



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA**  
**PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EFFECTO DE UN COMPLEJO MULTITENZIMÁTICO Y UN PROBIÓTICO EN**  
**GALLINAS DE POSTURA ALIMENTADAS CON DIETAS SORGO-SOYA-**  
**CANOLA.**

**TESIS QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**PEDRO JUÁREZ MORALES**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**MC. ERNESTO ÁVILA GONZÁLEZ (FMVZ-UNAM)**

**COMITÉ TUTOR:**

**DR. JUAN CARLOS DEL RÍO GARCÍA (FESC-UNAM)**

**DR. JOSÉ ARCE MENOCA (UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN**  
**NICOLAS DE HIDALGO)**

**MÉXICO, CD. MX. Diciembre 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIAS**

A una gran persona que Dios puso en mi camino y tengo la fortuna de amar: Verónica, mil gracias por tu apoyo incondicional, y darme lo más grande en mi vida, a Sofía y Mauricio, sin duda, han sido mis pilares para lograr esto. Siempre te llevaré en mi corazón.

A mis hijos adorados, porque sin ustedes muchas cosas en mi vida no tendrían sentido, son el motor que me impulsa a ser una mejor persona y a salir adelante día a día. Dios los bendiga siempre mis niños.

A mis padres, por su apoyo constante y por ser el gran ejemplo que hasta el momento he seguido.

A mi hermana Giovanna, que me apoyó en todo momento que lo necesité, nunca hay que perder esta gran unión que tenemos, te quiero.

A mi gran amigo José Luis, por sus sabios consejos y apoyo, en especial, en esta etapa de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al personal del centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (C.E.I.E.P.A.v) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por su apoyo en la realización de la prueba biológica.

Al personal del Laboratorio de Nutrición de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por su colaboración en el procesamiento de las muestras.

Al Departamento de Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por su colaboración en el procesamiento de las muestras, Dra. Gabriela Gómez por su apoyo y valiosos consejos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado durante la realización del presente trabajo.

Al Dr. Ernesto Ávila por su continuo asesoramiento y confianza en el desarrollo de ésta investigación. Gracias por sus invaluable consejos, tanto académicos como personales.

A mi comité tutor, Dr. Juan Carlos del Río y Dr. José Arce por sus valiosas y oportunas observaciones para el mejoramiento y culminación de la prueba.

A mis sinodales, Dra. Irma Tejada y Dr. Arturo Cortes, por sus invaluable consejos para el enriquecimiento del trabajo.

Al M en C. Aarón López, por su apoyo y consejos durante la realización de la prueba.

Al Dr. Benjamín por su apoyo y grandes consejos.

A Rebe, Montse y David, por su gran apoyo en la toma y procesamiento de muestras.

## RESUMEN

Con el objetivo de evaluar los parámetros productivos, IgA secretora intestinal, colesterol, LDL, HDL en suero, de gallinas de postura alimentadas con dietas a base de sorgo + soya + canola y adicionadas con un complejo multienzimático (proteasas, amilasas y xilanasas) y un probiótico (*Bacillus subtilis*), se realizó un estudio empleando 480 gallinas Bovans White de 42 semanas de edad distribuidas en un diseño completamente al azar, con un arreglo factorial 2 x 4. Donde los factores fueron las dietas (Basal + y Basal -) y los aditivos (nada, probiótico, enzimas, y probiótico más enzimas). Semanalmente, durante las 12 semanas de duración, se recopilaron los datos de producción de huevo, peso del huevo, consumo de alimento ave/día y conversión alimenticia, cada 4 semanas se tomaron datos de calidad interna y externa del huevo. Se determinó IgA secretora en duodeno. Se tomaron muestras de sangre para determinar colesterol LDL y HDL en suero. Los datos obtenidos, indicaron en los parámetros productivos en el factor dietas, 1.3% más en el peso de huevo ( $p < 0.05$ ) en las gallinas que consumieron las dietas control (+), las cuales tenía mayor contenido de energía metabolizable, proteína y aminoácidos esenciales. En los factores aditivos, no se observaron diferencias estadísticas en los parámetros productivos. No se observó diferencia estadística ( $p > 0.05$ ) en la inmunidad humoral, ni en los niveles de colesterol, LDL y HDL en el suero sanguíneo entre factores. Se concluye de la información obtenida, que el complejo enzimático con base en (proteasas, amilasas y xilanasas) y el probiótico (*Bacillus subtilis*), no mejoraron los parámetros productivos, la inmunidad humoral, la respuesta en las lipoproteínas de alta, baja densidad y colesterol en suero sanguíneo en gallinas Bovans de las 42 a las 54 semanas de edad.

**Palabras Clave:** amilasas, proteasas, xilanasas, IgA secretora intestinal, probiótico.

## **ABSTRACT**

In order to evaluate productive parameters, secretory intestinal IgA, cholesterol, LDL, serum HDL in laying hens fed on diets based on sorghum + soybean + canola and supplemented with a multi-enzyme complex (protease, amylase, and xylanase) and a probiotic (*Bacillus subtilis*), the present study was conducted with four hundred and eighty brown white hens of forty and two weeks old, were distributed in a completely randomized design, with a 2 x 4 factorial arrangement. In which the factors were the diets (basal positive and basal negative) and the additives (nothing, probiotic, enzymes and probiotic plus enzymes). Every week, during the twelve weeks, egg production data were collected: eggs weighted, food consumption hen/day and food conversion, every 4 weeks, data about the eggs external and internal quality were collected. IgA in duodenum was tested. Blood samples were taken to determine cholesterol "LDL" and "HDL" in serum. The data retrieved indicate the productive parameters within diet factors, 1.3% on the egg weight ( $p < 0.05$ ) in the hens that consumed control diets (+), which contained more metabolizable energy, protein and essential amino-acids. On the additive factors, no statistical differences were observed within productive parameters. No statistical difference was observed ( $p > 0.05$ ) within humoral immunity, neither on the cholesterol levels, LDL and HDL on the blood serum between factors. Our conclusion from the information obtained, that the enzymatic compound based on (protease, amylase and xylanase) and the probiotic (*Bacillus subtilis*), will not improve the productive parameters, humoral immunity, the response within the high and low density lipoproteins and cholesterol within blood serum on 42 - 54 weeks old brown laying hens.

**Keywords:** amylase, protease, xylanase, secretory intestinal IgA, probiotic

<b>ÍNDICE</b>	<b>PÁGINA</b>
1. Introducción	1
1.1. Avicultura en México	1
1.2. Establecimiento de la microbióta intestinal	1
1.3. Enzimas Exógenas	2
1.3.1. Proteasas	3
1.3.2. Xilanasas	4
1.3.3. Amilasas	4
1.4. Probioticos	5
1.4.1. Mecanismo de Probiosis	6
1.4.2. Uso de Probióticos en Gallinas de Postura	7
1.5. Uso de enzimas exógenas y probióticos en gallinas de postura	8
1.6. Tracto gastrointestinal de las aves	10
1.7. Justificación	11
1.8. Objetivo General	12
1.8.1. Objetivos Particulares	12
1.9. Hipótesis	13
2. Material y Métodos	14
2.1. Diseño de Tratamientos	14
2.2. Dietas	14
2.3. Peso inicio y final gallinas	16
2.4. Parámetros productivos	17
2.5. Calidad de Huevo	17
2.6. Determinación de IgA secretora	17
2.7. Determinación de Colesterol sérico, LDL y HDL	17
2.8. Análisis estadístico	18
3. Resultados	19
3.1. Parámetros productivos de 42 a 54 semanas de edad	19
3.2. Calidad de huevo	22
3.3. Análisis de colesterol sérico, LDL y HDL	23
3.4. Inmunidad humoral	24
4. Discusión	25
5. Conclusiones	29
6. Bibliografía	30

<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>PAG</b>
<b>Cuadro 1.</b> Composición y análisis calculados de dietas basales sorgo-soya-canola, en gallinas de postura de 42 a 54 semanas de edad, adicionadas con un complejo multienzimático y un probiótico.	16
<b>Cuadro 2.</b> Variables productivas de gallinas Bovans alimentadas con dietas sorgo-soya-canola, adicionadas con <i>B.subtilis</i> y un complejo enzimático de 42-54 semanas de edad.	20
<b>Cuadro 3.</b> Variables productivas de gallinas Bovans alimentadas con dietas sorgo-soya-canola y adicionadas con <i>B.subtilis</i> y un complejo enzimático, de 42-54 semanas de edad.	21
<b>Cuadro 4.</b> Variables en la calidad de huevo de las gallinas de postura de 42 semanas de edad, alimentadas con dietas sorgo-soya-canola y adicionadas con <i>B.subtilis</i> y un complejo enzimático.	22
<b>Cuadro 5.</b> Cambios ocurridos en el contenido de colesterol sérico, LDH y HDL de las gallinas de postura alimentadas con dietas sorgo-soya-canola y adicionada con <i>B.subtilis</i> y un complejo enzimático, de 42-54 semanas de edad.	23
<b>Cuadro 6.</b> Niveles de IgA secretora en el intestino, en las gallinas de postura alimentadas con dietas sorgo-soya-canola, con un complejo multienzimático y un probiótico.	24

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Avicultura en México**

La industria avícola es la actividad pecuaria más dinámica y pujante del país. Es también un sector estratégico en el ámbito agroalimentario, en virtud que de cada 10 kilos de proteína animal que se oferta en el mercado, 6 corresponden a alimentos avícolas como pollo y huevo. México permanece como el primer consumidor de huevo fresco en el mundo, con un consumo per cápita logrado en el 2014 de 22 kg. La industria avícola productora de huevo se desarrolla en: Jalisco 55%, Puebla 15%, Sonora 8%, la Comarca Lagunera 5%, Yucatán 4%, Guanajuato 2%, Sinaloa 3%, Nuevo León 2% y Guanajuato con 2%. En el ámbito internacional, México ocupa el sexto lugar en la producción de huevo (CIESA, 2015).

### **1.2. Establecimiento de la microbióta intestinal**

El desarrollo de la microbióta intestinal, comienza en el momento de la eclosión. Los pollitos recién nacidos están expuestos inicialmente a los microbios que se originan en la superficie de las cáscaras de huevo, que están pobladas por las bacterias del intestino de la madre y el ambiente circundante. El tracto gastrointestinal (TGI) es colonizado inicialmente por los aerobios facultativos como *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*, el consumo de oxígeno por estas bacterias, altera el entorno intestinal inferior a condiciones reductoras, lo que facilita el crecimiento posterior y la colonización de los anaerobios obligados extremadamente sensibles al oxígeno. El intestino delgado, es el compartimento del TGI donde ocurre la mayor parte de la digestión y absorción de nutrientes (Rinttila y Apajalahti, 2013).

Se ha revelado que la microbióta cecal en pollos sanos, está dominada por microorganismos del orden *Clostridiales*, las familias más comunes dentro de este orden son: *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* y *Veillonellaceae*. Estos parecen representar más del 50% de las bacterias de los ciegos, el resto principalmente

pertenecen a los órdenes *Bacteroidales* y *Lactobacillales* (Rinttila y Apajalahti, 2013).

### **1.3. Enzimas Exógenas**

Desde la década de 1980, la adición de enzimas a las dietas, se ha convertido en una práctica común en todo el mundo (Chaucheyras-Dury y Dury, 2010). Encontrar maneras de reducir los costos de alimentación en la producción, no es un concepto nuevo, como los precios de los granos tienen una continua tendencia a la alza, la industria ha estado trabajando para reducir los costos nutricionales. La adición de enzimas exógenas es una alternativa viable para mejorar la rentabilidad de la producción de las aves (Hahn, 2010).

En la producción avícola, el alimento representa el rubro más importante de los costos de producción, con oportunidades de modificación gracias al uso de la tecnología disponible. La mayoría de los ingredientes vegetales utilizados en las raciones para aves, contienen compuestos que pueden tener efectos antinutricionales (taninos, fitatos, polisacáridos no amiláceos, etc.) que afectan el rendimiento del animal (Cowieson, 2006).

Los polisacáridos no amiláceos (PNA) que están presentes en la dieta, tienen la capacidad de encapsular nutrientes, disminuyendo su accesibilidad al ave. Los efectos negativos de los PNA, pueden ser superados mediante modificaciones en la dieta, incluyendo la suplementación de las mismas dietas con preparaciones adecuadas de enzimas exógenas (Marquardt Brenes, 1996; Hahn-Didde 2010).

Las enzimas ampliamente utilizadas para degradar PNA en la industria, fueron las xilanasas y  $\beta$ -glucanasas, posteriormente se introdujeron las fitasas, que reducen la excreción de fósforo, disminuyendo por lo tanto el costo económico en la producción de aves (Bedford y Patridge 2011).

Las aves, naturalmente producen enzimas para ayudar a la digestión de los nutrientes del alimento (Cowieson, 2006). Sin embargo, no poseen la capacidad

enzimática para la hidrólisis de PNA presentes en la pared celular de los granos, esto se traduce en un bajo valor alimenticio (Marquardt y Brenes, 1996; Bedford, 1995).

Alta producción de huevo y mayor eficiencia, son características de la gallina ponedora moderna. Las mejoras en la eficiencia deben centrarse en maximizar la utilización de nutrientes de los piensos actuales y futuros (Ibrahim *et al*, 2003).

La adición de enzimas exógenas para la alimentación, mejora la digestibilidad, reduce la pérdida de nutrientes por las excretas y aumenta la absorción de nutrientes del alimento, disminuyendo de ese modo los costos de alimentación, disminuye el impacto ambiental y permite el uso de ingredientes de menor costo (Silversides *et al*, 2006) Novak *et al*, 2007; Hahn-Didde y Purdum, 2014).

### **1.3.1. Proteasas**

Las proteasas exógenas de origen microbiano, se están utilizando cada vez más en dietas para aves, los beneficios económicos de su uso son el reflejo del mejoramiento de la digestibilidad de los aminoácidos de la dieta. (Romero *et al*, 2013).

Las semillas, en especial las leguminosas como la soya, contienen altas concentraciones de proteínas de almacenamiento, las cuales son generadas por la planta, para brindarle una fuente de nitrógeno durante la germinación. Las proteínas de almacenamiento pueden unirse a los almidones y disminuir su disponibilidad; aunado a esto, las semillas de leguminosas contienen factores antinutricionales como los inhibidores de tripsina, que disminuyen la digestión al bloquear la enzima tripsina, y las lectinas, que son proteínas ligadoras de azúcar, que se ha demostrado reducen su digestibilidad. Las proteasas son enzimas que degradan proteína, son utilizadas en dietas para aves y cerdos, lo que las hace disponibles (Bedford y Partridge, 2011).

### **1.3.2. Xilanasas**

Los ingredientes vegetales contienen PNA, estos pueden ser solubles e insolubles. Los PNA de mayor peso molecular solubles, tienen una alta afinidad por el agua y tiene la capacidad de estimular un aumento geométrico en la viscosidad dentro del contenido del tracto gastrointestinal, la alta viscosidad intestinal, disminuye la digestibilidad de nutrientes, y se correlaciona negativamente con el rendimiento de las aves, se asocia con cambios perjudiciales en la flora microbiana en el tracto gastrointestinal distal y aumento de humedad en la cama, efecto que se puede superar a través del uso de las enzimas apropiadas. Los PNA insolubles, pueden atrapar partículas de almidón, proteína y grasa, quedando los nutrientes inaccesibles para los animales. Las xilanasas exógenas, facilitan una reducción de la viscosidad, y son capaces de liberar los nutrientes atrapados a través de la destrucción de algunas fracciones de las paredes celulares de los ingredientes (Bedford y Partridge, 2011; Bedford, 1995; Cowieson, 2006; Pirgozliev *et al*, 2010).

### **1.3.3. Amilasas**

La digestibilidad del almidón en ingredientes vegetales, varía de acuerdo a la cantidad de almidón resistente, tamaño del gránulo de almidón, composición y encapsulamiento de los mismos, esta variación se debe a las diferencias genéticas de las plantas, condiciones de cultivo, manejo, secado, almacenaje y procesos de elaboración del alimento. Las amilasas degradan el almidón en los granos haciéndolo más disponible para el animal (Bedford y Partridge, 2011).

Los posibles mecanismos de acción de las carbohidrasas en dietas para aves incluye: la mejora del acceso de las enzimas endógenas a la célula debido a la hidrólisis de arabinosilanos de la pared celular, modulación de la microflora intestinal y la reducción de la pérdidas de aminoácidos endógenos y la secreción de mucina. En general el incremento en la energía metabolizable aparente debido a xilanasas y amilasas exógenas, parecen ser aumento de la digestión y la

absorción de la porción no digerida de almidón y grasa de la dieta y la baja regulación de diversas secreciones digestivas (Romero *et al*, 2013).

El uso de enzimas en el sector pecuario es una herramienta que permite el mejor uso de los ingredientes contenidos en la dieta, contribuyendo a aumentar la digestibilidad de la materia prima. Reducen la variación en la calidad nutritiva de los granos y la respuesta es más evidente cuando la dieta contiene como fuente suplementaria energía, grasas y aceites de baja calidad (Bedford y Partridge, 2011).

#### **1.4. Probióticos**

Los probióticos se definen como los bio-preparados que incluyen células vivas o metabolitos de microorganismos autóctonos estabilizados, que optimizan la colonización y la composición de la microflora intestinal en los animales y los seres humanos y que tienen un efecto estimulante sobre los procesos digestivos y la inmunidad del hospedero (Zhang *et al*, 2012).

La inclusión en la dieta de bacterias benéficas para recuperar la integridad intestinal, mejoran la salud intestinal, la disponibilidad y la absorción de nutrientes. (Rinttilä y Apajalahti 2013) Se ha demostrado que *B. subtilis* reduce los signos clínicos de la coccidiosis aviar inducida experimentalmente, que se correlacionaba con el aumento de la inmunidad innata y adquirida en pollos de engorde (Kyung–Woo *et al*, 2015).

Una variedad de especies de microorganismos han sido usadas como probióticos, incluyendo especies de *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *E. coli*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, una variedad de especies de levaduras, y cultivos mixtos indefinidos (Patterson y Burkholder 2003).

*Bacillus spp*, son capaces de germinar y esporular en el tracto gastrointestinal de las aves. Las esporas son conocidas por soportar los procesos de peletizado del alimento y una vez ingerido, germinar en el tracto gastrointestinal, debido a la influencia del pH, nutriente y otros factores relevantes (Shivaramaiah *et al* 2011).

La aplicación de probióticos como aditivos para alimentos, ha sido persistentemente probada y utilizada en una variedad de entornos de producción avícola. Los probióticos son bacterias no patógenas que ejercen una influencia beneficiosa sobre la salud, la fisiología, o ambos del huésped (Mikulski *et al*, 2012). Los probióticos pueden proporcionar sustancias antimicrobianas que pueden ser eficaces en el mismo nivel de los antibióticos, especialmente en condiciones de estrés, alta temperatura y pH intestinal anormal. Los probióticos muestran una alta eficiencia en la reducción de la colonización de *Salmonella* y *Campylobacter*. Por otra parte, pueden modular la respuesta inmunológica y suprimir las reacciones inmunes inflamatorias en las paredes intestinales evitando daños en el tejido (Xu *et al*, 2006).

#### **1.4.1. Mecanismo de Probiosis**

La suplementación de probióticos, tiene la capacidad de inhibir la adhesión de bacterias patógenas a la pared intestinal y la mejora del sistema inmune, lo que sugiere que los probióticos tienen un papel importante en la normalización y la función fisiológica del colon, la integridad de la barrera, una reducción en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias de la mucosa, disminución de amoníaco, excreción de urea, reducción en el colesterol sérico, aumento de la actividad de enzimas digestivas y una mejor absorción de minerales (Mikulski *et al* 2012; Xu *et al*, 2006).

Los probióticos muestran varias formas importantes de acción, como antagonista de bacterias patógenas mediante la modificación del pH intestinal, efecto antimicrobiano directo por secreción de los productos que inhiben su desarrollo, como las bacteriocinas, ácidos orgánicos, producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el intestino, la regulación del sistema inmune del huésped, la normalización de la microbiota intestinal y diferentes efectos metabólicos (Xu *et al*, 2006).

Algunas especies de *Bacillus* tienen la capacidad de producir diferentes enzimas exógenas, incluyendo proteasas, lipasas, celulasas, xilanasas, fitasas, y

queratinasas, que pueden ayudar a descomponer moléculas complejas del alimento, mejorando la absorción de nutrientes, disminuyendo la viscosidad intestinal en dietas con PNA y disminuir la cantidad de sustratos disponibles para el crecimiento de bacterias patógenas. Adicionalmente, se ha demostrado que *Bacillus subtilis*, estimula el desarrollo de otros microorganismos benéficos, tales como *Lactobacillus* por la producción de subtilisina y catalasa y la disminución del pH intestinal (Latorre *et al*, 2014).

Otro modo de acción es la exclusión competitiva que representa la capacidad de colonización y la competencia, se adhiere en las membranas mucosas intestinales para prevenir adherencia y la invasión de patógenos, la inhibición de la colonización y la sustitución de los ya adheridos; compitiendo por sustancias disponibles, nutrientes y factores de crecimiento (Xu *et al*, 2006).

Los probióticos, comprenden un enfoque nutricional funcional, por lo que el mantenimiento de un entorno gastrointestinal saludable, mejora la función intestinal y se persigue a través de la ingesta de cantidades adecuadas de microorganismos vivos beneficiosos (Mountzouris *et al*, 2010).

#### **1.4.2. Uso de Probióticos en Gallinas de Postura**

La suplementación de probióticos para gallinas ponedoras, ha demostrado mejorar el rendimiento productivo de la gallina, incluyendo eficiencia de la alimentación, la producción de huevos, la digestibilidad de nutrientes, la modulación de la microflora intestinal, la inhibición del crecimiento de patógenos, inmunomodulación e inmunidad en la mucosa intestinal (Mikulski *et al*, 2012). Se ha observado mejoría en la conversión alimenticia, calidad del huevo (disminución del nivel de colesterol en yema, incremento en el grosor de cascarón y peso del huevo), y disminución de las concentraciones de colesterol en sangre (Sohail *et al*, 2011).

El uso de probióticos y prebióticos para el consumo a largo plazo y enfoques profilácticos, es mucho más seguro, ya que no causan efectos secundarios, como

diarrea asociada a antibióticos, daños en el hígado, y no estimulan la resistencia a los antimicrobianos y a la respuesta inflamatoria alérgica (Xu *et al*, 2006).

### **1.5. Uso de enzimas exógenas y probióticos en gallinas de postura**

Kurtoglu *et al.* (2004) utilizaron un total de 480 gallinas de 27 semanas de edad, y adicionaron esporas de *B. subtilis* a las dietas, observaron un incremento en la producción de huevo, disminución del huevo dañado, reducción en los niveles de colesterol sérico y disminución en el colesterol de la yema de huevo en las dietas adicionadas con el probiótico. Jalal *et al.* (2007) utilizaron dietas bajas en energía en gallinas de postura y adicionaron un producto comercial que contenía 1000 unidades de xilanasas / g, 4000 unidades de proteasa /g, y 2000 unidades de  $\alpha$ -amilasa / g, observaron una mayor producción de huevo en las dietas adicionadas con el producto. Silversides *et al.* (2006) adicionaron 2000 y 2300 U/kg de xilanasas, en dietas de gallinas de postura, observaron un incremento en el peso del huevo, una mayor altura y peso de la albumina en las dietas adicionadas con la enzima. Xu *et al.* (2006) adicionaron las diferentes concentraciones de un cultivo de *Bacillus subtilis*, 500 mg / kg, 1,000 mg / kg, o 1500 mg / kg, observaron un incremento en el grosor de cascarón, en el color de la yema y en las unidades Haugh y una disminución en la concentración del colesterol en la yema, en las gallinas de postura que fueron adicionados con el probiótico en la dieta. Bobeck *et al.* (2014) utilizaron una xilanasas, en dietas con diferentes concentraciones de EM, observaron aumento de la producción de huevo y masa de huevo, en dietas a las que se les adicionó la xilanasas. Divya *et al.* (1999) adicionaron una preparación comercial en dietas de gallinas de postura que contenía xilanasas y proteasa, derivadas de *Trichoderma viride* y *Bacillus subtilis*, observaron menor porcentaje de huevo deforme, mejor conversión alimenticia, mayor porcentaje de albúmina y yema de huevo, aumento del peso y masa de huevo, en las dietas adicionadas con enzimas. Jia *et al.* (2008) adicionaron una enzima multcarbhidrasa que contenía pectinasas, celulasas, xilanasas, glucanasas, amilasas y mananasas; observaron incremento del peso del huevo, mejor tasa de conversión alimenticia e incremento en la gravedad específica del huevo en dietas

de gallina de postura, adicionadas con las enzimas. (Mirzaie *et al*, 2011) suplementaron xilanasas en una dieta para gallinas de postura a base de trigo, observaron un incremento en la producción de huevo, en masa de huevo e índice de conversión, además de mejorar el grosor de cascarón y disminuir la viscosidad ileal, en las dietas adicionadas con xilanasas. Zhang *et al*. (2012) añadieron una composición de *Lactobacillus salivarius* y *Bacillus Subtilis* en dietas para gallinas de postura, y observaron un aumento en la producción de huevo, disminución en la conversión alimenticia y disminución del huevo dañado, además una disminución significativa sérica de colesterol total y lipoproteínas de baja densidad, en dietas adicionadas con *Bacillus subtilis* o en combinación con *Lactobacillus salivarius*. (Jaroni *et al*, 1999) utilizaron un producto comercial con base en xilanasas y proteasas en dietas para gallinas de postura, observaron una mayor disponibilidad de nutrientes y en los animales un peso intestinal significativamente mayor en los que recibieron las dietas adicionadas con enzimas, observaciones histológicas de yeyuno, en los mismos autores, observaron acortamiento, engrosamiento y atrofia de las vellosidades, en aves alimentadas sin enzimas, situación que mejoró cuando agregaron las enzimas a las dietas. Nahashon *et al*. (1994); reportaron que la suplementación de probióticos en gallinas de postura, aumentó la celularidad de las placas de Payer en el íleon, una indicación de la estimulación del sistema inmune de la mucosa, que secreta inmunoglobulina (IgA) en respuesta a estímulos antigénicos.

Kazue *et al*. (2012) mencionan que los cambios inducidos por los probióticos en el epitelio intestinal, se acentúan por la disminución de pH luminal, actividad antimicrobiana, secreción de péptidos antimicrobianos y el bloqueo de la adherencia a las células epiteliales. En este sentido, se mejora la barrera intestinal, al elevar la producción de citosinas, que a su vez, inducen la secreción de IgA en la mucosa intestinal, causando la liberación de mucinas. El efecto protector de los probióticos se muestra con una elevada respuesta humoral y celular que se logra a través de una mayor producción de linfocitos T, células secretoras de anticuerpos, expresión de citoquinas, producción de anticuerpos, etc.

## **1.6. Tracto gastrointestinal de las aves**

El tracto gastrointestinal (TGI) se compone de células altamente organizadas, cuya vasculatura y tejido conectivo, funcionan como uno de los más grandes componentes del sistema inmune, así como una superficie primaria a través de la cual los nutrientes y macromoléculas son absorbidos (Koutsos, 2006).

El tracto gastrointestinal de las aves, se puede subdividir en diferentes secciones anatómicas (por ejemplo: pico, esófago, buche, proventrículo, molleja, intestino delgado, intestino grueso y ciegos). El intestino delgado está involucrado críticamente en la mayor digestión de los componentes de la dieta y la absorción de nutrientes, el intestino grueso y ciegos, son regiones muy importantes para la colonización microbiana (Birger, 2014; Koutsos, 2006).

El tracto gastrointestinal presenta 5 regiones principales, que incluyen la capa de células epiteliales, lámina propia, región muscular, componentes del sistema inmune y la capa de moco. La capa de células luminales, son las células absorbentes primarias del intestino (enterocitos) (Koutsos, 2006).

La microflora intestinal desempeña una función protectora importante para mantener la integridad de la mucosa intestinal. Menoscabar esta integridad (es decir, una disfunción de la barrera intestinal) conduce a un aumento progresivo de la permeabilidad de la mucosa, lo que facilita la infección por patógenos (Abdur, 2013).

## **1.7. Justificación**

Existe poca información en gallinas de postura, el efecto de la combinación de un probióticos de reciente introducción al mercado con base en 3 cepas de *Bacillus subtilis* y un complejo multienzimático exógeno, también de reciente aparición, con base en proteasas, amilasas y xilanasas. Por otro lado, gran parte de la formulación de alimentos para aves es a base de sorgo + soya, es por ello que la finalidad del presente estudio fue evaluar la respuesta de los aditivos antes mencionados en gallinas de postura alimentadas con dietas con base en sorgo-soya-canola.

## **1.8. Objetivo General**

Se evaluó el comportamiento productivo, de un complejo multienzimático de reciente introducción con base en proteasas, amilasas y xilanasas, y un probiótico nuevo de tres cepas de *Bacillus subtilis*, en gallinas de postura alimentadas con dietas, sorgo-soya-canola.

### **1.8.1. Objetivos particulares**

- Se evaluaron los parámetros productivos; porcentaje de postura, peso del huevo, huevo sucio, huevo roto, huevo fáfara, consumo de alimento, e índice de conversión en las gallinas de postura alimentadas con dietas sorgo-soya-canola, con el complejo multienzimático y el probiótico.
- Se analizó la calidad interna del huevo (color, unidades Haugh) y externa (grosor de cascarón), en las gallinas de postura alimentadas con dietas sorgo-soya-canola, con el complejo multienzimático y el probiótico.
- Se cuantificaron los niveles de IgA secretora en el intestino, en las gallinas de postura, alimentadas con dietas sorgo-soya-canola, con un complejo multienzimático y un probiótico.
- Se analizaron los cambios ocurridos en el contenido de colesterol en suero sanguíneo, LDL, HDL en las gallinas de postura alimentadas con dietas sorgo-soya-canola, con un complejo multienzimático y un probiótico.

### **1.9. Hipótesis**

- El uso del complejo enzimático y del probiótico en dietas para gallinas de postura reducidas en EM, proteína y aminoácidos, mejoran las variables productivas.
- El uso del complejo enzimático y del probiótico mejoran la calidad interna (color, unidades Haugh) y externa (grosor de cascarón) en las gallinas de postura alimentadas con dietas sorgo-soya-canola.
- Los títulos de anticuerpos de IgA secretora del intestino, son incrementados en las gallinas de postura alimentadas con dietas sorgo-soya-canola, el complejo multienzimático y el probiótico.
- Los niveles de colesterol en suero sanguíneo, LDL, HDL, disminuyen en las gallinas de postura alimentadas con dietas sorgo-soya-canola, el complejo multienzimático y el probiótico.

## 2. Material y Métodos

El experimento se realizó en las instalaciones del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), ubicada en calle Manuel M. López s/n colonia Zapotitlán, delegación Tláhuac México, Distrito Federal entre los paralelos 19° 15' latitud Oeste, a una altura de 2,240 msnm. El clima es templado húmedo, con una temperatura media anual de 16.8°C y una precipitación pluvial anual de 550.1 mm.

### 2.1. Diseño de tratamientos

Se utilizaron 480 gallinas Bovans White de 42 semanas de edad, las cuales se distribuyeron en un diseño al azar con un arreglo factorial 2x4. Los factores fueron las dietas (testigo + y testigo -) y la adición o no de los aditivos (Sin aditivos, Probiótico, Enzimas y Probiótico + enzimas). Se tuvieron 8 tratamientos, con 5 réplicas por tratamiento de 12 animales cada una, los cuales se conformaron de la siguiente forma: **1) Testigo positivo (+)**, 2) como 1 + probiótico, 3) como 1 + enzima, 4) como 1 + probiótico + enzima, **5) Testigo negativo (-)**, 6) como 5 + probiótico, 7) como 5 + enzima, 8) como 5 + probiótico + enzima.

Las aves fueron alojadas en una caseta de ambiente natural en el CEIEPAv, en jaulas de 3 gallinas cada una, por un periodo de 12 semanas. Se les proporcionó luz artificial y luz natural para un total de 16 horas diariamente. Se les alimentó con las dietas experimentales sorgo-soya-canola en forma de harina, a razón de 105 g/ave/día. La administración de agua fue a voluntad.

### 2.2. Dietas

Se formularon las dietas, una dieta testigo (+) cumpliendo las recomendaciones de la estirpe Bovans White para la etapa y otra dieta testigo negativo (-) reducida en EM (-50 kcal/kg) y reducida (-2%) en proteína y aminoácidos esenciales. Ambas dietas fueron tipo comercial, incluyeron fitasa (Aextra PHY).

Se adicionaron dos productos comerciales a las dietas, un probiótico que contiene tres cepas de *B. subtilis* (Enviva PRO 201 GT<sup>R</sup>, Dupont, Animal Nutrition 3E+08 ufc/g) a razón de 250g/tonelada de alimento; además del probiótico, se les adicionó un complejo enzimático (Aextra XAP<sup>R</sup> 101 TPT , Dupont, Animal Nutrition) a razón de 250g/tonelada de alimento, que contiene xilanasas (20,000 u/g derivados de *Trichoderma longibrachiatum*), proteasas (40,000 u/g derivados de *Bacillus subtilis*) y amilasas (2000 u/g derivados de *Bacillus licheniformis*). Las dietas utilizadas en las gallinas de postura de 42 semanas de edad se muestran en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Composición y análisis calculados de dietas basales sorgo-soya-canola, en gallinas de postura de 42 a 54 semanas de edad, adicionadas con un complejo multienzimático y un probiótico.

<b>Ingredientes</b>	<b>Testigo + (kg)</b>	<b>Testigo – (kg)</b>
Sorgo	653.780	675.850
Pasta de Soya	148.520	136.950
Canola	58.160	58.160
Aceite vegetal	13.720	3.000
Ortofosfato de calcio	9.190	9.200
Carbonato de calcio	105.530	105.560
Sal (NaCL)	4.320	4.320
DL-Metionina	1.340	1.310
L-lisina HCl	0.470	0.670
Vitaminas y minerales *	2.400	2.400
BMD-100	0.500	0.500
Cloruro de colina 60 %	0.500	0.500
Pigmento rojo chile **	0.800	0.800
Larvadex	0.500	0.500
Antioxidante	0.150	0.150
Carophyll yellow	0.050	0.050
Axtra phy (fitasa)	0.045	0.045
<b>Total</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>
<b>Análisis Calculado</b>		
EM (Kcal/kg)	2800	2750
Proteína cruda %	15.79	15.41
Lisina %	0.73	0.71
Met+Cist, %	0.67	0.66
Calcio total %	4.25	4.25
Fósforo disponible, %	0.46	0.46
Sodio, %	0.18	0.18

**\*Vitaminas y minerales:** Vitamina A, 3000 000UI; Vitamina D3,750 000 UI; Vitamina E, 6 000 UI; Vitamina K3, 1.0 g; Niacina, 25 g; Biotina, 0.063 g; Cloruro de Colina, 250 g; Selenio, 0.2 g; cobalto, 0.1 g; yodo, 0.3 g; cobre, 10 g; zinc, 50 g; hierro, 100 g; manganeso, 100 g; Vehículo C.b.p 1.000.00 g.

**\*\*Pigmento rojo vegetal** (avired en polvo) colorante de origen vegetal 5g/kg, Capsicum.

### 2.3. Peso inicio y final gallinas

Se obtuvo el peso de las gallinas (4 gallinas por réplica) al inicio, a la semana 4 y al final del experimento, antes del suministro del alimento.

## **2.4. Parámetros productivos**

Semanalmente, durante las 12 semanas de duración, se registraron y resumieron los datos de producción; porcentaje de postura, peso del huevo, huevo sucio con sangre y con excretas, huevo roto, huevo fáfara, consumo de alimento, e índice de conversión.

## **2.5. Calidad de Huevo**

Cada cuatro semanas, se realizó la prueba de calidad de huevo. En cada prueba se utilizaron 4 huevos por réplica, los cuales fueron evaluados el mismo día de la postura. Se determinó el grosor de cascara sin membranas internas con micrómetro manual, las Unidades Haugh y color de yema; utilizando el sistema automatizado QCM+ de la empresa Technical Services y Supplies INC (TSS).

## **2.6. Determinación de IgA secretora**

Para evaluar la respuesta de anticuerpos en intestino, a las 54 semanas de edad, se seleccionó una gallina por cada réplica por tratamiento (para un total de 40 gallinas) y se sacrificaron por dislocación cervical. Se obtuvieron 10 cm de íleon, para posteriormente realizar lavados con 10 ml de solución salina isotónica SSI fría y estéril, pasando 3 veces la SSI a través del lumen intestinal, la solución se recolectó y se congeló a -20 °C, hasta su posterior evaluación con la prueba de ELISA siguiendo el procedimiento descrito previamente por Gómez et al. (2009).

## **2.7. Determinación de Colesterol sérico, LDL y HDL.**

A las 54 semanas de edad, se tomaron muestras de sangre de 80 gallinas (2 gallinas por réplica), cada muestra se centrifugó a 3000 rpm/10min, posteriormente se obtuvo el suero, para determinar los niveles de colesterol sérico, LDL y HDL, en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. Los resultados obtenidos fueron transformados de mmol/dL a mg/dL mediante el factor de conversión 0.0259.

## 2.8. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en variables de producción, colesterol en yema de huevo, colesterol sérico, LDL y HDL, se analizaron mediante un diseño completamente al azar, con un arreglo factorial 2x4, conforme al siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

En donde:

$Y_{ij}$ = Variables respuesta (variables productivas, colesterol sanguíneo, colesterol en yema de huevo, LDL, HDL e IgA secretora).

$\mu$ = Media general.

$\alpha_i$ = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento (dieta+ y dieta -).

$\beta_j$ = Efecto del  $j$ -ésimo tratamiento (testigo, probiótico, enzimas y probióticos + enzimas).

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Interacción entre el  $i$ -ésimo tratamiento y el  $j$ -ésimo tratamiento.

$\varepsilon_{ijk}$  = Error experimental.

Los resultados de las variables evaluadas, se analizaron por medio del paquete estadístico IBM SPSS Statistics 20, utilizando el análisis de varianza para un diseño completamente al azar y las diferencias entre tratamientos se compararon por medio de la prueba de Tukey.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Parámetros productivos de 42 a 54 semanas de edad.**

En el Cuadro 2, se muestran los datos obtenidos en 84 días de experimentación. Se puede apreciar en los resultados obtenidos para los efectos principales (dietas y aditivos) para % de postura, masa del huevo, consumo de alimento y conversión alimenticia, valores muy similares entre los tratamientos. Para el factor dietas, en % de postura, masa de huevo e índice de conversión alimenticia, no se encontraron diferencias estadísticas ( $p>0.05$ ).

Sin embargo, para peso de huevo, se detectó efecto al factor dietas, se puede apreciar que el peso del huevo fue mayor ( $p<0.05$ ) en las aves alimentadas con las dietas testigo positivo (+), que incluían mayor EM, proteína y aminoácidos esenciales.

Para el factor aditivos, los resultados fueron similares ( $p>0.05$ ), como se puede notar, en el % de postura, peso del huevo, masa del huevo, consumo de alimento e índice de conversión.

Para las variables mostradas en el Cuadro 2, no se observó interacción entre los factores Dietas x Aditivos.

**Cuadro 2.** Variables productivas de gallinas Bovans alimentadas con dietas sorgo-soya-canola, adicionadas con *B.subtilis* y un complejo enzimático de 42-54 semanas de edad.

DIETAS	ADITIVOS				
	% Postura				
	<b>Sin aditivo</b>	<b>Probióticos</b>	<b>Enzima</b>	<b>Prob.+enzima</b>	<b>Promedio</b>
Positiva	92.2 ± 1.9	92.4 ± 1.4	92.6 ± 2.4	91.7 ± 4.3	92.2 <sup>a</sup> ± 2.5
Negativa	92.2 ± 0.8	93.0 ± 1.7	92.8 ± 1.7	91.5 ± 1.7	92.4 <sup>a</sup> ± 1.5
Promedio	92.2 <sup>a</sup> ± 1.3	92.7 <sup>a</sup> ± 1.6	92.7 <sup>a</sup> ± 2.0	91.6 <sup>a</sup> ± 3.0	
	<b>Peso huevo g</b>				
Positiva	60.0 ± 0.4	60.4 ± 1.2	59.1 ± 0.7	59.9 ± 0.7	59.9 <sup>a</sup> ± 0.8
Negativa	59.3 ± 1.5	59.1 ± 0.3	58.9 ± 0.7	59.2 ± 0.4	59.1 <sup>b</sup> ± 0.7
Promedio	59.7 <sup>a</sup> ± 1.0	59.7 <sup>a</sup> ± 0.8	59.0 <sup>a</sup> ± 0.7	59.5 <sup>a</sup> ± 0.6	
	<b>Consumo alimento g</b>				
Positiva	104 ± 0.5	104 ± 0.4	104 ± 0.7	104 ± 0.5	104 <sup>a</sup> ± 0.5
Negativa	104 ± 0.7	104 ± 0.4	104 ± 0.8	104 ± 0.8	104 <sup>a</sup> ± 0.7
Promedio	104 <sup>a</sup> ± 0.6	104 <sup>a</sup> ± 0.4	104 <sup>a</sup> ± 0.8	104 <sup>a</sup> ± 0.7	
	<b>Índice de conversión, kg: kg</b>				
Positiva	1.9 ± 0.04	1.9 ± 0.05	1.9 ± 0.06	1.9 ± 0.09	1.9 <sup>a</sup> ± 0.06
Negativa	1.9 ± 0.03	1.9 ± 0.02	1.9 ± 0.03	1.9 ± 0.03	1.9 <sup>a</sup> ± 0.03
Promedio	1.9 <sup>a</sup> ± 0.04	1.9 <sup>a</sup> ± 0.04	1.9 <sup>a</sup> ± 0.05	1.9 <sup>a</sup> ± 0.06	
	<b>Masa de huevo</b>				
Positiva	55.4 ± 1.0	55.8 ± 1.6	54.7 ± 1.7	54.9 ± 2.3	55.1 <sup>a</sup> ± 1.7
Negativa	55.2 ± 2.0	54.9 ± 0.9	54.7 ± 0.8	54.0 ± 0.9	54.7 <sup>a</sup> ± 1.2
Promedio	55.3 <sup>a</sup> ± 0.2	55.4 <sup>a</sup> ± 1.3	54.7 <sup>a</sup> ± 1.3	55.0 <sup>a</sup> ± 1.7	

Valores ± desviación estándar.

Valores con diferentes letras son diferentes (p<0.05).

En el Cuadro 3, se muestran datos obtenidos durante el experimento de calidad del huevo. Se puede apreciar que para los efectos principales (dietas y aditivos), huevo roto, huevo fáfara, huevo sucio con sangre y con excretas, los resultados fueron muy similares entre los tratamientos. Para los factores dietas como aditivos, el % de huevo roto, huevo fáfara, huevo sucio con sangre y con excretas, no se encontraron diferencias estadísticas ( $p>0.05$ ).

**Cuadro 3.** Variables productivas de gallinas Bovans alimentadas con dietas sorgo-soya-canola y adicionadas con *B.subtilis* y un complejo enzimático, de 42-54 semanas de edad.

DIETAS	ADITIVOS				Promedio
	Sin aditivo	Probióticos	Enzima	Prob.+enzima	
	<b>Huevo roto %</b>				
Positiva	1.0 ± 1.3	0.7 ± 0.4	0.8 ± 0.4	0.7 ± 0.5	0.8 ± 0.6
Negativa	0.6 ± 0.5	0.7 ± 0.5	1.3 ± 1.1	1.4 ± 2.1	1.0 ± 1.0
Promedio	0.8 ± 0.9	0.7 ± 0.4	1.0 ± 0.8	1.1 ± 1.3	
	<b>Huevo fáfara %</b>				
Positiva	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.3
Negativa	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.3	0.2 ± 0.2
Promedio	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.3	
	<b>Huevo sucio sangre %</b>				
Positiva	1.0 ± 1.1	1.5 ± 1.3	0.7 ± 0.8	0.9 ± 0.7	1.0 ± 1.0
Negativa	1.4 ± 0.5	0.7 ± 0.6	1.6 ± 1.2	0.5 ± 0.4	1.0 ± 0.7
Promedio	1.2 ± 0.8	1.1 ± 1.0	1.1 ± 1.0	0.7 ± 0.6	
	<b>Huevo sucio heces</b>				
Positiva	1.4 ± 0.5	1.3 ± 0.6	1.3 ± 0.9	1.3 ± 1.0	1.3 ± 0.8
Negativa	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.4	0.7 ± 0.3	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.4
Promedio	1.1 ± 0.5	1.1 ± 0.5	1.0 ± 0.6	1.1 ± 0.7	

Valores ± desviación estándar

### 3.2. Calidad de huevo

En el Cuadro 4, se observan los datos obtenidos en las pruebas de calidad de huevo. Se puede apreciar para los efectos principales, que los resultados tanto para el factor dietas como para el factor aditivos; las Unidades Haugh, grosor del cascarón y color de la yema de huevo con relación al abanico DSM, se notan muy similares entre tratamientos. No se encontró diferencia estadística ( $p>0.05$ ), entre factores, ni efecto de interacción.

**Cuadro 4.** Variables en la calidad de huevo de las gallinas de postura de 42 semanas de edad, alimentadas con dietas sorgo-soya-canola y adicionadas con *B.subtilis* y un complejo enzimático.

DIETAS	ADITIVOS				Promedio
	Sin aditivo	Probióticos	Enzima	Prob.+enzima	
	<b>Grosor cascaron <math>\mu\text{m}</math></b>				
Positiva	337 $\pm$ 7.7	342 $\pm$ 9.4	342 $\pm$ 4.8	349 $\pm$ 12.4	342 $\pm$ 8.6
Negativa	345 $\pm$ 11.7	342 $\pm$ 5.2	352 $\pm$ 7.2	347 $\pm$ 9.2	346 $\pm$ 8.0
Promedio	341 $\pm$ 9.7	342 $\pm$ 7.3	347 $\pm$ 6.0	348 $\pm$ 10.8	
	<b>U. Haugh</b>				
Positiva	90.8 $\pm$ 2.8	89 $\pm$ 2.9	91 $\pm$ 2.5	89 $\pm$ 3.4	90.0 $\pm$ 3.0
Negativa	92.6 $\pm$ 2.0	89.2 $\pm$ 1.3	92.2 $\pm$ 2.5	91.2 $\pm$ 1.8	91.3 $\pm$ 2.0
Promedio	91.7 $\pm$ 2.4	89.1 $\pm$ 2.1	91.6 $\pm$ 2.5	90.1 $\pm$ 2.7	
	<b>Color yema abanico DSM</b>				
Positiva	9.4 $\pm$ 2.8	9.8 $\pm$ 0.4	9.8 $\pm$ 0.4	10 $\pm$ 0	9.75 $\pm$ 0.9
Negativa	9.2 $\pm$ 0.4	9.2 $\pm$ 0.4	9.2 $\pm$ 0.4	9.4 $\pm$ 0.5	9.25 $\pm$ 0.4
Promedio	9.3 $\pm$ 1.6	9.50 $\pm$ 0.4	9.50 $\pm$ 0.4	9.70 $\pm$ 0.3	

Valores  $\pm$  desviación estándar.

### 3.3. Análisis de colesterol sérico, LDL y HDL

En el Cuadro 5 se muestran los resultados promedio de los análisis de colesterol sérico, LDL y HDL. No se observó diferencia estadística ( $p>0.05$ ) en los factores tanto aditivos como dietas, se observa que los niveles de colesterol sérico, LDL y HDL, fueron muy parecidos entre los tratamientos.

**Cuadro 5.** Cambios ocurridos en el contenido de colesterol sérico, LDH y HDL de las gallinas de postura alimentadas con dietas sorgo-soya-canola y adicionada con *B.subtilis* y un complejo enzimático, de 42-54 semanas de edad.

Dietas	ADITIVOS				
	Colesterol mg/Dl				
	Sin aditivo	Probiótico	Enzima	Prob.+enzima	Prom.
Positiva	100.2 ± 26.0	113.3 ± 21.0	100.0 ± 19.9	105.3 ± 9.1	104.7±19.0
Negativa	129.6 ± 44.4	108.6 ± 22.8	109.7 ± 15.7	122.9 ± 21.1	117.7±26.0
Promedio	114.9 ± 35.2	110.9 ± 22.0	104.9 ± 17.8	114.1 ± 15.1	
	LDL mg/dL				
Positiva	13.9 ± 10.8	14.0 ± 1.8	14.9 ± 1.4	15.8 ± 2.5	31.7 ± 4.1
Negativa	18.9 ± 1.0	19.4 ± 4.7	17.3 ± 2.3	16.2 ± 0.9	17.1± 2.2
Promedio	16.4 ± 6.0	16.7 ± 3.3	16.0 ± 1.9	16.0 ± 1.7	
	HDL mg/dL				
<b>Positiva</b>	30.0 ± 2.5	30.2 ± 3.1	32.4 ± 3.4	34.1 ± 5.6	31.7 ± 3.7
<b>Negativa</b>	43.5 ± 7.3	41.7 ± 9.7	37.0 ± 5.2	35.7 ± 5.0	39.5 ± 6.8
<b>Promedio</b>	36.6 ± 4.9	35.9 ± 6.4	34.7 ± 4.3	34.9 ± 5.3	

Valores ± desviación estándar.

### 3.4. Inmunidad humoral

Los resultados del análisis de IgA secretora en intestino, se muestran en el Cuadro 6. No se observó diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) en los títulos de anticuerpos séricos a la enfermedad de Newcastle, tanto en el factor aditivos como para el factor dietas. En los valores de IgA secretora intestinal, en el factor dietas se observó que las gallinas que consumieron la dieta positiva (+) presentaron 24 % o 17 unidades de densidad óptica más respecto a las gallinas que consumieron la dieta negativa (-) pero sin mostrar diferencia significativa. En el factor aditivos se observó, una tendencia a la alza en las gallinas que consumieron las dietas con probiótico + enzima, pero sin mostrar ninguna variación significativa.

**Cuadro 6.** Niveles de IgA secretora en el intestino, en las gallinas de postura alimentadas con dietas sorgo-soya-canola, con un complejo multienzimático y un probiótico.

DIETAS	ADITIVOS				
	% IgA secretora				
	Sin aditivo	Probióticos	Enzima	Prob.+enzima	Promedio
Positiva	40.9 ± 30.4	38.0 ± 17.7	86.4 ± 8.0	132.9 ± 64.78	74.55 ± 30.2
Negativa	26.3 ± 10.6	22.6 ± 1.1	68.7 ± 34.0	113.0 ± 27.9	57.65 ± 18.4
Promedio	33.6 ± 20.5	30.3 ± 9.4	77.5 ± 21.0	123.0 ± 46.34	

Valores ± desviación estándar

#### 4. DISCUSIÓN

El incremento en el peso de huevo en el factor dietas, de alrededor de 1.3 %, en el periodo de 42 a 54 semanas, en las gallinas alimentadas con las dietas testigo positivo (+), se atribuye a la mayor densidad de nutrientes contenidos en esta dieta (Energía Metabolizable, proteína y aminoácidos esenciales), lo que a su vez coincide con Wu *et al.* (2005) informaron que el peso del huevo, aumentó con el incremento de energía en las dietas en gallinas Bovans. (Li *et al.*, 2013) realizaron un experimento en donde evaluaron diferentes niveles de energía metabolizable y proteína, y notaron que el aumento de EM y proteína PC mejoraron el peso del huevo. Jia *et a.*, (2014) evaluaron dietas con diferentes niveles de proteína (18.0, 17.5, 17.0, 16.5, y 16.0%); informaron una disminución en el peso del huevo en dietas con 16.0 y 16.5 % de proteína.

Novac *et al* (2006) evaluaron el efecto de diferentes niveles de proteína en dietas de gallinas de postura; reportaron que las gallinas en la fase II de 43 a 63 semanas de edad, que consumieron dietas con niveles bajos de proteína, redujeron significativamente el peso del huevo en comparación con las gallinas que consumieron dietas con niveles más altos de proteína.

Shim *et al* (2013) realizaron un experimento en donde evaluaron dietas con 3 diferentes niveles de proteína, en gallinas de postura de 17 a 74 semanas de edad; reportaron que las gallinas que consumieron 13.8 g de proteína / día disminuyeron significativamente el peso del huevo en comparación con las gallinas que consumieron 14.3 o 16.3 g de proteína / día.

En el presente estudio, el contenido de probiótico que se empleó en las dietas fue de 3E+08 ufc/g) a razón de 250g / tonelada de alimento; en los parámetros productivos, no se presentó efecto alguno en las gallinas que lo recibieron en su alimentación, efecto similar lo describe Xu *et al* (2006) al evaluar los parámetros productivos con diferentes dosis de *B. subtilis* 500, 1,000 y 1,500 mg /kg de alimento a una concentración de  $6.0 \times 10^9$  microorganismos / g; no observaron ningún efecto en la producción de huevos en los periodos de 26 a 54 semanas de

edad. Ribeiro y Albino (2014) realizaron un experimento en donde utilizaron dietas basadas en maíz + harina de soya con diferentes concentraciones de *Bacillus subtilis*: ellos no observaron diferencia en el consumo de alimento, masa de huevo, cáscara de huevo, yema o pesos de albumina, en las gallinas alimentadas con las dietas.

Kurtoglu et al (2004) realizaron un experimento en donde emplearon 4 concentraciones de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, empleando maíz + harina de soya + trigo como ingredientes principales; no observaron diferencia en peso del huevo y consumo de alimento. De la misma manera, la adición de probióticos a la dieta con base en *Lactobacillus salivarius*, *Clostridium butyricum* y *Bacillus subtilis*, en dietas con maíz + harina de soya como ingredientes principales; no mejoró el grosor de cascara, color de la yema, y colesterol en yema de huevo. Zhang et al, (2012), reportaron que puede haber efecto adverso a la adición del probiótico, debido a un posible aumento de la motilidad intestinal con un excesivo número de organismos, alterando de este modo, la disponibilidad de nutrientes para su absorción en puntos deseados. En segundo lugar, otras poblaciones bacterianas beneficiosas puede alterarse de manera que la convivencia de los microorganismos establecidos se interrumpe.

Mahdavi et al (2005) evaluaron un probiótico de esporas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*; sin influir significativamente en el peso del huevo.

En el presente estudio se observó mayor peso del huevo en las dietas sin reducción de nutrientes, lo que sugiere que la reducción de 2% de proteína, aminoácidos y 50 kcal de EM a las dietas sorgo-soya-canola, no aportó una mejor digestibilidad por el empleo del complejo multienzimático y del probiótico.

Los resultados observados en el presente trabajo, coinciden con Wena et al, (2012) quienes realizaron un estudio en donde evaluaron el efecto de un cóctel enzimático, informó que no hubo efecto en el comportamiento productivo de las gallinas ponedoras en la producción de huevos. Resultados similares fueron obtenidos también por Hahn (2010), quien no observó ningún efecto de una

combinación de fitasas, xilanasas, amilasas y proteasas en la producción de huevos y el peso del huevo en gallinas de postura.

Benabdeljelil y Arbaoui (1994) reportaron que no encontraron diferencia en las gallinas de postura, empleando un complejo multienzimático a base de amilasas, proteasas, celulasas, beta-glucanasas y lipasas en la producción de huevo, peso de huevo, unidades haugh, y calidad de cascarón.

Ibrahim *et al*, (2003) evaluaron el rendimiento y la calidad del huevo en gallinas de postura, con la adición de un complejo enzimático (amilasas, xilanasas,  $\beta$ -glucanasas y hemicelulasas), y diferentes niveles de energía, en dietas basadas en maíz + trigo + harina de soya; reportaron que en el grosor de cascarón, resistencia de cascarón y porcentaje de huevo sucio, no se vieron afectadas significativamente por la administración de enzimas y los diferentes niveles de energía. Cufadar *et al* (2009) realizaron un experimento donde evaluaron los efectos de la suplementación de xilanasas en el rendimiento y calidad de huevo en gallinas de postura, en dietas a diferentes concentraciones de maíz + trigo; reportaron que los tratamientos no tuvieron efecto sobre la producción de huevo, peso de huevo, masa de huevo, consumo de alimento y unidades Haugh.

Balevi *et al* (2001) emplearon dietas basadas en maíz + soya + trigo y añadieron un probiótico a diferentes concentraciones; al igual que en este trabajo, ellos no observaron diferencia en el consumo de alimento, conversión alimenticia, y huevos dañados. Del mismo modo, el peso del huevo y la respuesta inmune periférica no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Sobczak y Kozlowski (2015) evaluaron el efecto de *Bacillus subtilis* en la producción de huevo y parámetros fisiológicos en gallinas de postura, reportaron que no hubo efecto significativo en el peso de huevo, % de postura, consumo de alimento y conversión alimenticia en dietas de gallinas complementadas con *Bacillus subtilis*. Otros estudios también revelaron que los probióticos no tenían

ninguna influencia sobre los parámetros de rendimiento, tales como el peso del huevo y conversión alimenticia (Panda et al, 2003).

Gunawardana et al (2009) emplearon diferentes niveles de energía y proteína, y evaluaron un producto que contiene xilanasas y  $\beta$ -glucanasas; no reportaron efectos en el consumo de alimento en dietas adicionadas con enzimas, sin embargo obtuvieron un peso de huevo mayor en gallinas alimentadas con dietas altas en proteína.

Los datos obtenidos en colesterol, HDL y LDH, no mostraron diferencia en este estudio, sin embargo; Salma et al (2007) emplearon un probiótico a diferentes concentraciones a base de *Rhodobacter capsulatus* en dietas de gallinas de postura; reportaron que las dietas con la mayor concentración del probiótico presentaron un aumento en las lipoproteínas de alta densidad HDL, colesterol e índice aterogénico en el suero, también reportaron que el probiótico no pareció causar ningún efecto adverso en la producción de huevo, grosor de la cáscara, unidades Haugh y conversión alimenticia en las dietas con las diferentes concentraciones de probiótico.

## 5. Conclusiones

Con base en las condiciones empleadas en el presente estudio y las condiciones experimentales, se puede concluir que las gallinas Bovans de postura alimentadas con dietas con base en sorgo-soya-canola como ingredientes principales, con densidades de nutrientes mayores que aquellas que recibieron dietas reducidas en EM (-50 Kcal/kg) y -2% de aminoácidos esenciales:

- No tuvieron mejor % de postura, peso del huevo, consumo de alimento, índice de conversión, menor cantidad de huevo sucio y mejor calidad de huevo.
- No se afectó la proporción de IgA secretora intestinal.
- Los valores de colesterol, HDL y LDH no se vieron afectados.

El uso de probióticos de esporas de *Bacillus subtilis* solo o en combinación con un complejo multienzimático de xilanasas, proteasas y amilasas en dietas con sorgo-soya como ingredientes principales:

- No incrementaron el % de postura, peso del huevo, consumo de alimento, índice de conversión, menor huevo sucio, mejor calidad de huevo.
- No disminuyeron los niveles de colesterol en suero sanguíneo.
- No afectaron los niveles de IgA secretora intestinal.

Por último, de la información obtenida en presente trabajo, podemos concluir que el complejo multienzimático compuesto de amilasas, proteasas y xilanasas y el probiótico que contiene esporas de *Bacillus subtilis*, no tuvieron efecto significativo sobre el valor alimenticio de las dietas sorgo-soya para gallinas de postura Bovans White de 42 a 54 semanas de edad, que cubrían las necesidades recomendadas para la estirpe.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Abdur R. Fataftaha A., Das G. Effects of dietary *Bacillus subtilis* and inulin supplementation on performance, eggshell quality, intestinal morphology and microflora composition of laying hens in the late phase of production. *Animal Feed Science and Technology* (2013) 179;103– 111.
2. Balevi, B. Coskun, V. Kurtoglu y. S. Cetingül. Effect of dietary probiotic on performance and humoral immune response. *British Poultry Science* (2001) Sep; 42: 456–461.
3. Bedford M.R y Partridge G.G. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*, CAB International. 2nd Edition (2011).
4. Bedford M.R. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. *Animal Feed Science and Technology*. (1995) 53;145-155.
5. Benabdeljelil y M.I. Arbaou. Effects of enzyme supplementation of barley-based diets on hen performance and egg quality. *Animal Feed Science and Technology* (1994), 48;325-334.
6. Birger S. *Function of the digestive system*. Poultry Science Association, Inc 2014.
7. Bobeck, E.A, Nachtrieb, N.A, Batal A.B† and Persia M.E. Effects of xylanase supplementation of corn-soybean meal-dried distiller's grain diets on performance, metabolizable energy, and body composition when fed to first-cycle laying hens. *Appl. Poult. Res* (2014). 23:174–180.
8. Cufadar Y, Yıldız O, and Olgun O. Effects of xylanase enzyme supplementation to corn/ wheat-based diets on performance and egg quality in laying hens. *Can. J. Anim. Sci.* September 2009.
9. Chaucheyras D y Dury H. *Probiotics in animal nutrition and health* Accepted: 25 November 2008 © 2009 Wageningen Academic Publishers *Beneficial Microbes*, 2010; 1(1): 3-9.
10. *Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola*. 2015. Dirección de Estudios Económicos. Abril 2015.

11. Cowieson.A. J. Evolving enzyme technology: impact on commercial poultry nutrition. Danisco Animal Nutrition. Missouri, USA. 2006.
12. Dana Hahn-Didde y Sheila E. Purdum. The effects of an enzyme complex in moderate and low nutrient-dense diets with dried distillers grains with solubles in laying hens. 2014 J. Appl. Poult. Res. 23:23–33.
13. Divya Jaroni, Sheila E. Scheideler,\* Mary Beck,\* y Craig Wyatt†. The Effect of Dietary Wheat Middlings and Enzyme Supplementation. 1. Late Egg Production Efficiency, Egg Yields, and Egg Composition in Two Strains of Leghorn Hens. 1999 Poultry Science 78:841–847.
14. Fernyo G.P., Matheus R.1,† Marcio L.C. Exogenous enzyme complexes and linoleic acid to laying hens. 2015 J. Appl. Poult. Res. 24:30–36.
15. Gómez VGG. Modulación nutricional de la inmunidad en pollo de engorda mediante el empleo de un estimulante (paredes de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*) [Tesis de Doctorado. Distrito Federal, México: Universidad Nacional Autónoma de México. 2009.
16. Gunawardana, D. A. Roly Sr. y M. M. Bryant. Effect of dietary energy, protein, and a versatile enzyme on hen performance, egg solids, egg composition, and egg quality of Hy-Line W-36 hens during second cycle, phase two. 2009 J. Appl. Poult. Res. 18:43–53.
17. Hahn-Didde Dana, Purdum E. Sheila. The effects of an enzyme complex in moderate and low nutrient-dense diets with dried distillers grains with solubles in laying hens. 2014 J. Appl. Poult. Res. 23:23–33.
18. Hahn, D.L., 2010. The effects of phytase and an enzyme combination in moderate and low nutrient dense diets in laying hens. MS Dissertation. University of Nebraska, Lincoln, NE, USA.
19. Ibrahim Ç., Engin Yenice , Dilek G. y Elif Ö. Effects of Energy Level and Enzyme Supplementation in Wheat-Based Layer Diets on Hen Performance and Egg Quality. Animal Science, 2003 53:3, 113-119.
20. Jia,\* B. A. Slominski,\*1 W. Guenter,\* A. Humphreys,† y O. Jones‡. The Effect of Enzyme Supplementation on Egg Production Parameters and Omega-3

- Fatty Acid Deposition in Laying Hens Fed Flaxseed and Canola Seed. 2008 Poultry Science.
21. Ji F.\*† Fu S.Y,\*‡ Ren B,\* Wu G.S,\* Zhang H. J\* Yue H. J\* J. Qi G. H. Evaluation of amino-acid supplemented diets varying in protein levels for laying hens. 2014 J. Appl. Poult. Res. 23:384–392.
  22. Jaroni,\* S. E. Scheideler,\* M. M. Beck,\* y C. Wyatt. The Effect of Dietary Wheat Middlings and Enzyme Supplementation II: Apparent Nutrient Digestibility, Digestive Tract Size, Gut Viscosity, and Gut Morphology in Two Strains of Leghorn Hens<sup>1</sup>. †. Poultry Science 1999, 78:1664–1674.
  23. Jalal,\* S. E. Scheideler,† y E. M Pierson‡. Strain Response of Laying Hens to Varying Dietary Energy Levels With and Without Avizyme Supplementation. 2007 J. Appl. Poult. Res. 16:289–295.
  24. Kazue Luciana, Biondaro M, Elis Moraes y Loddi Maria. Variations on the Efficacy of Probiotics in Poultry. 2012 Otutumi et al., licensee InTech.
  25. Koutsos<sup>1</sup> y V. J. Arias. Intestinal Ecology: Interactions Among the Gastrointestinal Tract, Nutrition, and the Microflora. 2006 J. Appl. Poult. Res. 15:161–173.
  26. Kurtoglu, F. Kurtoglu, E. Seker, B. Coskun, T. Balevi. Effect of probiotic supplementation on laying hen diets on yield performance and serum and egg yolk cholesterol. Food Additives and Contaminants, Vol. 21, No. 9 (September 2004), pp. 817–823.
  27. Kyung-Woo Lee, Duk Kyung Kim, Hyun S. Lillehoj, Seung I. Jang, Sung-Hyen Lee. Immune modulation by Bacillus subtilis-based direct-fed microbials in commercial broiler chickens. Animal Feed Science and Technology 200 (2015) 76–85.
  28. Latorre JD, Hernandez X, Kallapura G, Mencini A. Evaluation of germination, distribution, and persistence of Bacillus subtilis spores through the gastrointestinal tract of chickens. 2014 Poultry Science 93 :1793–1800
  29. Li,<sup>1</sup> L. M. Zhang. X.H. Wu. X.J. Yang. Effects of metabolizable energy and balanced protein on egg production, quality, and components of Lohmann Brown laying hens. 2013 J. Appl. Poult. Res. 22:36–46.

30. Mahdavi, H.R. Rahmani\* y J. Pourreza. Effect of Probiotic Supplements on Egg Quality and Laying Hen's Performance. *International Journal of Poultry Science* 4 (7): 488-492, 2005.
31. Marquardt, RR, A. Brenes. Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, Volume 60, August 1996, Pages 321-330.
32. Mirzaie, S.; Zaghari, M.; Aminzadeh, S.; Perez Serrano, Martina; Hivazad, M. y Gonzalez Mateos, Gonzalo (2011). Efectos de la inclusión de trigo y suplementación con xilanasas del pienso sobre la actividad enzimática intestinal, la retención de los nutrientes y la productividad en gallinas de 25 a 33 semanas de edad. En: "ITEA XIV Jornadas sobre Producción Animal", 17/05/2011 - 18/05/2011, Zaragoza, España. pp. 1-3.
33. Mikulski, J. Jankowski, J. Naczmanski, M. Mikulska,\* y V. Demey. Effects of dietary probiotic (*Pediococcus acidilactici*) supplementation on performance, nutrient digestibility, egg traits, egg yolk cholesterol, and fatty acid profile in laying Hens. *2012 Poultry Science* 91 :2691–2700.
34. Mountzouris KC, Tsitsrikos P, Palamidi I. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. *Poult Sci.* 2010 Jan; 89(1):58-67.
35. Nahashon, S.N, Nakaue, H.S. Synder, S.P. Mirosh, L.W. Performance of Single Comb White Leghorn layers fed corn-soybean meal and barley-corn-soybean meal diets supplemented with a direct-fed microbial. *Poultry Science* 1994. 73: 1712-1723.
36. Novak, H.M. Yakout, y S.E. Scheideler. The effect of dietary protein level and total sulfur amino acid:lysine ratio on egg production parameters and egg yield in Hy-Line W-98 Hens. *2006 Poultry Science* 85:2195–2206.
37. Novak, H.M. Yakout,† y J. Remus‡. Response to Varying Dietary Energy and Protein With or Without Enzyme Supplementation on Growth and Performance of Leghorns Growing Period. *2007 J. Appl. Poult. Res.* 16:481–493.

38. Panda A.K. Reddy M.R. Rama Rao S.V. Praharaj N.K. Production performance, serum/yolk cholesterol and immune competence of White Leghorn layers as influenced by dietary supplementation with probiotic. Trop. Anim. Health Prod (2003) Feb; 35: 85–94.
39. Patterson. K.M. Burkholder. Application of prebiotics and Probiotics in Poultry Production. Poultry Science (2003) 82:627-631.
40. Pirgozliev V.R Rose. S.P Bedford M.R. The effect of amylose:amylopectin ratio in dietary starch on growth performance and gut morphology in broiler chickens.European Poultry Science. Arch 74 S. 21-29, 2010.
41. Ribeiro Jr. T. Albino. Effects of the dietary supplementation of *Bacillus subtilis* levels on performance, egg quality and excreta moisture of layers. Animal feed Science and Technology. September 2014, Volumen 195, pages 142-146.
42. Rinttilä y J. Apajalahti. Intestinal microbiota and metabolites Implications for broiler chicken health and performance. 2013 J. Appl. Poult. Res. 22:647–658.
43. Romero, C.M. Parsons, P.L. Utterback, P.W. Plumstead, V. Ravindran. Comparative effects of dietary carbohydrases without or with protease on the ileal digestibility of energy and amino acids AME<sub>n</sub> in young broilers. Animal Feed Science and Technology. Volume 18, April (2013), pages 35-44.
44. Salma. A.G. Miah, K.M. Tareq, T. Maki, † y H. Tsujii. Effect of Dietary Rhodobacter capsulatus on Egg-Yolk Cholesterol and Laying Hen Performance. Poultry Science (2007) 86:714-719.
45. Shivaramaiah, N.R. Pumford, M.J. Morgan, R.E. Wolfenden, A.D. Wolfenden, A. Torres-Rodríguez, B. M. Hargis, y G. Téllez . Evaluation of Bacillus species as potential cyidates for direct-fed microbials in commercial poultry. Poultry science (2011). 90:1574-1580 2011.
46. Shim, E. Song,† L. Billard ,† S.E. Aggrey , G.M. Pesti, y P. Sodsee. Effects of balanced dietary protein levels on egg production and egg quality parameters of individual commercial layers. Poultry Science (2013) 92:2687–2696.
47. Silversides, T.A. Scott, D.R. Korver, M. Afsharmanesh, y M. Hruby. A Study on the Interaction of Xylanase y Phytase Enzymes in Wheat-Based Diets Fed to

- Commercial White and Brown Egg Laying Hens. *Poultry Science* (2006), 85:297–305.
48. Sobczak Alicja, Kozłowski K. The effect of a probiotic preparation containing *Bacillus subtilis* ATCC PTA-6737 on egg production and physiological parameters of laying hens. *Ann. Anim. Sci.*, Vol. 15, No. 3 (2015) 711–723.
  49. Sohail Hassan Khan, Muhammad Atif, Nasir Mukhtar. Effects of supplementation of multi-enzyme and multi-species probiotic on production performance, egg quality, cholesterol level and immune system in laying hens. *Journal of Applied Animal Research*, Vol. 39, No. 4, December 2011, pages 386\_398.
  50. Wena, L.C. Wanga, Y.M. Zhoua, Z.Y. Jiangb, T. Wanga. Effect of enzyme preparation on egg production, nutrient retention, digestive enzyme activities and pancreatic enzyme messenger RNA expression of late-phase laying hens. *Animal Feed Science and Technology* 172 (2012) 180– 186.
  51. Wu G. M.M. Bryant, R.A. Voitle, y D.A. Roly. Effect of dietary energy on performance and egg composition of Bovans white y Dekolb white hens during phase 1. *Poult. Sci* (2005), Oct;84:1610–1615.
  52. Xu, C. Ji,† Q. Ma, K. Hao, Z.-Y. Jin, y K. Li. Effects of a Dried *Bacillus subtilis* Culture on Egg Quality. *Poultry Science* (2006), 85:364–368.
  53. Zhang, Q. M. Xie, J. Ji, W.H. Yang. Different combinations of probiotics improve the production performance, egg quality, and immune response of layer hens. *Poultry Science* (2012), 91:2755–2760.