

**TESIS EN OPCIÓN AL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO**

**PROYECTO CIENTÍFICO PRODUCTIVO**

**Título: Efecto de un crudo enzimático a partir de *Bacillus subtilis* E 44 en la dieta de pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras.**



**Autor: Yanisbel Díaz Blanco**

**Tutor: DrC. Aymara Valdiva Ávila.**

**Lic. Yasmery Rubio Fontanills.**

**Julio, 2019**

## *PENSAMIENTO*

*Ni el entusiasmo, ni la disciplina, ni el espíritu de sacrificio, ni el trabajo máximo, pueden concretarse en una gran obra, si no hay también conocimientos teóricos donde asentarse.*

*“Che”*

## **DECLARACIÓN DE AUTORIDAD**

Declaro que yo, Yanisbel Díaz Blanco, soy el única autora de este Trabajo de Diploma, en calidad de lo cual autorizo a la Universidad de Matanzas a hacer uso del mismo con la finalidad que estime pertinente.

---

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi familia por su apoyo incondicional, en especial a mi madre por estar siempre a mi lado, por guiarme, por pasar tantas noches de desvelo juntas. Gracias a ti he logrado llegar hasta aquí y cumplir este sueño.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia por su apoyo y comprensión.

A mis padres por su amor, sacrificio, ayuda y paciencia. Por impulsarme a seguir adelante. Los quiero mucho.

A mis tutoras Aymara Valdivia y Yasmery Rubio por su entrega y dedicación.

A mis amigos por los maravillosos momentos vividos y compartidos, a todos los voy a extrañar.

A las profesoras Madyu y Lliddrey por su ayuda.

Al claustro de profesores de la facultad por mi formación como estudiante.

A todo aquel que de una manera u otra me ha brindado su apoyo.

**MUCHAS GRACIAS.**

## OPINIÓN DEL TUTOR

**Tutores:**

---

**Dr C. Aymara Valdivia Ávila**

---

**Lic. Yasmery Rubio Fontanills**

## Índice

1. Introducción.....	1
2. Problema .....	3
3. Hipótesis.....	4
4. Fundamentación.....	5
4.1. La producción avícola en Cuba.....	5
4.2. Polisacáridos no amiláceos.....	6
4.3. Las enzimas en la nutrición de aves. ....	6
4.4. Fuentes de obtención de enzimas. ....	8
4.5. Procesos fermentativos para la producción de enzimas. ....	8
4.6. Principales enzimas utilizadas en la avicultura. ....	9
4.7. Actualidad en el uso de las enzimas en nutrición de aves. ....	11
4.8. Efecto de las enzimas en la salud animal. ....	12
4.9. Efecto de las enzimas en indicadores productivos de los animales.....	13
4.10. Digestibilidad.....	14
5. Objetivos .....	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos .....	17
6. Resultados esperados.....	18
7. Métodos y procedimientos. Cronograma de trabajo.....	19
Primera etapa: Familiarización con el tema del proyecto.....	19
Segunda etapa: Producción del crudo enzimático.....	19
Preparación del inóculo. ....	19
Tercera etapa: Evaluación del efecto del crudo enzimático en la digestibilidad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de la dieta para pollitas de remplazo de ponedora.....	20
Digestibilidad fecal <i>in vitro</i> aparente de la fracción fibrosa. ....	20
Digestibilidad fecal <i>in vivo</i> aparente de la fracción fibrosa.....	21
Cuarta etapa: Evaluación del efecto de la aplicación del crudo enzimático en los indicadores productivos de pollitas de remplazo de ponedoras. ....	22
Quinta etapa: Análisis de los resultados de los experimentos. ....	23
8. Recursos necesarios .....	2
9. Presupuesto .....	2
10. Valoración del impacto económico- medioambiental del proyecto.....	29

# *INTRODUCCIÓN*



## **1. Introducción**

La avicultura juega un papel significativo en la conversión de granos y otros productos en huevos y carne. Por este motivo constituye una fuente importante para satisfacer, fundamentalmente, la demanda de proteínas de la población que, a nivel mundial, crece aceleradamente.

La industria pecuaria exige cada vez mejores rendimientos productivos y eficiencia en la producción. En la avicultura esto se conseguiría con aves más precoces y con niveles de producción más altos; por lo que mantener estos estándares por un período prolongado del ciclo productivo es una tarea compleja debido a la alta demanda metabólica de las aves. La formulación de los piensos y el manejo de la alimentación son factores claves para asegurar el éxito productivo y la rentabilidad económica en este sector, ya que la alimentación representa entre el 50 y el 70% de los costos totales de la crianza (Ravindran, 2010).

La industria avícola cubana representa un sector importante para garantizar el aporte de proteína animal a la población. La producción avícola fue una de las de mayor crecimiento en la década de los 80 del siglo XX lo que enmarcó a la isla como uno de los 45 países más productores de huevos a nivel mundial y entre los 25 mayores consumidores (Bejerano, 2011). Posteriormente la avicultura cubana se afectó, entre otras razones, por la inestabilidad en la compra de las materias primas para los piensos debido a los altos precios en el mercado internacional, el recrudecimiento del bloqueo económico de los Estados Unidos contra Cuba el cual ha costado más de 59,6 millones de dólares en pérdidas, las intensas sequías y la entrada frecuente de huracanes. (MINREX, 2003; Ramírez y Ruíz Santa Cruz, 2007). Aun así, este sector se ha recuperado paulatinamente de la crisis y alcanzó en el 2016 un récord nacional en la producción de huevos de 2 069,9 millones de unidades (Bustamante Molina, 2019) lo que representó un incremento de 2,14 % con respecto al año anterior. (Gutiérrez, 2017). Sin embargo, los niveles productivos no satisfacen las demandas de la población por lo que se hace necesario buscar alternativas económicamente viables que contribuyan a mejorar la calidad en la producción y los servicios de este sector.

En los últimos años se ha incrementado el precio de los alimentos que se emplean en la avicultura, por lo que la búsqueda de nuevas estrategias que

mejoren la digestibilidad y el aprovechamiento de los nutrientes en esta especie es una prioridad para la ciencia animal. Entre las vías más prometedoras para lograr estos objetivos se encuentra la suplementación con enzimas. Esta práctica favorece la hidrólisis de los factores antinutricionales, incrementa la disponibilidad de algunos nutrientes, mejora la digestibilidad general, reduce la viscosidad intestinal, controla la proliferación de la flora intestinal del ave (Galarza, 2017) y reduce el impacto contaminante de excretas animales.

# *PROBLEMA*





## **2. Problema**

La presencia de polisacáridos no amiláceos en los componentes de la dieta de pollitas de reemplazo de ponedoras dificulta la digestibilidad de los nutrientes y afecta los indicadores productivos de estas aves.

# *HIPÓTESIS*



### **3. Hipótesis**

La aplicación de un extracto enzimático obtenido de *Bacillus subtilis* E44, en la dieta de pollitas de remplazo de ponedoras, permitirá incrementar la digestibilidad de la fibra y mejorar los indicadores productivos de estos animales.

# *FUNDAMENTACIÓN*



## **4. Fundamentación**

### **4.1. La producción avícola en Cuba.**

En los años de la década de los 50 del pasado siglo la producción de huevos y carne de aves en Cuba provenía fundamentalmente de los traspatios de las familias que habitaban en zonas rurales y suburbanas y se consumían por los núcleos poblacionales urbanos. El auge de la avicultura nacional coincide con el Triunfo de la Revolución y la creación del Combinado Avícola Nacional en 1964. En sus inicios, la industria avícola cubana contaba con las dos cadenas que se derivan de esta rama: carne de ave y producción de huevos. Con el desarrollo social y económico que comenzó a producirse con el triunfo de la Revolución en 1959 se alcanzó un alto nivel de consumo de productos avícolas, lográndose en la década de los 80 una producción por persona al año de 250 huevos y 9 kg de carne de aves. (Pampín, 2001).

Luego de la caída del Campo Socialista y con la agudización del bloqueo económico por parte del gobierno de los Estados Unidos, la producción de carne de ave a partir de reproductores pesados (pollos de ceba) se vio totalmente deprimida. Por este motivo dejó de desarrollarse completamente en el año 2002 y sigue sin recuperarse en la actualidad (Báez, 2015). El costo del bloqueo a la avicultura en el período entre abril de 2008 y marzo de 2009 fue estimado en 24 millones de dólares (Báez y Oramas, 2018).

La insuficiente producción cubana de alimentos constituye un problema sostenido en los últimos cincuenta años de la economía nacional. Al hacerse más vulnerable, se ha elevado su dependencia alimentaria externa y esto ha motivado elevadas erogaciones de divisas para la importación de alimentos, los que en muchos casos pudieran producirse nacionalmente bajo condiciones de competitividad (Nova, 2012).

La avicultura cubana actualmente está estructurada en tres partes fundamentales: la alternativa, que está representada por las familias que crían aves para su autoconsumo, además de los gobiernos provinciales y municipales y los consejos populares; la intermedia, cuyos actores fundamentales son el Ministerio de las Fuerzas Armadas Revolucionarias (MINFAR), el Ministerio del Interior (MININT) el Ministerio de la Agricultura, (MINAG) y otros organismos productores que aplican menos tecnología; y la intensiva, representada por la

Unión de Empresas del Combinado Avícola Nacional (UECAN) (Hernández, 2013).

En la avicultura cubana se trabaja con líneas comerciales (L33 y L84) para la producción de huevos. Estas presentan un potencial de producción de 280 a 300 huevos/año con más de un 85 % de viabilidad (Hidalgo, 2011). Sin embargo, los resultados en la última década muestran bajos índices de producciones. El mayor registro de huevos por ponedoras comerciales se obtuvo en el 2002, con 275,78 huevos/gallina. No obstante, estas producciones permitieron que se obtuviera un crecimiento anual del 3,3 % (FAO, 2010).

#### **4.2. Polisacáridos no amiláceos.**

Los polisacáridos no amiláceos (PNA) son los principales componentes de las paredes de las células vegetales. El término PNA representa una diversidad de compuestos que poseen diferentes propiedades fisicoquímicas; su clasificación se basó en un inicio en la metodología que se empleaba para su extracción y aislamiento. Se dividen en tres grandes grupos: celulosa, hemicelulosa (arabinoxilanos,  $\beta$ -glucanos, mananos, galactanos y xiloglucanos) y los polisacáridos pécticos (Llanes, 2018).

La presencia de polisacáridos no amiláceos (PNA) resulta indeseable en las dietas para monogástricos, debido a que estos animales no cuentan con enzimas para degradar estos compuestos. Los PNA disminuyen la absorción y aprovechamiento de los nutrientes en la dieta, especialmente de las grasas y proteínas (Galarza, 2017).

Los efectos negativos de estos polisacáridos son originados por un aumento de la viscosidad de la digesta por los PNA solubles y por la acción encapsuladora de los PNA insolubles, es decir actúan como una barrera física para la acción de las enzimas endógenas (Chot, 2006.).

#### **4.3. Las enzimas en la nutrición de aves.**

Las enzimas son compuestos orgánicos de origen proteico cuya función es catalizar las reacciones químicas que ocurren en las células vivas como los procesos digestivos y metabólicos. Estos incluyen todas las reacciones de síntesis, digestión y degradación, donde estas proteínas controlan las funciones de mantenimiento, crecimiento y reproducción de los animales (Ravindran, 2010 y Garg, 2016).

Las enzimas se caracterizan por su alta especificidad, por ejemplo, al ejercer su acción específica sobre un sustrato para mejorar la digestibilidad de algún nutriente (Bedford, 2000). Se clasifican por su origen en endógenas y exógenas. Las endógenas son las producidas por los diferentes órganos propios de los animales; mientras que las exógenas son suplementadas en el alimento (Rojo *et al.*, 2007).

Una de las estrategias que se utilizan para incrementar la producción avícola es la aplicación de enzimas a las dietas de los animales, las cuales según Bedford (2000) y Ravindran (2013) se emplean con la finalidad de:

- a) Destruir factores antinutritivos en las raciones de animales monogástricos.
- b) Mejorar la digestibilidad de algunos nutrientes de la dieta como los carbohidratos, proteínas o minerales y los PNA.
- c) Complementar la acción de las enzimas endógenas producidas por el animal en algunas etapas del crecimiento.
- d) Liberar algunos de los nutrientes atrapados, como azúcares simples, lisina y minerales como el calcio (Ca), Zinc (Zn), Magnesio (Mg) y Hierro (Fe).
- e) Reducir el impacto contaminante de las heces hacia el medio ambiente.

El uso de las enzimas como aditivos se ha hecho necesario debido a que el valor nutritivo potencial de las materias primas no se aprovecha completamente por la presencia de factores antinutricionales y la falta o insuficiencia de enzimas endógenas, que permitan la liberación de los nutrientes. El empleo de enzimas exógenas persigue el incremento de la digestibilidad de los alimentos y la eficiencia en su utilización. Su uso tiende a optimizar el rendimiento de los animales a través de mejoras en el consumo de alimento, ganancia de peso y eficiencia alimenticia (Ravindran, 2010).

La adición de enzimas a las dietas, según Guerra (2015) tiene algunos beneficios entre los que se encuentra el aumento en la disponibilidad de nutrientes ya que acelera las reacciones químicas que tienen lugar durante la digestión. La ruptura de las moléculas de los factores antinutricionales  $\beta$ -glucanos y arabinoxilanos por parte de las enzimas reduce la viscosidad del bolo alimenticio, de esta forma se incrementa el aprovechamiento de los alimentos en un 15-25 %.

Además, este autor considera que la inclusión de enzimas digestivas exógenas reduce la síntesis de enzimas digestivas endógenas, lo que incrementa la disponibilidad de aminoácidos para la síntesis de otras proteínas. También

permite la incorporación de ingredientes alternativos, lo que trae consigo la variabilidad de los componentes de la dieta.

La aplicación de estos aditivos refuerza el sistema enzimático inmaduro de los animales jóvenes y facilitan el ataque de las enzimas endógenas a los nutrientes presentes en la dieta. Con su empleo se aprovecha mejor el valor energético de los cereales, lo que supone un ahorro económico. Su empleo también facilita el cumplimiento de la restricción internacional de no usar antimicrobianos en la crianza animal.

#### **4.4. Fuentes de obtención de enzimas.**

Las enzimas pueden ser de origen vegetal, animal y microbiano. (Hamann *et al.*, 2015). Las enzimas microbianas se obtienen a partir de bacterias, arqueas y hongos. Los microorganismos pueden producir algunas de estas proteínas en concentraciones muy altas y excretarlas al medio. Muchas se obtienen a partir de hongos como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* o bien, mediante bacterias como *Streptomyces*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis* (Brufau, 2014).

*Bacillus subtilis* es una bacteria ubicua que es capaz de producir enzimas extracelulares las cuales secreta en grandes cantidades al medio de cultivo (Meima *et al.*, 2004). Además, esta especie se reconoce como segura (GRAS, por sus siglas en inglés *generally recognized as safe*) por lo que debido a esto y a su capacidad para producir enzimas extracelulares de interés biotecnológico se emplea para la producción de aditivos nutricionales (Cheng *et al.*, 2016; Elshagabee *et al.*, 2017 y Milián *et al.*, 2017).

Hamann *et al.* (2015) refiere que la producción de enzimas de origen microbiano resulta más económica y ofrece numerosas ventajas; entre las que puede mencionarse que los microorganismos poseen altas velocidades de crecimiento, son fáciles de manipular genéticamente, crecen en un amplio rango de condiciones ambientales y tienen una gran variedad de vías metabólicas para su síntesis.

#### **4.5. Procesos fermentativos para la producción de enzimas.**

Existen dos procesos fermentativos que se utilizan para la producción de enzimas: la fermentación sumergida (FSm) y la fermentación en estado sólido (FES) (Brandao, 2003).

La fermentación sumergida es ampliamente conocida, estudiada y aplicada. Entre los tipos de fermentación de este tipo se distinguen los procesos discontinuos, discontinuos alimentados, continuos y semicontinuos. La gran mayoría de las enzimas utilizadas industrialmente son producidas a través de la fermentación sumergida, para lo cual generalmente se utilizan microorganismos modificados genéticamente. No obstante, el costo de producción de estas enzimas es muy elevado y el proceso muchas veces se torna no viable económicamente (Brandao, 2003).

La fermentación en estado sólido según Rigo *et al.* (2010), representa una alternativa atractiva para la producción de enzimas a partir de microorganismos, debido a que la misma ofrece la posibilidad de utilizar residuos agroindustriales o subproductos como fuentes de nutrientes. En décadas pasadas se consideraba este proceso como tecnológicamente simple, sin embargo, hoy en día es una alternativa muy prometedora, no solo para la producción de alimento animal sino también con otros usos: farmacéuticos, biorremediación y biodegradación de compuestos peligrosos (Singhania *et al.*, 2009). La FES posee numerosas ventajas sobre la FSm entre las que se puede mencionar la obtención de un crudo enzimático más concentrado, lo que es de especial interés cuando sus productos pueden utilizarse directamente sin etapas previas de purificación. Como ejemplos de esto, se puede citar la elaboración de aditivos en la alimentación mediante la hidrólisis de materias lignocelulósicas y el procesado natural de fibras (Díaz, 2009). Ramírez *et al.* (2017) recomiendan el uso de los residuos agrícolas e industriales, como una fuente importante de biomasa para utilizarse en la alimentación animal. La FES permite el enriquecimiento de estos residuos y mejora su digestibilidad.

#### **4.6. Principales enzimas utilizadas en la avicultura.**

Entre las enzimas exógenas que más se han utilizado en la alimentación animal se encuentran las carbohidrasas, las fitasas y las proteasas. La inclusión de estas enzimas en las dietas de las especies monogástricas generó gran interés en los últimos años y tuvo una repercusión positiva en los indicadores productivos de estas especies (Asmare, 2014).

Las fitasas catalizan la hidrólisis del ácido fítico de una forma gradual. Se han utilizado en la alimentación animal para mejorar la disponibilidad de fósforo y

disminuir la contaminación con este mineral en los desechos de los animales (Borgi *et al.*, 2015).

Las enzimas  $\beta$ -mananasas hidrolizan los mananos en oligosacáridos (Zuluaga *et al.*, 2017). Tienen efectos como promotores de la salud y el crecimiento de los animales (Seo *et al.*, 2016).

Las xilanasas son enzimas implicadas en la degradación del xilano, hidrolizan los enlaces internos  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) entre moléculas de xilosa y dan lugar a una mezcla de xilooligosacáridos de diferente tamaño. Su aplicación en la industria alimentaria permite la bioconversión de materiales celulósicos en alimentos para aves de corral, con mejores tasas de digestión y absorción de nutrientes (Matos *et al.*, 2018).

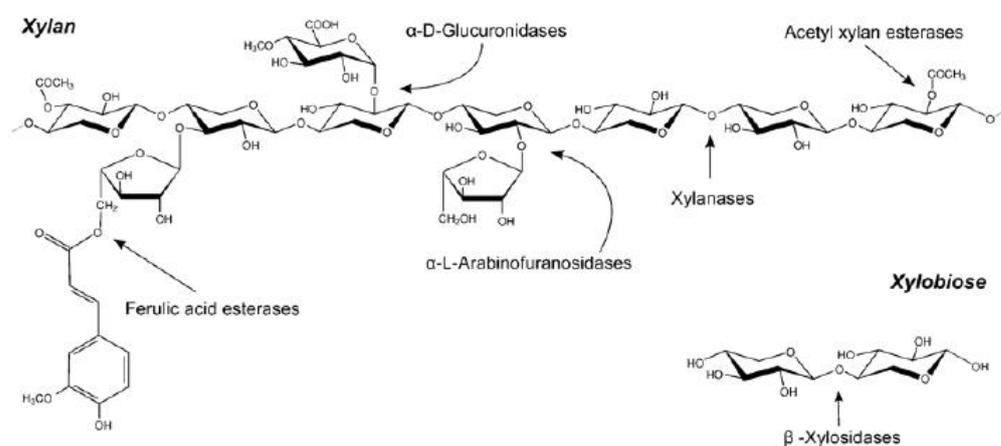


Figura 1. Enzimas xilanólíticas implicadas en la hidrólisis del xilano. (Tomado de Pastor *et al.*, 2007).

Las proteasas, también denominadas peptidasas, son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas. La suplementación con estas enzimas en las dietas de pollos aumenta el valor nutricional de una gran variedad de proteínas, así como su digestibilidad, y complementan la actividad de las enzimas digestivas endógenas como la pepsina, la tripsina y otras proteasas pancreáticas (Martínez-Alesón *et al.*, 2010).

La tabla 1 muestra un resumen de las enzimas más empleadas con el propósito de incrementar los rendimientos productivos en las aves.

Tabla 1. Principales enzimas exógenas utilizadas en la alimentación de las aves, sustrato sobre el que actúan y sus efectos (Bedford, 2000).

Enzimas	Sustrato	Efecto
Xilanasas	Arabinosilanos	Reducción de la viscosidad de la digesta.
Glucanasas	$\beta$ -Glucanos	
Pectinasas	Pectina	
Celulasas	Celulosa	Mejora la digestibilidad de la celulosa.
Proteasas	Proteínas	Mejora la degradación de las proteínas
Amilasas	Almidón	Mejora la degradación de los componentes amiláceos
Fitasas	Ácido fítico	Mejora el aprovechamiento del fósforo vegetal
Galactosidasas	$\alpha$ -galactósidos	Eliminación de los galactósidos

#### 4.7. Actualidad en el uso de las enzimas en nutrición de aves.

El concepto de usar enzimas en los alimentos no es nuevo, su aplicación de forma comercial en la industria avícola, como una nueva clase de aditivos se inició a finales de los años 80. Los países pioneros en su aplicación fueron los escandinavos, Gran Bretaña, Canadá y España. Su uso exitoso se informa después de 1992 (Brufau, 2014).

A inicio de los años 1990, la aplicación de enzimas microbianas se extendió al uso de las fitasas. En principio se usaron para dar respuesta a una alta preocupación medioambiental por la presencia de fósforo en las excretas de los animales y luego para demostrar la eficacia de varias fitasas para liberar, en diferentes proporciones, el fósforo presente en el fitato de los ingredientes vegetales. (Chot, 2006; Ravindran, 2010).

La primera aplicación de las enzimas xilanasas y  $\beta$ -glucanasas tuvo como propósito degradar los compuestos viscosos que afectaban el valor nutricional de los granos de los cereales (avena, cebada, centeno, trigo, y triticale) como son los polisacáridos no amiláceos de la pared celular del endospermo (Bedford y Partridge, 2010).

En las últimas décadas se ha extendido el uso de las enzimas en la alimentación animal de forma tal que su mercado en el 2016 en Estados Unidos fue de 1 100 millones de dólares y se prevé que superará los 2 millones de dólares para el año 2024 (Global MarketInsights, Inc, 2017).

En la alimentación de las especies monogástricas actualmente se emplean varios ingredientes con diferentes estructuras químicas, por lo que se recomienda emplear una combinación de enzimas. Estos cocteles enzimáticos mostraron efectos superiores en el desarrollo de los animales al compararlos con los que contienen solo una enzima (Dudley-Cash, 2014; Amerah *et al.*, 2016).

La combinación de enzimas que hidrolizan los PNA como xilanasas,  $\beta$ -D-glucanasas, celulasas, mananasas y pectinasas aumentó el rendimiento de los pollos. Estos resultados están asociados a una mayor ingestión de alimentos y conversión alimenticia que conllevó al incremento en la ganancia de peso (Nikan, 2017).

Por otra parte, el empleo de los aditivos enzimáticos en la alimentación animal representa una opción prometedora desde el punto de vista económico, ambiental y de sostenibilidad (Asmare, 2014). Su uso ofrece nuevas oportunidades en el mercado para cultivos como la canola, el girasol y el algodón, al favorecer el aprovechamiento de las propiedades nutricionales de estas fuentes alternativas (Souza *et al.*, 2014).

#### **4.8. Efecto de las enzimas en la salud animal.**

Los aditivos enzimáticos inducen cambios en la microbiota intestinal que repercuten beneficiosamente en la salud de los animales que los consumen. Entre los principales efectos que provocan se encuentran; el incremento de los nutrientes liberados del hospedero, la formación de oligosacáridos fermentables como resultado de la despolimerización de la fibra insoluble y la aceleración de la digestión que produce un rápido movimiento de los carbohidratos fermentables y las proteínas (Bedford and Cowieson, 2012).

Upadhaya *et al.* (2016) comprobó que la adición de enzimas a dietas basadas en maíz y harina de soya para la alimentación de cerdos en crecimiento, tuvo efectos positivos. Se apreció una reducción del número de coliformes fecales y una tendencia a disminuir la emisión de  $\text{NH}_3$  de las heces después de 24 h de fermentación.

Varios son los ejemplos que demuestran los efectos positivos de la suplementación de enzimas sobre los indicadores de la salud de los animales, algunos de los cuales se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Efectos de la suplementación de enzimas en la salud de los animales.

Enzimas	Especie animal	Efecto	Fuente
Combinación de productos multienzimáticos con preparados microbianos que contienen <i>Bacillus</i>	Pollos	Mejóro el bienestar animal y redujo las lesiones en las patas.	(Dersjant, <i>et al.</i> , 2015).
$\beta$ - mananasa	Aves	Mejora la digestión y la salud intestinal	(Bedford, 2000).
Mananasas	Pollos de ceba	Producción de oligosacáridos de manano con efecto prebiótico	(Yamabhai <i>et al.</i> , 2016)

#### 4.9. Efecto de las enzimas en indicadores productivos de los animales.

La suplementación con la enzima  $\beta$ -mananasa en dietas de pollos provocó una disminución en la ingestión de alimentos, lo cual debe estar asociada a la mejora de la absorción de nutrientes, el decrecimiento de la viscosidad de la digesta y el incremento de la altura de las vellosidades en el duodeno. Este último factor indica que la absorción de nutrientes se incrementó. También se comprobó que la adición de esta enzima mejoró la ganancia de peso y la conversión alimentaria (Imran *et al.*, 2014).

Sun *et al.* (2015) empleó un aditivo enzimático con actividad xilanasa, glucanasa y mananasa en la dieta de pollos y observó mejoras en la salud de pollos desafiados con *Clostridium perfringens*. Adicionalmente se logró atenuar los retardos en el crecimiento de los animales enfermos.

Algunos de los efectos positivos en los indicadores productivos de los animales se pueden apreciar en la tabla 3.

Tabla 3. Efectos de la suplementación de enzimas en los indicadores productivos de los animales.

Enzimas	Especie animal	Efecto	Fuente
$\beta$ -mananasa	Cerdos en crecimiento	Mejora la digestión y el crecimiento	Kim <i>et al.</i> (2017)
$\beta$ -mananasa	Novillas	Incremento del crecimiento y de la eficiencia de la alimentación.	Seo <i>et al.</i> (2016)
Mezcla de enzimas fitasa, xilanasas, celulasas, proteasas y amilasas	Gallinas ponedoras	Mejora el coeficiente de retención del tracto del extracto etéreo	Weng <i>et al.</i> (2012)

#### 4.10. Digestibilidad

La digestibilidad se define como la fracción del alimento que se consume y no aparece en las heces de los animales; por lo tanto se absorbe en el tracto gastrointestinal. Sirve como una medida para determinar la calidad de la dieta y de las materias primas utilizadas en ella, la disponibilidad de los nutrientes que las constituyen y la importancia que tienen estos en la salud de los animales. Existen técnicas *in vitro* e *in vivo* que permiten determinar la digestibilidad de carbohidratos, fibra y proteínas. Los ensayos *in vivo* en pollos son caros y consumen mucho tiempo para realizarse (Osorio-Carmona *et al.*, 2012; Karunaratne *et al.*, 2018).

En un estudio donde se emplearon distintos niveles de cáscara de arroz en dietas para pollos y se aplicaron diferentes productos comerciales que contenían enzimas, se comprobó que al incrementar los niveles de este subproducto en la dieta y en ausencia de la suplementación enzimática produjo una disminución de la digestibilidad de los nutrientes, especialmente de la proteína y la fibra. En este caso se emplearon modelos para determinar este parámetro *in vitro* e *in vivo* (Alabi *et al.*, 2015).

La aplicación de dosis entre 0-0,05 % de la enzima  $\beta$ -mananasa en dietas preparadas a base de soya y maíz en pollos provocó una disminución de la proteína bruta en el contenido ileal a medida que se incrementó la dosis de la enzima empleada. Un comportamiento semejante se encontró en la energía

bruta, lo cual refleja una utilización más eficiente de la misma (Musini *et al.*, 2011).

La adición de enzimas a dietas en las cuales los ingredientes se sometieron a procesamiento térmico disminuyó en tres veces de la viscosidad de las mismas al compararla con dietas sin procesar. El efecto de la adición de enzimas sobre la digestibilidad de la fibra fue de 1,5-6 veces mayor cuando se aplicó calor a la dieta comparado con dietas sin procesar (Vriesea *et al.*, 2011).

.

# *OBJETIVOS*



## **5. Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto de un crudo enzimático obtenido de *Bacillus subtilis* E44, sobre la digestibilidad de la fibra de la dieta para pollitas de remplazo de ponedoras y en sus indicadores productivos.

### **Objetivos específicos**

- ✓ Evaluar *in vitro* e *in vivo* la digestibilidad de la fibra de la dieta para pollitas de reemplazo de ponedoras tratada con el crudo enzimático.
- ✓ Determinar el efecto de la aplicación del crudo enzimático en los indicadores productivos y de salud de pollitas de remplazo de ponedoras.

# *RESULTADOS ESPERADOS*



## **6. Resultados esperados**

- ✓ Incremento de la digestibilidad de la fibra de la dieta de pollitas de remplazo de ponedoras.
- ✓ Incremento de los indicadores productivos de pollitas de remplazo de ponedoras en un 5%.
- ✓ Publicación de un artículo científico en una revista de alto impacto.
- ✓ Participación en un evento científico nacional y uno internacional.
- ✓ Formación de dos estudiantes de pregrado y uno de posgrado.
- ✓ Capacitación de los trabajadores que laboran en las unidades productivas donde se realizará la evaluación del crudo enzimático.

*MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS.  
CRONOGRAMA DE TRABAJO.*



## **7. Métodos y procedimientos. Cronograma de trabajo.**

El proyecto se desarrollará en cinco etapas:

### **Primera etapa: Familiarización con el tema del proyecto.**

En esta etapa se identificarán los recursos humanos que formarán parte del equipo que trabajará en la ejecución del proyecto. En el mismo participarán profesores del Centro de Estudios Biotecnológicos e investigadores del Instituto de Ciencia Animal y estudiantes del grupo científico estudiantil de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. Se estudiará la información disponible acerca de las técnicas y procedimientos a emplear en el proyecto. Se realizará una revisión bibliográfica sobre el empleo de las enzimas en la alimentación avícola que comprenderá los siguientes aspectos:

- La producción avícola en Cuba.
- Polisacáridos no amiláceos.
- Las enzimas en la nutrición de aves.
- Fuentes de obtención de enzimas.
- Procesos fermentativos para la producción de enzimas.
- Principales enzimas utilizadas en la avicultura.
- Actualidad en el uso de las enzimas en nutrición de aves.
- Efecto de las enzimas en la salud animal.
- Efecto de las enzimas en indicadores productivos de los animales.
- Digestibilidad.

Fecha de Ejecución: enero del 2020 junio 2020.

### **Segunda etapa: Producción del crudo enzimático.**

Esta etapa se realizará en el Laboratorio de Microbiología y en el de Tecnología Enzimática de la Universidad de Matanzas. Primeramente, se refrescará la cepa de *Bacillus subtilis* E44 y se preparará el preinóculo, el cual se incubará durante toda la noche a 37 °C.

#### **Preparación del inóculo.**

El preinóculo se inoculará en caldo nutriente y se incubará hasta obtener una densidad óptica de 0,8 a 600 nm de longitud de onda. Posteriormente se procederá a realizar la fermentación en estado sólido, con el empleo del bagazo de caña de azúcar como sustrato; la humedad será del 80 % con una

concentración de inóculo del 20 %. Se empleará una solución mineral con un pH de 7,5.

La extracción del crudo enzimático se realizará con agua destilada. Para desarrollar este proceso los erlenmeyers con el contenido de la FES se colocarán en una zaranda a 110 rpm durante 60 minutos. La solución resultante se filtrará a través de una gaza doble y se centrifugará a 10 000 rpm, durante 15 minutos a 4 °C.

Se cuantificarán las actividades enzimáticas de mananasas, xilanasas y celulasas, según el método descrito por Bailey *et al.* (1992). Se emplearán como sustratos el galactomanano, el xilano de haya y la carboximetilcelulosa respectivamente.

Fecha de Ejecución: septiembre del 2020-febrero del 2021.

**Tercera etapa: Evaluación del efecto del crudo enzimático en la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de la dieta para pollitas de remplazo de ponedora.**

**Digestibilidad fecal *in vitro* aparente de la fracción fibrosa.**

En esta etapa se empleará la metodología descrita en el “Manual de técnicas para los estudios de digestibilidad *in vitro* en aves, conejos y cerdos” elaborado por el Instituto de Ciencia Animal. La dieta se debe moler hasta obtener un tamaño de partícula de 1 mm. Se pesarán 2 g de cada tratamiento en las bolsas de muselina.

Los tratamientos experimentales consistirán en: Grupo control: dieta sin adicionar el extracto enzimático y Tratamiento: dieta tratada con 50 UI.mL<sup>-1</sup> de actividad mananasa por gramo de dieta.

Para los estudios del uso del contenido fecal de cerdo se debe preparar una disolución tampón con la que se elaborarán los inóculos. Esta debe tener un pH entre 6,7 y 6,9, una temperatura de 38 a 39 °C y mantenerse bajo condiciones de anaerobiosis con el uso de corrientes continuas de CO<sub>2</sub>.

La disolución tampón está compuesta por (NaHCO<sub>3</sub>, 42,50 g.L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 17,65 g.L<sup>-1</sup>; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 02,46 g.L<sup>-1</sup>; NaCl, 04,99 g.L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 02.46 g.L<sup>-1</sup>).

Se pesarán 500 g de heces por cada dos litros de inóculo a preparar, se diluirán con suficiente disolución tampón y se filtrarán en una muselina con una porosidad entre 48 a 100 µm. Posteriormente se centrifugarán a 4 000 rpm

durante 10 min. Se tomará el sobrenadante y se mantendrá en anaerobiosis, se completará con disolución tampón según el volumen calculado y se someterá a una corriente de CO<sub>2</sub> en baño termostático a 39 °C hasta lograr un pH de 6,9.

Para iniciar la fase fecal se adicionarán 100 mL a cada tubo de incubación y se colocarán de forma aleatoria en la incubadora a 39 °C durante 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación se retirarán todas las bolsas de muselina y se lavarán con agua destilada tres veces y posteriormente con etanol a 96°. Las bolsas se colocarán en la estufa a 60 °C por 48 h. Posteriormente se determinará la MS (materia seca) a partir de la metodología descrita por la AOAC (1995) y la FDN (fibra detergente neutra) según (Goering y Van Soest, 1970).

Para determinar la digestibilidad se tendrá en cuenta el cálculo de la materia seca del alimento y la materia residual.

Fecha de Ejecución: de marzo 2021 - diciembre del 2021.

#### **Digestibilidad fecal *in vivo* aparente de la fracción fibrosa.**

Se utilizarán 32 pollitas de remplazo de ponedoras. Se alojarán de manera aleatoria en jaulas individuales para metabolismo de alambre galvanizado cuyas dimensiones son de 40 x 40 x 40 cm.

Los tratamientos experimentales consistirán en: Grupo control: dieta sin la adición del extracto enzimático y tratamiento: dieta con la adición del crudo enzimático a una dosis de 50 UI.mL<sup>-1</sup> por gramo de dieta.

Durante 7 días las aves se adaptarán a las jaulas y al consumo de las dietas. En este período dispondrán de alimento y agua a voluntad. Posteriormente, durante cinco días, se ofertará el alimento en dos raciones: mañana y tarde. Se controlará el rechazo para calcular el consumo de alimentos. Se recolectarán, además, las heces de los animales. Una vez terminado el muestreo de los materiales biológicos se conformará una mezcla de las excretas que se conservará en congelación a -20°C hasta el momento en que se analizarán.

Las excretas se secarán en una estufa a 60°C y se molerán en un molino a tamaño de partícula de 1 mm, para determinar MS materia seca, FDN, Fibra ácida detergente (FDA), hemicelulosa y celulosa. La FDN y FDA se determinarán según (Goering y Van Soest, 1970) y la MS a partir de la metodología descrita por la AOAC (1995).

Para calcular la digestibilidad fecal aparente se tendrá en cuenta el consumo de alimentos y las excretas.

Fecha de Ejecución: de enero 2022 - julio del 2022

**Cuarta etapa: Evaluación del efecto de la aplicación del crudo enzimático en los indicadores productivos de pollitas de remplazo de ponedoras.**

El experimento se desarrollará en una granja avícola de la provincia de Matanzas. Se utilizarán pollitas de remplazo de ponedoras. Se empleará un diseño completamente aleatorizado en el cual se usarán dos grupos: Dieta basal, sin suplementación enzimática (grupo control) y dieta basal con la adición del extracto enzimático. La composición de la dieta será la siguiente:

Tabla 4: Composición de la dieta para pollitas de reemplazo de ponedoras.

<b>Componentes de la dieta</b>	<b>(%)</b>
Maíz	56.00
Soya	14.15
Salvado de Trigo	26.00
Fosfato monocálcico	1.25
Carbonato de calcio	1.60
Sal común	0.30
DL Metionina	0.17
Lisina	0.10
Colina	0.13
Premezcla vitaminas <sup>(1)</sup> –minerales <sup>(2)</sup>	0.30
<b>Aporte de nutrientes calculado</b>	
Proteína Bruta	14.55
Energía metabolizable (MJ·kg <sup>-1</sup> )	2 760
Fibra bruta	4.07
Fósforo disponible	0.41
Calcio	0.91

Se evaluará el efecto del crudo enzimático en los indicadores productivos: consumo de alimentos, peso vivo y ganancia media diaria, a las 6, 12 y 18 semanas de edad (Piad, 2001). También se evaluarán los indicadores de salud mortalidad y viabilidad durante el desarrollo del experimento. La selección de las aves se realizará basándose en el peso promedio de cada grupo de aves.

Para la determinación del peso vivo y la ganancia media diaria, se pesarán individualmente todas las aves en cada etapa.

Fecha de Ejecución: de septiembre del 2022- julio del 2023.

**Quinta etapa: Análisis de los resultados de los experimentos.**

Los resultados de los experimentos realizados se analizarán en la etapa de septiembre del 2023-diciembre del 2023.

# *RECURSOS NECESARIOS*



## 8. Recursos necesarios

Para la realización de este proyecto se llevó a cabo un levantamiento de todos los recursos necesarios para producir el extracto enzimático de los que se dispone en la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

El Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas posee la cepa de *Bacillus subtilis* E44 que se emplea para obtener el crudo, la cual está conservada a -30 °C en glicerol. El laboratorio de Tecnología Enzimática dispone del equipamiento necesario para las determinaciones bioquímicas que se realizan en la evaluación de la actividad del producto. (Tabla 5).

Tabla .5 Recursos disponibles para la preparación del crudo enzimático en el Laboratorio.

Recursos disponibles	UM	Cantidad
Mechero	U	1
Guantes	U	50
Gabinete de flujo laminar	U	1
Molino de martillos tipo Fritsch Modelo GmbH	U	1
Estufa	U	1
Zaranda	U	1
Incubadora	U	1
Autoclave	U	1
Centrífuga	U	1
Refrigerador	U	1
Erlenmeyer de 2 L	U	15
Volumétricos de 500 mL.	U	15
Gasa	m	10

En la tabla 6, se presentan los recursos humanos necesarios para llevar a cabo el proyecto.

Tabla 6. Recursos humanos necesarios para la investigación.

Nombres y apellidos	Grado científico	Categoría docente
Aymara Valdivia Ávila	Dr.C	PT
Madyu Matos Trujillo	M.Sc.	PT
Yasmery Rubio Fontanills	-	PI
Yunel Pérez Hernández	M.Sc.	PT
Loretta Brito Pérez		Esp
Zoraya Rodríguez	Dr. C	-
LianetCarbot Solís	-	Est

PT: profesora titular, PA: profesora auxiliar, PI: Profesor instructor, Esp: especialista de apoyo a la docencia y la investigación, Est: estudiante.

Los reactivos a emplear en la preparación del crudo enzimático son importados, por tanto para la adquisición de los mismos se incurre en un gasto en dólares (USD) de \$ 817,00 (Tabla 7) según el precio unitario que se informa en los sitios Web: <https://spanish.alibaba.com>, <https://mercadolibre.com.mx/> y <https://sigmaaldrich.com/>.

Tabla 7. Costos totales de los reactivos a emplear en la preparación del crudo enzimático.

Reactivos	Unidades a emplear	Costo unitario (USD)	Costo total (USD)
NaCl	1 frasco	1,72	1,72
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 frasco	2,53	2,53
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 frasco	1,07	1,07
MgSO <sub>4</sub>	1 frasco	1,80	1,8
Urea	1 frasco	74,24	74,24
Caldo nutriente	1 frasco (500g)	98,69	98,69
Peptona	1 frasco	3,37	3,37
Extracto de levadura	1 frasco (100g)	6,00	6,00
Galactomanano	1 frasco	354	354
Xilano de haya	1 frasco (100g)	118,40	118,40
Carboximetilcelulosa	1frasco (1kg)	2,50	2,50
NaHCO <sub>3</sub>	1 frasco, (1kg)	80,50	80,50
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 frasco(1kg)	2,50	2,50
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 frasco (1kg)	69	69
<b>Totales</b>		<b>816,32</b>	<b>816,32</b>

# *PRESUPUESTO.*



## 9. Presupuesto

En el proyecto se estiman otros gastos en moneda nacional (MN) a partir de informaciones referidas por la Dirección de Economía de la Universidad de Matanzas que se muestran en la tabla 8.

Tabla 8: Gastos en moneda nacional estimados en el proyecto.

Partidas	Año 2019	Año 2020	Año 2021	Total
<b>11- Materias primas y materiales</b>	<b>400,00</b>	<b>400,00</b>	<b>400,00</b>	<b>1 200,00</b>
<b>30- Combustibles y lubricantes</b>		<b>200,00</b>	<b>400,00</b>	<b>600,00</b>
Combustibles		200,00	400,00	600,00
<b>80- Otros gastos</b>	<b>1 000,00</b>	<b>5 400,00</b>	<b>9 500,00</b>	<b>15 900,00</b>
Viáticos	1 000,00	4 000,00	8 000,00	13 000,00
Otros servicios contratados		500,00	500,00	1 000,00
Otros gastos		900,00	1000,00	1 900,00
<b>Total</b>	<b>1 400,00</b>	<b>6 000,00</b>	<b>10 300,00</b>	<b>17 700,00</b>

A partir de la aplicación del crudo enzimático se logrará mejorar la digestibilidad de la fibra de la dieta para las pollitas de reemplazo de ponedoras. El incremento de este parámetro dará lugar a un aumento paulatino de la ganancia media diaria del peso y permitirá que se alcance en un menor tiempo el peso vivo necesario para pasar a la categoría de gallinas ponedoras. En este caso se estimó un incremento de un 5 % en los indicadores a evaluar en el proyecto (Tabla 9).

Tabla 9. Estimación del incremento de los indicadores productivos de las pollitas de reemplazo después de la aplicación del crudo enzimático.

Indicadores	Sin enzima	Con enzima
Ganancia media diaria (g/ave/día)	8,6	9,0
Peso vivo (g)	1180	1239

*VALORACIÓN DEL IMPACTO  
ECONÓMICO- MEDIOAMBIENTAL  
DEL PROYECTO.*



## **10. Valoración del impacto económico- medioambiental del proyecto.**

La ejecución de este proyecto de investigación permitirá que el país disponga de un nuevo aditivo nutricional para emplearse en la avicultura. La aplicación de este producto mejorará la digestibilidad de las dietas utilizadas en pollitas de remplazo, lo cual repercutirá en el incremento de los indicadores productivos de esta categoría y en la obtención de mayores producciones de huevos en las ponedoras.

Con la utilización de este aditivo también se podrán emplear subproductos de la agroindustria y otras materias primas los cuales tienen un costo menor que las que tradicionalmente se utilizan en la alimentación avícola. Además se contribuirá al aprovechamiento de productos de desecho que en muchas ocasiones se convierten en contaminantes del medio ambiente.

Las metodologías de obtención y aplicación del crudo enzimático que se deriven de este trabajo de investigación podrán utilizarse en la instrucción y capacitación de los trabajadores que laboran en el sector avícola, lo que contribuirá a incrementar su preparación en esta temática. Las publicaciones y participaciones en eventos científicos que realicen los investigadores del proyecto permitirán difundir los resultados científicos obtenidos en la provincia y la Universidad.

# *REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS*



## 11. Referencias bibliográficas

- Alabi, O.O.; Atteh, J.O. ; Adejumo, I.O. 2015. Digestibility of dietary levels of rice Husk supplemented with or without commercial enzymes. *International Journal of Research in agriculture and Forestry* .2 (6): 15-19.
- Asmare, B. 2014. Effect of common feed enzymes on nutrient utilization of monogastric animals. *Int. J. Biotechnol. Mol. Biol. Res.* 5 (4): 27-34.
- Amerah, A. M.; Romero, L.F.; Awati, A.; Ravindran, V. 2016. Effect of exogenous xylanase, amylase, and protease as single or combined activities on nutrient digestibility and growth performance. *Poultry Science* 0:1–10.
- AOAC (1995). *Official Methods of Analysis of the AOAC international*, 16<sup>th</sup> Edition. Association of Official Analytical Chemists International. Washington, DC, USA.
- Báez, N. 2015. La cadena de valor agregado avícola en Cuba: elementos a considerar para su proyección estratégica. Tesis de diplomado, Facultad de Economía de la Universidad de La Habana, Cuba.
- Báez Quiñones, Nadia y Oramas Santos, Onailis. 2018. El enfoque de cadenas de valor: una necesidad en el sector avícola cubano. *Economía y Desarrollo* 159(1): 154- 165.
- Bailey, M.; Biely, P. and Poutanen, K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*. 23:257-270.
- Bedford, M.R. & Classen, H.L. 2000. The influence of dietary xylanase on intestinal viscosity and molecular weight distribution of carbohydrates in rye-fed broiler chick. p. 361–370.
- Bedford, M.R. and Cowieson, A. J. 2012. Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. *Animal Feed Science and Technology*. 173:76– 85.
- Bedford, M.R. & Partridge, G. 2010. *Enzymes in farm animal nutrition*. Second Edition, ED. CAB International, London, UK, p .12-129.
- Bejerano, G. 2011. Evaluación del sistema de alojamiento para gallinas ponedoras White Leghorn L-33 en condiciones de producción comercial. *Revista Cubana de Ciencia Avícola*. 35 (1): 69.

- Borgi, M.A., Boudebouze, S., Mkaouar, H., Maguin, E., and Rhimi, M. 2015. *Bacillus* phytases: Current status and future prospects. *Bioengineered* 6(4): 233-236.
- Brandao, M. 2003. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. Florianópolis. Tesis en opción al grado de doctor en Ingeniería Química. Universidad Federal de Santa Catarina.
- Brufau, J. 2014. Introducción al uso de las enzimas en la alimentación animal un proceso de innovación. *Nutrínnews*. Noviembre: 17-21.
- Bustamante, V. Producción avícola y automatización encuentran sus caminos en Cuba. *Granma*. 6 de junio de 2019. Disponible en: <http://www.granma.cu/cuba/2019-06-06/produccion-avicola-y-automatizacion-encuentran-sus-caminos-en-cuba-06-06-2019-18-06-14>. [Consulta:10 de junio de 2019].
- Cheng, L.; Duan, S.; Feng, X.; Zheng, K.; Yang, Q. & Liu, Z. 2016. Purification and Characterization of a Thermostable  $\beta$ -Mannanase from *Bacillus subtilis* BE-91: Potential Application in Inflammatory Diseases. *BioMed. Research International*: 1-7.
- Chot, M. 2006. Enzymes for the feed industry: past, present and future. *World's Poultry Science Journal*. 62:5-15.
- De Paz, M. 2007. Evaluación de dos complejos enzimáticos en el comportamiento productivo de pollos de engorde alimentados con una dieta a base de maíz y pastas de soya bajo condiciones comerciales. Trabajo de Diploma en opción al título de Licenciada Zootecnista. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Dersjant -Li, Y.; Van de Belt, K.; Van der Klis, J.D.; Kettunen, H.; Rinttil, T.; Awati, A. 2015. Effect of multi-enzymes in combination with a direct-fed microbial on performance and welfare parameters in broilers under commercial production settings. *Journal of Applied Poultry. Research*. 24:80–90.
- Díaz, A. 2009. Reciclado del orujo de uva como medio sólido de fermentación para la producción de enzimas hidrolíticas de interés industrial. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias. Universidad de Cádiz. España.

- Dudley-Cash, B. 2014. La respuesta de las aves a las enzimas NSP varían. Selecciones avícolas. Enero: 16-18.
- FAO. 2010. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura. Rischkowsky, Barbara. y Pilling, D. Eds. Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-a1250s.pdf>. [Consulta:23 de mayo de 2019].
- Galarza, J.I. 2017. Rendimientos productivos en gallinas ponedoras alimentadas con torta de palmiste (*Elaeis guineensis*) y enzimas  $\beta$ -glucanasa y xilanas. Tesis para optar el grado de maestro magister scientiae en producción animal. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Guerra, J. J. 2015. Evaluación del uso de dietas con tres niveles de enzimas digestivas en la alimentación de cuyes en la fase de crecimiento y finalización. Tesis en opción al grado científico de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Central del Ecuador.
- Graham, H y Bedford, M. 2007. Using enzymes to improve energy utilization in animal feeds. 15<sup>th</sup> Annual ASAIM Southeast Asian Feed Technology and Nutrition Workshop. May 27-30, 2007, Conrad Bali Resort. Indonesia.
- Garg. S. 2016. Xylanase: Applications in Biofuel Production. Current Metabolomics.4: 23-37.
- Global Market Insights, Inc. 2017. El Mercado de enzimas de alimentación animal superará los \$ 2 mil millones en 2024. Disponible en: <https://www.engormix.com/MA-balanceados/noticias/mercado-enzimas-alimentacion-animal-t23461/p0.htm>. [Consulta: 18 de junio de 2019].
- Goering, H.K. y Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures and some applications). US Department of Agriculture. Agricultural Handbook. pp. 379.
- Gutiérrez, M.A. 28 de marzo de 2017. Cuba: Sector de postura se recupera. aviNews. Recuperado de: <https://avicultura.info/cuba-sector-de-postura-se-recupera/>. [Consulta: 2 de junio de 2019].
- Hamann, P.R.; Serpa, D.; Souza, A.; Camargo, B.; Ofuji, K.; Valle de Sousa, M, Felix, C.R.; Miller,R.; Noronha, E. F. 2015. Evaluation of plant cell wall degrading enzyme production by *Clostridium thermocellum* B8 in the

presence of raw agricultural wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation* 105: 97-105.

- Hernández, V. F. 2013. Propuesta para lograr una mayor eficiencia en la producción de huevos. Tesis de diplomado en Gestión Empresarial, Escuela Superior de Cuadros del Estado y el Gobierno, La Habana, Cuba.
- Hidalgo, K. 2011. Evaluación de la vinaza concentrada de destilería como aditivo en pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Ministerio de Educación Superior. Instituto de Ciencia Animal. Mayabeque
- Imran, M.; Pasha, N.; Akram, S.M.; Mehmood, K. & Sabir, A.J. 2014. Effect of  $\beta$ -Mannanase on Broilers Performance at different dietary energy levels. *Global Veterinaria*. 12 (5): 622-626.
- Karunaratne, N. D.; Dawn, A.; Chibbar, R. N.; Hucl, P. J.; Pozniac, C. J. y Classen, H. L. 2018. In vitro assessment of the starch digestibility of western Canadian wheat market classes and cultivars. *Canadian Journal of Animal Science*. 98(3): 463-476.
- Kim, M., Khan, M., Cheol, J. 2017. Antimicrobial and antioxidant peptide from *Bacillus* strain CBS73 isolated from Korean food. *J. Chosun Natural Sci.* 10 (3): 154 – 161.
- Llanes, F.D. 2018. Efecto del extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44 sobre una dieta para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras. Tesis en opción al grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”.
- Martínez-Alesón , R.; Korsbak A.; Brugger, R. y Pontoppidan, K. 2010. Proteasas para alimentación de las aves. *Selecciones avícolas*. Noviembre, 37-39
- Matos, M. M., Valdivia, A., Rodríguez, Z., Boucourt, R., Brizuela, M. A., Portilla, Y., Rubio, Y. and. Ramírez, H. L. 2018. Production of xylanases by *Bacillus subtilis* E44 under submerged fermentation conditions. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 52 (3): 1–8.
- Meima, R.; Van Dijn, J.M.; Holsappel, S., Bron, S. 2004. Expression systems in *Bacillus*. In: *Expression technologies: current status and future trends* Edited by: Baneux F. Wyomondham, UK. Horizon Scientific Press.

- Milián, Grethel.; Rondón, Ana Julia.; Pérez, M.; Bocourt, R.; Rodríguez, Marlen.; Arteaga, Fátima.; Portilla, Yadileiny; Pérez, Y.; Beruvides, A. y Laurencio, Martha. 2017. Caracterización de cepas *Bacillus subtilis* como candidatas para la elaboración de aditivos zootécnicos. Cuban Journal of Agricultural Science. 51(2): 1-8.
- MINREX 2003. Presentación del gobierno cubano al 58 Período de Sesiones de la Asamblea General de Naciones Unidas. Octubre-noviembre.
- Mussini, F.J.; Coto, C. A. ; Goodgame, S. D. ; Lu, C. ; Karimi, A. J. ;Lee, J.H. y Waldroup, P.W. 2011. Effect of beta-Mannanase on nutrient digestibility in Corn-Soybean meal diets for broilers Chicken. International Journal of Poultry Science. 10 (10): 774-777.
- Nikam, M.G., Ravinder, V., Raju<sup>1</sup>, M.V.L.N., Kondal, K. &Narasimha, J. 2017. Effect of dietary supplementation of Non Starch Polysaccharide hydrolyzing enzymes on performance of broilers fed diets based on guar meal, rape seed meal and cotton seed meal. International Journal of Livestock Research. 7 (2): 2277-1964.
- Nova, A. 2012: La agricultura cubana y el actual proceso de transformaciones económicas. Desde la Isla, [12/06/2019].
- Osorio-Carmona, E.; Giraldo-Carmona, J. y Narváez-Solart, W. 2012. Metodologías para determinar la digestibilidad de los alimentos utilizados en la alimentación canina. Veterinária e Zootecnia. 6 (1): 87-97.
- Pampín, M. 2001. Contribución de la gallina semirústica al incremento de los recursos genéticos.
- Pastor, F. L. J.; Gallardo. O.; Sanz-Aparicio, J., & Díaz. 2007. Industrial Enzymes. J. Polaina and A.P. MacCabe. Eds. Dordrecht. Springer Netherlands.
- Pérez, M.; Pérez, L.; Urquiaga, I.; Cruz, A.; Acosta, Z.; Puñales, O.; Leyva, V.; Medina, J.; Cintas, N.; Luna, M.; Felipe, L.; Rivera, M.; Tejedor, R.; Diago, E. y Hernández, D. 2013. El Análisis de Riesgos como Base de los Sistemas de Inocuidad de los Alimentos: producción e importación avícola en cuba. La Habana, Cuba: Centro de Gestión y Desarrollo de la Calidad

(CGDC) y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). pp. 154-155.

- Piad, R.E. 2001. Evaluación de la probiótica de un hidrolizado enzimático de crema de destilería en pollitas de reemplazo de ponedoras. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos".
- Ramírez, A.; y Ruíz Santa Cruz, D. 2007. El huevo en Cuba: ¿Necesidad o Alternativa? Revista de La Asociación Cubana de Producción Animal. (2): 41–44.
- Ramírez, J y Ayala, M. 2014. Enzimas ¿qué son y cómo funcionan? Revista Digital Universitaria. 15(12):1607-6079.
- Ramírez, V.; Peñuela, L.; Pérez, M. 2017. Los residuos orgánicos como alternativa para la alimentación en porcinos. Revista de Ciencias Agrícolas. 34(2): 107-124.
- Ravindran, V. 2010. Aditivos en la alimentación animal: presente y futuro. Institute of food, Nutrition and Human Health. Curso de especialización FEDNA. Recuperado el 12 de mayo de 2019, de [http://www.produccionanimal.com.ar/informacion\\_tecnica/invernada\\_promotores\\_crecimiento/44-10CAP\\_I.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/invernada_promotores_crecimiento/44-10CAP_I.pdf). [Consulta: 15 de mayo de 2019].
- Ravindran, V. 2013. Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities. Journal of Applied Poultry Research, 22(3). <http://doi.org/10.3382/japr.2013-00739>. [Consulta :2 de junio de 2019].
- Rigo, Elisandra; Ninow, J. L.; Di Luccio, M.; Oliveira, V.; Polloni, A. E.; Remonatto, Daniela.; Arbter, F.; Vardanega, Renata.; Oliveira, Débora.; Treichel, Helen. 2010. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. Food Science and Technology .43:1132-1137.
- Rojo, R.; Mendoza, G.D.; Crosbi, Montañez, O.D., Rebollar, S.; Cardoso, D.; Hernández J. & González, F.J. 2007. Enzimas amilolíticas exógenas en la alimentación de rumiantes. Universidad y Ciencia. 23 (2): 173-182.
- Seo, J.; Park, J.; Lee, J.; Lee, J. H.; Lee, J.J.; Kam, D. K. & Seo, S. 2016. Enhancement of daily gain and feed efficiency of growing heifers by dietary

supplementation of  $\beta$ -mannanase in Hanwoo (*Bos taurus coreanae*). Livestock Science.188: 21–24.

- Singhania, R.R.; Patel, A.K.; Soccol, C.R. y Pandey, A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal. 44(1): 13-18.
- Souza, G.; Arruda, E.; Lanna, T. & Mattos, M. 2014. Enzymes in animal diets: benefits and advances of the last 25 years.Zootecnia. 1(1):25-35.
- Sun, Q.; Liu, D.; Guo, S.; Chen, Y. & Guo, Y. 2015. Effects of dietary essential oil and enzyme supplementation on growth performance and gut health of broilers challenged by *Clostridium perfringens*. Animal Feed Science. and Technology. 207: 234–244.
- Upadhaya, S.D.; Park, J. W.; Lee, J. H. & Kim, I.H. 2016. Efficacy of  $\beta$ -mannanase supplementation to corn–soya bean meal-based diets on growth performance, nutrient digestibility, blood urea nitrogen, faecal coliform and lactic acid bacteria and faecal noxious gas emission in growing pigs. Archives of Animal Nutrition. 70 (1): 33–43.
- Vriese, S.;Putstjens, H.A. ;Shols, W. H. ; Hendriks, W.H. ; Gerrits, W.J.2012. Improving digestive utilization of fiber-rich feeds tufts in pigs and poultry by processing end enzymes technologies: A review. Animal Feed Sciences and Technology. 178: 123-138.
- Weng, C.; Wang, L.C.; Zhou, Y.M.; Jiang, Z.Y. & Wang, T. 2012. Effect of enzyme preparation on egg production, nutrient retention, digestive enzyme activities and pancreatic enzyme messenger RNA expression of late-phase laying hens. Anim. Feed Sci. and Tech.172: 180– 186.
- Yamabhai, M.; Sak-Ubol. S.; Srila, W. & Haltrich, D. 2016. Mannan biotechnology: from biofuels to health. Critical Reviews in Biotechnology. 36(1): 32–42.
- Zuluaga, Laura.; Padilla, Beatriz.; Aguilera, Elena.; Ocampo, Carolina.; Acuña, J. C. 2017. Remoción de sedimentos en extractos de café mediante hidrólisis enzimática con una mananasa de (*Hypothenemu shampei*). Cenecafé, 68 (2):90-98.

# *ANEXOS*



**Anexos**

## Anexo 1. Registros para calcular los indicadores productivos

### Registro de Consumo de Alimento Diario

Tratamiento:

Fecha:

No ANIMALES	OFRECIDO (g.)	RESIDUO (g.)	CONSUMO REAL (g.)
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
<b>TOTAL</b>			
<b>PROMEDIO</b>			

Fuente: Elaboración propia.

## Anexo 2. Registro de Incremento de peso semanal

Tratamiento:

Fecha:

<b>No ANIMALES</b>	<b>PESO INICIAL (g.)</b>	<b>PESO FINAL (g.)</b>	<b>INCREMENTO PESO (g.)</b>
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
<b>TOTAL</b>			
<b>PROMEDIO</b>			

Fuente: Elaboración propia.