo.

#### Retículo:

Esta víscera está poco desarrollada en el ternero lactante y está situada en la subregión xifoidea; su cara izquierda mira hacia el bazo, la derecha hacia el omaso, la craneal al hígado y al diafragma; mientras que la caudal y la dorsal miran hacia el rumen; y por último, la cara ventral del abomaso, sobre el cual se apoya separándola de la pared abdominal (Seren, 1967). El retículo representa la porción cráneo-ventral del estómago y se localiza centralmente detrás del diafragma. Las paredes ventrales derechas del órgano quedan normalmente libres, por la izquierda se pone en contacto con las porciones ventrales de los espacios intercostales sexto y séptimo y una pequeña parte con el sexto espacio intercostal derecho (Seren, 1967) . La pared reticular es muy espesa y gruesa (Laplace, 1968). El retículo presenta la membrana mucosa formando pliegues cuya altura es algo mayor de 1 cm en los bovinos, estos pliegues incluyen espacios o celdas de 4, 5 o 6 lados, cuya disposición peculiar da el nombre vulgar en inglés de “honey comb”, que significa panal de miel. Estas celdas están subdivididas en pliegues más pequeños y los fondos están incrustados de papilas córneas agudas; las celdas se hacen más pequeñas hasta desaparecer gradualmente cerca del surco esofágico del borde del pliegue rumino-reticular. A 3 o 4 cm de este último, la membrana mucosa ofrece la disposición papilar del rumen (Sisson, 1974).

#### Omaso:

El omaso ocupa una posición profunda dentro de la cavidad abdominal; ninguna de sus caras está en contacto con la pared del abdomen, del lado derecho que es el más cercano, se encuentra separado por el diafragma; el borde posterior por el hígado, muy voluminoso en los bovinos. Tiene una forma ovoide, con un gran eje vertical e incurvado que le da un aspecto arriñonado, presentando para su estudio

dos caras, dos bordes y dos extremidades (Sisson, 1979). El omaso se distingue muy claramente de las otras divisiones gástricas del rumiante y se sitúa enteramente en la pared derecha del plano medio, a nivel de las costillas, desde la séptima hasta la décima (Sisson, 1979). La estructura interna del omaso es particularmente interesante, ya que el epitelio presenta un cierto número de repliegues en forma de láminas que ocupan casi totalmente la cavidad y se insertan paralelamente al eje del órgano. Las láminas más largas parten de la región de la curvatura mayor; sus bordes son convergentes y miran hacia la curvatura menor. El epitelio que tapiza la cara interna de la curvatura menor se presenta ligeramente plegado en sentido longitudinal; entre estas mucosas y el borde libre de las láminas se encuentra un espacio libre: el canal nasal, que une los dos orificios del órgano. Según Blaxter *et al.* (1952), el omaso se encuentra aumentando de tamaño hasta las 36 o 38 semanas de edad. Warner *et al.* (1956), demostraron que los alimentos secos estimulan el desarrollo omasal, mientras que en los terneros alimentados con leche, el omaso creció en proporción al peso corporal y en los alimentados con granos secos produjo un omaso proporcionalmente de 2 a 5 veces mayor que el peso corporal. El volumen del omaso aumenta hasta 60 veces entre los 10 y los 15 días de edad. El peso del omaso aumenta desde 4.7 g al nacimiento hasta 28.7 g a las 16 semanas y su capacidad se incrementa desde 34 mm al nacimiento hasta 98.7 mm a las 16 semanas Blaxter *et al.* (1952). El crecimiento del omaso se produce solamente cuando es estimulado por un consumo periódico de alimentos sólidos (Hammada, Maeda y Kamecha, 1976).

#### Abomaso:

Es un saco alargado que se halla en su mayor parte sobre el suelo del abdomen; su extremidad anterior se halla en la región xifoidea en relación con el retículo; su extremidad posterior se relaciona con el intestino delgado. Su cara parcial se relaciona con el suelo del abdomen y su cara visceral con el retículo y el omaso (Sisson, 1974). (Hammada, Maeda y Kamecha, 1976) señalan que el abomaso puede verse varias horas después del nacimiento, situado inmediatamente detrás del diafragma y con su eje longitudinal en dirección dorso ventral. A las cuatro semanas, el omaso es pequeño aún y se localiza entre el suelo del abdomen y el

saco ventral del rumen, prolongándose caudalmente hasta alcanzar la proyección de la tercera vértebra lumbar, aproximadamente a las ocho semanas de edad (Tamate *et al.*, 1962). En fetos a término y en animales jóvenes, el abomaso es mayor que el rumen, ya que en las primeras edades, el alimento del animal es lácteo y la leche solamente necesita la actividad del estómago glandular o abomaso. En las tres primeras semanas de vida, el rumen todavía inactivo, no alcanza ni la mitad del contenido abomasal; pero pasado este tiempo cambia la alimentación del animal, haciéndose vegetal y como estos alimentos necesitan de las tres porciones de los estómagos anteriores y en especial del rumen, se cambia la relación de tamaño a favor de este. Así vemos que a las cuatro semanas la relación rumen-abomaso es de 0.5:2.1; a las 8 semanas es de 1:1 y después de los tres meses el rumen alcanza el doble del tamaño del abomaso y finalmente el rumen del animal adulto tiene 9 veces más la capacidad que tiene el abomaso.

Blaxter *et al.* (1952), señalan que el tamaño relativo abomasal adulto no se alcanza hasta las dos semanas de edad. Warner *et al.* (1952), plantean que el tamaño del abomaso es similar en los terneros alimentados con leche y en los alimentados con productos secos. Según Craplet (1970), corresponde al abomaso el 64% del volumen relativo de los divertículos gástricos al nacimiento, volumen que va disminuyendo a medida que avanza en edad y se produce el destete de los animales; agregando que el papel fundamental para el cambio de relación volumétrica es ejercido por el régimen alimenticio.

Cardias:

El cardias se presenta como una abertura semejante a un embudo, se haya inclinado centralmente y a la derecha, y está contorneado dorsal y lateralmente por los labios de la gotera esofágica (Seren, 1967). La unión gastro-esofágica o cardias está situada en la región dorsal al límite del rumen y del retículo y orientado hacia abajo y a la derecha, se prolonga por una doble pared muscular, constituyendo la gotera esofágica. Según investigaciones recientes, existen esfínteres funcionales en el esófago; dichas estructuras constituyen el esfínter esofágico craneal a la entrada del esófago y el esfínter caudal, constituido por fibras musculares cardiales

y por el esfínter diafragmático. Ambos esfínteres se hallan en interdependencia, resultando que una contracción craneal vaya acompañada de una relajación caudal y viceversa. Esta conexión funcional es particularmente importante en la eructación, pues de esta manera, solo puede evacuarse cada vez que el volumen de gas quede comprendido entre los dos (Kolb, 1976).

#### Gotera esofágica:

Se presenta como un surco delimitado por dos pliegues o labios, y tienen una sección semicircular. Representa la prolongación del esófago hasta el omaso. En relación con su curso podemos distinguir la gotera reticular y la omasal (Seren, 1967). La gotera reticular está orientada de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha y sigue al comienzo, la dirección de la pequeña curvatura del retículo; cerca de la pared craneal, sus labios se unen formando un rodete muscular denominado esfínter retículo-omasal. La longitud es de aproximadamente 15 a 20 cm. Atravesando el orificio retículo-omasal, la gotera continúa a lo largo del puente del omaso, con tracto terminal, que recibe el nombre de gotera omasal que presenta un surco inclinado hacia atrás y hacia abajo. Su longitud es de 6 a 7 cm y su ancho de 3 a 4 cm.

#### Orificio retículo omasal (ORO):

Este orificio se encuentra situado en la pequeña curvatura del retículo y se presenta como un conducto, orientado de la parte delantera hacia atrás, de la izquierda a la derecha y ligeramente de arriba hacia abajo; tiene una longitud de 2-3 cm (Seren, 1967). Se presenta bajo el aspecto de un conducto corto y estrecho, es un verdadero esfínter y la mucosa que lo tapiza forma repliegues longitudinales, presentando en algunos lugares largas papilas cónicas (Seren, 1967). Se encuentra en comunicación con el omaso mediante el orificio retículo-omasal que es estrecho, en forma de hendidura y está situado centralmente (Stewart., 1974).

#### Orificio omaso-abomasal:

Este orificio se encuentra situado entre la extremidad caudal del puente del omaso y el lado dorsal derecho de la parte craneal del abomaso. La abertura de forma redondeada tiene un diámetro variable entre 8 y 15 cm y se halla bordeado por una línea blanca dentada. En el interior del orificio se encuentran numerosos pliegues de mucosa, dispuestos a guisa de válvulas (Seren, 1967). El orificio omaso-abomasal es más largo que el retículo omasal, está rodeado de repliegues mucosos, dos de ellos están particularmente desarrollados, constituyendo una válvula (Brugere, 1969). Este orificio es oval y tiene una longitud aproximada de 10 cm. Limita por delante por un grueso pilar omasal muscular, cuyas fibras se extienden por los lados del abdomen; una pequeña zona glandular cardial circunda el orificio del lado abomasal (Sisson, 1974).

#### Píloro:

Se encuentra situado entre la porción pilórica del abomaso y el duodeno; presenta las características anatómo-funcionales de un esfínter, centralmente y sobre sus costados está circunscrito por un pliegue anular de la mucosa (Seren, 1967). La unión gastro duodenal o píloro está marcada por un espesamiento parietal y un pliegue anular de la mucosa (Laplace, 1968). Según Sisson (1974), la túnica muscular del abomaso consta de la capa longitudinal y la capa circular; esta última forma el esfínter pilórico, bien desarrollado, pero pequeño y redondeado.

#### Irrigación sanguínea:

En los bovinos, las arterias gástricas proceden de la arteria celiaca, que tiene una longitud aproximada de 10 a 12 cm, y la misma da origen a cinco ramificaciones principales llamadas:

- Arteria Hepática
- Arteria rumial-derecha
- Arteria rumial izquierda
- Arteria omaso-abomasal

- Arteria esplénica

La sangre del estómago se vierte a la vena porta que va directamente al hígado. La vena gástrica recibe sangre de la vena ruminal derecha y de la vena ruminal izquierda, de la vena reticular, omasal, y abomasal (Laplace, 1968).

Inervación:

Los estómagos de los ruminantes (bovinos) reciben una inervación extrínseca y otra intrínseca. La primera está constituida por el nervio parasimpático o vago y el nervio ortosimpático. El vago es el de mayor importancia para los fenómenos motores. La rama derecha e izquierda del vago cervical se divide y da lugar a la rama dorsal y ventral del nervio vago torácico. Como consecuencia de este doble origen, la sección de una rama en el cuello provoca trastornos leves y transitorios de la movilidad. La rama dorsal del vago abdominal inerva las porciones medial y caudal del rumen, retículo, omaso y abomaso; mientras que la rama ventral del vago abdominal inerva las porciones craneales (Laplace, 1968).

La pérdida de becerros en granjas lecheras obedece, en muchos casos, a la mala administración y alimentación, causa de infecciones y depresión del sistema inmunológico en los mismos. Estas pérdidas han incrementado el uso de antibióticos para proteger los animales y tratar las diarreas. El uso extensivo y prolongado de antibióticos puede dañar el balance de la flora intestinal e incrementar la susceptibilidad de los terneros ante algunos microorganismos patógenos, que ganan en resistencia a estos antibióticos (Fuller 1989); también puede incrementar el riesgo de diarrea y de mala absorción en los intestinos (Higginbotham y Bath 1993). El uso profiláctico de antibióticos como promotores del crecimiento ha sido cuestionado por la resistencia de las bacterias a estos y por razones de seguridad alimentaria. La resistencia de las cepas de bacterias a antibióticos puede provocar enfermedades en los humanos transmitidas por los animales mediante determinados productos. Estas traen consecuencias adversas para la salud humana. Las legislaciones gubernamentales y la opinión pública negativa acerca del uso de antibióticos como promotores del crecimiento, han obligado a los productores a buscar fuentes alternativas para los antibióticos como

por ejemplo el alimento aditivo. En los últimos años, el desarrollo en la biotecnología permite el uso de algunos cultivos microbianos como alimentos aditivos. Los probióticos contienen, generalmente, levadura, bacterias ácido-lácticas, *Aspergillus oryzae* y *A. niger*, *Bacillus subtilis*, algunos estreptococos y enterococos y/o su mezcla (Beauchemin *et al.*, 2000). Los estudios sobre probióticos mostraron que alimentar terneros con sustitutos de leche, suplementados con *Lactobacillus acidophilus*, evita la pérdida de peso durante sus dos primeras semanas de vida (Cruywagen *et al.*, 1996). También se observó una disminución en la incidencia de diarrea (Abe *et al.*, 1995 y Abu Tarboush *et al.*, 1996) y en el número de bacterias del grupo *coli* en becerros antes del destete cuando se les suministró el probiótico *Lactobacillus acidophilus* (Sokolova *et al.*, 1991 y Lema *et al.*, 2001). Sin embargo, Cruywagen *et al.* (1996), no informaron diferencias entre el probiótico (*Lactobacillus acidophilus*) y los grupos de control, con respecto al consumo de alimentos sólidos (pienso de inicio), a la incidencia de diarrea y a la relación alimento ganancia. La literatura, considerando los efectos de probióticos en el comportamiento del becerro, ha mostrado que los efectos positivos de los probióticos pueden variar según el cultivo del probiótico y algunas condiciones como el manejo del becerro, los alimentos, el régimen de alimentación, entre otras (Fuller 1990 y Denev 1996).

## **2.6 FUNDAMENTOS DEL RUMEN**

Se puede definir según Relling y Mattioli (2003), que el rumen y el animal son dos organismos independientes en donde en primer lugar se deben encontrar los ingredientes óptimos para la dieta que alimentará al rumen para que posteriormente se nutra el animal.

Siendo así, la primer característica fundamental es el pH mismo que tiene una variación entre 5.5 hasta 7 (Krause y Oetzel, 2006 citado por Araujo y Vergara, 2007), considerando el tipo de dieta proporcionada, de él depende que exista una

mayor sobrevivencia de la microbiota y por lo tanto una mejor digestión, energía y ganancia de peso en los animales.

La consecuente característica relevante que posee el rumen es la temperatura que oscila entre los 38 a 42 °C, puesto que es uno de los pilares que permiten que se generen las bacterias ruminales, recordemos que la glucólisis es el medio por el cual dicha microbiota obtiene la energía que necesita por su condición anaeróbica (Relling y Mattioli, 2003).

## **2.7 PROCESO FERMENTATIVO**

Los rumiantes tienen la increíble capacidad de darle transformación a la celulosa y la hemicelulosa que Ladisch *et al.* (1990), aseguran forman un aproximado del 70 % de la biomasa vegetal.

El tipo y número de microorganismos presentes en el rumen están directamente asociados con los ingredientes de la dieta (Febel y Fekete, 1996).

La finalidad de que los microorganismos lleven a cabo la fermentación es producir Ácidos Grasos Volátiles, acético, butírico, propionico y láctico; mismos que serán la fuente nutricional para la actividad metabólica del rumiante, lo que significa que el rendimiento de producción del animal está directamente relacionado a la actividad y calidad de la microbiota ruminal; además de la formación de otros compuestos como gases en su mayoría metano y dióxido de carbono (Roderick y White, 1990). La composición de los gases según (Calsamiglia y Ferret, 2002); es de 65% de CO<sub>2</sub>, 27% de CH<sub>4</sub>, 7% de N<sub>2</sub>, 0.6% de O<sub>2</sub>, 0.2% de H<sub>2</sub> y 0.01% de H<sub>2</sub>S que se expulsan mediante el eructo.

## 2.8 IMPACTO DEL pH EN LA DIGESTIBILIDAD

Los cambios repentinos en el nivel de pH alteran la cantidad y funcionamiento normal del rumen, haciendo que la digestión de la fibra se desplome volviendo al animal susceptible a pérdida del apetito y a una disminución de la motilidad ruminal que lo predispone a consecuentes trastornos metabólicos; siendo los animales más afectados los que están bajo un régimen alimenticio a base de concentrados en su mayoría. Se menciona que lo ideal es que el rumen se mantenga en un punto de equilibrio entre 6.2 y 7 (Ash, 1959 citado por Krausen *et al.*, 2002).

La clave de una buena producción de Ácidos Grasos Volátiles es el cuidado del pH, ya que mientras mayor sea la cantidad de bacterias fibrolíticas estos estarán siempre disponibles para el desarrollo del rumiante (Dirkensen, 1969 citado por Calsamiglia, 1997).

## 2.9 MICROBIOTA RUMINAL

El proceso de alimentación no sería posible sin la existencia de esos organismos microscópicos que gracias a la labor de investigación ya ha sido posible su cuantificación, de forma que autores como McDonald *et al.* (1995), nos dice que de bacterias hay entre  $10^9$ - $10^{10}$  por ml y más de 60 especies, añadiendo que la población de hongos puede variar entre un 8 a un 10 % del total de la población del rumen y que además el ciclo de vida de estos organismos es en dos tiempos, primero en una zoospora con la capacidad de moverse, seguido de la fase en que ya es un esporangio con la facilidad de adherirse con sus rizoides a las partículas del alimento mientras que los protozoarios según McDonald *et al.* (1995) se pueden encontrar de  $10^5$  a  $10^6$  células/gramo de líquido ruminal.

## **2.10 PROBIÓTICOS EN LA NUTRICIÓN ANIMAL**

(Parker, 1974) fue el primero que utilizó la palabra probiótico dentro del contexto para explicar que eran microorganismos capaces de hacer crecer otros, pero (Fuller, 1989) hace una modificación en el término señalando que es un suplemento alimentante, que mejora el equilibrio intestinal, además de proponer que el modo de acción puede ser a nivel de competir por receptores en el tracto gastrointestinal y de los nutrientes, promotor de sustancias antibacteriana y estimulador de la inmunidad,

Son parte de los aditivos utilizados en la producción animal como una alternativa a la utilización de otros, como los antibióticos, que ocasionan peligro para los consumidores de los productos y subproductos, los probióticos se definen como organismos vivos que van a tener un efecto positivo en el tracto gastrointestinal del organismo que los recibe sin perjudicar su funcionamiento normal (Van der Aa Kühle *et al.*, 2005).

## **2.11 LEVADURAS Y ENZIMAS COMO ADITIVOS EN LA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES**

Tiempo atrás se inició con lo que actualmente se ha convertido en una interesante manera de trabajar con la situación alimentaria de los rumiantes, misma que ya no solo es con la formulación de dietas a base de forrajes y sus derivados, si no con la introducción de aditivos como son las enzimas o las levaduras que en los últimos años han pasado por procesos de evaluación para determinar si son económicamente rentables para aplicarlas y con ello incrementar considerablemente la productividad de los animales mediante una mejora en la actividad digestiva (Yang *et al.*, 2001).

Como lo afirmaron en su momento Marrero *et al.* (2010), las levaduras y las enzimas fibrolíticas han ido ganando terreno por los resultados satisfactorios que han mostrado ya que en el experimento que realizaron donde confirmaron que al

incorporar una cepa de *S. cerevisiae* aumentaron las poblaciones de bacterias ruminales factibles para la producción de ácidos grasos volátiles.

## **2.12 LEVADURAS**

Este tipo de probióticos se clasifican como organismos eucariotes y a diferencia de las bacterias cuya medida oscila entre (0.5 x 5 µm), son resistentes a antibióticos, además de tener un mayor tamaño alrededor de 5 x 10 µm (Auclair, 2001).

Las levaduras tienen una amplia capacidad para colonizar el tracto gastrointestinal mediante mecanismos de entre los que destacan el farmacocinético dado por ser resistentes a la acidez gástrica y proteólisis y el farmacodinámico con el antagonismo directo que sugiere que previene que el intestino se inflame con la presencia de agentes patógenos (Mansour, 2003).

Se puede considerar que las más utilizadas son las de *Saccharomyces*, observando repuestas más favorables en ganado lechero aumentando la capacidad de degradación de la fibra y la producción (Newbold, 2003).

Sus efectos benéficos radican en la regulación del pH, aportan vitaminas a las bacterias ruminales haciéndolas más viables.

Cuando la dieta está constituida por una proporción elevada de concentrado es cuando más se recomienda el uso de levaduras, por ejemplo al comienzo de la lactación (Van Vuuren, 2003).

## **2.13 ENZIMAS**

En los años 60 se comenzó con las labores de investigación acerca de estos aditivos (Burroughs *et al.*, 1960).

Son proteínas biocatalizadoras que se enfocan en la degradación de los componentes de la pared celular (celulasas, xilanasas, glucanasas, pectinasas), o del interior (amilasas, proteasas).

La actividad sinérgica o individual de enzimas de *Trichoderma spp.* y *Phanerochaete spp.*, ha sido revisada (Forsberg *et al.*, 1993) . Mientras que Forsberg *et al.* (1993), comentan que las enzimas forman un complejo llamado celulosoma, el cual se ha estudiado de una manera más profunda con la bacteria *Clostridium thermocellum* (Forsberg *et al.*, 1993).

Se han realizado experimentaciones en cuanto a cuál es la mejor forma de aplicación ya sea en forraje fresco o seco; así, de acuerdo al estudio de (Feng *et al.*, 1992), en donde las enzimas aumentaron considerablemente la acción digestiva sobre la materia seca y la fibra.

## **2. 14 COMPORTAMIENTO DE LA DIGESTIÓN CON LA ADICIÓN DE ENZIMAS**

El tipo de enzimas que se utiliza repercute en la adecuada hidrólisis del sustrato lignocelulósico ya que pueden presentarse fallas o limitantes que impiden a la enzima dirigirse al sustrato o bien puede ocurrir que no exista una sinergia entre las diversas enzimas; también puede ser un contratiempo la distribución de la lignina (Brown *et al.*, 2010).

Krueger y Adesogan (2008), afirman que para corroborar que los productos enzimáticos están funcionando, es necesario evaluar el aumento en la digestión de la materia seca, el incremento en la síntesis de proteína microbiana y en el desarrollo de la microbiota ruminal.

## 2. 15 EFECTOS DE LA XILANASA

Enzima producida por el hongo *Trichoderma longibrachiatum* (*T. reesei*, *T. viride*) (Beauchemin *et al.*, 2003).

La Xilanasa actúa en un pH de entre 6 y 7 y no se ve afectada por la temperatura ya que para su peletización se emplea calor de hasta 85 °C.

Es de las más empleadas en las dietas de rumiantes sobre todo en ganado lechero, ya que por excelencia participan en la degradación de la pared celular de las plantas.

Nsereko *et al.* (2002), trabajaron con *Trichoderma longibrachiatum* y obtuvieron una respuesta cuadrática en cuanto al número de bacterias ruminales en vacas lecheras.

El efecto directo que la enzima ejerce depende de la humedad del alimento, especificidad del sustrato y el tiempo para que exista una adecuada interacción del sustrato con la enzima (Beauchemin *et al.*, 1995).

Cuadro 1. Componentes de la pared celular y enzimas que los hidrolizan

Componente	Composición	Enzima catabólica
Celulosa	Polímero de glucosa ( $\beta$ 1,4)	Celulasa ( $\beta$ 1,4 glucanasas)
Almidón	Polímero de glucosa ( $\alpha$ 1,4)	Amilasa
Pectina	Polímero de ácido galacturónico	Pectinasa (poligalacturonasa)
Xilano	Heteropolímero de xilosa y otros azúcares ( $\beta$ 1,4 y grupos laterales $\alpha$ 1,2 o $\alpha$ 1,3)	Xilanasa
Sacarosa	Disacárido glucosa-fructuosa	Invertasa

Adaptado de Madigan *et al.* (2004)

Las enzimas fibrolíticas exógenas (EFE) son aditivos modificadores del metabolismo ruminal que pueden mejorar la digestibilidad de los componentes fibrosos de la dieta, y de esta manera incrementar la energía digestible para rumiantes (Beauchemin y Holtshausen, 2010). Las EFE generalmente son obtenidas de organismos celulolíticos (Cuadro 2), los más comunes son los cultivos de hongos (*Aspergillus oryzae* y *Saccharomyces cerevisiae*) y de algunos tipos de bacterias que tienen la capacidad de producir cantidad suficiente de enzimas celulasas y hemicelulasas (Gado y Salem, 2013), capaces de degradar la pared celular vegetal.

Cuadro 2. Organismos celulolíticos utilizados en dietas para rumiantes

Actividad enzimática	Organismo celulolítico
Celulasa	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> ( <i>T. reesei</i> , <i>T. viride</i> )
	<i>Humicola insolens</i>
β-glucanasa	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Aspergillus aculeatus</i>
	<i>Bacillus lentus</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Humicola insolens</i>
	<i>Penicillium funiculosum</i>
	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> ( <i>T. reesei</i> , <i>T. viride</i> )
Hemicelulasa	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> ( <i>T. reesei</i> , <i>T. viride</i> )
	<i>Bacillus lentus</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Humicola insolens</i>
	<i>Aspergillus aculeatus</i>
Xilanasa	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Bacillus lentus</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> ( <i>T. reesei</i> , <i>T. viride</i> )
	<i>Penicillium funiculosum</i>
	<i>Humicola insolens</i>

Adaptado de Beauchemin *et al.* (2003)

### III. JUSTIFICACIÓN

En la industria lechera es una necesidad constante que los animales tengan una tasa de crecimiento adecuada que les permita llegar a la edad productiva con la mejor condición corporal y con un óptimo estado de salud, es por ello que el pilar para conseguir este resultado es la dieta proporcionada, que además de los ingredientes tradicionales como maíz, pasta de soya, canola, salvado y ensilados, tengan en su composición aditivos que no repercutan en la salud animal ni humana; pero que si tengan la capacidad de mejorar el trabajo digestivo del rumiante para un mayor aprovechamiento nutricional y por ende elevar la producción haciendo redituables las unidades productivas, además si se tienen becerros con buen aprovechamiento nutricional y con menor incidencia de enfermedades, en un periodo crítico como lo es lactancia-destete se garantizarán animales con un futuro más productivo.

En el presente trabajo se utilizaron levadura y xilanasas, mismas que ya han sido aplicadas en múltiples investigaciones por lo que se desea conocer el efecto que tiene en cuanto a digestibilidad, ganancia de peso, pH y en la presencia de bacterias como *E. coli* y *Salmonella spp.*

#### **IV. HIPÓTESIS**

Con la introducción de estos aditivos se mejorará la eficiencia digestiva de los becerros en comparación del grupo control al que solo se le ofrecerá la dieta base. Así mismo se obtendrá un peso más elevado que el resto de los animales y una menor cantidad de unidades formadoras de colonias de *E. coli* y *Salmonella*.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar el comportamiento productivo, el estado de salud general y la digestibilidad de la fibra por medio de la adición de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y la enzima (xilanasa) a la dieta de becerros lecheros.

### 5.2 Objetivos específicos

- Determinar los parámetros productivos de los terneros lecheros alimentados con dietas conteniendo levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y la enzima xilanasa como aditivos
- Determinar la digestibilidad del alimento en los terneros lecheros alimentados con dietas conteniendo levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y la enzima xilanasa como aditivos
- Determinar los parámetros de salud de los terneros lecheros alimentados con dietas conteniendo levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y la enzima xilanasa como aditivos

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 UBICACIÓN DEL SITIO EXPERIMENTAL

La investigación se realizó en un establo que está ubicado en las siguientes coordenadas (N: 19°34'25", W: 99°46'35.3") y una altura sobre el nivel del mar (msnm) de 2526 m. En el Estado de México.

### 6.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN DEL ESTABLO Y MATERIAL BIOLÓGICO

Se aplicó una encuesta al encargado del establo, para conocer las características generales y el manejo de los becerros desde el nacimiento al destete, la sanidad e higiene y el tipo de alimentación de estos.

#### 6.2.1 Establo

Los criterios para seleccionar el establo fueron:

- 1) Que se ubique en un municipio cercano, Ixtlahuaca.
- 2) Que sea un hato lechero.
- 3) Que el propietario otorgue su permiso y que se comprometa a no vender ni desechar a los animales incluidos en el estudio.
- 4) Que el establo cuente con inventarios actuales.

#### 6.2.2 Becerros

Se seleccionaron 40 becerros raza Holstein, sin problemas congénitos ni adquiridos, con un peso de  $40.0 \pm 5.0$  kg y sin signos clínicos evidentes, se distribuyeron en 4 tratamientos (control, xilanas (Dyadic®Xilanase PLUS, País de origen: USA), levadura (BIOCELL®,  $2.0 \times 10^{10}$  cfu/g Min, País de origen México), y xilanas con levadura), bajo un diseño completamente aleatorizado con mediciones repetidas.

Se identificaron y colocaron de forma individual en jaulas adecuadas (las cuales son de forma rectangular y tienen una medida de 1.20 x 0.8 m) para la toma de datos y se contemplaron el confort del animal, cada jaula contó con su comedero y bebedero

en la cual permanecieron durante toda la etapa de validación (60 días) antes del destete.

### **6.3 TRATAMIENTOS**

- 1) Control: Alimento Comercial + leche entera (4kg en dos veces/día)
- 2) Xilanasa: Alimento Comercial + leche entera (4kg en dos veces/día)+4 ml del producto con xilanasa.
- 3) Levadura (Biocel®-F53): Alimento Comercial + leche entera (4kg en dos veces/día)+4 g de levadura.
- 4) Xilanasa+levadura: Alimento Comercial + leche entera (4kg en dos veces/día)+4 ml xilanasa+ 4 g levadura.

### **6.4 Manejo de alimentación y aplicación de los tratamientos**

Se administraron cuatro litros diarios de leche entera por día (considerando tolerancia del animal a la leche con lo cual varía), dividido en dos tomas de dos litros cada una, en la mañana y por la tarde a los animales del grupo control y a los tratamientos, cuatro litros diarios de leche más xilanasa (4ml/animal/día), 4g levadura (Biocel®-F53)/animal/día o la combinación de las enzimas con la levadura a los animales de los grupos tratados, dichas enzimas y levadura se incluyeron dentro del recipiente (dosificadas previamente) junto a la leche y con la ayuda de un agitador se mezclaran perfectamente hasta que se diluyeron y se aseguró que fueran consumidos por los becerros, esto fue de manera diaria hasta completar el día 60 el cual fue el último.

#### **6.4.1 Agua**

Se suministraron a los becerros en cubetas de 2 litros por la mañana y si se terminó en la tarde se le suministraron 2 litros más, para así el día siguiente determinar el consumo (agua ofrecida-agua rechazada).

#### **6.4.2 Alimento sólido**

Se ofreció un concentrado comercial con un 18% de PC mínimo. Éste alimento fue ofrecido a libre acceso desde el nacimiento.

### **ANÁLISIS DEL CONCENTRADO INICIADOR BABY FARM PREMIUM (Becerras Ultra Malta Cleyton)**

Humedad, máx.	12.0 %	Grasa, min	3.0 %
Proteína, min	18.0 %	Cenizas, máx.	7.0 %
Fibra, máx.	10.0 %	E.L.N, min	50.0 %

#### **6.4.2.3. Ingredientes del alimento iniciador:**

Los ingredientes utilizados fueron suero de leche y / o lactosa, sorgo, maíz, cebada y/o avena, salvado de trigo, gluten de maíz, pasta de cártamo, pasta de girasol, pasta de canola, pasta de linaza, pasta de soya, melaza, levaduras y promotores de crecimiento, carbonato de calcio, fosfato de calcio, cloruro de sodio, manganeso, hierro, cobre, zinc, yodo, selenio, cobalto, vitaminas A, E D<sub>3</sub>, tiamina, riboflavina, niacina, cianocobalamina y antioxidante.

#### **6.5 Parámetros de medida:**

La ingestión del alimento (ofrecido –rechazado) e ingestión de agua, leche se registró a diario durante los 60 días del experimento.

Se midieron los siguientes parámetros en el día según correspondió, sea al inicio o al final de cada periodo después del parto:

- Peso vivo corporal y medidas físicas corporales, al inicio de cada periodo días 1 (P1), 15 (P2), 30 (P3), 45 (P4) y 60 (P5).

- Digestibilidad del alimento (se colectó una muestra de heces 50-100 g de cada animal en 5 días consecutivos al inicio de cada periodo, tomando en cuenta que fueron 5 periodos P1, P2, P3, P4 y P5, así que las muestras se tomaron en los días 1-5, 15-20, 30-35, 45-50 y 60-65).
- Bioquímica sanguínea: una muestra de cada animal (10 ml), Microbiología fecal: Una muestra de heces de cada animal (50 gr), Parasitología fecal: Una muestra de cada animal (50 gr), al final de cada periodo en los días 5, 20, 35, 50 y 65.

## **6.6 Parámetros productivos**

### **6.6.1 Peso Inicial y Peso Final (PI y PF)**

Los becerros(as) seleccionados fueron pesados al momento de su ingreso a la sala de crianza en una báscula romana (Día 1 del periodo 1); posteriormente cada dos semanas (Día 1 de cada periodo) se llevó a cabo un registro de campo de cada uno de los animales para así obtener el peso final alcanzado a los 60 días (Día 1 del periodo 5) de duración del estudio (destetado de los animales).

### **6.6.2 Altura Inicial y Altura Final (TI y TF)**

Se midió la altura a la cruz al siguiente día del nacimiento con un flexómetro (Día 1 de cada Periodo). Esta práctica se llevó a cabo posteriormente cada dos semanas manteniendo un registro de campo de cada uno de los becerros, para así obtener la altura final a los 60 días de duración del estudio (destetado de los animales).

### **6.6.3 Consumo de Alimento (CA)**

Para la obtención de los valores del CA a partir del día siete de edad de los becerros, se pesó el alimento ofrecido y se le restó el alimento sobrante diariamente. El consumo de alimento se registró a diario durante los 60 días del experimento.

### **6.6.4 Ganancia Diaria de Peso (GDP)**

La Ganancia Diaria de Peso (GDP) es el incremento de peso diario (g/día) de los becerros. Éste se determinó cada 15 días (Día 1 de cada periodo, se realizó el

pesado de los becerros), restando al peso final el peso inicial y dividiéndolo entre los días de evaluación (15 días). Mientras que la GDP ajustada al final del estudio, se determinó mediante la resta del peso al destete, el peso al nacimiento dividido entre los 60 días que duró el experimento.

#### **6.6.5 Índice de Conversión (IC)**

El IC es la proporción que resulta de dividir los kg de alimento consumido entre los kg de peso incrementado.

#### **6.6.7 Mortalidad (%)**

Se reportó en porcentaje: ( $\#$  de animales muertos/  $\#$  de animales en tratamiento)  $\times$  100.

#### **6.6.8 Enfermos**

En el caso de existir diarreas o enfermedad respiratoria, se aplicó el tratamiento que se usa de manera rutinaria en el rancho, de acuerdo al tipo de patología presente.

#### **6.6.9 Calificación del estado de salud**

Estos parámetros tuvieron medición diaria los 60 días que duró el experimento.

##### **6.6.9.1 Temperatura rectal**

Se midió semanalmente, empleado un termómetro, bajo la siguiente escala:

- 0= 37.7 a 38.2°C
- 1= 38.3 a 38.7°C
- 2= 38.8 a 39.3°C
- 3= >39.4°C

##### **6.6.9.2 Tos**

Es una medida subjetiva que tomó el operario o quien atendió a los becerros, diariamente empleado la siguiente escala:

- 0= No hay tos
- 1= Solo tos cuando se induce (reflejo tusígeno)
- 2= Tos inducida, espontánea u ocasional
- 3= Tos repetida u espontánea

#### **6.6.9.3 Secreción nasal**

Secreción nasal, se midió diariamente con la siguiente escala:

- 0= Secreción normal serosa
- 1= Pequeña cantidad moco cristalino unilateral
- 2= Secreción bilateral de moco
- 3= Excesiva secreción de moco purulento

#### **6.6.9.4 Calificación de ojos**

Se midió diariamente el estado y generación lagrimeo – secreciones, síntomas de infección con la siguiente escala.

- 0= Normal
- 1= Pequeña cantidad de secreción ocular
- 2= Moderada cantidad de secreción en ambos ojos
- 3= Fuerte secreción ocular

#### **6.6.9.5 Calificación de heces**

Se evaluó de forma diaria la cual se reportó de acuerdo a la siguiente escala durante todo el período experimental:

- 0= Heces normales
- 1= Moldeadas o pastosa
- 2= Semilíquidas
- 3= Líquidas

#### **6.6.9.6 Calificación de condición corporal general**

Se evaluó a cada becerro al inicio, a los 30 días y al final del periodo de estudio en los siguientes aspectos, iniciando con una calificación de 10 y descontando un punto por cada padecimiento presente en el animal.

- 1) Secreción nasal unilateral o bilateral
- 2) Artritis o poliartritis
- 3) Orejas caídas (una o dos)
- 4) Pelo hirsuto o descolorido
- 5) Secreción ocular con escurrimiento
- 6) Distención abdominal
- 7) Corvejones remetidos
- 8) Perfil acarnerado
- 9) No alcanzó el doble de su peso.
- 10) Reflejo tusígeno espontaneo o provocado

#### **6.6.9.7 Extracción de contenido ruminal**

Al final del experimento (día 65) se sondearon 4 becerros por cada grupo experimental, para extraer 50 ml de contenido ruminal, para determinar:

- pH
- Ácidos Grasos Volátiles (AGV'S) Totales e Individuales
- Concentración de Nitrógeno Amoniacal (NH<sub>3</sub>-N)
- Bacterias y protozoarios.

#### **6.6.9.8 Obtención de muestras de sangre**

A cada becerro se les extrajo 5 mL de sangre por la técnica de venopunción de la yugular, con una aguja de precisión de 21 G x 1.5" y un tubo vacutainer de tapa roja sin anticoagulante (marca BD Diagnostic Systems hechos en Buenos Aires, Argentina), cada tubo se identificó con los siguientes datos: ID del animal, tratamiento, la muestra se tomó por la mañana antes de ofrecer la leche y el concentrado a los becerros, en el día 5 de cada periodo experimental. Las muestras de sangre obtenidas se dejaron reposar por cinco minutos a temperatura ambiente,

posteriormente se centrifugaron a 3,000 rpm durante diez minutos en una centrifuga clínica (marca Solbat, modelo J-12 hecha en México). Del sobrenadante (suero) obtenido, se tomó una muestra y se colocó en el refractómetro modelo ATC 311 para medición de las Proteínas Totales (PT).

### **Análisis de laboratorio**

En muestras de la dieta y heces fue determinada la materia seca (MS), materia orgánica (MO), nitrógeno (N) y cenizas (AOAC, 2003), fibra detergente neutro (FDN) y ácida; (FDA) se determinaron con el analizador de fibras ANKOM<sup>200/220</sup> de acuerdo al método descrito por Van Soest *et al.*, (1991).

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando un diseño completamente al azar con mediciones repetidas, bajo el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad i = 1, 2, 3, \dots, t$$
$$j = 1, 2, 3, \dots, n$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Variable respuesta en la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento

$\mu$  = Media general

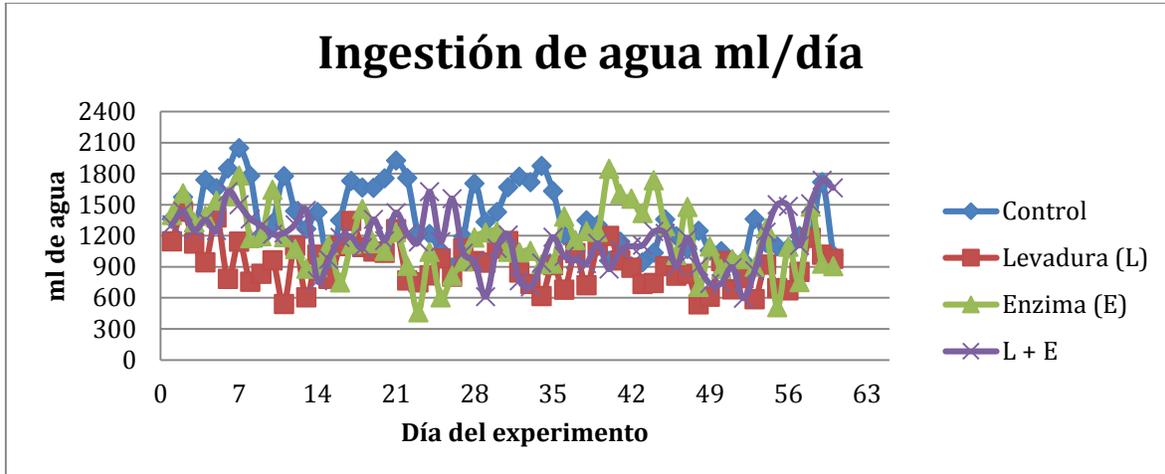
$\tau_i$  = Efecto del tratamiento i.

$\varepsilon_{ij}$  = Error aleatorio, donde  $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$

## VII. RESULTADOS

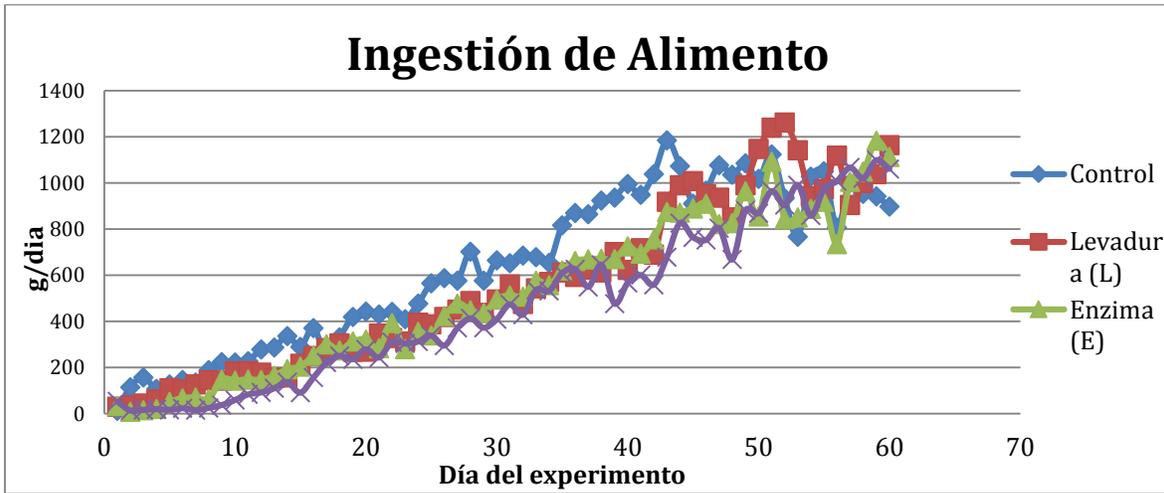
### AVANCE DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN (TRABAJO *in vivo*)

Figura 1. Consumo de agua ml/día de becerros Holstein lactantes tratados en enzima, levadura o la combinación de ambas.



En la primera figura se puede ver como se comportó el consumo de agua en los 4 grupos de becerros, aunque los picos más altos de la gráfica se pueden observar en los grupos control y el de enzimas no hubo diferencias estadísticas entre los 4 grupos.

Figura 2. Consumo de alimento gr/día de becerros Holstein lactantes tratados en enzima, levadura o la combinación de ambas.



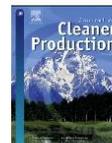
Esta gráfica muestra la ingesta de alimento durante los 60 días que duró el experimento, en la cual hubo diferencia estadística para el grupo que recibió levadura, no así para los grupos control, enzimas y levadura más enzimas que estadísticamente son iguales pero diferentes al grupo que recibió levadura, que fue el grupo que más bajo consumo de materia seca tuvo.

Cuadro 3. Parámetros productivos por variables en becerros Holstein lactantes tratados en enzima, levadura o la combinación de ambas.

VARIABLE	CONTROL	ENZIMAS	LEVADURA	LEV + ENZ	SEM
PESO	55.34 <sup>a</sup>	49.95 <sup>bb</sup>	49.59 <sup>b</sup>	50.54 <sup>bb</sup>	0.998
TALLA	97.20 <sup>aa</sup>	81.14 <sup>a</sup>	84.32 <sup>aa</sup>	81.83 <sup>aa</sup>	5.062
LECHE	3.62 <sup>a</sup>	3.75 <sup>aa</sup>	3.63 <sup>aa</sup>	3.75 <sup>aa</sup>	0.097
INICIADOR	594.00 <sup>aa</sup>	486.80 <sup>aa</sup>	470.50 <sup>a</sup>	483.38 <sup>aa</sup>	47.859
CIRCUNFERENCIA	94.07 <sup>aa</sup>	94.98 <sup>aa</sup>	90.28 <sup>a</sup>	110.43 <sup>aa</sup>	8.232
TEMPERATURA	37.66 <sup>a</sup>	38.46 <sup>aa</sup>	38.02 <sup>aa</sup>	57.16 <sup>aa</sup>	7.789
AGUA	1253.90 <sup>aa</sup>	1168.10 <sup>aa</sup>	971.20 <sup>a</sup>	1044.60 <sup>aa</sup>	113.150
HECES	4.86 <sup>aa</sup>	1.63 <sup>a</sup>	10.86 <sup>aa</sup>	6.63 <sup>aa</sup>	3.087
GANANCIA DE PESO	210.47 <sup>ba</sup>	255.07 <sup>aa</sup>	180.51 <sup>bb</sup>	217.34 <sup>ba</sup>	19.233

Medias dentro de la misma columna con diferentes superíndices difieren significativamente entre tratamientos (P <0,05).

En el Cuadro 4 se relacionan los valores promedios de los resultados obtenidos de los parámetros productivos que se evaluaron durante los 60 días que duró el experimento, dichos parámetros presentaron variación estadísticamente significativa (P <0.05), en el peso el grupo que recibió enzimas y la mezcla de levadura más enzimas fueron estadísticamente iguales no así para los grupo levadura y control, siendo el control quien tuvo el mayor peso, para talla los grupos que de forma estadística son similares fueron: control, levadura y levadura más enzimas, de forma contraria a enzimas, el consumo de leche solo mostró diferencias en el grupo control ya que estadísticamente los otros tres grupos son iguales, el consumo del alimento iniciador no presentó diferencias (P >0,05), grupo control, enzimas y levadura más enzimas, no así para el grupo levadura que además fue el grupo que menor consumo de materia seca presentó, este mismo comportamiento lo tuvieron la circunferencia y el consumo de agua, para condición de la heces el grupo control levadura y mezcla de levadura más enzimas fueron estadísticamente similares no así el grupo enzimas que fue diferente, en la ganancia diaria de peso el grupo control y enzimas más levadura son similares y diferentes al grupo de enzimas y levadura, presentando mayor ganancia diaria de peso el grupo de becerros que recibió las enzimas.



## Effectiveness of xylanase and *Saccharomyces cerevisiae* as feed additives on gas emissions from agricultural calf farms



Agustín Hernández<sup>a</sup>, Ahmed E. Kholif<sup>b</sup>, Mona M.M.Y. Elghandour<sup>a</sup>, Luis M. Camacho<sup>c</sup>, Moisés M. Cipriano<sup>c</sup>, Abdelfattah Z.M. Salem<sup>a,\*</sup>, Humberto Cruz<sup>a</sup>, Eziuche A. Ugbogu<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Mexico

<sup>b</sup> Dairy Science Department, National Research Centre, 33 Bahouth St., Dokki, Giza, Egypt

<sup>c</sup> Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Guerrero, Km. 3.5 Carretera Cd. Altamirano-Iguala, CP 40660, Cd. Altamirano, Guerrero, Mexico

<sup>d</sup> Department of Biochemistry, Abia State University, P.M.B 2000, Uturu, Abia State, Nigeria

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 September 2016

Received in revised form

12 January 2017

Accepted 12 January 2017

Available online 17 January 2017

#### Keywords:

Carbon dioxide

Methane

*S. cerevisiae*

Sustainable control

Xylanase

### ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the potential of supplementing calves' diets with exogenous enzymes (xylanase; XYL) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae* [SC]) on the sustainable control of methane (CH<sub>4</sub>) and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) productions in agricultural calves farming. Three different levels of supplemented diets of XYL (0, 3 and 6 mg/g of dry matter (DM)), SC (0, 2 and 4 mg/g of DM) and mixture of XYL and SC (0, 2 μL XYL + 2 mg SC, 6 μL XYL + 4 mg SC/g of DM) were tested. Asymptotic gas production (GP) consistently decreased by each of the additives with the lowest value at the high dose of XYL + SC mixture ( $P < 0.05$ ) compared with the control and the low dose of XYL + SC mixture. Methane production was reduced by additives inclusion ( $P < 0.05$ ) when compared with the control treatment with no additive. Xylanase + SC at all doses increased CO<sub>2</sub> production ( $P < 0.05$ ) whereas the high dose had the most statistically significant ( $P < 0.05$ ) reduction in GP and CH<sub>4</sub> production compared with control, XYL and SC additives at different doses. Interaction between additive and rumen liquor was observed for rate of GP ( $P = 0.027$ ) and initial delay before GP ( $P < 0.001$ ). Inclusion of XYL, SC, and XYL + SC mixture had less asymptotic GP while XYL + SC mixture had the lowest initial delay (39%) before GP began. The XYL + SC had the lowest rate of CH<sub>4</sub> production (9%) and highest asymptotic CO<sub>2</sub> production (81%). The findings of this study indicate that inclusion of XYL or SC additives can improve rumen fermentation and reduce greenhouse gases production. The study also established that the mixture of XYL and SC is more efficient in reducing gas and CH<sub>4</sub> emissions for cleaner environmental production conditions in calf farming.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Worldwide, agricultural farming systems, such as livestock production, face the increasing challenge of maintaining future global demand for meat and dairy products because of an expected increase in population (Wiedemann et al., 2017). The Food and Agriculture Organization (FAO, 2006) expects that an increase in purchasing power for food from animal sources raises the yearly

demand to 465 and 1.043 million t for meat and milk products. Besides, the FAO estimates the growth of global population to reach 9.6 billion by the y 2050 (FAO, 2016), with a doubled purchasing power for meat and dairy products. To meet this rise in demand, agricultural systems need to devise a means to adapt to the probability of dangerous climate change and become more resilient, productive and sustainable (FAO, 2016). This will not only reduce greenhouse gas (GHG) emissions but also ensure the wellbeing of

Abbreviations: ADF, acid detergent fiber; b, the asymptotic gas, methane, or carbon dioxide production; c, the fractional rate of fermentation; CFU, colony-forming unit; CH<sub>4</sub>, methane; CO<sub>2</sub>, carbon dioxide; DM, dry matter; DMD, dry matter disappearance; EE, ether extract; GHG, greenhouse gas; GP, gas production; Lag, the discrete lag time prior to any gas, CO<sub>2</sub> or CH<sub>4</sub> formation; NDF, neutral detergent fiber; SC, *Saccharomyces cerevisiae*; XYL, xylanase.

\* Corresponding author.

E-mail address: [asalem70@yahoo.com](mailto:asalem70@yahoo.com) (A.Z.M. Salem).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.01.070>

0959-6526/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

the ecosystem and rural populations.

Today, agricultural waste products are one of the largest contributors of anthropogenic sources of three major GHGs: methane (CH<sub>4</sub>), carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), and nitrous oxide, with livestock production accounting for approximately two-thirds of the direct emissions (Slade et al., 2016), largely from digestion by livestock. Methane is the major GHG emitted from enteric fermentation through the typical digestive process of ruminants (Hristov et al., 2015). Methane accounts for approximately 12 to 17% GHG emission (Beauchemin et al., 2009). However, the major constraints in ruminant farming include: excessive excretion of nutrients, inefficient digestibility and high CH<sub>4</sub> emission which represent a net loss of 2 to 12% of gross dietary energy (Hristov et al., 2015). The efficient reduction of such energy losses may be potentially used for the production of more meat and milk, rather than contributing to GHG production which impacts negatively on climate change (Eckard et al., 2010). Recently, the use of exogenous enzymes (Rojo et al., 2015) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*; SC) additives in ruminant diets has attracted considerable interest (Hassan et al., 2016). Many research studies have shown that supplementing exogenous enzymes in livestock diets improved forage quality (Kholif et al., 2017), increase digestibility, rumen fermentation, and ruminant production (Valdes et al., 2015). However, Lewis et al. (1999) reported that exogenous enzymes did not consistently enhance forage quality and utilization by ruminants. This inconsistency may be attributed to several factors such as the source of the enzyme (Khatab et al., 2011), doses and activities of the enzyme (Jalilvand et al., 2008), physical properties of the substrate (Elghandour et al., 2015), treatment duration, enzyme application method (Elghandour et al., 2016a), composition of the diet to which enzyme is added (Elghandour et al., 2016a) and level of animal productivity (Beauchemin et al., 2003).

Animal nutritionists and microbiologists have recently developed keen interest in the use of dietary feed additives to modify ruminal fermentation and reduce rumen GHG production (Hernandez et al., 2017). Dick et al. (2015) reported that the use of legumes as a replacement for nitrogen fertilizer enhanced reduction of GHG emission. Nguyen et al. (2010) suggested that increasing the proportion of concentrate-based diet would reduce the CH<sub>4</sub> production. Supplementation of SC improved digestibility of low quality forages and altered microbial environment by increasing the number of ruminal microflora which could enhance fiber fraction digestion in ruminants (Ahmed et al., 2015) and horses (Salem et al., 2016). Salem et al. (2015a) observed that inclusion of exogenous fibrolytic enzymes (e.g., cellulase and xylanase (XYL)) improved feed utilization in ruminants. Exogenous XYL was selected to be studied in the present study because emerging evidences show better results with XYL than cellulase (Vallejo et al., 2016).

Few studies investigated the effect of natural feed additives on CH<sub>4</sub> and GHG productions. The present study evaluated the use of exogenous enzyme (xylanase), yeast (*S. cerevisiae*) and their mixture, as dietary feed additives, to enhance the nutritive value of feeds and to mitigate the production of CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> from the agriculture calf farms using the *in vitro* gas production (GP) technique.

## 2. Materials and methods

### 2.1. *In vitro* incubations and treatments

Rumen inoculum was collected by stomach tube from 40 weaned Holstein calves (40–55 kg body weight) before morning feeding. They were divided into 4 groups (n = 10) which were fed a basal diet with no additive (Control rumen liquor), or daily

supplemented with 5 mL of XYL (Dyadic PLUS; Dyadic international, Inc, Jupiter, FL, USA) [XYL rumen liquor], or 4 g of SC, with a minimum guaranteed concentration of live yeast cells of  $1.5 \times 10^{10}$  CFU of SC/g of product (Procreatin 7, Safmix, Toluca, Mexico) [SC rumen liquor] or their mixture (2.5 mL XYL + 2 g SC) (XYL + SC rumen liquor) for 60 d of age. All the 40 calves were stabled and reared under the same condition. The calves were fed *ad libitum* a total mixed ration of a commercial concentrate (Ultra Malta Clayton®, Toluca, Mexico) formulated to meet their nutrient requirements (NRC, 1985) with free access to fresh water. The diet contained per kg dry matter (DM) of 200 g crude protein, 230 g neutral detergent fiber (NDF), 50.3 g acid detergent fiber (ADF) and 35.6 g ether extract (EE). The treatments which were tested against control treatment (no additives) were as follows: XYL treatment (at 3 and 6 μL/g DM), SC treatment (at 2 and 4 mg/g DM) and their mixture at 3 μL XYL + 2 mg SC, and 6 μL XYL + 4 mg SC (XYL + SC treatment). The diet fed to the calves was used as the substrate for the *in vitro* incubation. The product of XYL contained: 34,000 to 41,000 U of XYL/mL, 12,000 to 15,000 units of beta-glucanase/mL, and 45,000 to 55,000 U of cellulase/mL.

Immediately after collection, the rumen contents obtained from the donor calves were flushed with CO<sub>2</sub>, mixed and strained through four layers of cheesecloth into a flask with oxygen-free headspace. Filtered rumen fluid was immediately transported to the laboratory where it was mixed in a 1:4 (v/v) proportion with the buffer solution (containing micro- and macro-elements, a reducing agent and a reduction indicator of resazurin) as described by Goering and Van Soest (1970), with no trypticase added. Diluted rumen fluid (50 mL containing 10 mL of rumen liquor) was added to each incubation bottle of 120 mL containing 0.5 g of substrate, which had been previously weighed out and additive solutions dispensed.

Three incubation runs were performed in three different weeks. Bottles were inoculated within each incubation run, with three bottles as blanks (i.e., rumen fluid only with no substrate or additive). After filling all bottles, they were flushed with CO<sub>2</sub> and immediately closed with rubber stoppers, shaken and placed in a water bath at 39 °C. The volume of gas produced was recorded at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 24, 36, 48 and 70 h of incubation using a pressure transducer (Extech Instruments, Waltham, USA) following the technique of Theodorou et al. (1994). At the same incubation times, CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> concentrations in the headspace of the bottles were measured using a diffusion based gas detector (Gas Analyzer CROWCON Model Tetra3, Abingdon, UK). The *in vitro* incubation process can be summarized in Fig. 1.

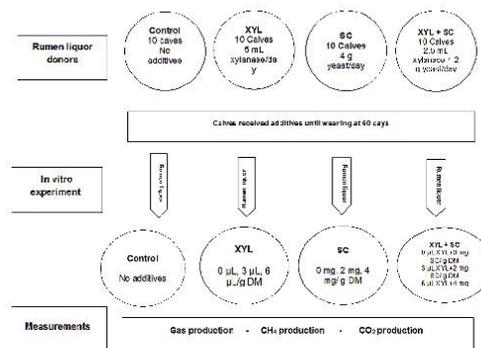


Fig. 1. Flowchart of the *in vitro* incubation process.

After sampling the supernatant for pH determination, the contents of each bottle were filtered under vacuum through sintered glass crucibles (coarse porosity no. 1, pore size 100–160 µm; Pyrex, Stone, UK). The incubation residues were then dried at 70 °C overnight to estimate apparent DM disappearance (DMD).

## 2.2. Chemical analyses

Samples of the incubated substrate were analyzed for DM (method ID 934.01), ash (method ID 942.05), nitrogen (method ID 954.01) and EE (method ID 920.39) using Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1997) official methods. The NDF (Van Soest et al., 1991) and ADF (AOAC, method ID 973.18) contents were determined using an ANKOM<sup>200</sup> Fiber Analyzer Unit (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY, USA). The NDF analysis was done with sodium sulfite, and with  $\alpha$ -amylase. Both NDF and ADF were expressed without residual ash.

## 2.3. Calculations and statistical analyses

Volumes (mL/g DM) of gas, CO<sub>2</sub>, and CH<sub>4</sub> were used to estimate the fermentation kinetic parameters using the NLIN procedure of Statistical Analysis System (SAS, 2002) according to France et al. (2000) model as:

$$y = b \times \left[ 1 - e^{-c(t-Lag)} \right]$$

where  $y$  is the volume of gas, CO<sub>2</sub> or CH<sub>4</sub> at time  $t$  (h);  $b$  is the asymptotic GP, CO<sub>2</sub> or CH<sub>4</sub> production (mL/g DM);  $c$  is the fractional rate of fermentation (per h), and  $Lag$  (h) is the discrete lag time prior to any gas, CO<sub>2</sub> or CH<sub>4</sub> formation.

The experimental design for the *in vitro* ruminal GP and fermentation parameters analysis was a completely randomized design, considering as fixed factors, additive type and additive doses in the linear model (Steel and Torrie, 1980). Data of each of the three runs within the same sample were averaged prior to statistical analysis. Mean values of each individual extract within each species (three samples of each) were used as the experimental unit. Multiple comparisons of means were performed using the Tukey's test. Significance was declared at a level of  $P < 0.05$ .

## 3. Results

Fig. 2 shows the *in vitro* rumen GP (mL/g incubated DM) of a calf's diet, supplemented with XYL, SC, and XYL + SC mixture. Interaction between additive and rumen liquor was observed for rate of GP ( $P = 0.027$ ) and initial delay before GP ( $P < 0.001$ ; Table 1). No effect ( $P > 0.05$ ) was noted between additive  $\times$  dose for asymptotic GP, rate of GP and initial delay before GP. Inclusion of XYL, SC, and XYL + SC had a higher asymptotic GP while XYL + SC mixture had the lowest initial delay (39%) before GP began. There was a decrease ( $P < 0.05$ ) in the average asymptotic GP (at all doses) of the treatment XYL + SC mixture compared with the control treatment (no additive). The supplementation of XYL and SC to the diets of the calves had no statistically significant effects ( $P > 0.05$ ) on the asymptotic GP at all tested doses, while the supplementation of a mixture of XYL + SC at a high dose affected it ( $P < 0.05$ ) compared with the control. The rate of GP showed a positive effect ( $P < 0.05$ ) on all the doses of XYL addition while no statistically significant effect ( $P > 0.05$ ) was observed with the addition of SC and XYL + SC mixture additives, when compared with the control. In addition, there was an increase in the lag time of GP at each dose of XYL, SC and XYL + SC mixture (only at the high dose) additives, and a statistically significant effect ( $P < 0.05$ ) on all the doses of XYL

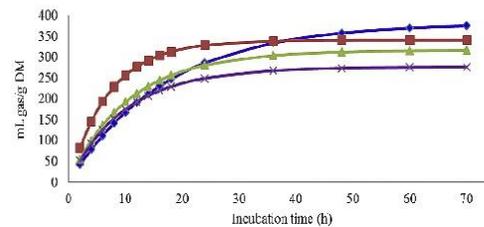


Fig. 2. *In vitro* rumen gas production (mL/g incubated DM) of calf's diet supplemented with: no additive (control) (—♦—), xylanase (—■—), *Saccharomyces cerevisiae* (—▲—), and their mixture (—×—) incubated with rumen inoculum from calves fed on diet supplemented with the same feed additives for 60 d of age.

and SC additives compared with the control.

Fig. 3 shows the *in vitro* rumen CH<sub>4</sub> production (mL/g incubated DM) of a calf's diet supplemented with XYL, SC and XYL + SC mixture. Interactions between additive and rumen liquor were observed ( $P < 0.05$ ) for asymptotic and rate of CH<sub>4</sub> productions (Table 1). Moreover, interactions were observed ( $P < 0.05$ ) between additive and dose for asymptotic CH<sub>4</sub>, initial delay before CH<sub>4</sub> production and at 48 h incubation for mL/g incubated DM. Xylanase, SC, and XYL + SC mixture in all doses except for 0 mg dose of XYL + SC mixture additive affected ( $P < 0.05$ ) CH<sub>4</sub> production when compared with the control treatment. Also the mean productions of CH<sub>4</sub> from the XYL, SC and XYL + SC mixture were decreased ( $P < 0.05$ ) compared with the control. The lowest asymptotic CH<sub>4</sub> production was observed at the high dose of XYL + SC mixture which was lower ( $P < 0.05$ ) than that of the control treatment. No effect ( $P > 0.05$ ) was observed in all the doses on the rate of CH<sub>4</sub> production except at 3 µL XYL/g DM that was increased ( $P < 0.05$ ), compared with the control, with no observable effect ( $P > 0.05$ ) being noticed with the addition of SC and XYL + SC mixture additives. Similarly, there was no statistically significant difference ( $P > 0.05$ ) in the lag time of CH<sub>4</sub> production at all doses when compared with the control treatment. The asymptotic CH<sub>4</sub> production reduced for all the additives, while the rate of CH<sub>4</sub> production was lowest for XYL + SC (9%).

Fig. 4 shows the *in vitro* rumen CO<sub>2</sub> production (mL/g incubated DM) of a calf's diet supplemented with XYL, SC and XYL + SC mixture. Interaction was observed ( $P < 0.05$ ) between additive and dose for mL/g incubated DM but there were no effects for mL/g degraded DM and proportional CO<sub>2</sub> production at 6, 24 and 48 h incubation. The XYL + SC had the highest asymptotic CO<sub>2</sub> (81%) followed by SC (37%) and XYL (20%). The mean asymptotic CO<sub>2</sub> production was higher ( $P < 0.05$ ) for SC and XYL + SC mixture additives addition than for the control (without additive). The highest asymptotic CO<sub>2</sub> production was recorded for the treatment containing 2 mg SC/g DM and high dose of XYL + SC mixture; it was greater in the two treatments ( $P < 0.05$ ) than in the control but a decrease below the control was observed at 6 µL XYL/g DM and 0 mg SC/g DM. The mean rate of GP differed ( $P < 0.05$ ) only with the addition of XYL and not with SC and XYL + SC mixture additives when compared with the control. All the values of the lag time of CO<sub>2</sub> production ranged from the lowest scale of 8.2 mL/g DM in 2 mg SC to the highest gauge of 10.9 mL/g DM in the high dose of XYL + SC mixture. There was no statistically significant effect ( $P > 0.05$ ) on mean lag time of CO<sub>2</sub> production for XYL, SC additives and the control, but a statistically significant effect was observed for XYL + SC mixture compared with the control treatment.

From previous studies, negligible amounts of CH<sub>4</sub> were released during the first 6 h of fermentation. Because the production peak

**Table 1**

*In vitro* gas, methane (CH<sub>4</sub>) and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) kinetics<sup>1</sup> as affected by addition of xylanase (XYL), yeast (SC) and mixture of both in rumen liquor of calves fed on diet supplemented with xylanase and/or yeast for 60 d of age.

Rumen liquor from calves fed on:	Additive:	Dose (/g DM)	Gas production (mL/g DM) <sup>2</sup>			CH <sub>4</sub> production (mL/g DM) <sup>3</sup>			CO <sub>2</sub> production (mL/g DM) <sup>4</sup>		
			<i>b</i>	<i>c</i>	Lag	<i>b</i>	<i>c</i>	Lag	<i>b</i>	<i>c</i>	Lag
Control	No additive	0	383 <sup>Aa</sup>	0.058 <sup>Cc</sup>	2.69 <sup>Ce</sup>	108 <sup>Aa</sup>	0.044 <sup>Bbc</sup>	7.15 <sup>ab</sup>	38 <sup>Cde</sup>	0.041 <sup>Bc</sup>	8.48 <sup>Bc</sup>
XYL	XYL	0 μL	375 <sup>A</sup>	0.141 <sup>A</sup>	5.28 <sup>abc</sup>	67 <sup>bc</sup>	0.093 <sup>ab</sup>	8.93 <sup>A</sup>	58 <sup>c</sup>	0.147 <sup>ab</sup>	10.17 <sup>ab</sup>
		3 μL	348 <sup>A</sup>	0.148 <sup>A</sup>	5.28 <sup>abc</sup>	60 <sup>c</sup>	0.102 <sup>A</sup>	8.30 <sup>ab</sup>	50 <sup>cd</sup>	0.162 <sup>A</sup>	9.78 <sup>abc</sup>
		6 μL	303 <sup>ab</sup>	0.128 <sup>ab</sup>	5.43 <sup>abc</sup>	64 <sup>c</sup>	0.070 <sup>abc</sup>	6.87 <sup>ab</sup>	35 <sup>de</sup>	0.060 <sup>c</sup>	8.39 <sup>c</sup>
		Mean	352 <sup>AB</sup>	0.119 <sup>A</sup>	4.67 <sup>A</sup>	75 <sup>B</sup>	0.077 <sup>A</sup>	7.81	45 <sup>BC</sup>	0.103 <sup>A</sup>	9.21 <sup>AB</sup>
SC	SC	0 mg	331 <sup>ab</sup>	0.000 <sup>bc</sup>	6.59 <sup>A</sup>	63 <sup>c</sup>	0.049 <sup>bc</sup>	8.53 <sup>ab</sup>	31 <sup>e</sup>	0.074 <sup>c</sup>	8.74 <sup>bc</sup>
		2 mg	329 <sup>ab</sup>	0.105 <sup>abc</sup>	5.58 <sup>ab</sup>	69 <sup>bc</sup>	0.062 <sup>abc</sup>	8.01 <sup>ab</sup>	90 <sup>ab</sup>	0.087 <sup>bc</sup>	8.18 <sup>c</sup>
		4 mg	295 <sup>ab</sup>	0.108 <sup>abc</sup>	6.02 <sup>A</sup>	67 <sup>bc</sup>	0.050 <sup>bc</sup>	9.03 <sup>A</sup>	47 <sup>cd</sup>	0.043 <sup>c</sup>	8.50 <sup>bc</sup>
		Mean	334 <sup>AB</sup>	0.086 <sup>BC</sup>	5.22 <sup>A</sup>	77 <sup>B</sup>	0.051 <sup>B</sup>	8.18	51 <sup>B</sup>	0.061 <sup>B</sup>	8.48 <sup>B</sup>
		0	295 <sup>ab</sup>	0.100 <sup>abc</sup>	3.78 <sup>de</sup>	105 <sup>ab</sup>	0.042 <sup>c</sup>	7.30 <sup>ab</sup>	97 <sup>A</sup>	0.041 <sup>c</sup>	10.49 <sup>A</sup>
XYL + SC	XYL + SC	3 μL XYL+2 mg SC	297 <sup>ab</sup>	0.105 <sup>abc</sup>	4.07 <sup>cde</sup>	74 <sup>abc</sup>	0.050 <sup>bc</sup>	6.40 <sup>bc</sup>	58 <sup>c</sup>	0.064 <sup>c</sup>	9.54 <sup>abc</sup>
		6 μL XYL + 4 mg SC	240 <sup>b</sup>	0.111 <sup>abc</sup>	4.37 <sup>bcd</sup>	55 <sup>c</sup>	0.055 <sup>abc</sup>	7.73 <sup>ab</sup>	80 <sup>b</sup>	0.049 <sup>c</sup>	10.88 <sup>A</sup>
		Mean	304 <sup>B</sup>	0.094 <sup>AB</sup>	3.73 <sup>B</sup>	86 <sup>B</sup>	0.048 <sup>B</sup>	7.15	68 <sup>A</sup>	0.049 <sup>B</sup>	9.85 <sup>A</sup>
		Additive effectiveness (as % of no additive treatment) <sup>5</sup> :									
	XYL		-8	105	74	-31	75	9	20	151	9
	SC		-13	49	94	-29	16	14	37	49	0
	XYL + SC		-21	62	39	-21	9	0	81	20	16
SEM <sup>6</sup>			20.6	0.0119	0.291	7.5	0.0091	0.434	3.2	0.0140	0.327
<i>P</i> value											
Additive type			0.138	0.033	<0.001	0.306	0.022	0.579	<0.001	0.008	0.008
Rumen liquor type			0.007	<0.001	<0.001	<0.001	0.038	0.004	<0.001	0.001	<0.001
Additive dose			0.031	0.255	0.133	0.024	0.551	0.159	<0.001	0.002	0.154
Additive type × Rumen liquor type			0.175	0.027	<0.001	0.017	0.025	0.168	<0.001	0.003	0.030
Additive type × additive dose			0.798	0.468	0.754	0.015	0.109	0.007	<0.001	0.004	0.001

<sup>1</sup>Determined as:  $y = b \times [1 - e^{-c(t-Lag)}]$ , where *y* is the volume of gas production at time *t* (h); *b* is the asymptotic gas, CO<sub>2</sub> or CH<sub>4</sub> production (mL/g DM); *c* is the fractional rate of fermentation (per h), and *Lag* (h) is the discrete lag time prior to any gas, CO<sub>2</sub> or CH<sub>4</sub> formation.

<sup>2</sup>*b* is the asymptotic gas production (mL/g DM); *c* is the rate of gas production (per h); *Lag* is the initial delay before gas formation (h).

<sup>3</sup>*b* is the asymptotic methane production (mL/g DM); *c* is the rate of methane production (per h); *Lag* is the initial delay before methane formation (h).

<sup>4</sup>*b* is the asymptotic carbon dioxide production (mL/g DM); *c* is the rate of carbon dioxide production (per h); *Lag* is the initial delay before carbon dioxide formation (h).

<sup>5</sup>Based on the mean value of each feed additive at different doses.

<sup>6</sup>SEM, standard error of the mean.

(A,B,C) arithmetic mean in the same column with different letters differ (*P* < 0.05) among additives (the mean of all doses for each additive).

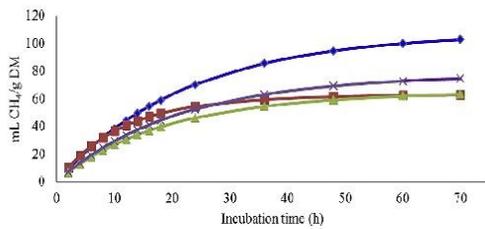
(a,b,c,d,e) arithmetic mean in the same row with different letters differ (*P* < 0.05) among doses of different feed additives.

occurred approximately at 24 h of fermentation, and then started to decrease until 48 h of incubation, after which negligible amounts were still released, only productions at 6, 24, and 48 h of incubation were tabulated, while productions at other times of incubation were presented as figures. Table 2 shows the *in vitro* CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> productions at 6, 24 and 48 h after incubation as affected by the addition of XYL, SC and a mixture of both in rumen liquor of calves fed on diet supplemented with the same three additives for 60 d of age. At 6, 24 and 48 h of incubation, XYL, SC and XYL + SC mixture did affect CH<sub>4</sub> production (mL/g incubated DM) compared with the control treatment. However, the mixture of XYL and SC had no effect on the CH<sub>4</sub> production at 24 and 48 h compared with their respective controls. Moreover, CH<sub>4</sub> production (mL/g degraded DM) was decreased at the high dose of XYL + SC mixture at 24 and 48 h of incubation. There was an observable reduction in the CH<sub>4</sub> production (mL/g degraded DM) in XYL, SC and mixture of XYL + SC mixture compared with the control. The proportional CH<sub>4</sub> production at 6, 24 and 48 h of incubation was reduced slightly but the reduction was marginal (*P* > 0.05) compared with the control treatment, while addition of additives resulted in a decreased proportional CH<sub>4</sub> production. On the other hand, addition of XYL, SC and XYL + SC mixture increased (*P* < 0.05) the production of CO<sub>2</sub> (mL/g incubated DM) and mL/g degraded DM but had no effect (*P* > 0.05) on the proportional CO<sub>2</sub> production when compared with the control treatment.

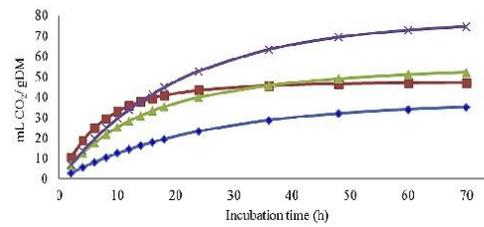
#### 4. Discussion

Agricultural wastes are important sources of global GHG emissions which are estimated to rise to about 8.2 billion t of CO<sub>2</sub>

equivalents by 2030, if adequate mitigation technique is not properly implemented (Slade et al., 2016). Apart from the impacts of GHG, enteric CH<sub>4</sub> emission contributes to a loss of net feed energy that cannot be used in ruminant animals for production purposes (Johnson and Johnson, 1995). Because of these challenges, intensive research efforts are recently directed towards ruminant animals CH<sub>4</sub> mitigation (Elghandour et al., 2016b). The use of *in vitro* GP technique is a powerful, simple and sensitive screening method for evaluating substrate fermentation or degradation and for monitoring the efficacy of feed additives (Elghandour et al., 2015) and GHG production (Elghandour et al., 2016c). The interactions between additive type and rumen liquor, as well as additive and additive dose, for some measured parameters, suggest that both fermentation kinetics and gas production are rumen liquor and additive-dose dependent, underpinning the importance of identifying optimal supplemental levels of each additive for each rumen liquor type. The addition of enzyme at all doses had no effects on the asymptotic GP. This finding is in agreement with the results of Jalilvand et al. (2008) who observed that the addition of enzyme additives to forage had negligible effects on GP kinetics, and opined that the effects of enzyme addition depend on the fiber content, structural polysaccharide compositions of the substrate and difference in enzyme composition. There were interactions between additive and rumen liquor for rate of GP and initial delay before GP. Enzyme addition significantly affected the rate of GP, which contradicts previous reports on other enzyme preparations and types (Jalilvand et al., 2008). Recent studies including *in vivo* (Morsy et al., 2016) and *in vitro* (Elghandour et al., 2016a) experiments showed that supplementation of ruminant diets with exogenous enzymes could improve feed utilization, digestion of



**Fig. 3.** *In vitro* rumen methane ( $\text{CH}_4$ ) production (mL/g incubated DM) of calf's diet supplemented with: no additive (control) (-♦-), xylanase (-■-), *Saccharomyces cerevisiae* (-▲-), and their mixture (-×-) incubated with rumen inoculum from calves fed on diet supplemented with the same feed additives for 60 d of age.



**Fig. 4.** *In vitro* rumen carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) production (mL/g incubated DM) of a calf's diet supplemented with: no additive (control) (-♦-), xylanase (-■-), *Saccharomyces cerevisiae* (-▲-), and their mixture (-×-) incubated with rumen inoculum from calves fed on diet supplemented with the same feed additives for 60 d of age.

DM, and animal performance by improving DM degradation (Alsersy et al., 2015).

Ahmed et al. (2015) showed that the supplementation of SC to diets of ruminants improved feed utilization. In contrast, Corona et al. (1999) reported that supplementation of SC to cow diets did not affect digestibility of DM, hemicellulose and starch. Yeast additives had no effect on rate of GP but there was a slight increase in rate of GP compared with the control. This result is in contrast to the work of Rodríguez et al. (2015) who reported a decreased rate of GP in response to SC additives. The differences in results may be due to the composition and incubation of the substrates (Elghandour et al., 2014).

Xylanase, SC and their mixture at all doses, except that of 0 mg dose of XYL + SC mixture, decreased CH<sub>4</sub> production when compared to the control treatment. This pronounced decrease in CH<sub>4</sub> production suggests that the use of XYL, SC or its mixture as additives in ruminant diets may serve as efficient methods to reduce CH<sub>4</sub> emission from ruminant production. Several researches have reported a reduction of CH<sub>4</sub> production with SC supplementation. For instance 58% reduction in CH<sub>4</sub> production have been reported by Newbold and Rode (2006) with the addition of SC in ruminant diets. Besides, Polyorch et al. (2014) noted a decrease in *in vitro* CH<sub>4</sub> production with supplementation of SC, which supports our findings.

Of the several studies which have evaluated the effects of exogenous enzymes on CH<sub>4</sub> emission in the rumen, few reported an absolute increase in production of CH<sub>4</sub> with addition of exogenous enzymes supplementation to the ruminant diets (Beauchemin et al., 2009). Dong et al. (1999) reported 43% increase in CH<sub>4</sub> production when cellulase and XYL were used as supplements with hay in RUSITEC system. Colombatto et al. (2003) reported that there was no effect of enzymes supplement on CH<sub>4</sub> production in continuous culture system. McGinn et al. (2004) observed no effect on CH<sub>4</sub> production in steers fed with barley silage-based diets supplemented with different feed additives including exogenous enzymes. In contrast, Kholif et al. (2016) reported that the addition of enzymes at certain doses reduced CH<sub>4</sub> production in equine diets. Salem et al. (2015b) observed the same results in horses fed diet supplemented with exogenous enzymes. In the present study, addition of enzymes at all doses decreased CH<sub>4</sub> production. This may be due to the possible stimulation of reductive acetogens in the rumen that alters hydrogen (H<sub>2</sub>) metabolism and its utilization by methanogens in a manner that reduces CH<sub>4</sub> formation and emissions (Stewart et al., 1997). The reduction in CH<sub>4</sub> production by the addition of a combination of XYL and SC at high dose depicts a positive impact on rumen fermentation, although the observed pronounced decrease in CH<sub>4</sub> production at high dose of the added additive was accompanied by a slight decrease in asymptotic GP,

indicating a direct inhibitory effect of rumen fermentation kinetics.

Many gases consisting of mainly CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> are produced during ruminal fermentation process within the rumen. In this study, addition of additives at all doses slightly increased CO<sub>2</sub> production at 6, 24 and 48 h of incubation. At 6 h of incubation, there was no CO<sub>2</sub> production in all the additives as well as in the control. Decreased CO<sub>2</sub> production below the control treatment was observed at 6  $\mu\text{L}$  XYL/g DM and 0 mg SC/g DM. This reduction in CO<sub>2</sub> production and decrease in rate of CO<sub>2</sub> may be due to increased cell wall content that can reduce the microbial activities. Elghandour et al. (2016c) reported a decreased CO<sub>2</sub> production when corn grain was replaced with soybean hulls. Elghandour et al. (2016d) observed that replacement of corn grain with prickly pear cactus increased CO<sub>2</sub> production. However, both experiments used the same organic acid addition, indicating that the observed different effect may be ration dependent. To the best of our knowledge, there is little information on the effects of supplementing diets of ruminants with enzymes and SC additives on CO<sub>2</sub> production which makes it difficult to compare the present results with previous results. The asymptotic CO<sub>2</sub> production recorded the highest values for 2 mg SC/g DM (90 mL/g DM) and (97 and 80 mL/g DM) for 0 and high dose of XYL + SC mixture; the three treatments had greater productions than the control treatment (38 mL/g DM). In this study, inclusion of additives had an increasing effect on asymptotic CO<sub>2</sub> production.

## 5. Conclusions

Methane and CO<sub>2</sub> from enteric fermentation in the digestive system of ruminants are two major contributors of greenhouse gas emissions in the world. Mitigating the loss of these gases from ruminant production will not only reduce greenhouse gas production from agricultural wastes but also will decrease loss of net feed energy to the animal. This study demonstrated that supplementing ruminant's diets with xylanase, *S. cerevisiae* and their mixture at different doses for 60 d of age changed the pattern of ruminal production of gas, CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>. Addition of a mixture of xylanase and *S. cerevisiae* at a high dose significantly reduced asymptotic gas production compared with other treatments with dose-dependent results. Inclusion of xylanase, *S. cerevisiae* and their mixture reduced asymptotic gas production to <1%. Again, addition of additives in the diets of ruminants at all doses had statistically significant reduction effect on CH<sub>4</sub> production. The pronounced decrease in CH<sub>4</sub> production shows that the use of xylanase, *S. cerevisiae* or their mixture as additives in ruminant diets may serve as efficient method to reduce CH<sub>4</sub> emission from ruminant production. This study also established that the mixture of xylanase and *S. cerevisiae* was more efficient and promising in

**Table 2**

*In vitro* dry matter disappearance (DMD), and production of methane (CH<sub>4</sub>) and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) at 6, 24 and 48 h after incubation as affected by addition of xylanase (XYL), yeast (SC) and mixture of both in rumen liquor of calves fed on diet supplemented with xylanase and/or yeast for 60 d of age.

Rumen liquor from calves fed on:	Additive:	Dose (mg/g DM)	DMD	CH <sub>4</sub> production									CO <sub>2</sub> production									
				mL/g incubated DM			mL/g degraded DM			Proportional CH <sub>4</sub> production			mL/g incubated DM			mL/g degraded DM			Proportional CO <sub>2</sub> production			
				6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h	
Control	No additive	0	693	25	70.2 <sup>AA</sup>	94.7 <sup>AA</sup>	2.47	85	128 <sup>AA</sup>	1.53 <sup>AA</sup>	21 <sup>A</sup>	25 <sup>A</sup>	8 <sup>BB</sup>	24 <sup>BB</sup>	32 <sup>CC</sup>	0	34	65	0	8	13	
XYL	XYL	0 µL	656	29	60 <sup>BB</sup>	66 <sup>BB</sup>	2.56	72	82 <sup>BB</sup>	0.79 <sup>BB</sup>	13	15	34 <sup>C</sup>	56 <sup>BB</sup>	58 <sup>CC</sup>	0	64	70	0	12	12	
		3 µL	644	28	55 <sup>BB</sup>	60 <sup>BB</sup>	2.22	78	81 <sup>BB</sup>	0.70 <sup>BB</sup>	15	17	31 <sup>C</sup>	49 <sup>BB</sup>	50 <sup>CC</sup>	0	72	78	0	14	14	
		6 µL	642	22	49 <sup>BB</sup>	59 <sup>C</sup>	2.59	63	81 <sup>BB</sup>	1.00 <sup>BB</sup>	14	17	11 <sup>B</sup>	26 <sup>CC</sup>	33 <sup>C</sup>	0	53	68	0	12	14	
		Mean	659	26	59 <sup>BB</sup>	70 <sup>B</sup>	2.46	75	96 <sup>B</sup>	1.00 <sup>B</sup>	16 <sup>BB</sup>	19 <sup>B</sup>	21 <sup>A</sup>	39 <sup>A</sup>	43 <sup>B</sup>	0	56	70	0	11	13	
SC	SC	0 mg	665	16	43 <sup>B</sup>	56 <sup>C</sup>	0.85	53	79 <sup>BB</sup>	0.51 <sup>B</sup>	13	16	11 <sup>B</sup>	25 <sup>CC</sup>	30 <sup>C</sup>	0	37	51	0	9	11	
		2 mg	671	22	54 <sup>BB</sup>	66 <sup>BB</sup>	1.41	60	90 <sup>BB</sup>	0.62 <sup>B</sup>	14	19	31 <sup>C</sup>	65 <sup>A</sup>	77 <sup>A</sup>	0	115	137	0	25	28	
		4 mg	625	16	42 <sup>B</sup>	56 <sup>C</sup>	1.42	59	84 <sup>BB</sup>	0.58 <sup>B</sup>	13	17	11 <sup>B</sup>	30 <sup>CC</sup>	41 <sup>CC</sup>	0	64	81	0	13	15	
		Mean	664	20	52 <sup>B</sup>	68 <sup>B</sup>	1.54	64	95 <sup>B</sup>	0.81 <sup>B</sup>	15 <sup>B</sup>	19 <sup>B</sup>	15 <sup>BB</sup>	36 <sup>A</sup>	45 <sup>B</sup>	0	63	83	0	14	17	
XYL + SC	XYL + SC	0	681	23	67 <sup>BB</sup>	91 <sup>BB</sup>	2.48	77	102 <sup>BB</sup>	1.28 <sup>BB</sup>	20	24	21 <sup>BB</sup>	60 <sup>BB</sup>	83 <sup>A</sup>	0	52	74	0	13	16	
		3 µL XYL + 2 mg SC	674	19	50	66 <sup>BB</sup>	2.20	58	77 <sup>BB</sup>	1.09 <sup>BB</sup>	15	18	18 <sup>BB</sup>	44 <sup>BB</sup>	54 <sup>CC</sup>	0	39	49	0	10	12	
		6 µL XYL + 4 mg SC	678	16	40 <sup>B</sup>	51 <sup>C</sup>	1.80	53	68 <sup>B</sup>	1.13 <sup>BB</sup>	17	19	20 <sup>BB</sup>	55 <sup>BB</sup>	72 <sup>BB</sup>	0	50	68	0	15	19	
		Mean	681	21	57 <sup>BB</sup>	76 <sup>B</sup>	2.24	68	94 <sup>B</sup>	1.26 <sup>BB</sup>	18 <sup>BB</sup>	21 <sup>BB</sup>	17 <sup>BB</sup>	46 <sup>A</sup>	60 <sup>A</sup>	0	44	64	0	12	15	
Additive effectiveness (as % of no additive treatment) <sup>1</sup>																						
XYL				-5	2.8	-17	-26	-0.4	-12	-25	-35	-24	-26	154	64	34.27	0	63	8.	0	36	6
SC				-4	-21	-25	-28	-38	-24	-26	-47	-28	-22	88	53	40	0	83	29	0	67	31
XYL + SC				-2	-17	-19	-20	-9	-20	-27	-18	-13	-14	105	94	88	0	28	-0.8	0	39	17
SEM <sup>2</sup>				23.8	2.9	5.3	6.1	0.400	9.5	10.4	0.175	2.0	2.1	3.4	4.1	3.0	0	17.8	23.6	0	3.4	4.3
P value																						
Additive type				0.433	0.065	0.170	0.219	0.128	0.439	0.784	0.208	0.607	0.632	0.054	<0.001	<0.001	1.000	0.775	0.937	1.000	0.962	0.962
Rumen liquor type				0.040	0.347	0.004	<0.001	0.134	0.032	<0.001	<0.001	0.003	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	1.000	0.257	0.983	1.000	0.330	0.926
Additive dose				0.422	0.083	0.013	0.008	0.712	0.496	0.476	0.872	0.936	0.840	<0.001	<0.001	<0.001	1.000	0.062	0.178	1.000	0.031	0.092
Additive type × Rumen liquor type				0.431	0.111	0.090	0.025	0.076	0.434	0.499	0.107	0.158	0.081	0.008	<0.001	<0.001	1.000	0.749	0.876	1.000	0.859	0.822
Additive × additive dose				0.228	0.835	0.361	0.048	0.575	0.443	0.202	0.566	0.245	0.121	0.003	0.001	<0.001	1.000	0.694	0.753	1.000	0.589	0.661

<sup>1</sup>Based on the mean value of each feed additive at different doses.

<sup>2</sup>SEM, standard error of the mean.

(A,B,C) arithmetic mean in the same column with different letters differ (P < 0.05) among additives (the mean of all doses for each additive). (a,b,c,d,e) arithmetic mean in the same row with different letters differ (P < 0.05) among doses of different feed additives.

reducing gas and methane emissions arising from ruminant production. If this mitigation practice is adopted, it can serve as an environmental friendly way of feeding livestock leading to cleaner environmental production conditions in calf farming.

#### Conflict of interest

All authors declare that there are no present or potential conflicts of interest among the authors and other people or organizations that could inappropriately bias their work.

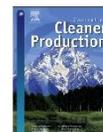
#### Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from the IAEA, Vienna, Austria (Research Contract Number MEX16307 within the D3.10.27 Coordinated Research Project). Kholif, A.E. thanks the National Council for Science and Technology (CONACYT, Mexico) and The World Academy of Sciences (TWAS, Italy) for supporting his postdoctoral fellowship at the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México.

#### References

- Ahmed, M.H., Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Zeweil, H.S., Kholif, A.E., Klieve, A.V., Abdelrassoul, A.M.A., 2015. Influence of *Trichoderma reesei* or *Saccharomyces cerevisiae* on performance, ruminal fermentation, carcass characteristics and blood biochemistry of lambs fed *Atriplex nummularia* and *Acacia saligna* mixture. *Livest. Sci.* 180, 90–97.
- Alsersy, H., Salem, A.Z., Borhami, B.E., Olivares, J., Gado, H.M., Mariezcurrena, M.D., Yacout, M.H., Kholif, A.E., El-Adawy, M., Hernandez, S.R., 2015. Effect of Mediterranean saltbush (*Atriplex halimus*) ensiling with two developed enzyme cocktails on feed intake, nutrient digestibility and ruminal fermentation in sheep. *Anim. Sci. J.* 86, 51–58.
- AOAC, 1997. Official Methods of Analysis, sixteenth ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Beauchemin, K.A., McAllister, T.A., McGinn, S.M., 2009. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. In: CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources. Vol. 4, (No. 035). CABI, Wallingford, UK, pp. 1–18.
- 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.
- Colombatto, D., Hervás, G., Yang, W.Z., Beauchemin, K.A., 2003. 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.
- Corona, L., Mendoza, G.D., Castrejón, F.A., Crosby, M.M., Cobos, M.A., 1999. Evaluation of two yeast cultures (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal fermentation and digestion in sheep fed a corn stover diet. *Small Rumin. Res.* 31, 209–214.
- Dick, M., Abreu Da Silva, M., Dewes, H., 2015. Mitigation of environmental impacts of beef cattle production in southern Brazil – evaluation using farm-based life cycle assessment. *J. Clean. Prod.* 87, 58–67.
- Dong, Y., Bae, H.D., McAllister, T.A., Mathison, G.W., Cheng, K.J., 1999. Effects of exogenous fibrolytic enzymes,  $\alpha$ -bromoethanesulfonate and monensin on fermentation in a rumen simulation (Rusitec) system. *Can. J. Anim. Sci.* 79, 491–498.
- Eckard, R.J., Grainger, C., De Klein, C.A.M., 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production. *Livest. Sci.* 130, 47–56.
- Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Hernández, J., Mariezcurrena, M.D., López, S., Camacho, L.M., Márquez, O., Salem, A.Z.M., 2016a. Influence of the addition of exogenous xylanase with or without pre-incubation on the *in vitro* ruminal fermentation of three fibrous feeds. *Czech J. Anim. Sci.* 61, 262–272.
- Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., López, S., German, D., Mendoza, G.D., Odongo, N.E., Salem, A.Z.M., 2016c. *In vitro* gas, methane, and carbon dioxide productions of high fibrous diet incubated with fecal inocula from horses in response to the supplementation with different live yeast additives. *J. Equine Vet. Sci.* 38, 64–71.
- Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Marquez-Molina, O., Vazquez-Armijo, J.F., Puniya, A.K., Salem, A.Z.M., 2015. Influence of individual or mixed cellulose and xylanase mixture on *in vitro* rumen gas production kinetics of total mixed rations with different maize silage and concentrate ratios. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 39, 435e442.
- Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Salem, A.Z.M., de Oca, R.M., Barbabosa, A., Mariezcurrena, M., Olafadehan, O.A., 2016b. Addressing sustainable ruminal methane and carbon dioxide emissions of soybean hulls by organic acid salts. *J. Clean. Prod.* 135, 194–200.
- Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Salem, A.Z.M., Olafadehan, O.A., Kholif, A.M., 2016d. Sustainable anaerobic rumen methane and carbon dioxide productions from prickly pear cactus flour by organic acid salts addition. *J. Clean. Prod.* 139, 1362–1369.
- Elghandour, M.M.Y., Vázquez-Chagoyán, J.C., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Martínez-Castañeda, J.S., Camacho, L.M., Cerrillo-Soto, M.A., 2014. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* at direct addition or pre-incubation on *in vitro* gas production kinetics and degradability of four fibrous feeds. *Ital. J. Anim. Sci.* 13, 295–301.
- FAO, 2006. Livestock's Long Shadow, Environmental Issues and Options, Rome, Italy.
- FAO, 2016. Climate Is Changing. Food and Agriculture Must Change Too, Rome, Italy.
- 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. *Br. J. Nutr.* 83, 143–150.
- Goering, M.K., Van Soest, P.J., 1970. Forage Fibre Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications), Agriculture Handbook No. 379. Agricultural Research Service, USDA, Washington, USA.
- Hassan, A.A., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Samir, M., Yacout, M.H., Abu Hafsa, S.H., Mendoza, G.D., Elghandour, M.M.Y., Ayala, M., Lopez, S., 2016. Performance of crossbred dairy Friesian calves fed two levels of *Saccharomyces cerevisiae*: intake, digestion, ruminal fermentation, blood parameters and faecal pathogenic bacteria. *J. Agric. Sci.* 154, 1488–1498.
- Hernandez, A., Kholif, A.E., Lugo-Coyote, R., Elghandour, M.M.Y., Cipriano, M., Rodríguez, G.B., Odongo, N.E., Salem, A.Z.M., 2017. The effect of garlic oil, xylanase enzyme and yeast on biomethane and carbon dioxide production from 60-d old Holstein dairy calves fed a high concentrate diet. *J. Clean. Prod.* 142, 2384–2392.
- Hristov, A.N., Oh, J., Giallongo, F., Frederick, T.W., Harper, M.T., Weeks, H.L., Branco, A.F., Moate, P.J., Deighton, M.H., Williams, S.R.O., Kindermann, M., Duval, S., 2015. An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 10663–10668.
- Jalilvand, G., Odongo, N.E., López, S., Naserian, A., Valizadeh, R., Eftekhari Shahrodi, F., Kebreab, E., France, J., 2008. Effects of different levels of an enzyme mixture on *in vitro* gas production parameters of contrasting forages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 146, 289–301.
- Johnson, K.A., Johnson, D.E., 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73, 2483–2492.
- Khattab, H.M., Gado, H.M., Kholif, A.E., Mansour, A.M., Kholif, A.M., 2011. The potential of feeding goats sun dried rumen contents with or without bacterial inoculums as replacement for berseem clover and the effects on milk production and animal health. *Int. J. Dairy Sci.* 6, 267–277.
- Kholif, A.E., Baza-García, L.A., Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Barbabosa, A., Dominguez-Vara, I.A., Sanchez-Torres, J.E., 2016. *In vitro* assessment of fecal inocula from horses fed on high-fiber diets with fibrolytic enzymes addition on gas, methane, and carbon dioxide productions as indicators of hindgut activity. *J. Equine Vet. Sci.* 39, 44–50.
- Kholif, A.E., Elghandour, M.M.Y., Rodríguez, G.B., Olafadehan, O.A., Salem, A.Z.M., 2017. Anaerobic ensiling of raw agricultural waste with a fibrolytic enzyme cocktail as a cleaner and sustainable biological product. *J. Clean. Prod.* 142, 2649–2655.
- Lewis, G.E., Sanchez, W.K., Hunt, C.W., Guy, M.A., Pritchard, G.T., Swanson, B.I., Treacher, R.J., 1999. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 611–617.
- McGinn, S.M., Beauchemin, K.A., Coates, T., Colombatto, D., 2004. Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *J. Anim. Sci.* 82, 3346–3356.
- Morsy, T.A., Kholif, A.E., Kholif, S.M., Kholif, A.M., Sun, X., Salem, A.Z., 2016. Effects of two enzyme feed additives on digestion and milk production in lactating Egyptian buffaloes. *Ann. Anim. Sci.* 16, 209–222.
- Newbold, C.J., Rode, L.M., 2006. Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. *Int. Congr. Ser.* 1293, 138–147.
- Nguyen, T.L.T., Hermansen, J.E., Mogensen, L., 2010. Environmental consequences of different beef production systems in the EU. *J. Clean. Prod.* 18, 756–766.
- NRC, 1985. Nutrient Requirements of Domestic Animals. National Research Council, Washington, DC, USA.
- Polyorach, S., Wanapat, M., Cherdthong, A., 2014. Influence of yeast fermented cassava chip protein (YEFECAP) and roughage to concentrate ratio on ruminal fermentation and microorganisms using *in vitro* gas production technique. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 27, 36–45.
- Rodríguez, M.P., Mariezcurrena, M.D., Mariezcurrena, M.A., Lagunas, B.C., Elghandour, M.M., Kholif, A.M., Kholif, A.E., Almaráz, E.M., Salem, A.Z., 2015. Influence of live cells or cells extract of *Saccharomyces cerevisiae* on *in vitro* gas production of a total mixed ration. *Ital. J. Anim. Sci.* 14, 3713.
- Rojo, R., Kholif, A.E., Salem, A.Z.M., Elghandour, M.M.Y., Odongo, N.E., de Oca, R.M., Rivero, N., Alonso, M.U., 2015. Influence of cellulase addition to dairy goat diets on digestion and fermentation, milk production and fatty acid content. *J. Agric. Sci.* 153, 1514–1523.
- Salem, A.Z.M., Alsersy, H., Camacho, L.M., El-Adawy, M.M., Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Rivero, N., Alonso, M.U., Zaragoza, A., 2015a. Feed intake, nutrient digestibility, nitrogen utilization, and ruminal fermentation activities in sheep fed *Atriplex halimus* ensiled with three developed enzyme cocktails. *Czech J. Anim. Sci.* 60, 185–194.
- Salem, A.Z.M., Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Odongo, N.E., Jiménez, F.J., Montese-Oca, R., Domínguez, I.A., Dibarrat, J.A., 2015b. The effect of feeding horses a high fiber diet with or without exogenous fibrolytic enzymes supplementation on nutrient digestion, blood chemistry, fecal coliform count, and *in vitro* fecal fermentation. *J. Equine Vet. Sci.* 35, 735–743.

- Salem, A.Z.M., Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Barbabosa, A., Camacho, L.M., Odongo, N.E., 2016. The effect of feeding horses a high fiber diet with or without live yeast cultures supplementation on feed intake, nutrient digestion, blood chemistry, fecal coliform count and *in vitro* fecal fermentation. *J. Equine Vet. Sci.* 39, 12–19.
- SAS, 2002. User's Guide: Statistics, Version 9.0. SAS Institute, Cary, NC.
- Slade, E.M., Riutta, T., Roslin, T., Tuomisto, H.L., 2016. The role of dung beetles in reducing greenhouse gas emissions from cattle farming. *Sci. Rep.* 6, 18140. <http://dx.doi.org/10.1038/srep18140>.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., 1980. Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach, second ed. McGraw Hill Inter-Book Co, Japan, Tokyo.
- Stewart, C.S., Flint, H.J., Bryant, M.P., 1997. The rumen bacteria. In: Hobson, P.N., Stewart, C.S. (Eds.), *The Rumen Microbial Ecosystem*. Chapman and Hall, London, UK, pp. 10–72.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185e197.
- Valkies, K.I., Salem, A.Z.M., López, S., Alonso, M.U., Rivero, N., Elghandour, M.M.Y., Domínguez, I.A., Ronquillo, M.G., 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. Agric. Sci.* 153, 732–742.
- Vallejo, L.H., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Elghandour, M.M.Y., Fajardo, R.C., Rivero, N., Bastida, A.Z., Mariezcurrena, M.D., 2016. Influence of cellulase or xylanase on the *in vitro* rumen gas production and fermentation of corn stover. *Indian J. Anim. Sci.* 86, 70–74.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.
- Wiedemann, S.G., Megahan, E.J., Murphy, C.M., 2017. Resource use and environmental impacts from Australian chicken meat production. *J. Clean. Prod.* 140, 675–684.



## The effect of garlic oil, xylanase enzyme and yeast on biomethane and carbon dioxide production from 60-d old Holstein dairy calves fed a high concentrate diet



A. Hernandez<sup>a</sup>, A.E. Kholif<sup>b</sup>, R. Lugo-Coyote<sup>a</sup>, M.M.Y. Elghandour<sup>a</sup>, M. Cipriano<sup>c</sup>,  
G.B. Rodríguez<sup>d</sup>, N.E. Odongo<sup>e</sup>, A.Z.M. Salem<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, México

<sup>b</sup> Dairy Science Department, National Research Centre, 33 Bohouth St. Dokki, Giza, Egypt

<sup>c</sup> Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Guerrero, Altamirano, P.O. 40660, México

<sup>d</sup> CENID-Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP, Ajuchitlán, Querétaro, México

<sup>e</sup> Department of Animal Sciences, School of Agriculture, Pwani University, P. O. Box, 195-80108, Kilifi, Kenya

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 August 2016

Received in revised form

7 October 2016

Accepted 6 November 2016

Available online 8 November 2016

#### Keywords:

Garlic oil

Greenhouse gases

Methane mitigation

Xylanase

Yeast

### ABSTRACT

Ruminal fermentation is accompanied by production of methane (CH<sub>4</sub>) and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) which are greenhouse gases (GHG) that cause environmental pollution. The effect of natural feed additives on the *in vitro* fermentation and production of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> in dairy calf has had less attention. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of garlic oil, xylanase enzyme, and yeast on *in vitro* biogas production from dairy calves fed a high concentrate diet. Rumen contents from 60-d old Holstein calves fed a concentrate diet were used as inoculum source. Garlic oil was included at 30, 120, 250 and 500 µL/g dry matter (DM), while xylanase was included at 3 and 6 µL/g DM and yeast at 2 and 4 mg/g DM. The substrate used was the same as the diet fed to calves. Garlic oil linearly decreased ( $P < 0.05$ ) *in vitro* DM digestibility and there were no differences among levels of either xylanase or yeast. Garlic oil decreased ( $P < 0.05$ ) DM degradability while xylanase and yeast had no effect. The lag phase was linearly increased ( $P < 0.05$ ) with increasing level of garlic oil. Garlic oil quadratically decreased CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> production. The control treatment had the highest CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> production followed by xylanase, yeast and garlic oil. Increasing level of xylanase and yeast increased ( $P < 0.05$ ) CO<sub>2</sub> production. It can be concluded that garlic oil followed by yeast and then xylanase can be used to mitigate *in vitro* CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> production from dairy calves fed a high concentrate diet. However, further research is warranted to establish the efficacy of such feed additives in *in vivo* trials.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Ruminant nutritionists aim to manipulate the ruminal microbial ecosystems and fermentation to improve feed utilization and feed conversion to animal products. Antibiotics have good effects on feed utilization and production, but have been banned due to the

increasing public concern for their usage. Thus, looking for natural alternative has gained interest and importance. Phytochemical extracts (Cedillo et al., 2015), exogenous enzymes (Vallejo et al., 2016), and yeast (Hassan et al., 2016) are gaining increasing interest as feed additive for animal feeding. Such feed additives can reduce energy losses as methane (CH<sub>4</sub>), and nitrogen (N) as ammonia, which reduce animal performance and contribute to the release of pollutants to the environment.

Currently, the livestock production sector is one of the largest contributors of anthropogenic sources of greenhouse gases (GHG), where livestock production accounts approximately for two-thirds of the direct emissions (Slade et al., 2016). Methane is the most important GHG since it accounts for about 50–60% of emitted GHG; it is also responsible for a loss of about 2–12% of gross energy of

**Abbreviations:** ADF, acid detergent fiber; *b*, the asymptotic gas production; *c*, the fractional rate of fermentation; CH<sub>4</sub>, methane; CO<sub>2</sub>, carbon dioxide; CP, crude protein; DM, dry matter; DMD, dry matter degradability; EE, ether extract; GHG, greenhouse gas; GP, gas production; *L*<sub>0</sub>, the discrete lag time prior to any gas being released; N, nitrogen; NDF, neutral detergent fiber; O<sub>2</sub>, oxygen.

\* Corresponding author.

E-mail address: [asalem70@yahoo.com](mailto:asalem70@yahoo.com) (A.Z.M. Salem).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.11.036>

0959-6526/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

feed in ruminant production systems (Mirzaei-Aghsaghali et al., 2012). Thus, it is important to reduce enteric CH<sub>4</sub> production in ruminants and contribute to reduce global GHG emissions without any negative effect on feed conversion efficiency.

Garlic (*Allium sativum*) has been shown to have positive effects on nutrient digestibility and antimicrobial activity in ruminant feeding. Garlic oil contains several active compounds, including organosulfur compounds, enzymes, sterols, steroids, triterpenoid glycosides, flavonoids, phenols, and organoselenium compounds (Lawson, 1996). The use of garlic oil as a feed additive in ruminant nutrition has not been researched until recently. In some experiments (Busquet et al., 2005; Mirzaei-Aghsaghali and Maheri-Sis, 2011), garlic oil reduced the concentration of short chain fatty acids and proportions of acetate, and increased the proportions of propionate and butyrate, with inhibition of CH<sub>4</sub> production. However, garlic oil has antimicrobial activity, which may be detrimental to ruminal fermentation at high levels (Busquet et al., 2005). The antimicrobial activity is related mainly to the active components in garlic oil (i.e., organosulfur compounds) which caused reduced CH<sub>4</sub> proportions, revealing its role in rumen microbial modulation (Busquet et al., 2005). Busquet et al. (2005) suggested that the anti-methanogenic effect of garlic is due to its active components which have direct inhibition on *Archaea* microorganisms in the rumen. However, the mechanism by which garlic decreases CH<sub>4</sub> production is not known; although the mechanism could be related to the capacity of organosulfur compounds to inhibit the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by a thiol-disulfide exchange reaction (Gebhardt and Beck, 1996).

Feeding ruminants on diets supplemented with fiber-degrading enzymes has been shown to improve feed utilization and animal performance (Rojo et al., 2015; Morsy et al., 2016), although the mode of action has not been fully elucidated. However, hydrolysis of dietary fiber and alteration of ruminal fermentation (Alsersy et al., 2015), and enhanced ruminal microorganisms attachment and colonization to the plant cell wall (Wang et al., 2001) were observed. Synergistic enhancement of microbial enzyme activity in the rumen (Morgavi et al., 2000) have been suggested as possible modes of action. Morgavi et al. (2000) demonstrated a synergism between exogenous and endogenous rumen enzymes. The net result was a higher hydrolytic effect in the rumen with combined enzymes than that estimated from individual enzyme activities.

*Saccharomyces cerevisiae* is generally recognized as safe by the Food and Drug Administration organization of USA, and it can be legally used as an animal feed additive to stabilize rumen fermentation and prevents rumen microflora disorders (Elghandour et al., 2015; Hassan et al., 2016). Yeast has the ability to modify ruminal fermentation through provision of important nutrients and nutritional cofactors required for microbial growth and activity (Polyorach et al., 2014). Besides, yeast could enhance fungal colonization of plant cell walls resulting in increased dry matter (DM) and neutral detergent fiber (NDF) digestion (Patra, 2012) and mitigate CH<sub>4</sub> production due to stimulation of the acetogens to compete or co-metabolize hydrogen (H<sub>2</sub>) with methanogens, thereby reducing CH<sub>4</sub> emissions (Hristov et al., 2013).

To the best of our knowledge, no study has been carried out to test the effect of natural feed additives on the *in vitro* fermentation of feeds using rumen inoculum from calves. Besides, the *in vitro* biogases produced (e.g., CH<sub>4</sub> and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>)) from dairy calves has not been investigated before. Therefore, the present experiment aimed to investigate the effect of natural feed additives i.e. garlic oil, xylanase enzyme and yeast at different levels on *in vitro* biogases production from 60-d old dairy calves fed a high concentrate diet.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Treatments

Three feed additives were tested against a control treatment (no additives): garlic oil (Garlic oil, Chinese, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) at 30,120, 250 and 500 µL/g DM, xylanase (Dyadic® Xylanase PLUS, Dyadic International, Inc., Jupiter, USA) at 3 and 6 µL/g DM and yeast (Procreatin 7, Safmix, Toluca, Mexico) at 2 and 4 mg/g DM. The substrate used was the same diet fed to calves.

### 2.2. *In vitro* incubations

Rumen inoculum was collected before morning feeding from 6 weaned calves at 60 days of age with 40–55 kg body weight using a stomach tube and hand pump. Calves were fed *ad libitum* a starter feed of a total mixed ration of a commercial concentrate (Ultra Malta Clayton®, Toluca, Mexico) containing (g/kg DM): 200 crude protein (CP), 230 NDF, 50.3 acid detergent fiber (ADF) and 35.6 ether extract (EE). The starter feed was formulated to meet the calves' nutrient requirements as per the National Research Council (NRC, 2001). Calves had free access to fresh water at all times during inoculum collection phase. Immediately after collection, the rumen contents from each calf were flushed with CO<sub>2</sub>, mixed and strained through four layers of cheesecloth into a flask with an oxygen (O<sub>2</sub>) free headspace. Filtered rumen fluid was immediately transported to the laboratory where it was mixed in a 1:4 (v/v) ratio with the buffer solution as described by Goering and Van Soest (1970), with no trypsinase added. Diluted rumen fluid (40 mL containing 10 mL of rumen liquor) was added to each incubation bottle, where substrates (0.5 g DM) had been previously weighed out and additive solutions dispensed.

Three incubation runs were performed in three different weeks. In addition to bottles containing substrate, three bottles were incubated as blanks (i.e., rumen fluid only, with no substrate). After filling all bottles, they were immediately closed with rubber stoppers, shaken and placed in a water bath at 39 °C. The volume of gas production (GP) was recorded at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 24, 36, 48, 60 and 72 h of incubation using a pressure transducer (Extech Instruments, Waltham, USA) following the technique of Theodorou et al. (1994). At the same incubation period, CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> concentrations in the headspace of the bottles was measured using a diffusion based gas detector (Gas Analyzer CROWCON Model Tetra3, Abingdon, UK).

After sampling the supernatant and pH determination, the content of each bottle was filtered under vacuum through sintered glass crucibles (coarse porosity no. 1, pore size 100–160 µm; Pyrex, Stone, UK) and incubation residues dried at 105 °C overnight to estimate apparent DM degradability (DMD).

### 2.3. Chemical analyses

Samples of feeds were analyzed for DM (#934.01), ash (#942.05), N (#954.01) and EE (#920.39) using AOAC (1997) official methods. The NDF (Van Soest et al., 1991) and ADF (AOAC, 1997; #973.18) contents in both feeds and incubation residues were determined using an ANKOM<sup>200</sup> Fiber Analyzer Unit (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY, USA). The NDF analysis was done with sodium sulfite, and with α-amylase. Both NDF and ADF were expressed without residual ash.

### 2.4. Calculations and statistical analyses

To estimate kinetic parameters of GP, gas volumes recorded (mL/g DM) were fitted using the NLIN procedure of SAS (2002)

according to France et al. (2000) model as:

$$y = b \times \left[ 1 - e^{-c(t-Lag)} \right]$$

where  $y$  is the volume (mL/g DM) of GP at time  $t$  (h);  $b$  is the asymptotic GP (mL/g DM);  $c$  is the fractional rate of fermentation (/h), and  $Lag$  (h) is the discrete lag time prior to any gas is released.

The experimental design for the *in vitro* ruminal gas, CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> productions, and fermentation parameters analysis was a completely random design considering, as fixed factors, additive types (A) and additive doses (D) in the linear model (Steel et al., 1997). Data of each of the three runs within the same sample were averaged prior to statistical analysis. Mean values of each individual extract within each species (three samples of each) were used as the experimental unit. The statistical model was:

$$Y_{jkl} = \mu + A_j + D_k + (A \times D)_{jk} + E_{jkl}$$

where:  $Y_{jkl}$  is every observation of the  $j$ th feed additive ( $A_j$ ) when incubated in the  $k$ th additive doses ( $D_k$ );  $\mu$  is the general mean; and  $E_{jkl}$  is experimental error. Linear and quadratic polynomial contrasts were used to examine responses to increasing levels of additives.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Gas production and fermentation

Extents 'b' and rate of GP were similar among different treatment at different levels; however, the rate of digestion was highest ( $P < 0.05$ ) at 120  $\mu$ L garlic oil and intermediate in all other treatments (Table 1). The *in vitro* rumen GP (mL/g incubated DM) as affected by the different feed additives are shown in Fig. 1. Fermentation is generally index with degradation yielding short chain fatty acids and various gases, principally CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, and nitrous oxide; some of which are affected by other substances including organic acids (Elghandour et al., 2016a), exogenous fibrolytic enzymes (Elghandour et al., 2016b; Kholif et al., 2016), yeast cell (Elghandour et al., 2016c,d; Velazquez et al., 2016).

**Table 1**  
Effect of different feed additives on *in vitro* rumen gas kinetics of a high concentrate diet fed to young calves at 60 days of age.

Additive type	Dose (/g DM)	Gas production (mL/g DM) <sup>a</sup>			Fermentation kinetics	
		b	c	Lag	pH	DMD <sup>b</sup>
Control	No additive	382.9	0.058ab	2.69b	6.9	693.3a
Garlic oil	30 $\mu$ L	404.1	0.057b	2.72b	7.0	671.1a
	120 $\mu$ L	283.4	0.108a	6.33ab	6.8	684.9a
	250 $\mu$ L	372	0.085ab	8.94a	5.8	615.3ab
	500 $\mu$ L	213	0.067ab	6.45ab	7.0	554.1b
			350.5	0.068ab	2.78b	6.9
Xylanase	3 $\mu$ L	354	0.077ab	3.14b	6.9	689.8a
	6 $\mu$ L	345.2	0.069ab	2.92b	6.9	698.6a
Yeast	2 mg	347.5	0.063ab	2.44b	6.9	695.1a
	4 mg	74.61	0.0192	1.699	0.62	34.4
Pooled SEM <sup>c</sup>		0.794	0.847	1.000	0.992	0.713
Additive effect						
	Dose effect					
	Linear	0.718	0.073	<0.001	0.022	0.005
Quadratic	0.051	0.008	0.520	0.254	0.191	
Additive $\times$ Dose		0.5021	0.569	0.975	0.899	0.416

Means in the same column with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>a</sup>  $b$  is the asymptotic gas production (mL/g DM);  $c$  is the rate of gas production (/h);  $Lag$  is the initial delay before gas production begins (h).

<sup>b</sup> DMD is dry matter degradability.

<sup>c</sup> SEM is standard error of the mean.

However, xylanase enzyme was expected to increase degradation and GP rate (Elghandour et al., 2016b; Kholif et al., 2016) but was not limiting fermentation in the rumen. Yeast cells consume O<sub>2</sub> molecules making the environment commensurate for optimum activity of various organisms (Newbold et al., 1996). The current study confirmed the lack of effect due to levels of yeast (Velazquez et al., 2016) but disagrees with others (Elghandour et al., 2016c,d) who report improved GP, suggesting that yeast can sometime but not always increase GP. These feed additives tended to exert a quadratic decrease in maximum GP. Garlic oil linearly delayed ( $P < 0.001$ ) the onset of fermentation relative to xylanase, yeast and the control, suggesting that substances that directly affect the general population of rumen micro-organisms would generally delay the onset of fermentation.

The fermentation pH was affected linearly ( $P = 0.022$ ) with different additives (Table 1). Garlic oil linearly decreased *in vitro* digestibility of DM ( $P < 0.05$ ), while there was no difference between levels of either xylanase or level of yeast. Moreover, garlic oil ( $P < 0.01$ ) decreased DMD, while xylanase and yeast had no effect. The linear decrease in the pH with increasing garlic oil level was unexpected since DM degradation decreased linearly with increasing additives, but these relationships are difficult to explain in fermentation terms. It was expected garlic oil would reduce the activity of all rumen micro-organism (bacteria, fungi and protozoa), therefore, a decrease in DM degradation in the current study agrees with the anti-microbial effects in various reports (Mirzaei-Aghsaghali et al., 2012).

#### 3.2. Effect of additives on CH<sub>4</sub> production

Fig. 2 shows the *in vitro* rumen CH<sub>4</sub> production (mL/g incubated DM) as affected by the different feed additives. The effect of additive  $\times$  dose interaction was significant ( $P < 0.05$ ) during all hours of incubation (Table 2). The control produced most ( $P < 0.05$ ) CH<sub>4</sub> (expressed as: mL/g DM incubated, and mL/g degraded DM) followed in decreasing order by xylanase, yeast and garlic oil. These effects were rather amplified when CH<sub>4</sub> production was expressed as a proportion of total GP. It is accepted that the production of H<sub>2</sub> in the rumen limits the fermentation of fiber, and reduces digestibility; however, a copious quantity of H<sub>2</sub> is produced and together with CO<sub>2</sub> is used to synthesize CH<sub>4</sub> by methanogenic microorganisms. This process of CH<sub>4</sub> production uses reduced co-factors liberating oxidized ones, helping rumen microbes to recycle these co-factors. Although in agreement with Kholif et al. (2016), it is surprising that the control treatment yielded the highest amount of CH<sub>4</sub>, followed by yeast and xylanase (Table 2). It is not clear why xylanase would depress CH<sub>4</sub> production when this supplementary enzyme is supposed to increase the availability of hemicellulose and CH<sub>4</sub> production (Elghandour et al., 2016b). Unless the digestion of hemicellulose liberates lignin compounds, increasing the chance of attachment to microorganisms or with microbial products forming antibiotic or bacteriostatic metabolite, as such having little or no effect on digestion as indicated in this study.

It is known that yeast products increase nutrient digestibility (Hassan et al., 2016) specifically by elevating populations of cellulolytic and amylolytic bacteria in the rumen accompanied by altered fatty acid production (Kumar et al., 1997). Some live *S. cerevisiae* added in very small amounts have been reported to reduce methanogenesis in the rumen (Hristov et al., 2013). In other studies, yeast supplementation had no impact on CH<sub>4</sub> production (McGinn et al., 2004). In addition, studies on yeasts appear somewhat conflicting, suggesting either an increase in CH<sub>4</sub> production (Elghandour et al., 2016c,d) or no effect (Opsl et al., 2011) in batch cultures with mixed rumen microflora; in agreement with the

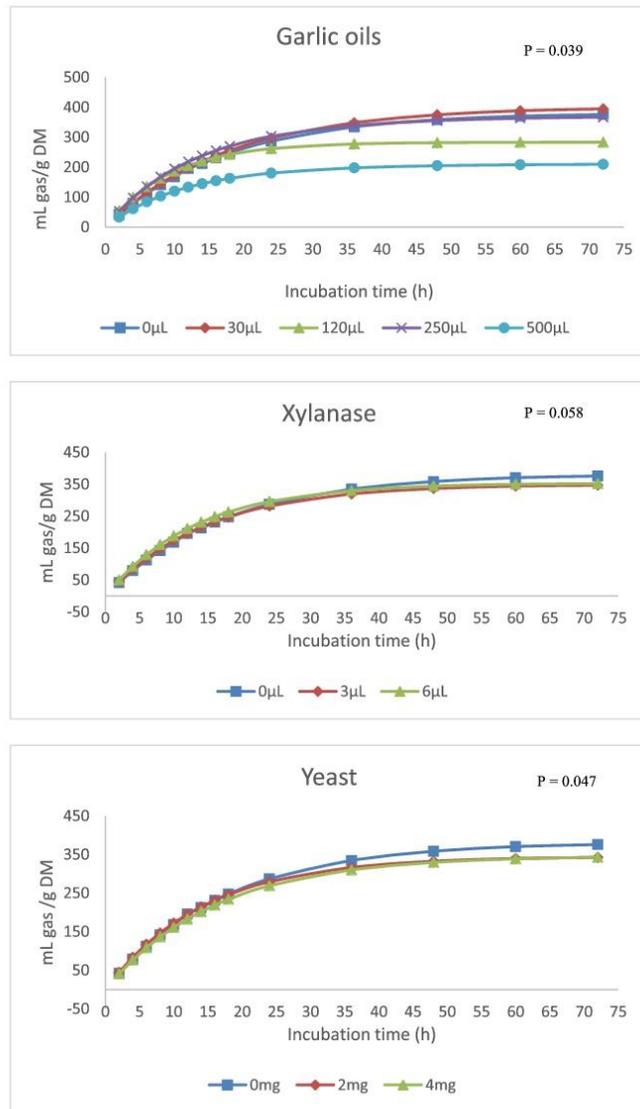


Fig. 1. *In vitro* rumen gas production (mL/g incubated DM) of a high concentrate diet fed to young calves at 60 days of age incubated with no additive, garlic oil, xylanase, and yeast.

observations in the current study. It was expected that yeast cultures would stimulate acetogens to compete or to co-metabolize H<sub>2</sub> with methanogens and reduce CH<sub>4</sub> emissions (Hristov et al., 2013) and/or scavenge O<sub>2</sub> and make the environment more conducive for fermentation and microbial growth. Implying a tendency of decreased CH<sub>4</sub> production with yeast was expected in the study. Thus, in a few studies, feeding live yeast products have consistently

reduced CH<sub>4</sub> production by 20–58% (Lynch and Martin, 2002; Newbold and Rode, 2006) but it remains uncertain whether a 60-day old rumen environment could be less responsive to yeast.

Garlic oil has been shown to have both Gram negative and Gram positive anti-bacteria properties largely due to allicin (allyl 2-propene thiosulfinate) (Cavallito and Bailey, 1944), anti-fungi (Adetumbi et al., 1986) and anti-viruses (Weber et al., 1992)

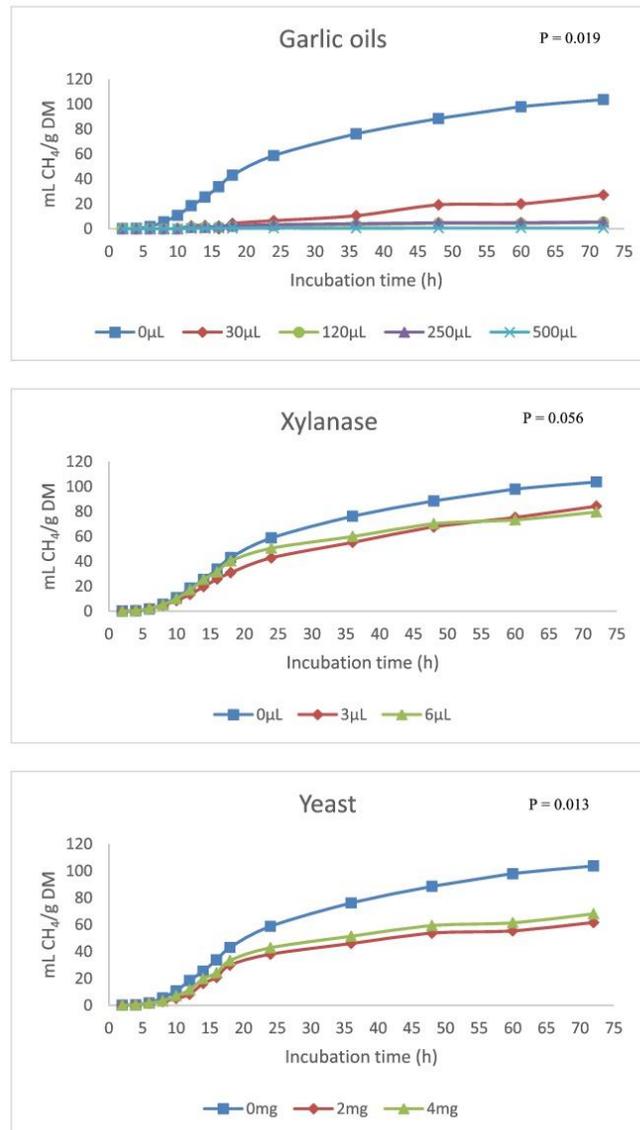


Fig. 2. *In vitro* rumen methane ( $\text{CH}_4$ ) production (mL/g incubated DM) of a high concentrate diet fed to young calves at 60 days of age incubated with no additive, garlic oil, xylanase, and yeast.

properties. Based on these properties, others have either defined the minimum inhibitory concentration (Nejad et al., 2014) or pointed to the antiparasite role (Goncagui and Ayaz, 2010) of this food item. In rumen fluid,  $\text{CH}_4$  producing organisms live in symbiotic relationship with cellulolytic organism, protozoa and fungi,

the latter two relationships being involved in extensive production of  $\text{CH}_4$ ; methanogens also shift  $\text{H}_2$  among themselves (McAllister et al., 1994). Both linear and quadratic decreases in  $\text{CH}_4$  production due to increasing levels of garlic oil reported here may be related to any one of the following explanation. Garlic oil might

**Table 2**  
Effect of different feed additives on *in vitro* methane (CH<sub>4</sub>) production of a high concentrate diet fed to young calves at 60 days of age.

Additive type	Dose (/g DM)	CH <sub>4</sub> production											
		mL/g incubated DM				mL/g degraded DM				Proportional CH <sub>4</sub> production			
		6 h	24 h	48 h	72 h	6 h	24 h	48 h	72 h	6 h	24 h	48 h	72 h
Control	No additive	1.71a	58.7a	88.4a	103.7a	2.47a	84.9a	127.7a	149.6a	1.53a	20.55a	24.83a	27.81a
Garlic oil	30 µL	0.00b	6.5c	19.2d	27.1bc	0.00b	9.6b	28.5c	40.3bc	0.00b	2.17b	5.00b	6.67bc
	120 µL	0.00b	2.2c	4.3d	5.3c	0.00b	3.3b	6.2c	7.0c	0.00b	0.83b	1.50b	1.83c
	250 µL	0.00b	3.3c	4.8d	5.4c	0.00b	5.4b	7.6c	8.6c	0.00b	1.17b	1.50b	1.67c
	500 µL	0.00b	0.5c	0.6d	0.6c	0.00b	0.9b	1.0c	1.1c	0.00b	0.50b	0.50b	0.50c
Xylanase	3 µL	2.04a	42.8ab	67.6ab	84.2a	2.92a	61.1a	96.5ab	120.2a	1.70a	15.08a	20.08a	24.28a
	6 µL	2.14a	50.5ab	70.1ab	79.5a	3.11a	73.4a	102.0ab	115.7a	1.67a	17.09a	20.22a	22.39a
Yeast	2 mg	1.39a	38.0b	53.7bc	61.6ab	2.00a	54.5b	76.9b	88.2ab	1.19a	13.53a	16.11a	17.93ab
	4 mg	1.66a	42.8ab	59.3ab	68.0ab	2.39a	61.7b	85.4ab	97.9ab	1.54a	15.92a	18.01a	19.86a
Pooled SEM <sup>a</sup>		0.440	7.79	11.69	16.76	0.669	12.39	18.01	24.87	0.371	2.886	3.444	4.693
Additive effect		0.001	0.001	0.003	0.015	0.002	0.003	0.006	0.020	0.001	0.001	0.002	0.006
Dose effect													
Linear		0.101	0.176	0.043	0.045	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Quadratic		0.001	0.031	0.203	0.229	0.009	<0.001	<0.001	0.001	0.004	<0.001	<0.001	0.001
Additive × Dose		0.001	0.001	0.001	0.004	0.001	0.001	0.002	0.006	0.001	0.001	0.001	0.002

Means in the same column with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>a</sup> SEM standard error of the mean.

suppressed the activity of all organisms in the rumen with increasing concentration thus delaying colonization, decreasing digestion, and reducing the population of protozoa (Harris et al., 2001) and methanogens.

### 3.3. Effect of additives on CO<sub>2</sub> production

Fig. 3 shows the *in vitro* rumen CO<sub>2</sub> production (mL/g incubated DM) as affected by the different feed additives. The effect additive × dose interaction was significant (at least at  $P < 0.04$ ) during all hours of incubation (Table 3). The control produced more ( $P < 0.05$ ) CO<sub>2</sub> (expressed as: mL/g DM incubated, mL/g degraded DM, and as a proportion of total GP) than any other treatment. Consequently, the yield of CO<sub>2</sub> was highest ( $P < 0.001$ ) in the control followed in decreasing order by xylanase, yeast and garlic oil. Within each additive, CO<sub>2</sub> production increased linearly with xylanase and yeast levels ( $P < 0.001$ ) but decreased linearly ( $P < 0.001$ ) and in a quadratic fashion ( $P < 0.001$ ) with increasing level of garlic oil. Carbon dioxide in the most produced gas in rumen fermentation during metabolism of pyruvic acid in the production of acetic acid. Throughout the incubation period the control treatment yielded significantly more CO<sub>2</sub> than any of these feed additives in agreement with Kholif et al. (2016) for reasons advanced below. Xylanase is viewed simply as an enzyme that hydrolyses hemicellulose to xylose before further fermentation can take place. However, it is a xylan-degrading enzyme system which includes the main-chain-cleaving enzymes, endo-b-1,4-xylanases and b-xylosidases, and the side-chain enzyme activities, acetylxyylan esterases, a-glucuronidases, ferulic acid esterases and a-arabinofuranosidases (Coughlan et al., 1993). Therefore, in the process of fermentation or digesting of hemicellulose, some of its metabolites and intermediates of lignin might react forming products that slows or reduce microbial activity. In some situations, addition of lignin compounds (vanillic acid, protocatechuic acid, acetovanillone, and vanillin) increased the rate of hydrolysis of xylan probably changing the structure of xylanase (Kaya et al., 2000); therefore, it is possible some other substances would have a negative effect. Since xylanase is sometimes none-limiting in the rumen fluid there is generally little to high changes in digestion following xylanase supplementation (Elghandour et al., 2016b). A tendency of decreased CO<sub>2</sub> production with increasing level of xylanase as demonstrated in this study was observed suggesting

that xylanase enzyme may help to increase sugars for the survival of propionate-producing microorganisms.

Live yeast cells naturally scavenge for O<sub>2</sub> and produce CO<sub>2</sub> in the rumen, thus increasing rumen anaerobiosis and microbial viability. That is why most groups of rumen microbes that do not compete for a common substrate (glucose) would tend to increase in the presence of live yeast cells. An increase in the population of fibrolytic organisms was expected to increase the rate of fiber digestion; this process majors in the production of acetate and CO<sub>2</sub> in the rumen. Naturally, it was expected that more CO<sub>2</sub> would be produced with this feed additive but the results showed an opposite trend from the control treatment. It is speculated that yeast in these feed additive produced anti-microbial metabolites that tended to affect digestion adversely. That is why the control treatment produced more CO<sub>2</sub> at all incubation times than yeast treatments. Yeast is known to shift H<sub>2</sub> utilization from methanogenesis to reductive acetogenesis through the homoacetogenic bacteria that produces acetate from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> (Mwenya et al., 2004), even in the presence of methanogens (Chaucheyras-Durand et al., 1997), thus helping to explain a tendency for yeast to decrease CO<sub>2</sub> emission.

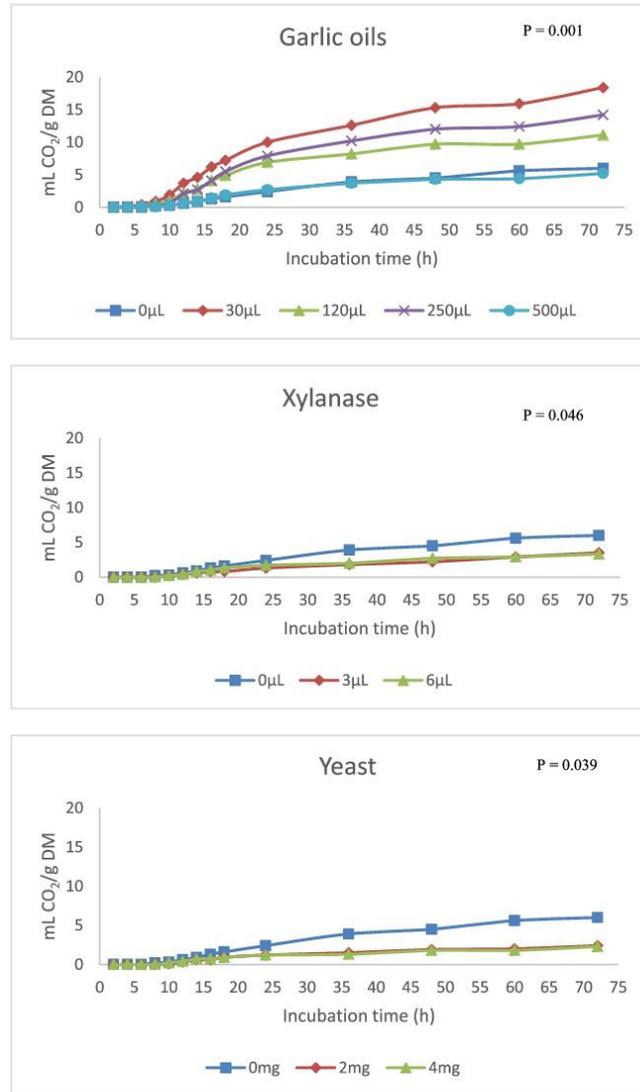
Consequently, both CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production would reduce as observed in this study, where CH<sub>4</sub> production was highest in the control treatment and lowest in the intermediate garlic treatment, suggesting that 250 µl of garlic oil might be the level at which the least CH<sub>4</sub> would be produced.

### 4. Future outlook

The research area of including natural feed additives in ruminant nutrition has gained the attention of researchers to improve feed utilization, animal productivity and reduce GHG emission. However, studies dealing with dairy calves are still relatively scarce, with almost no study on GHG emission. The tested feed additives showed promising results to reduce CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> production in the *in vitro* scale. However, further research is warranted to establish the efficacy of such feed additives in *in vivo* trials.

### 5. Conclusions

Garlic oil, yeast, and xylanase at different levels did not affect the extents of GP; however, garlic oil increased the rate of digestion and the lag phase. Besides, garlic oil decreased CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>



**Fig. 3.** *In vitro* rumen carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) production (mL/g incubated DM) of a high concentrate diet fed to young calves at 60 days of age incubated with no additive, garlic oil, xylanase, and yeast.

**Table 3**  
Effect of different feed additives on *in vitro* carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) production of a high concentrate diet fed to young calves at 60 days of age.

Additive type	Dose (μg DM)	CO <sub>2</sub> production											
		mL/g incubated DM				mL/g degraded DM				Proportional CO <sub>2</sub> production			
		6 h	24 h	48 h	72 h	6 h	24 h	48 h	72 h	6 h	24 h	48 h	72 h
Control	No additive	0.00d	2.4bc	4.5bc	6.0bc	0.00d	3.42cd	6.47bc	8.57bc	0.00c	0.83c	1.27bc	1.60abc
Garlic oil	30 μL	0.42a	10.0a	15.3a	18.4a	0.62a	14.77a	22.60a	27.40a	0.36a	3.33a	4.05a	4.64a
	120 μL	0.23abc	6.9ab	9.7abc	11.1abc	0.37b	10.10abc	14.16abc	16.28abc	0.19b	2.62ab	3.42ab	3.91ab
	250 μL	0.16bcd	7.9a	12.0ab	14.2ab	0.25bc	12.77ab	19.50ab	23.11ab	0.12bc	2.67ab	3.45ab	3.96a
	500 μL	0.07cd	2.7bc	4.3bc	5.2bc	0.13cd	4.96bcd	8.01bc	9.75abc	0.09bc	1.19bc	1.65abc	1.60abc
Xylanase	3 μL	0.00d	1.3c	2.2c	3.5bc	0.00d	3.09cd	6.25bc	9.07bc	0.00c	0.77c	1.27bc	1.76abc
	6 μL	0.00d	1.7c	2.7c	3.3bc	0.00d	2.02d	3.62c	4.80c	0.00c	0.47c	0.70c	0.90c
Yeast	2 mg	0.00d	1.2c	1.9c	2.4c	0.00d	1.89d	2.68c	3.58c	0.00c	0.47c	0.57c	0.73c
	4 mg	0.00d	1.2c	1.8c	2.3c	0.00d	1.81d	2.70c	3.32c	0.00c	0.47c	0.57c	0.67c
Pooled SEM <sup>a</sup>		0.075	1.97	3.26	4.33	0.085	3.024	5.264	6.861	0.044	0.655	0.931	1.158
Additive effect		<0.001	0.001	0.004	0.011	<0.001	0.005	0.024	0.058	<0.001	0.004	0.031	0.082
Dose effect													
Linear		0.011	0.033	0.052	0.085	0.001	0.001	0.003	0.009	0.002	0.001	0.004	0.012
Quadratic		0.494	0.046	0.031	0.041	0.001	0.312	0.731	0.920	<0.001	0.049	0.088	0.144
Additive × Dose		<0.001	0.001	0.001	0.003	<0.001	0.001	0.007	0.018	<0.001	0.001	0.009	0.027

Means in the same column with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).  
<sup>a</sup> SEM standard error of the mean.

productions, followed by yeast and xylanase. It can be concluded that garlic oil followed by yeast and then xylanase can be used to mitigate *in vitro* CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> production from dairy calves fed a high concentrate diet. However, further research is warranted to establish the efficacy of such feed additives in *in vivo* trials.

#### Acknowledgement

The authors acknowledge the financial support from the IAEA, Vienna, Austria, research contract number MEX16307 within the D3.10.27 Coordinated Research Project. First author would like to thank the Mexican National Council for Science and Technology (CONACYT, Mexico) for the M.Sc scholarship received. Kholif, A.E. thanks the CONACYT and The World Academy of Sciences (TWAS, Italy) for supporting his postdoctoral fellowship at the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México.

#### References

Adetumbi, M., Javor, G.T., Lau, B.H.S., 1986. Allium sativum (Garlic) inhibits lipid synthesis by *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30, 499–501.

Alseersy, H., Salem, A.Z.M., Borhami, B.E., Olivares, J., Gado, H.M., Mariezcurrena, M.D., Yacout, M.H., Kholif, 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. *Anim. Sci. J.* 86, 51–58.

AOAC, 1997. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*, sixteenth ed. AOAC, Arlington, VA, USA.

Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Cardozo, P.W., Kamel, C., 2005. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *J. Dairy Sci.* 88, 2508–2516.

Cavallito, C.J., Bailey, J.H., 1944. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties, and antibacterial action. *J. Am. Chem. Soc.* 66, 1950.

Cedillo, J., Kholif, A.E., Salem, A.Z.M., Elghandour, M.M.Y., Vázquez, J.F., Alonso, M.U., Barbabosa, A., Chagoyán, J.C.V., Reyna, A.G., 2015. Oral administration of Sauce lorón extract to growing lambs to control gastrointestinal nematodes and *Moniezia* spp. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 8 (7), 520–525.

Chaucheyras-Durand, F., Fonty, G., Bertin, G., 1997. Effects of a microbial additive, Levucell SC, on growth and metabolism of a ruminal acetogenic bacterial strain *in vitro*. In: *Proceedings of Rumen Function Conference*, Chicago, USA, p. 33.

Coughlan, M.P., Tuohy, M.G., Filho, E.X.F., Puls, J., Claeysens, M., Vrsianskaa, M., Hughes, M.M., 1993. Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems. In: Coughlan, M.P., Hazlewood, G.P. (Eds.), *Hemicellulose and Hemicellulases*. Portland Press, London, pp. 53–84. ISBN 1 85578 036 4.

Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Hernandez, J., Mariezcurrena, M.D., Lopez, S., Camacho, L.M., Marquez, O., Salem, A.Z.M., 2016b. Influence of the addition of exogenous xylanase with or without pre-incubation on the *in vitro* ruminal

fermentation of three fibrous feeds. *Czech. J. Anim. Sci.* 61, 262–272.

Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Lopez, S., Mendoza, G.D., Odongo, N., Salem, A.Z.M., 2016c. *In vitro* gas, methane, and carbon dioxide production of high fibrous diets incubated with fecal inocula from horses in response to the supplementation with different live yeast additives. *J. Equine Vet. Sci.* 38, 67–71.

Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Salem, A.Z.M., de Oca, R.M., Barbabosa, A., Mariezcurrena, M.D., Olafadehan, O.A., 2016a. Addressing sustainable ruminal methane and carbon dioxide emissions of soybean hulls by organic acid salts. *J. Clean. Prod.* 135, 194–200.

Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Martínez Castañeda, J.S., Camacho, L.M., Kholif, A.E., Vázquez, J.C., 2015. Direct-fed microbes: a tool for improving the utilization of low quality roughages in ruminants. *J. Integr. Agr.* 14 (3), 526–533.

Elghandour, M.M.Y., Vázquez, J.C., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Capriano, M.M., Camacho, L.M., Marquez, O., 2016d. *In vitro* gas and methane production of two mixed rations influenced by three different cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Anim. Res.* <http://dx.doi.org/10.1080/09712119.2016.1204304>.

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. *Br. J. Nutr.* 83, 143–150.

Gebhardt, R., Beck, H., 1996. Differential inhibitory effects of garlic-derived organosulfur compounds on cholesterol biosynthesis in primary rat hepatocyte cultures. *Lipids* 31, 1269–1276.

Goering, M.K., Van Soest, P.J., 1970. *Forage Fibre Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications)*. Agricultural Research Service, USDA, Washington, DC.

Goncagul, G., Ayaz, E., 2010. Antimicrobial effects of garlic (*Allium sativum*) and traditional medicine. *J. Anim. Vet. Adv.* 9 (1), 1–4.

Harris, J.C., Cottrel, S.L., Plummer, S., Lloyd, D., 2001. Antimicrobial properties of allium sativum (garlic). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 282–286.

Hassan, A.A., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Samir, M., Yacout, M.H., Abu Hafa, S.H., Mendoza, G.D., Elghandour, M.M.Y., Ayala, M., Lopez, S., 2016. Performance of crossbred dairy Friesian calves fed two levels of *Saccharomyces cerevisiae*: intake, digestion, ruminal fermentation, blood parameters and faecal pathogenic bacteria. *J. Agric. Sci.* 154, 1488–1498.

Hristov, A.N., Oh, J., Firkins, J.L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H.P., Adesogan, A.T., Yang, W., Lee, C., Gerber, P.J., Henderson, B., Tricarico, J.M., 2013. Special topics: mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *J. Anim. Sci.* 91, 5045–5069.

Kaya, F., Heitmann Jr., J.A., Joyce, T.W., 2000. Influence of lignin and its degradation products on enzymatic hydrolysis of xylan. *J. Biotech.* 80, 241–247.

Kholif, A.E., Baza-García, L.A., Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Barbabosa, A., Dominguez-Vara, I.A., Sanchez-Torres, J.E., 2016. *In vitro* assessment of fecal inocula from horses fed on high-fiber diets with fibrolytic enzymes addition on gas, methane, and carbon dioxide productions as indicators of hindgut activity. *J. Equine Vet. Sci.* 39, 44–50.

Kumar, U., Sareen, V.K., Singh, S., 1997. Effect of yeast culture supplement on ruminal microbial populations and metabolism in buffalo calves fed a high roughage diet. *J. Sci. Food Agric.* 73, 231–236.

Lawson, L.D., 1996. The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. In: Koch, H.P., Lawson, L.D. (Eds.), *Garlic: the Science and Therapeutic Application of Allium Sativum L. And Related Species*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 37–108.

Lynch, H.A., Martin, S.A., 2002. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on *in vitro* mixed ruminal microorganism

- fermentation. *J. Dairy Sci.* 85, 2603–2608.
- McAllister, T.A., Okine, E.K., Mathison, G.W., Cheng, K.J., 1994. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 72, 231–243.
- McGinn, S.M., Beauchemin, K.A., Coates, T., Colombatto, D., 2004. Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *J. Anim. Sci.* 82, 3346–3356.
- Mirzaei-Aghsaghali, A., Maheri-Sis, N., 2011. Factors affecting mitigation of methane emission from ruminants I: feeding strategies. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 6, 888–908.
- Mirzaei-Aghsaghali, A., Syadati, S.A., Fathi, H., Rasouli, S., Sadaghian, M., Tarahomi, M., 2012. Garlic in ruminants feeding. *Asian J. Biol. Sci.* 5, 328–340.
- Morgavi, D.P., Nseroko, V.L., Rode, L.M., Beauchemin, K.A., McAllister, M., Wang, Y., 2000. A *Trichoderma* feed enzyme preparation enhances adhesion of *Fibrobacter succinogenes* to complex substrates but not to pure cellulose. In: Proceedings of the 25th Conference on Rumen Function, Chicago, Illinois, US.
- Morsy, T.A., Kholif, A.E., Kholif, S.M., Kholif, A.M., Sun, X., Salem, A.Z.M., 2016. Effects of two enzyme feed additives on digestion and milk production in lactating Egyptian buffaloes. *Ann. Anim. Sci.* 16 (1), 209–222.
- Mwenya, B., Santoso, B., Sar, C., Gamo, Y., Kobayashi, T., Arai, I., Takahashi, J., 2004. Effects of including 1,4-galacto-oligosaccharides, lactic acid bacteria or yeast culture on methanogenesis as well as energy and nitrogen metabolism in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115, 313–326.
- Nejad, A.S.M., Shabani, S., Bayatt, M., Hosseini, S.E., 2014. Antibacterial effects of garlic aqueous extract on *Staphylococcus aureus* in Hamburger. *J. Microbiol.* 7, e13134.
- Newbold, C.J., Rode, L.M., 2006. Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. *Int. Congr. Ser.* 1293, 138–147.
- Newbold, C.J., Wallace, R.J., McIntosh, F.M., 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *Br. J. Nutr.* 76, 249–261.
- NRC, 2001. Nutrient Requirement of Dairy Cattle. 7th Rev. National Academy Press, Washington, DC.
- Opsi, F., Fortina, R., Tassone, S., Bodas, R., López, S., 2011. Effects of inactivated and live cells of *Saccharomyces cerevisiae* on in vitro ruminal fermentation of diets with different forage: concentrate ratio. *J. Agr. Sci.* 150, 271–283.
- Patra, A.K., 2012. The use of live yeast products as microbial feed additives in ruminant nutrition. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 7, 366–375.
- Polyorach, S., Wanapat, M., Cherdthong, A., 2014. Influence of yeast fermented cassava chip protein (YEFECAP) and roughage to concentrate ratio on ruminal fermentation and microorganisms using in vitro gas production technique. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 27, 36–45.
- Rojo, R., Kholif, A.E., Salem, A.Z.M., Elghandour, M.M.Y., Odongo, N.E., de Oca, R.M., Rivero, 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.* 153, 1514–1523.
- SAS, 2002. User's Guide: Statistics. Ver 9.0. SAS Institute, Cary, NC.
- Slade, E.M., Riutta, T., Roslin, T., Tuomisto, H.L., 2016. The role of dung beetles in reducing greenhouse gas emissions from cattle farming. *Sci. Rep.* 6, 18140. <http://dx.doi.org/10.1038/srep18140>.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., Dickey, D.A., 1997. Principles and Procedures of Statistics: a Biometrical Approach. McGraw Hill, New York, NY.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185–197.
- Vallejo, L.H., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Elghandour, M.M.Y., Fajardo, R.C., Rivero, N., Bastida, A.Z., Matezcurena, M.D., 2016. Influence of cellulase or xylanase on the in vitro rumen gas production and fermentation of corn stover. *Indian J. Anim. Sci.* 86 (1), 70–74.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and non-starch carbohydrates in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583e3597.
- Velazquez, A.E., Kholif, A.E., Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Jimenez, R.M.O., Pliego, A.B., Odongo, N., Borquez, J.L., Cipriano, M., Olivares, J., 2016. Effect of partial replacement of steam rolled corn with soybean hulls or prickly pear cactus in the horse's diet in the presence of live *Saccharomyces cerevisiae* on in vitro fecal gas production. *J. Equine Vet. Sci.* 42, 94–101.
- Wang, Y., McAllister, T.A., Rode, L.M., Beauchemin, K.A., Morgavi, D.P., Nseroko, 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.
- Weber, N.D., Anderson, D.O., North, J.A., Murray, B.K., Lawson, L.D., Hughes, B.G., 1992. In vitro virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. *Planta Med.* 58, 417–423.

## VIII. DISCUSIÓN GENERAL

Las células de levadura vivas eliminan naturalmente el  $O_2$  y producen  $CO_2$  en el rumen, lo que aumenta la anaerobiosis ruminal y la viabilidad microbiana. Es por eso que la mayoría de los grupos de microbios del rumen que no compiten por un sustrato común (glucosa) tenderían a aumentar en presencia de células de levadura vivas. Se esperaba que un aumento en la población de organismos fibrolíticos aumentara la tasa de digestión de fibras; este proceso se especializa en la producción de acetato y  $CO_2$  en el rumen. Naturalmente, se esperaba que se produjera más  $CO_2$  con este aditivo para piensos, pero los resultados mostraron una tendencia opuesta al tratamiento de control. Se especula que la levadura en estos aditivos alimenticios produce metabolitos antimicrobianos que tienden a afectar la digestión de manera adversa. Es por eso que el tratamiento de control produjo más  $CO_2$  en todos los tiempos de incubación que los tratamientos de levadura. Se sabe que la levadura desplaza la utilización de  $H_2$  de la metanogénesis a la acetogénesis reductiva a través de las bacterias homoacetogénicas que producen acetato a partir de  $CO_2$  y  $H_2$  (Mwenya *et al.*, 2004), incluso en presencia de metanógenos (Chaucheyras-Durand *et al.*, 1997), lo que ayuda a explicar la tendencia de la levadura a disminuir la emisión de  $CO_2$ .

En consecuencia, tanto la producción de  $CO_2$  como la de  $CH_4$  se reducirían observado en este estudio, donde la producción de  $CH_4$  fue más alta en el tratamiento de control y más baja en el tratamiento intermedio con ajo, lo que sugiere que 250 ml de aceite de ajo podrían ser el nivel al que se produciría el menor  $CH_4$ .

Además de los impactos de los gases de efecto invernadero, la emisión de  $CH_4$  entérico contribuye a la pérdida de la energía neta de alimentación que no se puede utilizar en los animales rumiantes con fines de producción (Johnson y Johnson, 1995). Debido a estos desafíos, los esfuerzos de investigación intensivos se han dirigido recientemente a la mitigación de  $CH_4$  en animales rumiantes (Elghandour *et al.*, 2016). El uso de la técnica GP *in vitro* es un método de cribado potente, simple y sensible para evaluar la fermentación o degradación del sustrato y para controlar la eficacia de los aditivos para piensos (Elghandour *et al.*, 2015) y la producción de

GEI (Elghandour *et al.*, 2016). Las interacciones entre el tipo aditivo y el licor ruminal, así como la dosis aditiva, para algunos parámetros medidos, sugieren que tanto la cinética de la fermentación como la producción de gas son dependientes de la dosis aditiva, lo que respalda la importancia de identificar niveles suplementarios óptimos de cada aditivo para cada tipo de licor ruminal. La adición de enzima en todas las dosis no tuvo efectos en la GP asintótica. Este hallazgo está de acuerdo con los resultados de Jalilvand *et al.* (2008), que observaron que la adición de aditivos enzimáticos al forraje tuvo efectos insignificantes sobre la cinética del GP, y opinaron que los efectos de la adición de enzimas dependen del contenido de fibra, las composiciones de polisacáridos estructurales del sustrato y la diferencia en la composición de la enzima. Hubo interacciones entre el licor aditivo y el rumen para la tasa de GP y el retraso inicial antes de GP. La adición de enzimas afectó significativamente la tasa de GP, lo que contradice los informes previos sobre otros preparados y tipos de enzimas (Jalilvand *et al.*, 2008). Estudios recientes que incluyeron experimentos *in vivo* (Morsy *et al.*, 2016) e *in vitro* (Elghandour *et al.*, 2016) mostraron que la suplementación de dietas de rumiantes con enzimas exógenas podría mejorar la utilización de alimento, la digestión de DM y rendimiento animal al mejorar la degradación de la MS (Alsersy *et al.*, 2015). Ahmed *et al.* (2015), mostraron que la suplementación de SC a dietas de rumiantes mejoró la utilización de alimento. Por el contrario, Corona *et al.* (1999), informaron que la suplementación de las dietas con SC a las vacas no afectó la digestibilidad de la MS, la hemicelulosa y el almidón. Los aditivos de levadura no tuvieron efecto en la tasa de GP, pero hubo un ligero aumento en la tasa de GP en comparación con el control. Este resultado contrasta con el trabajo de Rodríguez *et al.* (2015), que informaron una disminución en la tasa de GP en respuesta a los aditivos SC. Las diferencias en los resultados pueden deberse a la composición e incubación de los sustratos (Elghandour *et al.*, 2014). Xilanasa, SC y su mezcla en todas las dosis, excepto en la dosis de 0 mg de la mezcla XYL + SC, disminuyeron la producción de CH<sub>4</sub> en comparación con el tratamiento de control. Esta pronunciada disminución en la producción de CH<sub>4</sub> sugiere que el uso de XYL, SC o su mezcla como aditivos en las dietas de rumiantes puede servir como métodos eficientes para reducir las emisiones de CH<sub>4</sub> de la

producción de rumiantes. Varias investigaciones han informado una reducción de la producción de CH<sub>4</sub> con suplementación SC. Por ejemplo, Newbold y Rode (2006), informaron una reducción del 58% en la producción de CH<sub>4</sub> con la adición de SC en las dietas de rumiantes. Además Polyorach *et al.* (2014), notaron una disminución en la producción de CH<sub>4</sub> *in vitro* con la suplementación de SC, lo que apoya nuestros hallazgos. Los estudios que evaluaron los efectos de las enzimas exógenas en la emisión de CH<sub>4</sub> en el rumen, pocos informaron un aumento absoluto en la producción de CH<sub>4</sub> con la adición de suplementos de enzimas exógenas a las dietas de rumiantes (Beauchemin *et al.*, 2009). Dong *et al.* (1999), informaron un aumento del 43% en la producción de CH<sub>4</sub> cuando se usaba celulasa y XYL como suplementos con él en el sistema RUSITEC. Colombatto *et al.* (2003), informaron que no hubo ningún efecto del suplemento de enzimas en la producción de CH<sub>4</sub> en el sistema de cultivo continuo. McGinn *et al.* (2004), no observaron ningún efecto en la producción de CH<sub>4</sub> en novillos alimentados con dietas a base de ensilaje de cebada suplementadas con diferentes aditivos para la alimentación incluyendo enzimas exógenas. Por el contrario, Kholif *et al.* (2016), informaron que la adición de enzimas a ciertas dosis redujo la producción de CH<sub>4</sub> en los productos equinos. Salem *et al.* (2015), observaron los resultados en caballos alimentados con dieta suplementada con enzimas exógenas. En el presente estudio, la adición de enzimas en todas las dosis disminuyó la producción de CH<sub>4</sub>. Esto puede deberse a la posible estimulación de los acetógenos reductivos en el rumen que altera el metabolismo del hidrógeno (H<sub>2</sub>) y su utilización por metanógenos de una manera que reduce la formación y las emisiones de CH<sub>4</sub> (Stewart *et al.*, 1997). La reducción en la producción de CH<sub>4</sub> mediante la adición de una combinación de XYL y SC a dosis elevadas muestra un impacto positivo en la fermentación ruminal, aunque la disminución se observa en la producción de CH<sub>4</sub> una dosis alta del aditivo añadido se acompaña de una ligera disminución en GP asintótica, que indica un efecto inhibitorio directo de la cinética de fermentación ruminal.

Muchos gases que consisten principalmente en CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> se producen durante el proceso de fermentación ruminal dentro del rumen. En este estudio, la adición de aditivos en todas las dosis aumentó ligeramente la producción de CO<sub>2</sub> a las 6, 24 y

48 h de incubación. A las 6 h de incubación, no hubo producción de CO<sub>2</sub> en todos los aditivos ni en el control. Disminución de la producción de CO<sub>2</sub> por debajo del tratamiento de control se observó a 6 ml de XYL / g de MS y 0 mg de SC / g de MS. Esta reducción en la producción de CO<sub>2</sub> y la disminución en la tasa de CO<sub>2</sub> pueden deberse al aumento en el contenido de la pared celular que puede reducir las actividades microbianas. Elghandour *et al.* (2016), informaron una disminución en la producción de CO<sub>2</sub> cuando el grano de maíz fue reemplazado por cascarillas de soja. Elghandour *et al.* (2016d), observaron que la sustitución del grano de maíz con nopal aumentó la producción de CO<sub>2</sub>. Sin embargo, ambos experimentos usaron la misma adición de ácido orgánico, lo que indica que el efecto diferente observado puede ser dependiente de la ración. A nuestro leal saber y entender, existe poca información sobre los efectos de las dietas complementarias de los rumiantes con enzimas y los aditivos SC sobre la producción de CO<sub>2</sub>, lo que dificulta la comparación de los resultados actuales con los resultados previos. La producción asintótica de CO<sub>2</sub> registró los valores más altos para 2 mg de SC / g de MS (90 ml / g de MS) y (97 y 80 ml / g de MS) para 0 y una dosis alta de XYL + SC mezcla; los tres tratamientos tuvieron producciones mayores que el tratamiento de control (38 ml / g de MS). En este estudio, la inclusión de aditivos tuvo un efecto creciente en la producción de CO<sub>2</sub> asintótico.

## IX. CONCLUSIONES

El metano y el CO<sub>2</sub> de la fermentación entérica en el sistema digestivo de los rumiantes son dos de los principales contribuyentes de las emisiones de gases de efecto invernadero en el mundo. La mitigación de la pérdida de estos gases a partir de la producción de rumiantes no solo reducirá la producción de gases de efecto invernadero a partir de los desechos agrícolas, sino que también reducirá la pérdida de energía neta de alimentación del animal. Este estudio demostró que El tratamiento de las dietas de rumiantes con xilanasa, *S. cerevisiae* y su mezcla en diferentes dosis durante 60 días de edad cambió el patrón de producción ruminal de gas, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. La adición de una mezcla de xilanasa y *S. cerevisiae* a una dosis alta redujo significativamente la producción de gas asintótico en comparación con otros tratamientos con resultados dependientes de la dosis. La inclusión de xilanasa, *S. cerevisiae* y su mezcla redujo la producción de gas asintótico a <1%. De nuevo, la adición de aditivos en las dietas de los rumiantes a todas las dosis tuvo efecto de reducción estadísticamente significativo en la producción de CH<sub>4</sub>. La pronunciada disminución en la producción de CH<sub>4</sub> muestra que el uso de xilanasa, *S. cerevisiae* o su mezcla como aditivos en las dietas de rumiantes puede servir como un método eficiente para reducir la emisión de CH<sub>4</sub> de la producción de rumiantes. Este estudio también estableció que la mezcla de xilanasa y *S. cerevisiae* era más eficiente y prometedora en reducir las emisiones de gas y metano derivadas de la producción de rumiantes. Si se adopta esta práctica de mitigación, puede servir como una forma respetuosa con el medio ambiente de alimentar al ganado y lograr condiciones de producción ambiental más limpias en la cría de terneros.

La levadura, la xilanasa y el aceite de ajo, en diferentes niveles no afectaron las extensiones de GP; sin embargo, el aceite de ajo aumentó la tasa de digestión y la fase de latencia. Además, el aceite de ajo disminuyó las producciones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, seguido de levadura y xilanasa. Se puede concluir que el aceite de ajo seguido de levadura y luego la xilanasa puede usarse para mitigar la producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> *in vitro* de terneros lecheros alimentados con una dieta alta en concentrados. Sin embargo, se requiere más investigación para establecer la eficacia de dichos aditivos en ensayos *in vivo*.

En el experimento *in vivo* los aditivos (*Saccharomyces cerevisiae*) y la enzima xilanasa no afectaron los parámetros de ingestión del alimento, el agua o leche en becerros lactantes del día 4 al día 60. Sin embargo, la adición de la xilanasa mejoró la ganancia de peso de los becerros, pero no hubo diferencia con respecto al control o a la combinación de levadura con xilanasa.

## X. LITERATURA CITADA

- Abe, F., Ishibashi, N. & Shimamura, S. 1995. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J. Dairy Sci.* 78:2838
- Abu Tarboush, H.M., Al Saidy, M.Y. & Keir El Din, A.H. 1996. Evaluation of diet containing lactobacilli on performance, fecal coliform, and lactobacilli of young dairy calves. *Anim. Feed Sci. Techn.* 57:39
- Ahmed, M.H., Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Zeweil, H.S., Kholif, A.E., Klieve, A.V., Abdelrassol, A.M.A., 2015. Influence of *Trichoderma reesei* or *Saccharomyces cerevisiae* on performance, ruminal fermentation, carcass characteristics and blood biochemistry of lambs fed *Atriplex nummularia* and *Acacia saligna* mixture. *Livest. Sci.* 180, 90e97.
- Angeles, S. 2000. Fermentación, tamaño de partícula y efecto de la fibra en la alimentación de vacas de lechería. (On line) <<http://www.fmvz.mx/bovinotecnia/BtRgZooG014.pdf>> 15 Jun 2009.
- Angenent, L.T.; K. Karim; M. H. Aldahlan; B. A. Wrenn y R. Domíquez- Espinosa. 2004. Production of bioenergy and biochemical from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.*, 22: 477-485. <http://angenent.bee.cornell.edu/research/TIBTECH-04.pdf>
- Araujo, O. y Vergara, J. 2007. Propiedades físicas y químicas del rumen. *Arch. Latinoam.* Vol. 15.

- Beauchemin, K. A.; L. M. Rode y V. J. H. Sewalt, 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. *Can. J. Anim. Sci.*, 75: 641-644.
- Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Yang, W.Z. & Newbold, C.J. 2000. Enzymes and direct fed microbials in diets for dairy cows. *Proceeding of the Three-State Dairy Nutrition Conference. Indiana-USA*
- Blaxter, K. L. Hutcheson, M.K. Robertson, J.K. and Wilson, A.L. 1952: the influence of diet on the development of the alimentary tract of the calf. *Brit J. Nutr*, 6: 1-12
- Brown, R. F.; Agbogbo, F. K. y Holtzapfle, M.T. 2010. Comparison of mechanistic models in the initial rate enzymatic hydrolysis of AFEX-treated wheat Straw. <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/6>
- Brugere, E.H. 1969 Contribution a l'etude de la physiologie du frujllet (Omasum) des Ruminants. Roladans l'absorption de eau des electrytes. Thesc Dost. Veter maison alfort. Paris. France, 96 Pag
- Burroughs, W., Woods, W., Ewing, S.A., Greig, J. y Theurer, B. 1960 *J. Anim. Sci.*, 19: 458-464.
- Calsamiglia, S. 1997. Nuevas bases para la utilización de la fibra en dietas de ruminantes. XIII Curso de especialización FEDNA, Madrid, 6 y 7 de noviembre 1997.

- Calsamiglia, S. y Ferret, A. 2002. Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: Acidosis y meteorismo. XVIII Curso de especialización FEDNA. Barcelona, 4 y 5 de Noviembre de 2002
- Cheng K.J., Lee S.S., Bae H.D., y Ha J.K. 1999. Industrial applications of rumen microbes. *Asian-Australian. J. Anim. Sci.* 12: 84-92.
- Chesson, A. y Forsberg, C.W. 1997 En: *The Rumen Microbial Ecosystem*, 2º ed. Hobson, P. y Stewart, C. (Eds.). Chapman y Hall Ltd, Andover, UK.
- Church, D.C. 1974: Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes (Vol.1) Ed. Acribia, Zaragoza, España
- Colombatto, D., Hervas, G., Yang, W.Z., Beauchemin, K.A., 2003. 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, 2617e2627.
- Corona, L., Mendoza, G.D., Castrejon, F.A., Crosby, M.M., Cobos, M.A., 1999. Evaluation of two yeast cultures (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal fermentation and digestion in sheep fed a corn stover diet. *Small Rumin. Res.* 31, 209e214.
- Craplet, C. 1970. El ternero. Ed. Oranismo, IC.I La Habana, Cuba Pag.45, 61 y 75.

Cruywagen, C.W., Jordan, I. & Venter, L. 1996. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplementation of milk replacer on preweaning performance of calves. *J.Dairy Sci.*79:483

Das, H. y S. K. Singh. 2004. Useful byproducts from cellulosic wastes of agriculture and food industry- a critical appraisal. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 44: 77-89.

Denev, S. 1996. Probiotics-past, present and future. *Bulgarian J. Agric. Sci.* 2:445

EL-Adawy, M. M.; A. Z. M. Salem; B.E. Borhami; H. M. Gado; M. S. Khalil y A. Abo-Zeid, 2008. *In Vitro* cecal gas production and dry matter degradability of some anaerobic bacterium in NZW rabbit. Proceedings of the 9th WRSA World Rabbit Congress, June10-13, Verona, Italy, pp: 643-647

Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Martínez Castan~eda, J.S., Camacho, L.M., Kholif, A.E., Vazquez, J.C., 2015. Direct-fed microbes: a tool for improving the utilization of low quality\_roughages in ruminants. *J. Integr. Agr.* 14 (3), 526e533.

Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Lopez, S., Mendoza, G.D., Odongo, N., Salem, A.Z.M., 2016c. In vitro gas, methane, and carbon dioxide production of high fibrous diets incubated with fecal inocula from horses in response to the supplement- tion with different live yeast additives. *J. Equine Vet. Sci.* 38, 67e71.

Fébel, H. y Fekete, S. 1996. Factors influencing microbial growth and the efficiency of microbial protein synthesis: a review. *Acta Veterinaria Hungarica*. 44(1): 39-56.

Feng, P., C.W. Hunt, W.E. Julien, K. Dickinson y T. Moen. 1992 *J. Anim.Sci.* 70 (Suppl 1): 309 (Abstr.).

Forsberg, C.W. y Cheng, K.-J. 1992. En: *Biotechnology and Nutrition*. Bills, D.D. y Kung, S.D. (Eds.). Butterworth Heinemann, Stoneham. pp. 107-147.

Forsberg, C.W., Cheng, K.J. y Phillips, J.P. 1993 En: Proc. VII World Conference on Animal Production. World Association for Animal Production, Edmonton.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriology*. 66:365

Gado, H. and Salem, A.Z.M. 2013a. Anaerobic enzymes as a new technology in animal feed. *In: Nutritional strategies of animal feed additives*. Salem, A.Z.M. (Ed). Nova Science Publishers. New York, USA. pp. 1-24.

Haight, M. 2005. Assessing the environmental burdens of anaerobic digestion in comparison to alternative options for managing the biodegradable fraction of municipal solid wastes. *Water. Sci. Technol.*, 52: 553-559

Hamada, T. Mayda, S. and Kamecka, k. 1976. Factors Influencing growth of rumen, liver and other organs in kids weaned from milk replacers to solid feedg *J. Dairy Sci*, 59: 1100-1118.

- Hamer, G. 2003. Solid waste treatment and disposal: Effects on public health and environmental safety. *Biotechnol. Adv.*, 22: 71-79.
- Higginbotham, G.E. & Bath, D.L. 1993. Evaluation of *Lactobacillus* fermentation cultures in calf feeding systems. *J. Dairy Sci.* 76:615
- Jung H.G., Ralph J., and Hatfield R.D. 1991. Degradability of phenolic acid-hemicellulose esters: A model system. *J. Sci. Food Agric.* 56: 469-478.
- Kholif, A.E., Baza-García, L.A., Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Barbabosa, A., Dominguez-Vara, I.A., Sanchez-Torres, J.E., 2016. In vitro assessment of fecal inocula from horses fed on high-fiber diets with fibrolytic enzymes addition on gas, methane, and carbon dioxide productions as indicators of hindgut activity. *J. Equine Vet. Sci.* 39, 44e50.
- Kolb, E, 1975: *Fisiología Veterinaria*. Vol I Dags 266, 267, 268.
- Krausen, K. Combs, D. Y Beauchemint, K. 2002. Effects of Forage Particle Size and Grain Fermentability in Midlactation Cows. II. Ruminal pH and Chewing Activity. *Journal of Dairy Science.* 85 (8): 1947–1957.
- Ladisich, M. R.; K. W. LIN; M. Voloch & G. T. Tsao. 1990. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme Tech.* 15: 90-99
- Laplace, J.P. 1968: *Sur les phenomenes mecaniques et electriques du tractus digestif chez le mouton*. Laboratoire de physiologie – Pharmacodynamie de I.N.S. A Lyon, France, 200 Pag.

- Laplace, J.P. 1968: Sur les phénomènes mécaniques et électriques du tractus digestif chez le mouton. Laboratoire de physiologie – Pharmacodynamie de I.N.S. A Lyon, France, 200 Pages.
- Lewis, G. E.; C. W. Hunt; W. K. Sanchez; bR. Treacher; G. T. Pritchard y Pfeng. 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. <http://jas.fass.org/content/74/12/3020.full.pdf+html>
- Marrero, Y., Martín, E., Rodríguez, D. & Galindo, J. 2010. Efecto de la inclusión de fracciones del cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación ruminal in vitro de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*). *Rev. Cubana Cienc. Agríc.* 44:161
- McDonald, P. Edwards, R. Greenhalgh, J y Morgan, C. 1995. *Nutrición animal* 5ª edición. Zaragoza, España. Acribia S.A. 145-147 p.
- McGinn, S.M., Beauchemin, K.A., Coates, T., Colombatto, D., 2004. Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *J. Anim. Sci.* 82, 3346e3356.
- Morsy, T.A., Kholif, A.E., Kholif, S.M., Kholif, A.M., Sun, X., Salem, A.Z.M., 2016. Effects of two enzyme feed additives on digestion and milk production in lactating Egyptian buffaloes. *Ann. Anim. Sci.* 16 (1), 209e222.
- Murad, H. H.; Hanfy, M.A.; Kholif, A.M.; Abdel Gawad, M.H. y Murad, H.A. 2009. Effect of cellulases supplementation to some low quality roughages on digestion and milk production by lactating goats. *J. Biol. Chem. Environ. Sci.*, 4:791-809.

NEWBOLD, C.J. 2003 En: International One-Day Seminar: Role of Probiotics in Animal Nutrition and their Link to the Demands of European Consumers. Lelystad.

Nsereko VL, Beauchemin KA, Morgavi DP, Rode LM, Furtado AF, McAllister TA, Iwaasa AD, Yang WZ, Wang Y (2002) Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. *Can. J. Microbiol.* 48: 14-20.

Nsereko, V. L.; D.P. Morgavi; L.M. Rode; K. A. Beauchemin y T.A. Mcallister, 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.

PERON. N. y RUIZ, R. 1992. *Rev. Cubana Ciencia Agri. Desarrollo Anatómico del tracto gastrointestinal. En terneros alimentados con basadas en miel y concentrados Vol. Pag. 77.)*

Polyorach, S., Wanapat, M., Cherdthong, A., 2014. Influence of yeast fermented cassava chip protein (YEFECAP) and roughage to concentrate ratio on ruminal fermentation and microorganisms using *in vitro* gas production technique. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 27, 36e45.

Relling, A. Y Mattioli, G. 2003. *Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes.* (On line). Universidad Nacional de La Plata. La Plata. <<http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catbioquimicavet/fisio%20dig%20rumiantes.pdf>> 15 jun 2009.

Roderick, M. y White, B. 1990. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: Potential impact on nutrient output. *Journal Dairy Science* 73(10): 2971-2995.

Rodriguez, M.P., Mariezcurrena, M.D., Mariezcurrena, M.A., Lagunas, B.C., Elghandour, M.M., Kholif, A.M., Kholif, A.E., Almaraz, E.M., Salem, A.Z., 2015. Influence of live cells or cells extract of *Saccharomyces cerevisiae* on in vitro gas production of a total mixed ration. *Ital. J. Anim. Sci.* 14, 3713.

Rodríguez, M.A.M.; P. Pinto; R.M.F. Becerra; A.A. Dias y C.V.M Guedes *et al.* 2008. Effect of enzyme extracts isolated from whiterot fungi on chemical composition and in vitro digestibility of wheat straw. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 141: 326-338.

Salem, A.Z.M., Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Odongo, N.E., Jimenez, F.J., Montes-de-Oca, R., Domínguez, I.A., Dibarrat, J.A., 2015b. The effect of feeding horses a high fiber diet with or without exogenous fibrolytic enzymes supplementation on nutrient digestion, blood chemistry, fecal coliform count, and in vitro fecal fermentation. *J. Equine Vet. Sci.* 35, 735e743.

Sere, E. 1967: *Enfermedades de los estómagos de los bovinos*, Editorial Acribia, Zaragoza, España.

Sisson S. 1974. *Anatomía de los animales domésticos* Edic. Revolucionaria Inst. Cubano del Libro La habana Cuba.

- Sokolova, N.A., Khmel, I.A., Shedevich, E.A., Evglevskaya, N.I., Gorsjaya, E.M. & Kurepine, N.E. 1991. Preventing colibacteriosis in calves by administering microcin-producing strains. *Veterinariya Moskova*.1:24
- Stella, A. V.; R. Paratte; L. Valnegri; G. Cigalino y G. Soncinl *et al.* 2007. Effect of administration of live *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, milk composition, blood metabolites and faecal flora in early lactating dairy goats. *Small Rumin. Res.*, 67: 7-13
- Stewart, J. 1974 Cria de terneros. Boletín de Reseña. Serie Ganadería. Cida, 1:1-22.
- Tomate y Cols 1962 Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach on the calf *J. Dairy sei* 45: 408-412.
- Tricarico, J. M.; J. D. Johnston; K. A. Dawson; K. C. Hanson; K.R. Mcleod y D. L. Harmon. 2005. The effects of an *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on ruminal fermentation and milk production in lactating Holstein cows. *Anim. Sci.*, 81: 365-374.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, 74:3583–3597.
- Van Vuuren, A.M. 2003 En: International One-Day Seminar: Role of Probiotics in Animal Nutrition and their Link to the Demands of European Consumers. Lelystad.

Wardrop, I. D 1961, Some preliminary observations on the histological development of the fore – stomach of the lamb. I. Histological changes during age in the period from 46 days fetal life to 76 days post – natal J. Agric. Sci, 335-338

Warner and cols 1956: Dietary factors affecting development of the ruminant stomach J. agr, food chem., 778-783.

Warner, E. D. 1958, The organogenesis and early histogenesis of the bovine stomach Amer J. Anatomy, 102: 33-37.

Weimer, P. 1998. Manipulating ruminal fermentation: A microbial ecological perspective. Journal Animal Science. 76(12): 3114-3122.

Yang, X.; H. Chen; H. Gao y Z. Li. 2001. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and SSF. Biores. Technol., 78:277-280.