

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN  
Y DE LA SALUD ANIMAL

EVALUACIÓN DE LAS ENZIMAS FIBROLÍTICAS PRODUCIDAS POR LOS  
HONGOS *Trametes sp.*, *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger*

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

ALIS TERESA MÁRQUEZ ARAQUE

TUTOR: GERMÁN DAVID MENDOZA MARTÍNEZ

COMITÉ TUTORAL: SERGIO SEGUNDO GONZÁLEZ MUÑOZ  
SILVIA ELENA BUNTINX DIOS

MÉXICO. DF.

FEBRERO DEL 2008



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.

## DEDICATORIA

“A cada mujer y a cada hombre que tienen la voluntad de luchar por conseguir lo que quieren en un universo donde las dificultades son el principal estímulo para avanzar un gran trecho en cortos pasos”

A mis padres María y José.

A mi familia, por que siempre han estado compartiendo conmigo todos los tropiezos y los logros.

A mis amigos de ayer, de hoy, y de siempre.....

***“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir”***

Albert Einstein

## **AGRADECIMIENTOS**

A las inexplicables fuerzas divinas, por la fortaleza que me dan todos los días.

Al Dr. Germán D. Mendoza Martínez, por su incondicional apoyo. Infinitas gracias por permitirme ser su alumna. Agradecida estoy por tener la fortuna de compartir con un gran Maestro, pero sobre todo por contar con la dirección de un ser humano especial, que Dios le bendiga siempre junto a su familia.

A la familia Mendoza Barrera, por permitirme compartir su hogar en tiempos difíciles.

Al la Dra. Silvia Buntinx Dios, por haberme brindado tanta confianza y cariño, y por todo el apoyo durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Octavio Loera Corral, gracias por estar siempre apoyándome, por sus oportunas y acertadas sugerencias, y por el apoyo dado en el laboratorio de Biología Molecular en la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, DF.

Al Dr. Sergio S. González Muñoz, por apoyo y confianza durante mis estudios, y por sus acertadas sugerencias.

Al Dr. Marcos Meneses Mayos, por todo el apoyo brindado para la realización del trabajo en el Laboratorio de Nutrición Animal del Colegio de Postgraduados de México.

A la MC. Magdalena Crosby, gracias por su incondicional ayuda en el Laboratorio de Nutrición Animal del Colegio de Postgraduados de México.

A los Sres. Anastasio, Laura y Andrés, por la colaboración en el laboratorio de Nutrición Animal del Colegio de Postgraduados.

A la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” en Barquisimeto, Venezuela, por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme ser una más de sus estudiantes.

Al Dr. Javier Flores Covarrubias, gracias por su apoyo.

A mis compañeros Armando, Alfonso, Divanery, Rafael, Juan Carlos, Lorena, Maricela, gracias por su ayuda y amistad.

Y a todos, los que de alguna u otra manera me ayudaron a soportar la distancia de mis raíces.

**Gracias.**

Esta tesis fue parcialmente financiada por el CONACYT con el Proyecto de Investigación básica N.º42782-Z

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN GENERAL.....	xi
GENERAL ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN .....	1
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>REVISION DE LITERATURA</b>	
Características químicas de los constituyentes de la pared celular y su relación con el valor nutritivo de los forrajes.....	4
Constituyentes de la pared celular de las plantas.....	4
Carbohidratos estructurales y compuestos fenólicos.....	6
Fracciones de fibra y su relación con el valor nutritivo de los forrajes.....	10
Degradación ruminal de los carbohidratos estructurales.....	12
Microorganismos fibrolíticos del rumen.....	12
Degradación de la celulosa y hemicelulosa.....	14
Actividad enzimática ruminal.....	17
Enzimas fibrolíticas exógenas .....	21
Modo de acción de las enzimas fibrolíticas exógenas.....	23
Efectos de las enzimas fibrolíticas exógenas en la composición química y en la digestibilidad de los alimentos.....	24
Efectos de las enzimas fibrolíticas en el consumo de alimento, ganancia de peso y producción de leche.....	28
Factores que influyen en la actividad y estabilidad de las enzimas fibrolíticas exógenas.....	29
Hongos productores de enzimas fibrolíticas.....	33

Referencias.....	38
------------------	----

## **CAPÍTULO II**

### **ACTIVIDAD FIBROLÍTICA DE LAS ENZIMAS PRODUCIDAS POR *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 Y *Aspergillus niger* AD96.4 EN FERMENTACIÓN SÓLIDA**

Resumen.....	52
Abstract.....	53
Introducción.....	54
Material y métodos.....	55
Resultados.....	58
Discusión y conclusiones.....	59
Referencias.....	63

## **CAPÍTULO III**

### **DETERMINACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE LAS ENZIMAS DE *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 Y DE UN PRODUCTO FIBROLÍTICO COMERCIAL EN LÍQUIDO RUMINAL**

Resumen.....	69
Abstract.....	70
Introducción.....	71
Material y métodos.....	73
Resultados.....	75
Discusión y conclusiones.....	78
Referencias.....	80

## **CAPÍTULO IV**

### **EFFECTO DE LAS ENZIMAS DE UN PRODUCTO FIBROLÍTICO COMERCIAL Y DEL pH INICIAL DEL LÍQUIDO RUMINAL SOBRE LA DEGRADACION DE LA FIBRA DETERGENTE NEUTRO DE HENO DE ALFALFA (*Medicago sativa*) Y PASTO OVILLO (*Dactylis glomerata*).**

Resumen.....	92
--------------	----

Abstract.....	93
Introducción.....	94
Material y métodos.....	95
Resultados.....	97
Discusión y conclusiones.....	99
Referencias.....	102
<b>CONCLUSIONES FINALES.....</b>	<b>112</b>



## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
<b>CAPÍTULO I</b>	
Cuadro 1.1. Principales polímeros que componen la pared celular de las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas .....	6
Cuadro 1.2. Principales enzimas que hidrolizan los constituyentes de la pared celular de las plantas .....	15
Cuadro 1.3. Polisacáridasas producidas por algunos microorganismos del rumen.....	18
Cuadro 1.4. Actividad enzimática específica de carbohidrasas de protozoos asociados a la fase líquida (PAL) y de bacterias asociadas a la fase sólida (BAS) en muestras de líquido ruminal .....	20
Cuadro 1.5. Efectos de la aplicación de enzimas fibrolíticas en la digestibilidad .....	27
Cuadro 1.6. Composición química y digestibilidad de materiales fibrosos tratados o no con <i>Pleurotus</i> sp.....	35
<b>CAPÍTULO II</b>	
Cuadro 2.1. Efecto de la especie de hongo y del tiempo de fermentación sobre la actividad enzimática y concentración de proteína de los extractos enzimáticos.....	68
<b>CAPÍTULO III</b>	
Cuadro 3.1. Niveles de proteína de las fuentes de enzimas en los tratamientos.....	83
Cuadro 3.2. Contrastes ortogonales para la concentración de nitrógeno amoniacal ( $\text{mg dL}^{-1}$ ) en líquido ruminal con enzima de <i>Trametes</i> sp. EUM1 incubada con xilano.....	83
Cuadro 3.3. Contrastes ortogonales para la concentración de nitrógeno amoniacal ( $\text{mg dL}^{-1}$ ) en líquido ruminal con enzima de <i>Trametes</i>	

sp. EUM1 incubada con carboximetilcelulosa.....	84
Cuadro 3.4. Contrastes ortogonales para la concentración de nitrógeno amoniacal (mg dL <sup>-1</sup> ) en líquido ruminal con enzima de <i>P. ostreatus</i> IE8 incubada con xilano.....	85
Cuadro 3.5. Contrastes ortogonales para la concentración de nitrógeno amoniacal (mg dL <sup>-1</sup> ) en líquido ruminal con enzima de <i>P. ostreatus</i> IE8 incubada con carboximetilcelulosa.....	86
Cuadro 3.6. Contrastes ortogonales para la concentración de nitrógeno amoniacal (mg dL <sup>-1</sup> ) en líquido ruminal con enzimas de un producto fibrolítico comercial (Fibrozyme®) incubado con xilano.....	87
Cuadro 3.7. Contrastes ortogonales para la concentración de nitrógeno amoniacal (mg dL <sup>-1</sup> ) en líquido ruminal con enzimas de un producto fibrolítico comercial (Fibrozyme®) incubado con carboximetilcelulosa.....	88

#### **CAPÍTULO IV**

Cuadro 4.1. Composición de la fibra detergente neutro del heno de alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y pasto ovinillo ( <i>Dactylis glomerata</i> ).....	106
Cuadro 4.2. Degradación de la fibra detergente neutro (g kg <sup>-1</sup> MS) del heno de alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) con y sin enzima de Fibrozyme en líquido ruminal con diferentes pH inicial.....	106
Cuadro 4.3. Degradación de la fibra detergente neutro (g kg <sup>-1</sup> MS) del pasto ovinillo ( <i>Dactylis glomerata</i> ) con y sin enzima de Fibrozyme en líquido ruminal con diferentes pH inicial... ..	107
Cuadro 4.4. Cinética de la degradación de la fibra detergente neutro del heno de alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) con y sin enzima de Fibrozyme en líquido ruminal con diferentes pH inicial.....	108
Cuadro 4.5. Cinética de la degradación de la fibra detergente neutro del pasto ovinillo ( <i>Dactylis glomerata</i> ) con y sin enzima de Fibrozyme en líquido ruminal con diferentes pH inicial.....	109

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>CAPÍTULO III</b>	
Figura 3.1. Concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH <sub>3</sub> ) en líquido ruminal con enzimas de <i>Trametes sp.</i> EUM1.....	89
Figura 3.2. Concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH <sub>3</sub> ) en líquido ruminal con enzimas de <i>P. ostreatus</i> IE8.....	90
Figura 3.3. Concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH <sub>3</sub> ) en líquido ruminal con enzimas de un producto fibrolítico comercial (Fibrozyme®).....	91
<b>CAPÍTULO IV</b>	
Figura 4.1. Degradación de la fibra detergente neutro (DFDN) de heno de alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) con y sin enzima de Fibrozyme en líquido ruminal con diferentes pH inicial.....	110
Figura 4.2. Degradación de la fibra detergente neutro (DFDN) del pasto ovillo ( <i>Dactylis glomerata</i> ) con y sin enzima de Fibrozyme en líquido ruminal Con diferentes pH inicial.....	111

## RESUMEN GENERAL

Se realizaron tres experimentos para evaluar diferentes fuentes de enzimas fibrolíticas para uso en alimentación de rumiantes. En el primer experimento, se estudió la actividad de enzimática de xilanasas, celulasas y lacasas de *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 a los 14 y 19 días de fermentación sólida en bagazo de caña de azúcar. El *Trametes* sp. expresó la mayor ( $P \leq 0.01$ ) actividad de xilanasas y celulasas, sin diferencias entre 14 y 19 días. La mayor ( $P \leq 0.01$ ) actividad de lacasas fue expresada por *P. ostreatus* a los 14 días de fermentación. La actividad enzimática de xilanasas expresada por *Trametes* sp. EUM1 muestra potencial para su posible utilización en aplicaciones biotecnológicas. En el segundo experimento, se determinó la degradación en líquido ruminal de las enzimas producidas por los hongos *Trametes* sp. EUM1, *P. ostreatus* IE8 y de las presentes en un producto fibrolítico comercial (Fibrozyme<sup>®</sup>) mediante la medición del nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) liberado al ser incubadas con un sustrato. La concentración de N-NH<sub>3</sub> en el líquido ruminal con enzimas de *Trametes* sp. o *P. ostreatus* e incubadas con xilano o carboximetilcelulosa, y Fibrozyme con xilano fueron menores ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a la enzima sin sustrato. Entre niveles de proteína de la enzima, la concentración de N-NH<sub>3</sub> fue diferente ( $P \leq 0.05$ ) para las enzimas de *Trametes* sp y *P. ostreatus*, pero no para Fibrozyme. El tiempo de contacto entre la enzima y el sustrato no fue significativo. La concentración de N-NH<sub>3</sub> fue menor en presencia de un sustrato para todas las enzimas estudiadas. En el tercer experimento se estudió el efecto de las enzimas de un producto fibrolítico comercial y del pH inicial del líquido ruminal sobre la degradación de la fibra detergente neutro (DFDN), tasa de degradación (*kd*), fase lag y fracción FDN indigestible (FDNi) de heno de alfalfa (*Medicago sativa*) y pasto ovillo (*Dactylis glomerata*). La DFDN del heno de alfalfa fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) en el tratado con enzima y el efecto del pH<sub>i</sub> sobre la DFDN fue lineal ( $P \leq 0.05$ ) a las 3, 9 y 12 h y cuadrático a las 24, 48 y 72 h de incubación. La *kd* fue similar entre los tratamiento con y sin enzima, mientras que en el tratamiento sin enzima se observó la mayor ( $P \leq 0.05$ ) fase lag y FDNi. La interacción tratamiento por pH<sub>i</sub> fue significativa para *kd*, fase lag y FDNi y se encontró la mayor *kd* y mayor fase lag en el tratamiento sin enzima a pH<sub>i</sub> 6.2 y el mayor promedio de la FDNi se observó en el tratamiento sin enzima a pH<sub>i</sub> 5.6. En el pasto ovillo, la DFDN fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) en el tratado con enzima a las 24 y 48 h de incubación. El pH<sub>i</sub> tuvo efecto ( $P \leq 0.05$ ) sobre la DFDN a las 3 h de incubación. La *kd*, la fase lag y FDNi fueron similares entre con y sin enzima y en los diferentes pH<sub>i</sub>. La degradación de la FDN del heno de alfalfa y pasto ovillo fue mejorada por las enzimas. La adición de enzimas y el pH inicial de incubación modificaron las variables de la cinética de la degradación de la FDN del heno de alfalfa, pero no las del pasto ovillo.

**Palabras claves:** Actividad enzimática, Enzimas Fibrolíticas, Hongos, Degradación, FDN, Cinética. pH, Líquido ruminal

## GENERAL ABSTRACT

Three studies were conducted to evaluate different fibrolytic enzyme for use in ruminant nutrition. In first trial, the enzymatic activity of xylanases, cellulases and lacasses from the fungi *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8, and *Aspergillus niger* AD96.4 was studied at 14 and 19 days of solid fermentation in sugar cane bagasse. The *Trametes* sp. expressed the highest ( $P \leq 0.01$ ) activity of xylanases and cellulases without differences between 14 and 19 days of fermentation. The highest ( $P \leq 0.01$ ) activity of lacasse was showed by *Pleurotus ostreatus* at 14 days. The activity of xylanases enzyme of *Trametes* sp. EUM1 indicated a potential use for biotechnological applications. In second trial, the ruminal degradation of enzymes produced by fungi *Trametes* sp. EUM1 and *Pleurotus ostreatus* IE8, and enzymes derived from a commercial product (Fibrozyme®) was estimated through the released of ammonia nitrogen ( $N-NH_3$ ) being incubated with a substrate. The  $N-NH_3$  concentration in ruminal fluid with enzymes from *Trametes* sp. or *P. ostreatus* incubated with xylan or carboxymethylcellulose, and Fibrozyme with xylan were lower ( $P \leq 0.05$ ) than enzyme without substrate. There were differences ( $P \leq 0.05$ ) between protein levels of enzyme for *Trametes* sp., and *P. ostreatus* but not for Fibrozyme. The time of contact enzyme-substrate effect was not significant for any of studied enzymes. The  $N-NH_3$  concentration was smaller in presence of a substrate in all studied enzymes. In the third trial, the effect of fibrolytic enzymes (Fibrozyme®) and initial pH (ipH) on the degradation of neutral detergent fiber (DNDF), rate of degradation ( $kd$ ), lag time and indigestible NDF (iNDF) of alfalfa hay (*Medicago sativa*) and orchardgrass (*Dactylis glomerata*) in ruminal fluid was studied. The DNDF of alfalfa hay was greater ( $P \leq 0.05$ ) with enzyme and the ipH effect on DNDF was linear ( $P < 0.05$ ) at 3, 9 and 12 h and quadratic at 24, 48 and 72 h of incubation. The  $kd$  was similar with and without enzyme, whereas in treatment without enzyme the greatest ( $P \leq 0.05$ ) lag time and iNDF was observed. The treatment by ipH was significant for  $kd$ , lag time and iNDF and highest  $kd$  and lag time was observed in treatment without enzyme at ipH 6.2 y the greater average of iNDF was observed in treatment without enzyme at ipH 5.6. The DNDF of orchardgrass was greatest ( $P \leq 0.05$ ) with enzyme treatment at 24 and 48 of incubation. The ipH effect ( $P \leq 0.05$ ) on DNDF was only observed at 3 h of incubation. The orchardgrass DNDF was not affected by the interaction. The  $kd$ , lag time and iNDF were similar with enzyme and without enzyme, and at the different ipH. The NDF degradation of alfalfa hay and orchardgrass was improved with the enzymes. The addition of enzymes and initial pH of incubation modified the kinetic variables of DNF degradation from alfalfa hay but not from the orchardgrass.

**Key words:** Enzymatic activity, Fibrolytic enzyme, Degradation FDN, Kinetic, pH. Ruminal liquid.

## INTRODUCCIÓN

En diversos sistemas de producción con rumiantes, la base de la alimentación son los forrajes y una característica nutricional importante es la alta proporción de la pared celular, en la cual la celulosa, hemicelulosa y lignina están presentes en mayor proporción (Van Soest, 1982; Akin, 1986). La digestibilidad de los polisacáridos de la pared celular esta relacionada con la lignina, la cual interfiere actuando como una barrera física para las enzimas microbianas, con un impacto directo en los nutrientes energéticos digestible del forraje (Moore y Jung, 2001), ya que limita la cantidad de energía disponible para el animal y la respuesta productiva. Una estrategia para mejorar la utilización de los alimentos, en particular de los componentes fibrosos, es el uso de enzimas fibrolíticas exógenas (celulasas, xilanasas) para tratar los forrajes o adicionadas como suplemento en la ración (Dawson y Tricarico, 1999).

Los principales efectos mostrados por las enzimas fibrolíticas exógenas están relacionados con la reducción de la cantidad de fibra detergente neutro, fibra detergente ácido y aumento en la digestibilidad de los forrajes (Krause *et al.*, 1998; Pinos-Rodríguez *et al.*, 2001), mejoría en la ganancia de peso (Beauchemin *et al.*, 1995; 1997) y aumento de la producción de leche (Rode *et al.*, 1999). La actividad de las enzimas puede estar influida por factores como la especie de forraje, el contenido de humedad, el tiempo de contacto de la enzima con el material, la temperatura, el nivel de enzima, el pH del medio ruminal (Morgavi *et al.*, 2000<sup>a</sup>; Colombatto *et al.*, 2004) y el tiempo de incubación en el rumen (Beauchemin *et al.*, 1995; Pinos-Rodríguez *et al.*, 2001; 2002); por tanto, los efectos y la respuesta a su aplicación pueden variar.

La estabilidad de las enzimas en el medio ruminal podría estar comprometida y pueden ser degradadas por las proteasas microbianas (Kopečný *et al.*, 1987). Sin

embargo, las enzimas parecen ser relativamente estables en el rumen (Hristov *et al.*, 1998<sup>a,b</sup>; Morgavi *et al.*, 2001) y la actividad fibrolítica se incrementa debido posiblemente a la sinergia entre las enzimas microbianas y las enzimas fibrolíticas exógenas (Morgavi *et al.*, 2000<sup>a</sup>).

Los complejos de enzimas fibrolíticas (celulasas y xilanasas) se obtienen de extractos de fermentación de hongos aeróbicos, principalmente. Las especies más utilizadas como fuentes de enzimas en productos comerciales son *Aspergillus niger*, *Trichoderma longibrachiatum* (Beauchemin *et al.*, 1995; Nadeau *et al.*, 2000) y *Penicillium funicalosum* (Liu y Orskov, 2000).

Los hongos de los géneros *Pleurotus* y *Trametes* se caracterizan por producir diferentes complejos enzimáticos con habilidad para degradar materiales lignocelulósicos (Marzullo *et al.*, 1995; Levin y Forchiassin, 1997), pero la mayoría de las enzimas caracterizadas en estos hongos son del tipo oxidasas y se han utilizado principalmente en el tratamiento de aguas residuales o productos recalcitrantes (Rodríguez *et al.*, 2003; Camarero *et al.*, 2005). Estos hongos producen complejos de enzimas fibrolíticas (Villa-Cruz *et al.*, 1999; Levin y Forchiassin, 1998; Ludwing *et al.* 2004; Sun *et al.*, 2004), que podrían tener aplicación en la alimentación de rumiantes.

Con base en lo anterior, se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Caracterizar la actividad de las enzimas fibrolíticas producidas por *Trametes sp. EUM1*, *P. ostreatus* IE8 y *A. niger* AD96.4 en dos tiempos de fermentación en bagazo de caña.
- 2) Evaluar el efecto del sustrato, nivel de proteína y tiempo de contacto de la enzima con el sustrato sobre la degradación en líquido ruminal de las enzimas producidas por los hongos *Trametes sp. EUM1* y *Pleurotus ostreatus* IE8 y de las presentes en un producto fibrolítico comercial.

3) Evaluar el efecto de las enzimas de un producto fibrolítico comercial y del pH inicial del líquido ruminal sobre la degradación de la fibra detergente neutro de heno de alfalfa (*Medicago sativa*) y del pasto ovillo (*Dactylis glomerata*).



## **CAPITULO I**

### **REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **Características químicas de los constituyentes de la pared celular y su relación con el valor nutritivo de los forrajes**

Los rumiantes poseen características anatómicas y fisiológicas en su aparato digestivo que favorecen la permanencia de un ecosistema ruminal altamente especializado, con poblaciones microbianas heterogéneas capacitadas para degradar las moléculas complejas y utilizar diferentes alimentos fibrosos (Hungate, 1988). Considerando que los forrajes constituyen la base de la alimentación de los rumiantes en la mayoría de los sistemas de producción, es conveniente revisar algunas de las características bioquímicas de importancia nutricional, que permitan comprender en parte la complejidad de los procesos involucrados en la degradación microbiana, la utilización de sus constituyentes por el animal y algunos procesos biotecnológicos que se han desarrollado para facilitar u optimizar el uso de los nutrientes presentes en los alimentos.

#### **Constituyentes de la pared celular de las plantas**

Las plantas son complejos heterogéneos que consisten de diferentes órganos, tejidos, células y componentes subcelulares. Las células vegetales presentan una estructura compleja denominada pared celular, que contiene diferentes moléculas, cuya biosíntesis está controlada por enzimas codificadas y reguladas por genes (Iiyama *et al.*, 1993). Estructuralmente, la pared celular está constituida por fibrillas de celulosa embebidas dentro de una matriz de lignina y hemicelulosa (Monties, 1991). También

contiene proteínas, ceras y compuestos fenólicos, que están presentes junto con los carbohidratos dentro de la pared celular (Barton *et al.*, 1976).

Aun cuando la pared celular de las plantas tiene una arquitectura básica similar, hay importantes diferencias entre los principales grupos taxonómicos de forrajes en relación con la composición y estructura (Jung y Allen, 1995). En proporción, las hojas de las leguminosas tienen menor contenido de pared celular que las hojas de las gramíneas y no exhiben el incremento en la concentración de constituyentes de pared celular que ocurre en las gramíneas con el avance de la madurez (Wilman *et al.*, 1977; Wilman y Altimimi, 1984). La concentración de pared celular en los tallos de todos los forrajes es mayor que en las hojas, y la proporción de tallos aumenta con la madurez (Griffin y Jung, 1983; Albrecht *et al.*, 1987; Jung y Vogel, 1992).

La pared celular de las leguminosas es rica en pectinas y tiene relativamente mayor cantidad de celulosa que de xilanos (Aman, 1993). Todas las especies contienen ácidos fenólicos en la pared celular; sin embargo, las gramíneas tienen mayores concentraciones que las leguminosas (Jung y Deetz, 1993). En las leguminosas la concentración de lignina es mayor que en las gramíneas (Hatfield *et al.*, 1994).

En cuanto al tipo y cantidad de los principales polímeros que conforman la pared celular de las plantas hay algunas diferencias entre las plantas dicotiledóneas y las monocotiledóneas. Los arabinogalacturanos y xiloglucanos están en mayor concentración en la pared de las plantas dicotiledóneas, mientras que la celulosa es el carbohidrato que predomina en la pared celular de ambos tipos de plantas (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1. Principales polímeros que componen la pared celular de las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas

Constituyente	Pared celular (%)	
	Monocotiledóneas	Dicotiledóneas
Rhamnogalacturanos	4	16
Arabanos	-	10
(Arabino) galacturano	4	10
Xiloglucano	11	21
Arabinoxilano	21	-
Celulosa	46	23
Proteína	7	10

Fuente: Chesson y Forsberg (1988).

### **Carbohidratos estructurales y compuestos fenólicos**

En la pared celular de las plantas hay una amplia variedad de polisacáridos, que difieren entre tipos de células, órganos y especies de plantas (Moore y Hatfield, 1994). Con base en la asociación biológica y disponibilidad nutricional, los polisacáridos asociados a la pared celular de las plantas se han dividido en dos clases: 1) los carbohidratos que carecen de enlaces covalentes con el núcleo de lignina, son más solubles y se fermentan completamente en el rumen; 2) los que tienen enlaces covalentes con el núcleo lignificado y son parcialmente digestibles. Se clasifican en carbohidratos no estructurales (CNE) y carbohidratos estructurales (CE) (Van Soest, 1994).

Los CNE participan activamente en funciones dinámicas de la planta: el metabolismo intermediario, el transporte y almacenamiento de energía; y su concentración varía con el estado fisiológico de la misma. El almidón y los fructosanos se encuentran en mayor proporción y son rápidamente fermentados por los microorganismos

del rumen y aportan cantidades substanciales de energía; sin embargo, para los rumiantes que consumen forrajes son cuantitativamente menos importantes que los CE (Moore y Hatfiel, 1994).

Los CE son los polisacáridos que forman parte de la estructura de la pared celular, donde la celulosa y la hemicelulosa representan aproximadamente 70% de la biomasa vegetal (Ladisch *et al.*, 1983) y las sustancias pécticas están presentes en menor proporción. La composición y concentración de los CE varía entre especies de plantas: la concentración de celulosa en la pared celular de las leguminosas es mayor con respecto a las gramíneas, lo contrario ocurre con la concentración de hemicelulosa (Moore y Hatfield, 1994).

De los CE, la celulosa es la molécula orgánica más abundante en la naturaleza y constituye entre 20 y 40% de la materia seca (MS) de las plantas superiores (Van Soest, 1994). La celulosa pertenece al grupo de los homopolisacáridos que contienen sólo unidades de D-glucosa unidas por enlaces glicosídicos  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (Moore y Hatfield, 1994). Estructuralmente, la celulosa consiste de cadenas de celobiosa unidas por enlace covalente o puentes de hidrógeno (Akin, 1986). Las unidades repetitivas de la cadena forman haces y microfibrillas de varios anchos debido a variaciones en la agregación de esas cadenas (Gilbert y Tsao, 1983). Las microfibrillas de celulosa están colocadas en un patrón entrecruzado e impregnado con una matriz del resto de polisacáridos y algunas proteínas. La celulosa puede encontrarse en forma de cadenas totalmente extendidas y las cadenas pueden formar cintas que se empaquetan lado a lado con una red de enlaces de hidrógeno dentro de ellas y entre ellas (Matew *et al.*, 2004).

La hemicelulosa está constituida por heteropolisacáridos complejos, que varían en su composición primaria, sustitución, grado de ramificación y especies de plantas (Moore y Hatfield, 1994). Los polisacáridos que predominan en las hemicelulosas son los xilanos,

glucomananos y galactanos (Matew *et al.*, 2004;). Los xilanos, polímeros de xilosa con enlace  $\beta(1,4)$ , son los carbohidratos estructurales no celulósicos predominantes y existen como compuestos lineales o ramificados en asociación con otros carbohidratos: arabinosa, manosa, glucosa, ramnosa y ácidos urónicos, principalmente el ácido glucorónico (White *et al.*, 1993). Los arabinoxilanos y xiloglucanos son los polisacáridos predominantes en las hemicelulosas de las plantas monocotiledóneas mientras que en las dicotiledóneas predominan arabinoxilanos, xiloglucanos, arabinanos y galactanos (Wilkie, 1979; Chesson y Forsberg, 1988). También, se han aislado glucomananos y galactomananos de hemicelulosas de dicotiledóneas, pero cuantitativamente son menos importantes (Bailey, 1973).

La hidrólisis de la hemicelulosa de los forrajes produce monosacáridos: glucosa, xilosa, arabinosa, manosa, galactosa, ramnosa y fucosa y los ácidos galacturónicos, glucorónicos y 4-*O*-metil-glucorónico (Wilkie, 1979; Chesson y Forsberg, 1988; Aman y Grahan, 1990). La proporción de cada monosacárido varía entre especies, reflejando diferencias en la composición de los polisacáridos. La xilosa y la arabinosa cuantitativamente son los principales azúcares neutros aislados de las hemicelulosas de las gramíneas y leguminosas (Collings y Yokohama, 1979; Wedig *et al.*, 1987).

La característica común de la fracción hemicelulosa es que representa polisacáridos nativos solubles en ácido o álcali y están asociados a la lignina; su digestibilidad está directamente relacionada con la celulosa e inversamente con la lignina. La hemicelulosa y la lignina forman en conjunto un material incrustante en el engrosamiento secundario de la pared. En las plantas forrajeras la mayor parte de la hemicelulosa se encuentra lignificada en la pared y es generalmente insoluble, pero llega a ser soluble en agua cuando se deslignifica (Van Soest, 1994).

Las sustancias pécticas se encuentran en todas las plantas forrajeras, pero están presentes en mayor proporción en la pared celular de las plantas dicotiledóneas. Estos polisacáridos complejos están basados en cadenas de unidades de ácido galacturónico unidas mediante enlace  $\alpha$ -1,4, en los cuales el grupo carboxilo está esterificado con metanol y residuos de ácidos urónicos, y variablemente sustituidos en el carbono 2 por grupos acetilo. Las pectinas son rápida y completamente degradadas en el rumen por diversas pectinasas (Chesson y Forsberg, 1988; White *et al.*, 1993).

Los principales compuestos fenólicos en la pared celular de las plantas son la lignina y los ácidos fenólicos, estos últimos están químicamente ligados a lignina o directamente a los polisacáridos, y son de relativa importancia en la utilización de los carbohidratos estructurales (Moore y Hatfield, 1994). La lignina es un factor antinutricional en los forrajes debido al impacto negativo en la disponibilidad nutricional de los carbohidratos estructurales de las plantas, al limitar la digestión de la celulosa y hemicelulosa (Moore y Hatfield, 1994; Hatfield *et al.*, 1999). La lignina se deposita en las paredes celulares de las plantas como parte del proceso de maduración de la célula y, con base en la dificultad para la extracción de la pared celular, se ha concluido que la lignina está químicamente ligada a los carbohidratos y posiblemente a proteínas, para formar las macromoléculas de la pared celular (Moore y Jung, 2001).

Químicamente, la lignina es un polímero de alcoholes hidroxicinamílicos y contiene tres alcoholes aromáticos: coniferilo, sinapilo y cumarilo (Sarkanen y Ludwig, 1971). La lignina está fuertemente ligada a la celulosa y a la hemicelulosa, formando un sello físico que actúa como una barrera, que previene la penetración de soluciones y enzimas (Howard *et al.*, 2003). La lignina es importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas; tiene funciones de soporte mecánico, conducción de agua, resistencia a enfermedades y patógenos (Higuchi, 1990; Iiyama *et al.*, 1994) y es la principal línea de

defensa de la planta (Hatfield y Fukushima, 2005). Sin embargo, la lignificación controla la cantidad de fibra que puede ser digerida y, tiene un importante efecto en los nutrientes energéticos digerible del forraje (Jung y Allen, 1995) y en la cantidad de MS que puede consumir el animal (Moore *et al.*, 1993; Mertens, 1994).

Los ácidos fenólicos están en la pared celular de las gramíneas y dicotiledóneas; son compuestos de bajo peso molecular y los más importantes son el ácido *p*-cumárico, el ácido ferúlico y la vanillina (Morrison, 1974; Hartley y Jones, 1977). Los ácidos fenólicos generalmente están esterificados con los grupos alcohol de otros ácidos fenólicos (Howard *et al.*, 2003); con frecuencia están ligados a residuos de glucanos y xilanos, por lo que estos ácidos sirven como agentes ligantes en los complejos lignina-carbohidratos (Scalber *et al.*, 1985; Akin, 1986). Los ácidos fenólicos libres, principalmente el *p*-cumárico, inhiben el crecimiento de protozoos (entodiniomorfos) y la digestión de celulosa (Chesson *et al.*, 1982; Akin y Barton, 1983; Jung y Fahey, 1983). El tipo de ácidos fenólicos en la pared celular puede ser un importante aspecto en la calidad del forraje (Akin, 1986), considerando que la esterificación con los polisacáridos reduce la tasa de degradación microbiana (Jung y Sahl, 1986).

### **Fracciones de fibra y su relación con el valor nutritivo de los forrajes**

En los sistemas de producción de rumiantes que basan la alimentación en los forrajes, la calidad de éstos tiene un efecto en la productividad de los animales (Allen y Segarra, 2001), determinando las necesidades de suplemento, según el contenido de nutrientes en los forrajes (Kunkle *et al.*, 1999). El valor nutritivo de los forrajes está relacionado directamente con la proporción de constituyentes de la pared celular. La fibra, se define como una entidad nutricional utilizada para describir los componentes de los

forrajes y alimentos con baja solubilidad en disolventes específicos y son menos digestibles que el almidón (Jung y Allen, 1995). La fibra agrupa un conjunto de sustancias (celulosa, hemicelulosa y compuestos fenólicos) resistentes a la digestión por las enzimas producidas por los mamíferos, y su degradación por enzimas microbianas es lenta o parcial (Van Soest, 1982).

Con base en la biodisponibilidad para los rumiantes, el sistema de análisis por detergentes permite fraccionar los constituyentes de la materia seca de los forrajes en constituyentes de la célula y de la pared celular (Van Soest *et al.*, 1991). La fracción fibra detergente neutro (FDN) se usa para denotar a la pared celular, y es el residuo que queda después de remover los carbohidratos solubles y nutricionalmente disponibles de la pared celular. La FDN está constituida por celulosa, hemicelulosa, lignina, menores cantidades de proteína y minerales (sílice). La fracción fibra detergente ácido (FDA) representa los constituyentes de la pared celular que no se solubilizan en soluciones detergentes ácidas, y está constituida por celulosa y lignina principalmente, restos de minerales o cenizas insolubles, compuestos nitrogenados insolubles (productos de reacción de Maillard) y cutina (Van Soest *et al.*, 1991).

La importancia de las fracciones FDN y FDA radica en que se utilizan en la valoración de los forrajes y se usan para expresar o cuantificar la fibra en los forrajes y alimentos. De manera similar, la proporción de estas fracciones en los alimentos se correlaciona con el consumo (Dado y Allen, 1995; Forbes, 1996) y con la digestibilidad del alimento. Se han desarrollado modelos matemáticos para calcular el consumo con base en la capacidad de distensión del rumen por efecto del contenido de FDN del forraje (Mertens, 1987; 1994).

Algunos factores como la especie y la edad de la planta influyen en la concentración de las fracciones de fibra y tienen una relación directa con el valor nutritivo



para el animal. En las gramíneas las concentraciones de FDN y FDA son mayores que en las leguminosas, y las leguminosas presentan mayores tasas de degradación (Schofield y Pell, 1995). La disminución de la calidad del forraje con la madurez se asocia con la reducción de la relación hoja:tallo y con la acumulación y la progresiva lignificación de las paredes primaria y secundaria del tejido vascular y del esclerénquima (Grabber, 2005). Los incrementos en la concentración de FDN, FDA, celulosa y lignina reducen la digestibilidad *in vitro* de la materia seca al aumentar la edad de corte (Burns *et al.*, 1997).

### **Degradación ruminal de los carbohidratos estructurales**

Los rumiantes poseen un ecosistema microbiano ruminal diverso, con capacidad para la utilizar los polímeros complejos de los vegetales. La degradación de la pared celular por los microorganismos se debe a que cuentan con estrategias adaptativas: 1) producción de complejos multienzimáticos, requeridos para la ruptura de los enlaces de la pared celular; 2) adhesión y colonización microbiana a las partículas; 3) las interacciones sinérgicas entre las especies microbianas. Este sistema proporciona la habilidad de usar carbohidratos estructurales y producir proteína microbiana y ácidos grasos volátiles para satisfacer en parte las necesidades del huésped (Akin, 1986). Sin embargo, la digestión de la fibra en el rumen es incompleta y se debe en parte a la existencia de barreras físicas presentes en los sustratos ingeridos (Wang y McAllister, 2002), asociadas con la composición y estructura de la pared celular, principales factores que influyen la digestibilidad de la fibra (Akin, 1986).

### **Microorganismos fibrolíticos del rumen**

La población microbiana del rumen está constituida principalmente por bacterias, protozoos y hongos. La densidad de la población de bacterias en el rumen es muy alta, hasta  $10^{10}$  células  $g^{-1}$  de contenido ruminal (Rusell, 2002). Las principales bacterias involucradas en la degradación de la fibra son *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* (Van der Linden *et al.*, 1984; Cheng *et al.*, 1984; Weimer, 1998) y *Butyrivibrio fibrisolvens*, los cuales utilizan celulosa y hemicelulosa como principal fuente de energía. Los butirivibrios son organismos muy versátiles, pueden usar varios sustratos (pentosas, hexosas, pectina, almidón, xilanos y hemicelulosa), aunque son débilmente celulolíticos (Rusell, 2002).

Los protozoos ciliados (holotricos y entodiniomorfos) participan en la degradación de la fibra y junto con los hongos colonizan fragmentos de plantas; además tienen potencial para digerir fibra, pero no son esenciales y su función es pequeña comparada con la de las bacterias (Hungate, 1975). Los protozoos entodiniomorfos (excepto *Entodinium sp.*) contienen celulasas con alta actividad específica (Coleman, 1985), aun cuando la mayor parte es de origen bacteriano (Coleman, 1986). Se calcula, que entre un cuarto a un tercio de la fibra degradada en el rumen se debe a los protozoos (Demeyer, 1981; Orpin, 1984). Dependiendo de la dieta, los protozoos pueden digerir 5 a 21 % de los materiales celulósicos que llegan al rumen (Dijkstra y Tamminga, 1995). Debido a su habilidad para ingerir bacterias y degradar proteína, los protozoos reducen la eficiencia en la utilización de nutrientes nitrogenados por el huésped; sin embargo, si el contenido de nitrógeno en la dieta es bajo, la predación y la lisis microbiana pueden contribuir al reciclaje de proteína en el rumen (Rusell, 2002).

Se calcula que 8% de la biomasa microbiana ruminal corresponde a los hongos que pueden digerir celulosa y otros materiales fibrosos; la prevalencia de los hongos

depende de la dieta y son más importantes cuando la dieta es fibrosa. En la fase de crecimiento, el micelio penetra profundamente la partícula de alimento y rompe la fibra; lo cual aumenta la superficie de ataque para hongos y bacterias; además hay una relación inversa entre las bacterias y los hongos (Russell, 2002). Las principales especies de hongos encontradas en el rumen son: *Neocallimastix frontalis*, *N. patriciarum*, *Piromyces communis*, *Caecomyces communis*, *Orpinomyces joyonii* (Orpin y Joblin, 1988; Russell, 2002).

### **Degradación ruminal de la celulosa y la hemicelulosa**

Los microorganismos secretan una amplia variedad de carbohidrasas, las cuales digieren carbohidratos estructurales y no estructurales. Los carbohidratos no estructurales son rápidamente fermentados por los microorganismos del rumen y representan una importante cantidad de energía para los rumiantes que consumen forrajes; sin embargo, como fuente de energía son cuantitativamente menos importantes que los carbohidratos estructurales para estos animales (Moore y Hatfield, 1994. White *et al.* (1993) presentan una lista de las enzimas requeridas para la hidrólisis de los polisacáridos estructurales de la pared celular de las plantas (Cuadro 1.2).

La degradación de celulosa es un proceso complejo, realizado por la acción combinada de al menos tres enzimas extracelulares ligadas a la superficie del microorganismo o secretadas dentro del medio, 1) endo  $\beta$ -1,4-glucanasa, rompe aleatoriamente cadenas internas de polisacáridos hasta oligosacáridos; 2) exo- $\beta$ -1,4-glucanasa ataca terminales no reductores de oligosacáridos produciendo celobiosa; 3) endo- $\beta$ -1,4-glucosidasa hidroliza la celobiosa a glucosa (White *et al.*, 1993).

Cuadro 1.2. Principales enzimas que hidrolizan los constituyentes de la pared celular de las plantas

Polímero de la pared celular	Enzima	Sustrato	Enlace hidrolizado	Producto final
Celulosa	Endo- $\beta$ -1,4-glucanasa	Celulosa	$\beta$ -1,4-glucosa	Celooligómeros
	Exo- $\beta$ -1,4-glucanasa	Celulosa-Terminal reductor	$\beta$ -1,4-glucosa	Celobiosa
	$\beta$ -glucosidasa	Celobiosa	$\beta$ -1,4-glucosa	Glucosa
Polisacáridos no celulósicos	Celulodextrinasa	Celooligómeros solubles	$\beta$ -1,4 glucosa	Celobiosa o celotriosa
	Endo- $\beta$ -1,4-xilanasa	Xilano	$\beta$ -1,4-xilosa	Xilooligómeros
	Exo- $\beta$ -1,4-xilanasa	Xilano	$\beta$ -1,4-xilosa	Xilobiosa
	$\beta$ -1,4-xilosidasa	Xilobiosa	$\beta$ -1,4-xilosa	Xilosa
	$\alpha$ -L-arabinofuranosidasa	Arabinoxilano	Enlaces $\alpha$ -1,3-	Arabionoxilano y arabinosa
	$\alpha$ -glucoronidasa	Glucoronoxilano	Enlaces $\alpha$ -1,3 o $\alpha$ -1,2	Acido glucorónico y glucoronoxilano
	O-acetil-xilano estearasa	Acido acetilxilano ferúlico	Enlaces acetil éster	Acetilxilano y acetato
	Acido ferúlico estearasa	Enlace cruzado	Enlace feruléster	Acido ferúlico y xilano
	Endo-1,3-(4)- $\beta$ -glucanasa	Laminarina, $\beta$ -D-glucano	$\beta$ -1,3-hexosa en $\beta$ -D-glucanos	Oligómeros de Laminarina, oligómeros $\beta$ -D-glucano
	Liquenasa	Liquen, $\beta$ -D-glucano	$\beta$ -1,3-hexosa en $\beta$ -D-glucanos, y enlaces 1,3- y 1,4	
Xilocelulasas	Celulosa o xilano	$\beta$ -1,4-glucosa o xilosa	Celooligómeros o xilooligómeros	
Pectina	Pectato liasa	Poligalacturanos	A-1,4-galacturónico	Oligómeros de ácido poligalacturónico
	Pectina liasa	Metilester de poligalacturano	$\alpha$ -1,4-galacturónico	Oligómeros de ácido poligalacturónico

Fuente: White *et al.* (1993)

Todas las celulosas estructurales están combinadas con lignina, cutina y minerales. La disponibilidad nutricional de la celulosa varía desde totalmente indigestible a completamente digestible, dependiendo del grado de lignificación, aunque existen otros factores inhibitorios o limitantes, como los depósitos de sílice y de cutina y las propiedades intrínsecas de la celulosa (Van Soest, 1994), que limitan la utilización por los microorganismos (Moore y Hatfield, 1994).

La digestión de la hemicelulosa en el rumen es compleja y ocurre de una manera análoga a la digestión de la celulosa, pero participa una mayor gama de enzimas debido a que está compuesta por diferentes azúcares y posee diferentes tipos de enlaces glucosídicos. El xilano es el principal heteropolisacárido en la pared celular, por lo cual se considera que las xilanasas están más ampliamente distribuidas que las celulasas en las bacterias del rumen. Los microorganismos producen más de una xilanasas, entre las que se incluyen  $\beta$ -xilosidasas (1,4- $\beta$ -D-xilano-xilano-hidrolasa,  $\beta$ -glucosidasa y  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa ( $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa-arabinofuranohidrolasa)), son esenciales para la completa degradación de fragmentos oligoméricos y están ampliamente distribuidas entre las bacterias del rumen (Williams *et al.*, 1984; Chesson y Forsberg, 1988). La unión de las cadenas de xilano a lignina y el enlace ester influyen en la degradación de la hemicelulosa (Russell, 2000).

La digestión de los polisacáridos de la pared celular está influida por las interacciones entre sus diferentes polímeros y está limitada por la presencia de compuestos fenólicos (lignina y ácidos fenólicos) dentro de la matriz de la pared celular (Jung, 1989; Eraso y Hartley, 1990; Hatfield, 1993). Se considera que dicha asociación es el principal factor que limita la accesibilidad de los polisacáridos como sustrato para las hidrolasas microbianas (Moore y Hatfield, 1994), y hay una relación negativa entre la

concentración de lignina y la digestibilidad del forraje (Jung y Vogel, 1986; Jung, 1989; Jung y Deetz, 1993).

Los efectos inhibitorios de la lignina en la digestibilidad del forraje dependen de la composición de monómeros y grupos funcionales, contenido de lignina y extensión de los enlaces cruzados con los polisacáridos de la pared celular (Jung y Vogel, 1986; Casler y Jung, 1999). Sin embargo, la lignina no es el único factor que limita la degradabilidad de los carbohidratos estructurales y no se conoce bien el mecanismo por el cual la lignina restringe la degradabilidad de la pared celular de las planta (Grabber, 2005).

### **Actividad enzimática ruminal**

El estudio de la actividad hidrolítica ruminal es complicada por la gran diversidad de enzimas que, en su mayoría, operan de modo sinérgico. Las especies microbianas individuales producen más de una enzima y se pueden necesitar mas de una enzima para hidrolizar polímeros complejos (Russell, 2002). La principal fuente de enzimas fibrolíticas en el rumen son las bacterias, pero los hongos y protozoos también son fuentes de enzimas para la degradación de polisacáridos estructurales (Cuadro 1.3).

La actividad fibrolítica del rumen es muy alta, depende de la dieta del animal, y varía con respecto a la localización de los microorganismos dentro del compartimiento ruminal. Cheng y Costerton (1980) dividieron el ecosistema microbiano en tres poblaciones: 1) microorganismos libres en el fluido ruminal; 2) asociados con la partícula del alimento, y 3) asociados con la pared del rumen. Además, Czerkawski (1986) subdividió al segundo grupo en: 1) firmemente asociados con la partícula del alimento; 2) reversiblemente asociados.

Cuadro 1.3. Polisacaridasas producidas por algunos microorganismos del rumen

<i>Microorganismo</i>	<b>Enzimas</b>
<i>Prevotella ruminicola</i>	Xilanasa, endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa, pectato liasa, $\beta$ -D-glucuronidasa
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Xilanasa, $\beta$ -D-xilosidasa, pectato liasa, endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, celodextrinasa, $\beta$ -glucosidasa
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Xilanasa, ácido ferúlico esterasa, O-acetil xilano esterasa, endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, celobiasa, celodextrinasa, $\beta$ -glucosidasa,
<i>Lachnospira multiparus</i>	Ácido poligalacturónico liasa, pectina metilesterasa
<i>Ruminococcus albus</i>	Xilanasa, $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa, endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, celobiasa, $\beta$ -glucosidasa, xilocelulasa
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Xilanasa, exo- $\beta$ -1,4-glucanasa, endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, celodextrinasa, xilocelulasa
<i>Selenomonas ruminantium</i>	Poligalacturonasa
Hongos anaeróbicos	Xilanasa, ácido ferúlico esterasa, <i>p</i> -cumárico esterasa, $\beta$ -D-xilosidasa, endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, $\beta$ -D-glucosidasa, $\beta$ -D-glucoronidasa, $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa, $\alpha$ -glucuronidasa, ácido poligalacturónico liasa, pectina metilesterasa
Protozoos anaeróbicos	Xilanasa, $\beta$ -D-xilosidasa, endo- $\beta$ -1,4-glucanasa

Fuente: Adaptado de White *et al.* (1993).

Uno de los microorganismos con mayor actividad fibrolítica es el *Fibrobacter succinogenes* (antes *Bacteroides succinogenes*). La actividad enzimática específica de endoglucanasas y xilanasas se evaluó en medio de cultivo con celulosa y resultó mayor en la fracción líquida que en las células, con promedios de 0.642 vs. 0.289 y 0.476 vs. 0.076  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína (Forsberg *et al.*, 1981).

Diferencias en la actividad de carboximetilcelulasa de las bacterias ruminales asociadas a las partículas de alimento fueron observadas por Bowman y Firkins (1993) en

trébol rojo (*Trifolium pratense*), pasto gama (*Tripsacum dactyloides*) y pasto ovillo (*Dactylis glomerata*) y en los tiempos de incubación; los picos de actividad enzimática se detectaron a las 18 h para trébol rojo y a las 36 h para pasto gama y pasto ovillo (8.7, 7.2 y 6.3  $\mu\text{mol}$  de glucosa  $\text{g}^{-1}$  MS  $\text{min}^{-1}$ ). También, observaron mayor número de bacterias asociadas a partículas en la leguminosa, lo que en parte pudiera explicar la mayor tasa de desaparición de la fibra usualmente encontrada en éstas con respecto a las gramíneas.

El tiempo de ingestión del alimento, el tipo de dieta y la localización dentro del retículo-rumen influyen en la actividad de las enzimas fibrolíticas de las bacterias asociadas con la fase sólida (BAS) y de los protozoos asociados con la fase líquida (PAL). Este efecto fue reportado por Martin *et al.* (1999), quienes encontraron que la actividad fibrolítica de las BAS fue máxima 1 h antes respecto a 3 h después de la ingestión en ambas dietas y fue significativamente más baja para la dieta con 40% de heno (Cuadro 1.4) y la actividad específica de polisacáridasas de PAL (xilanasas, avicelasa,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\beta$ -D-glucosidasa y  $\beta$ -D-xilosidasa) fue mayor en la parte superior que en la parte inferior del rumen y estuvo de acuerdo con la distribución o repartición del número de protozoos en los sitios de muestreo.

Michalet-Doreau *et al.* (2002) encontraron que la actividad específica de polisacáridasas (xilanasas y avicelasa) de los microorganismos asociados con la fase sólida del rumen fue significativamente alta en todos los tiempos de muestreo. El promedio de actividad específica fibrolítica en el rumen fue 5.8 y 0.3  $\mu\text{mol}$  azúcares  $\text{mg}^{-1}$  proteína  $\text{h}^{-1}$  para xilanasas y avicelasa, y de 1.79 y 2.71  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol  $\text{mg}^{-1}$  proteína  $\text{h}^{-1}$  para  $\beta$ -D-xilosidasa y  $\beta$ -D-glucosidasa. También, la actividad de las polisacáridasas fue máxima antes de la ingestión de alimento.



Cuadro 1.4. Actividad enzimática específica de carbohidrasas de protozoos asociados con la fase líquida (PAL) y de bacterias asociadas con la fase sólida (BAS) en muestras de líquido ruminal

Enzima/ Tiempo <sup>(2)</sup>	PAL		BAS	
	Dieta F	Dieta C	Dieta F	Dieta C
	Actividad de polisacaridasas <sup>(1)</sup>			
	(nmol AR mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup> )		(μmol AR mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup> )	
<b>Amilasa</b>				
-1 h	557	1464.7	1.02	5.23
+ 3 h	484.67	2271.3	1.11	13.48
<b>Xilanasa</b>				
-1 h	3378.3	2641.6	12.45	6.37
+3 h	1965	2471.7	7.40	4.36
<b>Avicelasa</b>				
-1 h	856	1023.6	3.22	2.39
+3 h	692.6	1132.6	2.56	1.79
Actividad de glucosidasas <sup>(1)</sup>				
(nmol <i>p</i> -nitrofenol mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup> )				
<b>α-D-glucosidasa</b>				
-1 h	50	257	0.3	0.54
+3 h	56.3	190.3	0.34	0.54
<b>α-D-arabinofuranosidasa</b>				
-1 h	435	257	1.41	1.49
+ 3 h	227.3	190.3	1.07	1.06
<b>β-D-glucosidasa</b>				
-1 h	2147.6	1661.6	1.77	1.77
+ 3 h	2497.6	2190.6	1.76	1.35
<b>β -D-xilosidasa</b>				
- 1 h	238.3	204.33	3.55	2.22
+ 3 h	152	266	2.33	1.62

<sup>(1)</sup> Promedios de los sacos anterior, dorsal y ventral del rumen

<sup>(2)</sup> Tiempo relativo a la ingestión. Dieta F= 93% heno + 7% paja de trigo; Dieta C=60% avena+33% heno+7% paja de trigo. AR=azúcares reductores

Fuente: Adaptado de Martín *et al.* (1999).

Además de las bacterias, los hongos aneróbicos en el rumen producen un amplio rango de celulasas y xilanasas (Wood *et al.*, 1986; Borneman *et al.*, 1989; Gordon *et al.*, 1989) que le permiten degradar sustratos lignocelulósicos. Los hongos *N. patriciarum* y *P. communis* producen diferentes glicosidasas, cuya actividad está relacionada con el estado de crecimiento del hongo y con el medio de crecimiento (Williams y Orpin, 1987). Yanke *et al.* (1996) midieron la actividad enzimática de celulasas y xilanasas de varias cepas de hongos ruminales, las cuales fueron: *P. communis* cepa 22 (87.9 y 820 mU mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), *N. patriciarum* cepa 27 (49.3 y 252 mU mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), *O. joyonii* cepa 9-2 (24.4 y 23 mU mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) y *N. frontalis* cepa RE1 (44.3 y 85 mU mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), indicando que la actividad enzimática está influida por el sustrato en el cual crece el hongo. En otro estudio, Lee *et al.* (2000) indican que la actividad enzimática específica de carboximetilcelulasa y xilanasas de *Orpinomyces* cepa KNGF-2 fue de 1883 y 4720 UI mg<sup>-1</sup>; además, mostraron actividad de 0.125 y 5572 UI mg<sup>-1</sup> para amilasa y proteasa. Mayorga *et al.* (2005) indican que el *N. frontalis* NFT 101 expresó un complejo de enzimas hidrolíticas que incluyen endoxilanasas, endoglucanasas y exopoligalacturonidasas, aun cuando la principal fue endoxilanasas, y su nivel fue regulado por fuente de carbono.

### **Enzimas fibrolíticas exógenas**

Los carbohidratos estructurales de las plantas son los principales contribuyentes para cubrir los requerimientos de energía de los rumiantes; por tanto, son importantes los esfuerzos para optimizar la tasa y la extensión de la digestión por la microflora ruminal. Se han multiplicado los estudios destinados a comprender la enzimología de la digestión de la fibra por los microorganismos ruminales. Asimismo, se han desarrollado estrategias

para aumentar la disponibilidad de los nutrientes de la pared celular y, mejorar las características de la dieta para proporcionar a los animales nutrientes en cantidades adecuadas a sus necesidades para un eficiente rendimiento. Se han descrito tratamientos para cambiar el valor nutritivo de los materiales fibrosos: tratamientos físicos, químicos, microbianos o biológicos. Los tratamientos biológicos surgen como una alternativa al tratamiento químico y consisten en inocular los forrajes con microorganismos o tratar los materiales con preparados enzimáticos producidos por éstos.

Según Berger *et al.* (1994), algunas ventajas de los tratamientos biológicos de materiales fibrosos, son: 1) mejoramiento de la digestibilidad (grado y tasa de digestión) de la fracción lignocelulosa; 2) incrementos en la cantidad de proteína; 3) destrucción de compuestos dañinos. El fundamento de los tratamientos biológicos para mejorar la utilización de la fibra está en el uso de microorganismos que poseen la habilidad de producir enzimas, las cuales favorecen los procesos hidrolíticos de los polímeros complejos de la pared celular.

El uso de enzimas fibrolíticas exógenas es una tecnología que tiene potencial para mejorar la utilización de los forrajes por los rumiantes (Beauchemin *et al.*, 2004). Los complejos de enzimas fibrolíticas que se obtienen principalmente de hongos aeróbicos se componen de polisacaridasas que degradan celulosa y hemicelulosa. El uso de tales enzimas en estudios *in vitro* e *in vivo* ha tenido como objetivo principal evaluar los efectos en la utilización de los nutrientes de la pared celular. Dawson y Tricarico (1999) resumen algunos de los cambios en la actividad ruminal asociados con el empleo de enzimas exógenas: 1) incremento de la digestión de la MS y de la FDN, producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y mejoría en la utilización de carbohidratos; 2) disminución de la relación acetato:propionato; 3) alteración del pH ruminal, aumento de la síntesis de proteína microbiana, incremento en la producción de amonio y actividad ureásica.

## **Modo de acción de las enzimas fibrolíticas exógenas**

El mecanismo de acción por el cual las enzimas fibrolíticas ejercen efectos en la digestión y utilización de los alimentos por los rumiantes aún no se conoce. Colombatto *et al.* (2003<sup>b</sup>) señalan que los mecanismos son complicados, debido principalmente a tres factores: 1) los alimentos son estructuralmente muy complejos, contienen gran variedad de polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos fenólicos en estrecha asociación; 2) los productos comerciales utilizados son mezclas de diferentes enzimas con diferentes actividades enzimáticas, difiriendo en relación a las condiciones óptimas y especificidades; 3) el fluido ruminal es extremadamente complejo, conteniendo cientos de especies microbianas que secretan una amplia variedad de enzimas.

Se ha propuesto que el modo de acción de las enzimas fibrolíticas se relaciona con: 1) hidrólisis directa de los constituyentes del alimento, principalmente la alteración de la estructura de los polisacáridos estructurales; 2) potenciación del ataque microbiano y la colonización de los constituyentes de la pared celular; 3) mejor capacidad hidrolítica del rumen, posiblemente por efectos aditivos a las enzimas microbianas del rumen o con un efecto sinérgico con los microorganismos ruminales; 4) estimulación del crecimiento microbiano; 5) mejor capacidad digestiva del rumen; 6) cambios en la viscosidad del tubo digestivo (Chen *et al.*, 1995; Beauchemin *et al.*, 1999; Morgavi *et al.*, 2000<sup>a</sup>)

Además, la inclusión de enzimas fibrolíticas en la dieta del rumiante estimula el crecimiento de microorganismos. Así, Yoon y Stern (1996) observaron que al añadir un extracto de *Aspergillus oryzae* en la dieta de vacas se aumentó la población de bacterias celulolíticas y proteolíticas. Dietas para vacas con varios niveles de un producto fibrolítico preparado a partir de *T. longibrachiatum* aumentaron significativamente la población de

bacterias totales viables y bacterias celulolíticas utilizadoras de celobiosa en el rumen, lo cual contribuiría a incrementar la digestión (Nsereko *et al.*, 2002).

### **Efectos de las enzimas fibrolíticas exógenas en la composición química y en la digestibilidad de los alimentos**

El estudio de la influencia de las enzimas fibrolíticas en las características de la degradación de la materia seca y de la fibra de los forrajes o alimentos indica efectos variados. Las características nutricionales más influenciadas por las enzimas fibrolíticas son la concentración de fracciones fibrosas y la digestibilidad; sin embargo, las respuestas varían según las diferentes condiciones experimentales.

Un ensilado de forraje de maíz con enzimas de *Trichoderma reesei* disminuyó la FAD, FDN y hemicelulosa, pero la enzima no tuvo efectos consistentes en la digestión *in vitro* de la MS (Sheperd y Kung, 1996). La aplicación de una mezcla de celulasas y hemicelulasas al ensilado de planta entera de trigo no modificó la desaparición *in vitro* de la MS (Adogla-Bessa *et al.*, (1999). Además, el uso de enzimas de *T. longibrachiatum* en ensilados de maíz y pasto ovillo no cambió la digestibilidad total de la MS, MO y almidón (Sutton *et al.*, 2003).

Krause *et al.* (1998) indican que el tratamiento de granos de cebada con mezclas de enzimas fibrolíticas redujo la concentración de FDN y FAD de la dieta y aumentó la digestibilidad de la FAD en 28%. Rode *et al.* (1999) encontraron mayor digestibilidad de la MS (69.1 vs 61.7%), MO (70.7 vs 63.9%), FDN (51.0 vs 42.5%) y FDA (41.9 vs 31.7%) de la dieta con enzimas fibrolíticas adicionadas a la porción de concentrado.

Según Beauchemin *et al.* (1999) las enzimas fibrolíticas no cambiaron la desaparición *in vitro* de la MO, FDN y FAD, pero sí el aumentaron la digestibilidad total de la MO del grano de cebada integral. La digestión de la fracción FDN de la porción de forrajes (ensilado de maíz y heno de alfalfa) no varió en los forrajes tratados con enzimas de *T. longibrachiatum* (Kung *et al.*, 2000), mientras que la aplicación de un complejo enzimático (Promote®) sobre la porción de forraje de la dieta no afectó la digestibilidad verdadera de la MO, FND y FAD (Boutatour *et al.*, 2004).

Bowman *et al.* (2002) aplicaron enzimas fibrolíticas a dietas para vacas lecheras y observaron incrementos en la digestibilidad total de la MO (73.8 vs 66.6%), FDN (55.6 vs 44.3%) y FDA (55.6 vs 43.6%). El pretratamiento de heno de *Dactylis glomerata* con enzimas fibrolíticas de *Aspergillus niger* aumentó la digestibilidad de la MO, de la celulosa y hemicelulosa en 9, 15 y 20%, sin cambiar la población total de bacterias o población de bacterias celulolíticas, ni la producción de AGV, pero aumentó la producción de butirato y de metano (Dong *et al.*, 1999). Las enzimas mejoraron la digestibilidad *in vitro* de la MS y MO de la alfalfa (*Medicago sativa*) y del pasto ballico (*Lolium perenne*) en presencia de microorganismo ruminales (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2001).

Según Pinos-Rodríguez *et al.* (2002), la administración de enzimas fibrolíticas exógenas directamente al rumen puede cambiar la fermentación ruminal, consumo y digestibilidad de forrajes con diferente valor nutritivo e indican que: 1) la enzima incrementó la digestibilidad aparente de la hemicelulosa y FDN del heno de alfalfa, pero no del ballico; 2) mejoró el balance de nitrógeno e incrementó la concentración de AGV; 3) aumentó el consumo de MO de henos de alfalfa y de ballico, y sugirieron que el efecto de la enzima puede estar relacionado con el sustrato (especie de forraje) y el ambiente ruminal.

Moreno-Jaramillo (2004) evaluó el efecto de la adición de enzimas fibrolíticas en la digestibilidad *in vitro* (DIVMS) de dietas con diferentes proporciones forraje-concentrado, encontraron que la DIVMS fue mayor en las primeras 12 h de incubación en las dietas con enzima (34.0 vs. 31.79%), sin diferencias a las 24, 48 y 72 h; la digestibilidad *in vitro* de la FDN fue mayor en las primeras 12 h de incubación, mientras que la degradación *in situ* de la MS y de la FDN aumento en las primeras 24 h.

Caton *et al.* (1993) estudiaron la degradabilidad *in situ* del pasto *Bromes inermes* tratado con extracto de *A. oryzae* y observaron que el grado de digestión, la tasa de digestión y la fase lag no fueron influenciados por el tratamiento. De manera similar Varel y Kreikemeier (1994) aplicaron extracto de *A. oryzae* sobre el pasto bromo y no encontraron efectos en la desaparición *in situ* de la FDN, la celulosa y la hemicelulosa, ni en el grado de digestión, tasa de digestión y fase lag. Sievert y Shaver (1993) aplicaron extracto de *A. oryzae* sin efecto en la desaparición *in situ*, grado de digestión, tasa de pasaje, ni fase lag de la degradación de la MS, pero se redujo la fase lag de la FND (2.4 vs 3.5 h). Una mezcla de enzimas de *A. oryzae* y *Bacillus subtilis* aplicadas al ensilado de cebada no cambiaron la tasa o grado de digestión *in situ* de la MS y FDN (Zahiroddini *et al.* (2004).

Preparados de enzimas fibrolíticas incrementaron la tasa inicial (a las 12 h) de la degradación de la MO de alfalfa (hojas y tallos) así como el grado de digestión de la hojas (Colombatto *et al.* (2003<sup>a</sup>). En un estudio *in vitro* donde las enzimas se aplicaron a sustratos puros se incrementó la liberación de azúcares reductores, la tasa y el grado de la fermentación de los sustratos (Colombatto *et al.*, 2003<sup>b</sup>). La aplicación de enzimas fibrolíticas a pajas tratadas con álcali aumentó significativamente la tasa y grado de digestión de la MS, y parte de este efecto se atribuye a la remoción de las barreras de compuestos fenólicos que impiden la digestión microbiana por el álcali (Wang *et al.*,

2004). En otros estudios se incrementó la tasa, pero no el grado de digestión al usar enzimas fibrolíticas en dietas para rumiantes (Fondevilla *et al.*, 1990; Feng *et al.*, 1996). Zinn y Zalinas (1999) no encontraron efectos en el pH, ni en la digestión ruminal de la MO. Resultados de varios estudios acerca de los efectos de las enzimas fibrolíticas en la digestibilidad se resumen en el Cuadro 1.5.

Cuadro 1.5. Efectos de la aplicación de enzimas fibrolíticas en la digestibilidad

	Incremento en la digestibilidad (%)				Fuente
	FDN	FDA	MS	MO	
Novillos	8.9	13	8.5	-	Feng <i>et al.</i> (1996) <sup>a</sup>
Novillos	SE	55	SE	-	Krause <i>et al.</i> (1998)
Novillos	23	-	-	-	Zinn y Salinas (1999) <sup>bc</sup>
Vacas lecheras	SE	SE	SE	-	Bertrand y Grimes (1997) <sup>b</sup>
Vacas lecheras	20	32	12	10.48	Rode <i>et al.</i> (1999) <sup>d</sup>
Vacas	14.8	23.6	6.3		Eun y Beauchemin (2004) <sup>e</sup>
Corderos	6	8	4	4	Titi y Tabbaa (2004)
<i>In vitro</i>	28 (12 h)	-	-	-	Varel <i>et al.</i> (1993) <sup>b</sup>
<i>In vitro</i>	-	-	17.1 (12 h)	-	Dawson y Tricarico (1998) <sup>c</sup>
<i>In vitro</i>	29 (12 h) 8.4 (48 h)	-	-	-	Nsereko <i>et al.</i> (2000)

Enzima: <sup>a</sup> Alphazyme+Grasszyme; <sup>b</sup> Extracto de *Aspergillus oryzae*; <sup>bc</sup> Fibrozyme (extracto de *Aspergillus niger* y *Trichoderma longibrachiatum*); <sup>d</sup> Pro-Mote; <sup>e</sup> Enzimas proteolíticas  
 FDN=fibra detergente neutro; FDA=fibra detergente ácido; MS=materia seca; MO=materia orgánica



## **Efectos de las enzimas fibrolíticas exógenas en el consumo de alimento, ganancia de peso y producción de leche**

Los resultados sobre el uso de enzimas fibrolíticas en animales productores de carne o de leche muestran variabilidad, gran parte de tales diferencias puede estar asociada a diferentes condiciones experimentales, de manera que el efecto en el consumo y la mejoría en la respuesta animal no son consistentes (McAllister *et al.*, 1999). Un suplemento con fibrozyme (celulasas y xilanasas) aumentó en 4% el consumo de MS (Zinn y Salinas, 1999). Para dietas que contienen forrajes tratados con enzimas o cuando se incorpora la enzima al alimento, la tasa de consumo de alimento fue similar a los no tratados (Bertrand y Grimes, 1997). Otros resultados indican que el tratamiento con enzimas no influyó en el consumo de alimento (Dhiman *et al.*, 2002; Vicini *et al.*, 2003).

La adición de enzimas fibrolíticas mejora la ganancia de peso de bovinos, pero el óptimo nivel de la enzima depende del tipo de forraje, debido a que la mejor respuesta se observó con forrajes secos en comparación con ensilados (Beauchemin *et al.*, 1995). El uso de Fibrozyme incrementó en 6% la ganancia de peso de novillos estabulados, debido al aumento de la digestión de la FDN en el rumen, pero el valor de la energía neta (EN) de la dieta no cambio (Zinn y Salinas, 1999).

En vacas lecheras, los efectos de las enzimas fibrolíticas exógenas son diversos. Así, en algunos estudios se reporta el aumento de la producción de leche, efecto relacionado con el aumento en la digestibilidad (Beauchemin *et al.*, 1999; Rode *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999), y en otros la producción de leche no fue influida por el tratamiento con enzimas (Dhiman *et al.*, 2002; Bowman *et al.*, 2002; Vicini *et al.*, 2003; Higginbotham *et al.*, 2004).

Además de las enzimas derivadas de hongos aeróbicos, también se ha explorado el potencial que representan los hongos anaeróbicos del rumen para producir enzimas (Bauchop y Mountfort, 1981; Borneman *et al.*, 1989; Mayorga *et al.*, 2005) y ser considerados como fuentes de enzimas para el rumiante, sin embargo se disponen de pocos estudios relacionados con efecto de estas enzimas sobre la digestibilidad y utilización de los nutrientes por el animal. Lee *et al.* (2000) observaron que la administración directa de cultivos de *Orpinomyces* cepa KNGF-2 al rumen de ovejos mejoró la digestibilidad de la MS, FDN, ADF, hemicelulosa, celulosa y nitrógeno, pero la administración de las enzimas fungicas no tuvo efecto en la digestibilidad ni en las variables de fermentación, indicando que esas proteínas fueron degradadas por los microorganismos o que esas enzimas pudieron reducir el crecimiento y actividad de los microorganismos. En otro estudio, Lee *et al.* (2004) administraron cultivos de *Piromyces communis* cepa 22 y obtuvieron aumentos de la digestión de la celulosa entre 22 y 31%.

### **Factores que influyen en la actividad y estabilidad de las enzimas fibrolíticas exógenas**

La variabilidad en los resultados al utilizar enzimas fibrolíticas indica que la especificidad del sustrato, el nivel de humedad del alimento, la dosis de enzima, el tiempo requerido para la interacción de la enzima con el sustrato, el pH y la temperatura durante el tratamiento, son factores importantes y posiblemente afectan la unión de la enzima con el sustrato (Beauchemin *et al.*, 1995; Feng *et al.*, 1996). El método de liberación o

aplicación de la enzima también puede influir en la digestibilidad (Yang *et al.*, 2000), ya que la aplicación directa al alimento comparado con la infusión de la mezcla en el rumen parece potenciar la efectividad de la enzima (Treacher *et al.*, 1997). Además, el contacto previo de la enzima con el sustrato es aparentemente importante para el efecto benéfico de la enzima (McAllister *et al.*, 1999).

El pH del medio (Krause *et al.*, 1998) tiene un efecto importante, ya que la actividad óptima de las enzimas ocurre a un pH más bajo que el valor normal del rumen. Yang *et al.* (2002) reportaron que el incremento en la digestibilidad de la fibra por adición de enzimas fue menor con pH 5.6 (8%) que con pH mayor a 6 (18%); entonces, el pH del medio puede influir en la actividad hidrolítica y en el sinergismo de las enzimas endógenas con las enzimas exógenas (Morgavi *et al.*, 2000<sup>a</sup>). Por tanto, se recomienda que las pruebas se deben conducir con pH 6.0 y 6.5 y a 39 °C, que reflejen las condiciones del rumen (Colombatto y Beauchemin, 2003).

Otro factor que incide en la actividad es la dosis de enzima. La respuesta ruminal a diferentes niveles de enzimas no es lineal y la actividad óptima ocurre sobre estrechos intervalos de inclusión (Dawson y Tricarico (1999). En algunos casos, para estudios *in vitro* se requieren mayores niveles de enzimas para producir efectos similares a los observados *in vivo* (Wallace *et al.*, 2001).

La fuente de enzimas o el producto enzimático (McAllister *et al.*, 1999; Nsereko *et al.*, 2000; Morgavi *et al.*, 2001) y la estabilidad de la enzima (Yang *et al.*, 2000) influyen en la actividad, lo cual ha sido observado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Colombatto *et al.* (2003<sup>a</sup>) señalaron que los productos enzimáticos contienen diferentes cantidades de proteína y azúcares, distintas propiedades bioquímicas y la actividad de las polisacaridasas también cambia para cada producto analizado, lo que parece indicar la existencia de una relación entre la actividad con nivel de enzima y con la concentración de

proteína en el producto. La disminución de la actividad fue más acentuada al menor nivel de enzima, y el contenido de proteína de la enzima explicó 60 y 59 % de la variación en la liberación de azúcares reductores del heno de alfalfa y ensilado de maíz, considerando a los productos con alto contenido de proteína más efectivos (Colombatto *et al.*, 2003<sup>c</sup>). Nsereko *et al.* (2000) señalan que la cantidad de proteína y la habilidad total para hidrolizar enlaces  $\beta$ -glucosa representada por las actividades de celulasas y celulasa 1-4,  $\beta$ -celobiosidasa,  $\beta$ -glucanasa, liquenasa y endo-1,3-(4) - $\beta$ -glucanasa fueron diferentes entre preparados enzimáticos derivados del hongo *Trichoderma* sp.

La intensa actividad microbiana que ocurre en el rumen, y en particular la rápida degradación de las proteínas solubles de la dieta (Broderick *et al.*, 1991) alteraría la estabilidad y las enzimas podrían ser rápidamente inactivadas por las proteasas microbianas, efecto observado por Kopečný *et al.* (1987) en complejos de celulasas de *Trichoderma reesi*. Sin embargo, las enzimas que conforman los productos comerciales como el Fibrozyme son relativamente estables en el medio ruminal (Zinn y Salinas, 1999; Morgavi *et al.*, 2000<sup>b</sup>). Algunas enzimas retuvieron su actividad por más tiempo cuando fueron adicionadas al rumen, e incluso escaparon parcialmente del retículo-rumen e incrementaron la actividad xilanásica en el quimo (Hristov *et al.*, 1998<sup>a</sup>).

La estabilidad en el líquido ruminal de diferentes preparados fue evaluada por Morgavi *et al.* (2000<sup>b</sup>) con extractos obtenidos de los hongos *Irpex lacteus*, *T. viride*, *A. niger* y una mezcla enzimática (M) similar a *I. lacteus*. La actividad de las  $\beta$ -1,4-endoglucanasas y xilanasas del extracto derivado de *A. niger* fue estable en líquido ruminal al menos por 6 h; las otras preparaciones enzimáticas tuvieron un tiempo de vida medio de 2 h para *T. viride* y 4 h para *I. lacteus* y el preparado M.

Otros factores que pueden influir en la estabilidad de las enzimas son la procedencia del líquido ruminal y la concentración de proteína del producto enzimático.

Morgavi *et al.* (2001) encontraron que las polisacaridasas fueron más estables en el líquido ruminal obtenido después de la ingestión de alimento que en el obtenido antes y la reducción de la actividad de celulasas fue menor en la mayor concentración de proteína comparada con la menor concentración. Esto parece indicar que una mayor concentración de proteína en los productos enzimáticos incrementa la estabilidad de las polisacaridasas a las proteasas del rumen.

Según Colombatto *et al.* (2003<sup>b</sup>) la actividad enzimática de xilanasas, endoglucanasas y  $\beta$ -D-glucosidasas de *T. reesi* se incrementó en promedio 85% después de incubar con líquido ruminal. Esto sugiere que las enzimas expresaron una mayor actividad y resistencia a la degradación. Además, se había señalado que las hidrolasas de *Trichoderma* generalmente resisten la inactivación microbiana (Rode *et al.*, 1999). Las diferencias en la estabilidad entre preparaciones pueden ser explicadas por el origen, la estructura y la conformación secundaria y terciaria de las proteínas, que influye en la susceptibilidad a las proteasas. La presencia de un sustrato también es un factor que incrementa la resistencia a la inactivación proteolítica (Fontes *et al.*, 1995). La aplicación de la enzima al alimento previo a la ingestión hace más fuerte la unión de la enzima con el sustrato, lo cual incrementa la resistencia de la enzima a la proteólisis y prolonga el tiempo de permanencia en el rumen (Fontes *et al.*, 1995; Beauchemin *et al.*, 2003); la aplicación de la enzima al alimento también provee un mecanismo de liberación lenta de la enzima en el rumen (Beauchemin *et al.*, 1999).

La estabilidad de xilanasas y celulasas en el rumen igualmente está relacionada con una característica bioquímica importante, la glucosilación, que las protege de inactivación por temperatura y proteasas (Fontes *et al.*, 1995). Las proteínas que componen las enzimas están glucosiladas en forma natural, proceso que posiblemente ocurre durante la producción de la enzima (Anisson, 1997). En xilanasas no glucosiladas

de *T. longibrachiatum* en el líquido ruminal, van de Vyver *et al.* (2004) encontraron que éstas presentaron menor actividad que las enzimas naturalmente glucosiladas a las 3 y 6 h de incubación, sin diferencias a las 9 y 24 h. Asimismo, se observó que la estabilidad y actividad se relacionan con el tiempo de incubación, ya que después de 6 h la actividad de las dos tipos de enzimas se redujo, y la tasa de disminución fue más alta en las enzimas no glucosiladas. Ramírez *et al.* (2005), evaluaron la degradación *in vitro* de varios productos enzimáticos en líquido ruminal y no encontraron diferencias en la concentración de amoníaco ni en el tiempo medio de degradación entre enzimas, pero la producción de N-NH<sub>3</sub> aumentó después de 12 h de incubación; esto sugiere que las enzimas tienen estabilidad en el líquido ruminal por lo menos durante 12 h.

### **Hongos aeróbicos productores de enzimas fibrolíticas exógenas**

Los complejos de enzimas fibrolíticas (celulasas y xilanasas) en productos comerciales se obtienen de extractos de fermentación de las especies de hongos *A. niger*, *T. longibrachiatum*, *T. reseei* (Beauchemin *et al.*, 1995; Nadeau *et al.*, 2000; Pinos-Rodríguez *et al.*, 2001), *A. oryzae* (Caton *et al.*, 1993), *T. viride* (McHan, 1986) y *Penicillium funicalosum* (Liu y Orskov, 2000) principalmente.

Otros hongos que producen enzimas fibrolíticas son los géneros *Pleurotus* sp. y *Trametes* sp. El interés biotecnológico de los hongos del género *Pleurotus* se ha incrementado debido a su habilidad para degradar madera (Giardina *et al.*, 1995; Marzullo, *et al.*, 1995) y por la significativa producción de la enzima lacasa, del tipo fenol-oxidasa extracelular, la cual degrada lignina (Call y Mucke, 1997; Ardon *et al.*, 1998). Además, producen celulasas y xilanasas (Platt *et al.*, 1984; Tsang *et al.*, 1987; Eichlerová

*et al.*, 2000). Al inocular materiales lignocelulósicos con *P. ostreatus* se producen cambios en la composición química y en la digestibilidad. En particular, se destaca la reducción de los constituyentes de la pared celular: concentración de FDN, hemicelulosa, celulosa y FDA (Adamovic *et al.* 1998) así como de la cantidad de lignina (Beg *et al.*, 1986; Moyson y Verachtert, 1991).

La inoculación de heno de *Brachiaria* con *P. ostreatus* favoreció la degradación de la fibra, siendo más acentuado el efecto sobre la hemicelulosa que en los demás componentes de la fibra. Schmidt *et al.* (2003<sup>a</sup>) encontraron una reducción de 15.5% en la cantidad de FDN y de 33% en la hemicelulosa del heno de *Brachiaria* inoculado con *P. ostreatus*. De manera similar, Schmidt *et al.* (2003<sup>b</sup>) observaron una disminución de 5 y 30% en las concentraciones de FDN y hemicelulosa y un incremento de 20% de la lignina del heno en similares condiciones experimentales. Hay una reducción significativa en las concentraciones de FDN, FDA, celulosa y hemicelulosa y un aumento en la digestibilidad *in vitro* de la MS de paja de trigo tratada con *Pleurotus* sp. (Fazaeli *et al.*, 2003), mientras que Castro *et al.* (2004) reportan el incremento de la proteína y reducción de la FDN y la FDA de residuos de algodón tratados con *P. sajor-caju* (Cuadro 1.6).

Los hongos aeróbicos producen diferentes enzimas fibrolíticas y su actividad varía con la especie de hongo, la cepa y con el crecimiento, entre otros factores. Se ha encontrado que *P. ostreatus* produce endo- $\beta$ -xilanasas y celulasas (Villa-Cruz *et al.*, 1999; Márquez-Rocha *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2004). La actividad de celulasas se midió en las cepas F6 y el derivado P19 de *P. ostreatus*, las cuales fueron similares (11.4 U mg<sup>-1</sup> MS y 10.14 U mg<sup>-1</sup> MS para P19 y F6), mientras que la actividad de xilanasas fue más alta en la cepa P19 (0.28 U mg<sup>-1</sup> MS) que en la F6 (0.22 U mg<sup>-1</sup> MS) (Eichelerová *et al.*, 2000).

Ávila (2005) midió la actividad de enzimas fibrolíticas de *P. ostreatus* (Cepa IE8) en rastrojo de maíz como sustrato, y encontró la máxima actividad de xilanasas (0.195 U g<sup>-1</sup> soporte seco (SS) y de celulasas (0.073 U g<sup>-1</sup> SS) el día 12 de crecimiento del hongo. Ghosh *et al.* (2004) señalan que la actividad de carboximetilcelulasa, β -glicosidasa y xilanasas de *P. ostreatus* alcanzaron su máximo a los 16 días de crecimiento en pseudotallo de banano (1.1, 0.09 y 1.1 U mL<sup>-1</sup>).

Cuadro 1.6. Composición química de materiales fibrosos tratados o no con *Pleurotus* sp.

Fracción	Material lignocelulósico					
	Paja de trigo <sup>(1)</sup>		Algodón <sup>(2)</sup>		Paja de maíz <sup>(3)</sup>	
	Sin tratar	Tratada	Sin tratar	Tratado	Sin tratar	Tratado
MO (%)	95.3	94.16				
PC (%)	1.6	3.06	0.87	3.2	3.44	3.36
PS (%)					0.54	0.69
FDN (%)	83.6	75.52	95.24	76.13	70.64	62.79
FDA (%)	62.9	56.68	91.16	74.0		
LDA (%)	8.0	7.32				
Celulosa (%)	54.8	49.16				
Hemicelulosa (%)	20.7	18.84				
Carbohidratos solubles					0.37	0.76
DIVMS (%)	28.1	37.58				
DIVMO (%)	25.5	37.5	43.87	58.3		
% MS degradable (48 h)	33	47.8				
% FDA degradable (48 h)	22	38.6				
% FDN degradable			44.15	66.62		

PC=proteína cruda; PS=proteína soluble; FDN=fibra detergente neutro; FDA=fibra detergente ácido; LDA=lignina detergente ácido; MO=materia orgánica  
 DIVMS=digestibilidad *in vitro* de la materia seca; DIVMO=digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica.

Fuente: Adaptado de: 1) Fazaelli *et al.* (2003); 2) Castro *et al.* (2004); 3) Díaz-Godínez y Sánchez (2002)



Los hongos del género *Trametes* sp. se han caracterizado principalmente como productores de enzimas lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa (Jönsson *et al.*, 1989; Johansson y Nyman, 1993; Johansson *et al.*, 2002) y oxidasas (lacasas), utilizadas especialmente para procesar compuestos recalcitrantes (Van Hamme *et al.*, 2003; Camarero *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha demostrado que el *T. trogii* expresa un sistema celulolítico completo cuando crecen en medios que contienen celulosa cristalina como única fuente de carbono (Levin y Forchiassin (1995; 1997). Las especies *T. versicolor*, *T. trogii* y *T. gallica* son eficientes degradadores de los tres principales componentes de la madera: la celulosa, hemicelulosa y lignina (Dumonceaux *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2002). Las enzimas xilanolíticas más estudiadas en algunas especies de estos hongos son las endoxilanasas y  $\beta$ -xilosidasas (Polizeli *et al.*, 2005).

La producción y actividad de las enzimas están relacionadas con el crecimiento del hongo. En la especie *T. trogii*, Levin y Forchiassin (1998) observaron las máximas actividades de  $\beta$ -xilosidasas y endoxilanasas entre los días 13 y 15 de incubación en medio líquido, respectivamente, reportando niveles de actividad de 423.0 mU mL<sup>-1</sup> para endoxilanasas y de 38.57 mU mL<sup>-1</sup> para  $\beta$ -xilosidasas en cultivo con xilano de avena más celulosa cristalina, indicando que la producción de xilanasas fue eficientemente inducida por los sustratos. Sun *et al.* (2004) señalan que la especie *T. gallica* produce al menos dos tipos de enzimas con actividad de xilanasas, reportando actividad de 33.3 UI mL<sup>-1</sup> cuando éste crece en paja de trigo durante 14 días.

Ludwing *et al.* (2004) señalan que hubo altos niveles de actividad de celobiosa deshidrogenasa en 11 cepas de *Trametes* sp. y se destacaron las cepas *T. pubescens* MB89 con 2.10 U mL<sup>-1</sup> a los 13 días, *T. versicolor* MB52 con 2.03 U mL<sup>-1</sup> a los 11 días, *T. hirsuta* MB50 0.95 U mL<sup>-1</sup> a los 10 días y *T. villosa* CBS 334.49 759 U L<sup>-1</sup> a los 13 días, en medio de crecimiento a base de celulosa.

Algunas especies de *Aspergillus* son eficientes productores de xilanasas (Pandey y Pandey, 2002; Wu *et al.*, 2005). Los resultados de varios estudios indican que la máxima actividad de xilanasas de *Aspergillus* sp. se expresa entre los 3 y 5 d (Deschamps y Huet, 1985; Lenartovicz *et al.*, 2002; Loera y Córdova, 2003). Park *et al.* (2002) indican que el tiempo de cultivo y la concentración del medio fueron los factores que más influyeron en la actividad xilanásica de *A. niger* KK2, al encontrar valores entre 168 y 1177 UI g<sup>-1</sup>, con máximos niveles de actividad a los 5 d de fermentación en paja de arroz como medio de cultivo.

## REFERENCIAS

- Adamovic, M., G. Grubic, I. Milenkovic, R. Jovanovic, R. Protic, L. Sretenovic, and L. Stoicevic. 1998. The biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* mushrooms and its use in cattle feeding. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 71:357-362.
- Adogla-Bessa, T., E. Owen and A.T. Adesogan. 1999. Ensiling of whole crop wheat with cellulose-hemicellulase based enzymes. 3. Comparing effects of urea or enzyme treatment on forage composition and stability. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 82:51-61.
- Akin, D.E. 1986. Chemical and biological structure in plants related to microbial degradation of forage cell walls. *In: Milligan L.P., W.L. Gicovun, and D. Dobson, editors. Control of Digestion and Metabolism in Ruminants. Prentice-Hall Englewood Cliff. New Jersey. pp. 139-157.*
- Akin, D.E. and F.E. Barton. 1983. Rumen microbial attachment and degradation of plant cell walls. *Fed. Proc.* 42:114-121.
- Albrecht, K.A., W.F. Wedin and D.R. Buxton. 1987. Cell-wall composition and digestibility of alfalfa stems and leaves. *Crop Sci.* 27:735-741.
- Allen, V.G. and E. Segarra. 2001. Antiquality components in forage: Overview, significance, and economic impact. *J. Range Manage.* 54:409-412.
- Aman, P. 1993. Composition and structure of cell wall polysaccharide. *In: Jung, H.G., D.R. Buxton, R.D. Hatfield, and J. Ralph, editors. Forage Cell Wall Structure and Digestibility. ASA-CSSA-SSSA, Madison, Wisc. pp. 183-199.*
- Aman, P. and H. Grahan. 1990. Chemical evaluation of polysaccharides in animal feed. *In: Wiseman, J. and D.J.A. Cole, editors. Feedstuff Evaluation. Butterworths. London. pp. 161-177.*
- Annisson, G. 1997. The use of enzymes in ruminant diets. *In: Lyons, T.P. and K.A. Jacques, editors. Biotechnology in Feed. Industry. Procc. of Annual Symposium Nottingham University Press. Nottingham, Leics. U.K. p. 115.*
- Ardon, O., Z. Kerem and Y. Hadar. 1998. Enhancement of lignin degradation and laccase activity in *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *Can. J. Microbiol.* 44:676-680.
- Ávila, H. 2005. Enzimas fibrolíticas de *Pleurotus ostreatus* y su actividad en rastrojo de maíz. (Tesis de Maestría). Colegio de Postgraduados de México. Montecillo, Edo. de México. 92 p.
- Bailey, R.W. 1973. Structural carbohydrates. *In: Butler, G.W. and K.W. Bailey, editors. Chemistry and Biochemistry of Herbage. Academic Press. New York. Vol 1:157-211.*

- Barton, F.E., H.E. Amos, D. Burdick and R.L. Wilson. 1976. Relationship of chemical analysis to *in vitro* digestibility for selected tropical and temperate grasses. J. Anim. Sci. 43:504-512.
- Bauchop, T. and D.O. Mountfort. 1981. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogens. App. Environ. Microbiol. 42:1103-1110.
- Beauchemin, K.A., L.M. Rode and V.J. Sewalt. 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. Can. J. Anim. Sci. 75:641-644.
- Beauchemin, K.A., S.D. Jones, L.M. Rode and V.J. Sewalt. 1997. Effects of fibrolytic enzymes in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. Can. Anim. Sci. 77:645-653.
- Beauchemin, K.A., W.Z. Yang and L.M. Rode. 1999. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. J. Dairy Sci. 82:378-390.
- Beauchemin, K.A., D. Colombatto and D.P. Morgavi. 2004. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. Can. J. Anim. Sci. 84:23-36.
- Beg, S., S.I. Zafar and F.H. Shah. 1986. Rice husk biodegradation by *Pleurotus ostreatus* to produce a ruminant feed. Agric. Wastes. 17:15-21.
- Berger, L.L., G.C. Fahey, L.D. Bourquin and E.C. Titgemeyer. 1994. Modification of forage quality after harvest. In: Fahey, G.C., editor. Forage Quality Evaluation and Utilization. USA. Pp. 922-952.
- Bertrand, J.A. and L.W. Grimes. 1997. Influence of tallow and *Aspergillus oryzae* fermentation extract in dairy cattle rations. J. Dairy Sci. 80:1179-1184.
- Borneman, W.S., D.E. Akin and L.G. Ljungdahl. 1989. Fermentation products and plant cell wall-degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. App. Environ. Microbiol. 55:1066-1073
- Boutatour, A., L. Castillejos, R. Casals, and S. Casamiglia. 2004. Effects of fibrolytic enzymes and fat supplementation on fiber digestibility, nitrogen metabolism and fermentation profile in continuous culture system. J. Anim. Sci. 82:49, Suppl. 1.
- Bowman, J.G.P., and J.L. Firkins. 1993. Effects of forage species and particle size on bacterial cellulolytic activity and colonization *in situ*. J. Anim. Sci. 71:1623-1633.
- Bowman, G.R., K.A. Beauchemin, and J.A. Shelford. 2002. The proportion of the diet to which fibrolytic enzymes are added affects nutrient digestion by lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 85:3420-3429.

- Broderick, G.A., R.J. Wallace and E.R. Orskov. 1991. Control of rate and extent of protein degradation. *In*: Tsuda, T., Y. Sasaki and R. Kawashima, editors. Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants. Academic Press. San Diego C.A. pp. 541-582.
- Burns, J.C., K.R. Ponds, D.S. Fisher and J.-M. Luginbuhl. 1997. Changes in forage quality, ingestive mastication, and digesta kinetics resulting from Switchgrass maturity. *J. Anim. Sci.* 75:1368–1379.
- Call, H.P. and I. Mucke. 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase mediator systems (Lignozym-Process). *J. Biotechnol.* 53:163-202.
- Camarero, S., D. Ibarra, M. J. Martínez and A. T. Martínez. 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1775-1784.
- Casler, M.D. and H.G. Jung. 1999. Selection and evaluation of smooth bromegrass clones with divergent lignin or etherified ferulic acid concentration. *Crop Sci.* 39:1866-1873.
- Castro, A.L., P.C. de Aguiar Paiva, E. Souza Dias, J. dos Santos. 2004. Avaliação das alterações bromatológicas e degradabilidade do resíduo de lixiviadora do algodão após tratamento biológico com *Pleurotus sajor-caju*. *Cienc. Agrotec. Lavras.* 3:608-613.
- Caton, J.S., D.D. Ericsson, D.A. Carey and L.L. Ulmer. 1993. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on forage intake, site of digestion, *in situ* degradability, and duodenal amino acid flow in steers grazing cool-season pasture. *J. Anim. Sci.* 71:779-787.
- Chen, K.H., J.T. Huber, J. Simas, C.B. Theurer, P. Yu, S.C. Chan, F. Santos, Z. Wug, R.S. Swingle and E.J. DePeters. 1995. Effect of enzyme treatment or steam-flaking of sorghum grain on lactation and digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78:1721-1727.
- Cheng, K.J., and J.W. Costerton. 1980. Adherent rumen bacteria: Their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. *In*: Ruckebush, Y. and P. Thivend, editors. Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants. MTP Press, Lancaster, U.K. pp.227-250.
- Cheng, K.-J., C.S. Stewart, D. Dinsdale and J.W. Costerton. 1984. Electron microscopy of bacteria involved in the digestion of plant cell walls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:93-120.
- Chesson, A., C.S. Stewart and R.J. Wallace. 1982. Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:597-603.
- Cheeson, A. and C.W. Forsberg. 1988. Polysaccharide degradation by rumen microorganism. *In*: Hobson, P.N., editor. The Rumen Microbial System. Elsevier Applied Sci. New York, NY. pp. 151-284.
- Coleman, G.S. 1985. The cellulose content of 15 species of entonidiniomorphid protozoa, mixed bacteria and plant debris isolated from the ovine rumen. *J. Agric. Sci.* 104:349-360.

Coleman, G.S. 1986. The distribution of carboxymethylcellulase between fractions take from the rumen of sheep containing no protozoa or one of five different protozoal populations. *J. Agric. Sci.* 106:121-127.

Collings, G.F. and M.T. Yokoyama. 1979. Analysis of fiber component in feed and forage using gas liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 27:373-377.

Colombatto, D. and K.A. Beauchemin. 2003. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. *Can. J. Anim. Sci.* 83:559-568.

Colombatto, D., F.L. Mould, M.K. Bhat and E. Owen. 2003a. Use of fibrolytic enzymes to improve the nutritive value of ruminant diets. A biochemical and *in vitro* rumen degradation assessment. *Anim. Feed Sci. Technol.* 107:201-209.

Colombatto, D., F.L. Mould, M.K. Bhat, D.P. Morgavi, K.A. Beauchemin and E. Owen. 2003b. Influence of fibrolytic enzymes by mixed ruminal microorganism *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 81:1040-1050.

Colombatto, D., D.P. Morgavi, A.F. Furtado and K.A. Beauchemin. 2003c. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: relationship between biochemical characteristic and *in vitro* ruminal degradation. *J. Anim. Sci.* 81:2628-2638.

Colombatto, D., F.L. Mould, M.K. Bath and E. Owen. 2004. Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and incubation pH on the *in vitro* ruminal fermentation of alfalfa stems. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137:150-162.

Czerkawski, J.W. 1986. Chemical composition of solid feeds in the rumen: Spatial distribution of microbial activity and it consequence. *In: Milligan, L.P., W.L. Grovum and A. Dobson, editors. Control of Digestion and Metabolism in Ruminants.* Reston, NJ. pp.158-172.

Dado, R.G. and M.S. Allen. 1995. Intake limitations, feeding behavior and rume funtion of cows challenged with rumen fill from dietary fiber or inert or inert bulk. *J. Dairy Sci.* 78:118-133.

Dawson, K.A. and J.M. Tricarico. 1999. The use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance microbial activities in the rumen and the performance on ruminant animals. *In: Lyons, T.P. and K.A. Jacques, editors. Biotechnology in the Feed Industry. Proc. 15<sup>th</sup> Annu Symp.* Nottingham University Press. pp. 303-312.

Demeyer, D.I.1981. Rumen microbes and digestion of plant cell walls. *Agric. Environ.* 6:295-337.

Deschamps, F. and M.C. Huet. 1985. Xylanase production in solid-state fermentation: a study of its property. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22:177-180.

Dhiman, T.R., M.S. Zama, R.R. Gimenez, J.L. Walters and R. Treacher. 2002. Performance of dairy cows fed forage treated with fibrolytic enzymes prior to feeding. *Anim. Feed Sci. Technol.* 101:115-125.

- Díaz-Godínez, G. y C. Sánchez. 2002. *In situ* digestibility and nutritive value of maize straw generated after *Pleurotus ostreatus* cultivation. *Can. J. Anim. Sci.* 82:617-619.
- Dijkstra, J. and S. Tamminga. 1995. Simulation of the effect of diet on the contribution of rumen protozoa to degradation of fiber in the rumen. *Br. J. Nutr.* 74:617-634 .
- Dong, Y., H.D. Bae, T.A. McAllister, G.W. Mathison and K.-J. Cheng. 1999. Effects of exogenous fibrolytic enzymes,  $\alpha$ -bromoethanosulfonate and monensin on fermentation in a rumen simulation (RUSITEC) system. *Can. J. Anim. Sci.* 79:491-498.
- Dumonceaux T, K. Bartholomew, L. Valeanu, T. Charles and A. Archibald. 2001. Cellobiose dehydrogenase is essential for wood invasion and nonessential for kraft pulp delignification by *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* 29:478-489.
- Eichlerová, I., K. Ruel, L. Homolka, J.-P. Joseleau and F. Nerud. 2000. Ligninolytic characteristics of *Pleurotus ostreatus* strain F6 and its monokariotic protoplast derivate P19. *Can. J. Microbiol.* 46:1153-1158.
- Eraso, F. and R.D. Hartley. 1990. Monomeric and dimeric phenolconstituents of plant cell walls. Possible factors influencing wall biodegradability. *J. Sci. Food Agric.* 51:163-170.
- Eun, J.-S. and K. Beauchemin. 2004. Use of exogenous proteolytic enzymes to improve lactational performance of dairy cows. *J. Anim. Sc.* 82:304, Suppl. 1 (Abstr.).
- Fazaeli, H., A. Azizi, Z.A. Jelan and S.A. Mirhadi. 2003. Effect of fungal treatment on the chemical composition, *in vitro* digestibility and *in sacco* degradability of wheat straw. *Proc. Br. Soc. Anim Sci.* p. 166.
- Feng, P., C.W. Hunt, G.T. Pritchard and W.E. Julien. 1996. Effect of enzyme preparations on *in situ* and *in vitro* degradation and *in vivo* digestive characteristic of mature cool-season grass forage in beef steers. *J. Anim. Sci.* 74:1349-1357.
- Fondevila, M., C.J. Newbold, P.M. Hotten and E.R. Orskov. 1990. A note on the effect of *Aspergillus oryzae* fermentation of sheep given straw. *Anim. Prod.* 51:422-425.
- Fontes, C.M., J. Hall., B.H. Hirst, G.P. Hazlewood and H.J. Gilbert. 1995. The resistance of cellulases and xylanases to proteolytic inactivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:52-57.
- Forbes, J.M. 1996. Integration of regulatory signals controlling forage intake in ruminants. *J. Anim. Sci.* 74:3029-3035.
- Forsberg, C.W., T.J. Beveridge and A.H. Hellstron. 1981. Cellulase and xylanase release form *Bacteroides succinogenes* and its importance in the rumen environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:886-896.
- Ghosh, M., R. Mukherjee and B. Nandi. 2004. Production of extracellular enzymes by two *Pleurotus* species using banana pseudostem biomass. *Acta Biotechnologica.* 18:243-254.

- Giardina, P., R. Canio, L. Martiriani, L. Marzullo, G. Palmieri and G. Sania. 1995. Cloning and sequencing of laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2408-2413.
- Gilbert, I.G. and C.T. Tsao, 1983. Interaction between solid substrate and cellulase enzymes in cellulose hydrolysis. *Ann. Rep. Ferm. Process.* 6:323-358.
- Gordon, G.L.R. and M.W. Philips. 1989. Degradation and utilization of cellulose and straw by three different anaerobic fungi from the ovine rumen. *App. Environ. Microbio.* 55:1703-1710.
- Grabber, J.H. 2005. How do lignin composition, structures, and cross-linking affect degradability?. A review of cell wall model studies. *Crop Sci.* 45:820-831.
- Griffin, J.L. and G.A. Jung. 1983. Leaf and stem forage quality of big bluestem and switchgrass. *Agron. J.* 75:723-726.
- Hartley, R.D. and E.C. Jones. 1977. Phenolic component and degradability of cell walls of grass and legume species. *Phytochem.* 16:1531-1534.
- Hatfield, R.D. 1993. Characterization of pectin fraction from smooth bromegrass cells walls using an endopolygalacturonase. *J. Agric. Food Chem.* 41:380-387.
- Hatfield, R. and R.S. Fukushima. 2005. Can lignin be accurately measured?. *Crop Sci.* 45:832-839.
- Hatfield, R.D., H.G. Jung, J. Ralph, D.R. Buxton and P.J. Weimer. 1994. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. *J. Sci. Food Agric.* 65:51-58.
- Hatfield, R.D., J. Ralph and J.H. Grabber. 1999. Cell wall structural foundations: molecular basis for improving forage digestibilities. *Crop Sci.* 39:27-37.
- Higginbotham, G.E., J.E. Santos, S.O. Juchem and E.J. DePeters. 2004. Effects of feeding *Aspergillus oryzae* extract on milk production and rumen parameters. *Liv. Prod. Sci.* 86:55-59.
- Higuchi, T. 1990. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24:23-63.
- Hristov, A.N., T.A. McAllister and K-J. Cheng. 1998a. Stability of exogenous polysaccharide degrading enzymes in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 76:161-168.
- Hristov, A.N., T.A. McAllister and K-J. Cheng. 1998b. Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharide-degrading enzymes on rumen fermentation and nutrient digestibility. *J. Anim. Sci.* 76:3141-3156.
- Howard, R. L., E. Abotsi, E. L. Jansen van Rensburg and S. Howard. 2003. Lignocellulose biotechnology: Issus of bioconversion and enzyme production. *African J. Biotech.* 2:602-619.



- Hungate, R.E. 1975. The rumen microbial system. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 6:39-60.
- Hungate, R.E. 1988. Introduction: The ruminant and the rumen. *In: Hobson, P.N.* editor. *The Rumen Microbial Ecosystem.* Elsevier Applied Science. London and New York. pp. 1-19.
- Iiyama, K., T.B. Lam, P.J. Meilke, D.I. Rhodes and B.A. Stone. 1993. Cell wall biosynthesis and its regulation. *In: Jung, H.G., R.R. Buxton, R.D. Hatfield and J. Ralph,* editors. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility.* ASA-CSSA-ASSA. Madison, Wi. pp. 621-683.
- Iiyama, K.T., B.T. Lam and B. Stone. 1994. Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.* 104:315-320.
- Johansson, T. and P.O. Nyman. 1993. Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. I. Isolation of enzyme forms and characterization of physical and catalytic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 300:49-56.
- Johansson, T., P.O. Nyman and D. Cullen. 2002. Differential regulation of *mnp2*, a new manganese peroxidase-encoding gene from the lignolytic fungus *Trametes versicolor* PRL 527. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2077-2080.
- Jönsson, L., O. Karlsson, K. Lundquist and P.O. Nyman. 1989. *Trametes versicolor* ligninase: isoenzyme sequence homology and substrate specificity. *FEDS Lett.* 247: 143-146.
- Jung, H.G. 1989. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. *Agron. J.* 81:33-38.
- Jung, H.G. and M.S. Allen. 1995. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forage by ruminants. *J. Anim. Sci.* 73:2774-2790.
- Jung, H.G. and G.C. Fahey. 1983. Interactions among phenolic monomers and *in vitro* fermentation. *J. Dairy Sci.* 66:1255-1263.
- Jung, H.G. and T. Sahlu. 1986. Depression of cellulose digestion by esterified cinnamic acids. *J. Sci. Food Agric.* 37:659-665.
- Jung, H.G. and K.P. Vogel. 1986. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. *J. Anim. Sci.* 62:1703-1712.
- Jung, H.G. and K.P. Vogel. 1992. Lignification of switchgrass (*Panicum virgatum*) and big bluestem (*Andropogon gerardii*) plant parts during maturation and its effect on fiber degradability. *J. Sci. Food Agric.* 59:169-176.
- Jung, H.G. and D.A. Deetz. 1993. Cell wall lignification and degradability. *In: Jung, H.G., D.R. Buxton, R.D. Hatfield and J. Ralph,* editors. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility.* ASA-CSSA-ASSA, Madison, Wi. pp. 315-346.

- Kopecny, J., M. Marounek and K. Holub. 1987. Testing the suitability of the addition of *Trichoderma viride* cellulose. *Zivoc.Vyroba*.35:587-592.
- Krause, M., K.A. Beauchemin, L.M. Rode, B.I. Farr and P. Norgaard. 1998. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. *J. Anim. Sci.* 76:2912-2929.
- Kunkle, W.E., J.T. Johns, M.H. Poore and D.B. Herd. 1999. Design supplementation programs for beef cattle fed forage-based diets. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.* <http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0912.pdf>.
- Kung, L.Jr., R.J. Treacher, G.A. Nauman, A.M. Smagala, K.M. Endres and M.A. Cohen. 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:115-122.
- Ladisch, M.R., K.W. Lin, M. Voloch and G.T. Tsao. 1983. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme Tech.* 15:90-99.
- Lee, S.S., J.K. Ha and K.-J. Cheng. 2000. Influence of anaerobic fungal culture administration on *in vivo* ruminal fermentation and digestive nutrient digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.* 88:201-217.
- Lee, S.S., C.K. Choi, B.H. Ahn, Y.H. Moon, C.H. Kim and J.K. Ha. 2004. *In vitro* stimulation of rumen microbial fermentation by a rumen anaerobic fungal culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115:215-226.
- Lenartovicz, V, C.G. Marques De Souza, F. Guillen Moreira and R.M. Peralta. 2002. Temperature effect in the production of multiple xylanases by *Aspergillus fumigatus*. *J. Basic Microbiol.* 42:388-395.
- Levin, L. y F. Forchiassin. 1995. Influencia de fuentes carbonadas y nitrogenadas sobre la actividad celulolítica de *Trametes trogii*. *Rev. Arg. Microbiol.* 27:11-20
- Levin, L. y F. Forchiassin. 1997. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de celulasas por *Trametes trogii*. *Rev. Arg. Microbiol.* 29:16-23.
- Levin, L. and F. Forchiassin. 1998. Influence of growth conditions on the production of xylanolytic enzymes by *Trametes trogii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14:443-446.
- Liu, J.X. and E.R. Orskov. 2000. Cellulase treatment of untreated and steam pre-treated rice straw-effect on *in vitro* fermentation characteristics. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 88:189-200.
- Loera, O. and J. Córdova. 2003. Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strains. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46:177-181.
- Ludwing, R., A. Salomón, J. Varga, M. Zamocky, C.K. Peterauber, K.D. Kulbe and D. Haltrich. 2004. Characterization of cellobiose dehydrogenase from the white-rot fungi *Trametes pubescens* and *Trametes villosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:213-222.

- Márquez-Rocha, F.J., V.Z., Hernández-Rodríguez, and R. Vázquez-Duhalt. 2000. Biodegradation of soil-adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnol. Lett.* 22:469-472.
- Mayorga, O.L., E. López, T.E. Díaz y R. Barahona. 2005. Efecto de la fuente de carbono y el tipo de inóculo sobre la producción de enzimas hidrolíticas del hongo anaeróbico ruminal *Neocallimastix frontalis* NFT 101. *Rev. Corpoica.* 6:12-19.
- Martin, C., E. Devillard and B. Michalet-Doreau. 1999. Influence of sampling site on concentrations and carbohydrate-degrading enzymes activities of protozoa and bacteria in the rumen. *J. Anim. Sci.* 77:979-987.
- Marzullo, L., R. Canio, P. Giardina, M.T. Sartini and G. Sania. 1995. Veratryl alcohol oxidasa from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevent polymerization of laccase-oxidized substrates. *J. Biol. Chem.* 270:3823-3827.
- Matew, C. K., Van Holde and K.G. Ahern. 2004. *Bioquímica.* 3<sup>ra</sup> ed. Madrid: Pearson Educación, S.A. 1335 p.
- McAllister, T.A., S.J. Oosting, J.D. Popp, Z. Mir, L.J. Yake, A.N. Hristov, R.J. Treacher and K.-J. Cheng. 1999. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 79:353-360.
- McHan, F. 1986. Pretreatment of coastal bermudagrass with sodium hydroxide and cellulose before ensiling. *J. Dairy Sci.* 69:1837-1846.
- Mertens, D.R. 1987. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminant function. *J. Anim. Sci.* 65:1548-1558.
- Mertens, D.R. 1994. Regulation of forage intake. *In: Fahey, G.C. Jr., editor. Forage Quality Evaluation and Utilization.* ASA-CSSA,ASSA, Madison, Wi. pp. 450-493.
- Michalet-Doreau, B., I. Fernández and G. Fonty. 2002. A comparison of enzymatic and molecular approaches to characterize the cellulolytic microbial ecosystems of the rumen and cecum. *J. Anim. Sci.* 80:790-796.
- Monties, B. 1991. Plant cell walls as fibrous lignocelulosic composites: relations with lignin structure and function. *Anim. Feed Sci. Technol.* 32:159-175.
- Moore, K.J., P. Vogel, A.A. Hopkins and L.E. Moser. 1993. Improving the digestibility of warm-season perennial grasses. *Proc. XVI International Grassland Congr.* pp.447-448.
- Moore, K.J. and R.D. Hatfield. 1994. Carbohydrates and forage quality. *In: Fahey, G.C. Jr., editor. Forage Quality Evaluation and Utilization.* ASA-CSSA,ASSA, Madison, Wi. pp. 224-280.
- Moore, K.J. and H.J. Jung. 2001. Lignin and fiber digestion. *J. Range Manage.* 54:420-430.

- Moreno Jaramillo, R.A. 2004. Enzimas fibrolíticas en dietas para rumiantes. (Tesis de Doctorado). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 129 p.
- Morgavi, D.P., K.A. Beauchemin, V.L. Nsereko, L.M. Rode., A.D. Iwaasa, W.Z. Yang, T.A. McAllister and Y. Wang. 2000a. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. J. Dairy Sci. 83:1310-1321.
- Morgavi, D.P., C.J. Newbold, D.E. Beever, and R.J. Wallace. 2000b. Stability and stabilization of potential feed additive enzymes in the rumen fluid. Enz. Microbiol. Technol. 26:171-177.
- Morgavi, D.P., K.A. Beauchemin, V.L. Nsereko, L. Rode, T.A. McAllister, A.D. Iwaasa, Y. Wang and W.Z. Yang. 2001. Resistance of feed enzymes to proteolytic activation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. J. Anim. Sci. 79:1621-1630.
- Morrison, I.M. 1974. Structural investigations on the lignin-carbohydrate complexes of *Lolium perenne*. Biochem. J. 139:197-204.
- Moyson, E. and H. Verachert. 1991. Growth of higher fungi on wheat straw and their impact on the digestibility of the substrate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:421-424.
- Nadeau, E.M., J.R. Russell and D.R. Buxton. 2000. Intake, digestibility and composition of orchardgrass and alfalfa silages treated with cellulase, inoculant, and formic acid fed to lambs. J. Anim. Sci. 78:2980-2989.
- Nsereko, V.L., D.P. Morgavi, L.M. Rode, K.A. Beauchemin and T.A. McAllister. 2000. Effects of fungal preparation on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganism *in vitro*. Anim. Feed Sci. Technol. 88:153-170.
- Nsereko, V.L., K.A. Beauchemin, D.P. Morgavi, L.M. Rode, A.F. Furtado, T.A. McAllister, A.D. Iwaasa, W.Z. Yang and Y. Wang. 2002. Effect of fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. Can. J. Microbiol. 48:14-20.
- Orpin, C.G. 1984. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. Anim. Feed Sci. Technol. 10:121-143.
- Orpin, C.G. and K.N. Joblin. 1988. The rumen anaerobic fungi. In: Hobson, P.N. editor. The Rumen Microbial Ecosystem. Elsevier Science Publishers LTD. London and New York. pp. 129-150
- Pandey, P. and A.K. Pandey. 2002. Production of cellulase-free thermostable xylanases by an isolated strain of *Aspergillus niger* PPI, utilizing various lignocellulosic wastes. World J. Microbiol. Biotechnol. 18:281-283.
- Park, Y.S., S.W. Kang, J.S. Lee, S.I. Hong and S.W. Kim. 2002. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58:762-766.

- Polizeli, M.L., A.C. Rizzatti, R. Monti, H.F. Terenzi, J.A. Jorge and D.S. Amorin. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:577-591.
- Pinos-Rodríguez, J.M., S.S. González Muñoz, G. Mendoza Martínez, R. Bárcena Gama y M. Cobos Peralta. 2001. Efecto de enzimas fibrolíticas glucosiladas en la digestibilidad *in vitro* de MS y MO de alfalfa (*Medicago sativa*) y ballico (*Lolium perenne*). *Rev. Cient. FCV-LUZ.* 11:505-509.
- Pinos-Rodríguez, J.M., S.S. González, G. Mendoza, R. Bárcena, M.A. Cobos, A. Hernández and M.E. Ortega. 2002. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 80:3016-3020.
- Platt, M., W. Hadar and Y. Henis. 1984. Fungal activities involved lignocellulose degradation by *Pleurotus*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20:150-154.
- Ramirez, L., E. Aranda, G.D. Mendoza, L. Landois, L.A. Miranda y M.M. Crosby. 2005. Caracterización de productos fibrolíticos comerciales utilizados en la alimentación de rumiantes. *Vet. Mex.* 36:1-9.
- Rode, L.M., W.Z. Yang and K.A. Beauchemin. 1999. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 82:2121-2126.
- Rodríguez, S., M. Fernández, R.C. Bermúdez y H. Morris. 2003. Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp. *Rev. Iberoam Micol.* 20:164-168.
- Russell, J.B. 2002. Rumen Microbiology and Its Role in Ruminant Nutrition. Russell, J.B. editor. Ithaca, NY. 121 p.
- Sarkanen, K.V and C.H. Ludwig. 1971. Definition and nomenclature. *In*: Sarkanen, K.V. and C.H. Ludwig. editors. Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions. Wiley-Interscience. New York. pp. 1-18
- Scalbert, A., B. Monties, J.Y. Lallemand, E. Guittet and C. Rolando. 1985. Ether linkages between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochem.* 24:1359-1362.
- Schmidt, P., F.S. Wechsler, J.S. Nascimento, F. Miranda. 2003a. Tratamento do feno de braquiaria pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. *R. Bras. Zootec.* 32:1866-1871.
- Schmidt, P., F.S. Wechsler, J.S. Nascimento, F. Miranda, P. Rosi. 2003b. Valor nutritivo do feno de braquiaria amonizado com ureia ou inoculado com *Pleurotus ostreatus*. *R. Bras. Zootec.* 32:2040-2049.
- Schofield, P. and A.N. Pell. 1995. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble. *J. Anim. Sci.* 73:3455-3463.
- Sheperd, A.C. and L. Kung. 1996. Effects of an enzyme additive on composition of corn silage ensiled at various stages of maturity. *J. Dairy Sci.* 79:1767-1773.

- Sievert, S.J. and R.D. Shaver. 1993. Effect of nonfiber carbohydrate level and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on intake, digestion, and milk production in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 71:1032-1040.
- Sun, X., S. Ren and R. Bl. 2002. Lignocelullose degradation of wheat straw by *Trametes gallica*. *J. Microbiol.* 22:24-26.
- Sun, X., R. Zhang and Y. Zhang. 2004. Production of lignocellulolytic enzymes by *Trametes gallica* and detection of polysaccharide hydrolase and laccase activities in polyacrylamida gels. *J. Basic Microbiol.* 44:220-231.
- Suton, J.D., R.H. Phipps, D.E. Beever, D.J. Humphries, G.F. Hartnell, J.L. Vicini and D.L. Hard. 2003. Effect of methods of application of a fibrolytic enzyme product on digestive processes and milk production in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 86:546-556.
- Titi, H.H. and M.J. Tappa. 2004. Efficacy of exogenous cellulose on digestibility in lambs and growth of dairy calves. *Livest. Prod. Sci.* 87:207-214.
- Treacher, R., T.A. McAllister, J.D. Popp, Z. Mir, P. Mir and K-J. Cheng. 1997. Effect of exogenous cellulases and xylanases on feed utilization and growth performance of feedlot steers. *Can. J. Anim. Sci.* 77:541 (Abstr.).
- Tsang, J., L. Reid and C.E. Coxworth. 1987. Delignification of wheat straw by *Pleurotus* spp. under mushroom growing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1304-1306.
- Van der Linden, Y.N.O. Van Gylswyk and H. Schwartz. 1984. Influence of supplementation of corn stover with corn grain on the fibrolytic bacteria in the rumen of sheep and their relation to the intake and digestion of fiber. *J. Anim. Sci.* 59:772-783.
- van de Vyver, W.F.J., K.A. Dawson, N.H. Casey and J.M. Tricarico. 2004. Effect of glycosilation on the stability of fungal xylanase exposed to protease or rumen fluid *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 116:259-269.
- Van Hamme, J.D., E.T. Wong, H. Dettman, M.R. Gray and M.R. Pickard. 2003. Dibenzyl sulfide metabolism by white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1320-1324.
- Van Soest, P.J. 1982. *Nutritional Ecology of Ruminant*. (1<sup>nd</sup> Ed.) Cornell University Press. Ithaca, NY. 374 p.
- Van Soest, P.J. 1994. *Nutritional Ecology of Ruminant*. (2<sup>nd</sup> Ed.) Cornell University Press. Ithaca, NY. 119 p.
- Van Soest, P.J., J.B. Robertson and B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74 :3583-3597.
- Varel, V.H. and K.K. Kreikemeier. 1994. Response to various amounts of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal metabolism in cattle. *J. Dairy Sci.* 77:3081-3086.

- Varel, V.H, K.K. Kreikemeier, H-J.G. Jung and R.D. Hatfield. 1993. *In vitro* stimulation of forage fiber degradation by ruminal microorganisms with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. Appl. Environm. Microbiol. 59:3171-3176.
- Vicini, J.L., H.G. Bateman, M.K. Bhat, J.H. Clark, R.A. Erdman, R.H. Phips, M.E. Van Amburgh, G.F.Hartnell, R.H. Hintz and D.L. Hard. 2003. Effect of feeding supplemental fibrolytic enzymes or soluble sugar with malic acid on milk production. J. Dairy Sci. 86:576-585.
- Villa-Cruz. V., G. Huerta-Palacios and J.E. Sánchez-Vázquez. 1999. Fermentation of a mixture of corn-cobs and coffee pulp for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. Micol. Neotrop. Appl. 12:67-74.
- Wallace, R.J., S.J. Wallace, N. McKain, V.L. Nsereko and G.I. Hartnell. 2001. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silage by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. J. Anim. Sci. 79: 1905-1916.
- Wang, Y. and T.A. McAllister. 2003. Rumen microbes enzymes and feed digestion. [http://rumen.snu.ac.kr/Symposium/Lectures/McAllister\\_TA.pdf](http://rumen.snu.ac.kr/Symposium/Lectures/McAllister_TA.pdf).
- Wang, Y.,T.A. McAllister, L.M. Rode, K.A. Beuchemin, D.P. Morgavi, V.L. Nsereko, A.D. Iwaasa and Y. Wang. 2002. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on epiphytic microbial populations and *in vitro* silage digestion. J. Sci. Food Agric. 82:760-768.
- Wang, Y., B.M. Spratling, D.R. ZoBell, R.D. Wiedmeier and T.A. McAllister. 2004. Effect of alkali pre-treatment of wheat straw on the efficacy of exogenous fibrolytic enzymes. J. Anim. Sci. 82:198-208.
- Wedig, C.L., E.H. Jaster, K.J. Moore and N.R. Merchen. 1987. Rumen turnover and digestion of normal and brown hybrid sorghum x sudan-grass hybrid silages in dairy cattle. J. Dairy Sci. 70:1220-1227.
- Weimer, P.J.1998. Manipulation ruminal fermentation: A microbial ecological perspective. J. Anim. Sci. 76:3114-3122.
- White, B.A., R.I. Mackie and K.C. Doerner. 1993. Enzymatic hydrolysis of forage cell walls. *In*: Jung, H.G., D.R. Buxton, R.D. Hatfield, and J. Ralph, editors. Forage Cell Wall Structure and Digestibility. ASA-CSSA-ASSA, Madison, Wi. pp. 455-484.
- Wilkie, K.C. 1979. The hemicelluloses of grasses and cereals. Adv. Carbohydrate Chem. Biochem. 36:215-264.
- Williams, A.G. and C.G. Orpin. 1987. Glycoside hydrolase enzymes present in the zoospore and vegetative growth stages of the rumen fungi *Neocallimastix patriciarum*, *Piromonas communis*, and an unidentified isolate, grow on a range of carbohydrates. Can. J. Microbiol. 33:427-434
- Williams, A.G., S.E. Withers and G.S. Coleman.1984. Glycoside hydrolase of rumen bacteria and protozoa. Curr. Microbiol. 10:207-294.

- Wilman, D. and A.K. Altimimi. 1984. The *in vitro* digestibility and chemical composition of plant parts in white clover, red clover and Lucerne during primary growth. *J. Sci. Food Agric.* 35: 133-138.
- Wilman, D., M. Aly, A. Koocheki and A.B. Lwoga. 1977. The effect of interval between harvest and nitrogen application on the proportion and digestibility of cell wall cellulose, hemicellulose and lignin and on the proportion of lignified tissue in leaf cross-section in two perennial ryegrass varieties. *J. Agric. Sci.* 89:53-63.
- Wood, T.M., C.A. Wilson, S.I. McCrea and K.N. Joblin. 1986. A highly active extracellular cellulose from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 34:37-40.
- Wu, M., L. Shi Chang, Y. Jian Ming, P. Ren Rui and Y. Zeng Liang. 2005. Mutant of a xylanase-producing strain of *Aspergillus niger* in solid state fermentation by low energy ion implantation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21:1045–1049.
- Yang, W.Z., K.A. Beauchemin and L.M. Rode. 1999. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:391-403.
- Yang, W.Z., K.A. Beauchemin and L.M. Rode. 2000. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. *J. Dairy Sci.* 83:2512-2520.
- Yang, W.Z., K.A. Beauchemin and D.D. Vedres. 2002. Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial synthesis, and fermentation in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 102:137-150.
- Yanke, L.J., L.B. Selinger, J.R. Lynn and K.J. Cheng. 1996. Comparison of the influence of carbon substrate on fibrolytic activities of anaerobic rumen fungi. *Anaerobe.* 2:373-378.
- Yoon, I.K. and M.D. Stern. 1996. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* cultures on ruminal fermentation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79:411-417.
- Zahiroddini, H., J. Baah, W. Absalom and T.A. McAllister. 2004. Effect of an inoculant and hydrolytic enzymes on fermentation and nutritive value of whole crop barley silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 117:317-330.
- Zinn, R.A. and J. Salinas. 1999. Influence of fibrozyme on digestive function and growth performance of feedlot steers fed a 78% concentrate growing diet. *In: Lyons, T.P. and K.A. Jacques, editors. Biotechnology in the Feed Industry. Proc. 15<sup>th</sup> Annu Symp. Nottingham University Press. pp. 313-319.*



## CAPITULO II

### ACTIVIDAD FIBROLÍTICA DE ENZIMAS PRODUCIDAS POR *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 EN FERMENTACIÓN SÓLIDA

#### RESUMEN

Se estudió la actividad de enzimática (UI g<sup>-1</sup> MS) y la actividad específica (UI mg<sup>-1</sup> de proteína) de xilanasas, celulasas y lacasas de *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 a los 14 y 19 d de fermentación sólida en bagazo de caña de azúcar. Las xilanasas y celulasas producidas por *Trametes* sp. EUM1 mostraron la mayor actividad (P≤0.01) expresando 141.77 UI g<sup>-1</sup> MS y 1073.8 UI mg<sup>-1</sup> de proteína las primeras, y 9.04 UI g<sup>-1</sup> MS y 69.16 UI mg<sup>-1</sup> de proteína las celulasas, sin diferencias significativas entre 14 y 19 d. La actividad de estas enzimas de *P. ostreatus* IE8 y *A. niger* AD96.4 fue menor (P≤0.01) que *Trametes* sp. EUM1, pero similar entre ellos y en ambos tiempos de fermentación. La mayor (P≤0.01) actividad de lacasas fue expresada por *P. ostreatus* IE8 con promedios de 15.54 UI g<sup>-1</sup> MS y 128.75 UI mg<sup>-1</sup> proteína a los 14 días de fermentación, mayores (P≤0.01) que a los 19 días (11.75 UI g<sup>-1</sup> MS y 102.88 UI mg<sup>-1</sup> proteína). En *Trametes* sp. EUM1, la actividad de lacasas fue menor (P≤0.01) que en *P. ostreatus* IE8 y similar en ambos tiempos de fermentación. En *A. niger* AD96.4 la actividad de lacasas fue menor (P≤0.01) con respecto a *Trametes* sp. y *P. ostreatus*. La actividad de las enzimas fibrolíticas del *Trametes* sp. EUM1 muestra potencial para su posible utilización en aplicaciones biotecnológicas en alimentación de rumiantes.

**PALABRAS CLAVES:** Enzimas fibrolíticas. Hongos. Tiempo de Fermentación.

Artículo publicado en: INTERCIENCIA. Vol. 32 (11):780-785 (2007)

## ABSTRACT

The enzymatic activity (UI g<sup>-1</sup> dry matter) and specific activity (UI mg<sup>-1</sup> protein) of xylanases, cellulases and laccases from the fungi *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8, and *Aspergillus niger* AD96.4 was studied at 14 and 19 d of solid fermentation in sugar cane bagasse. The higher activity of xylanases and cellulases (P≤0.01) was expressed by *Trametes* sp. EUM1, with averages of 141.77 UI g<sup>-1</sup> DM and 1073.8 UI mg<sup>-1</sup> protein for xylanases, and 9.04 UI g<sup>-1</sup> DM and 69.16 UI mg<sup>-1</sup> protein for cellulases, without significant differences at 14 and 19 d. *P. ostreatus* IE8 and *A. niger* AD96.4 showed lower activity (P≤0.01) of these enzymes than *Trametes* sp. EUM1, but similar among them and in both fermentation periods. The higher (P≤0.01) laccase activity was expressed by *P. ostreatus* IE8 with averages of 15.54 UI g<sup>-1</sup> DM and 128.75 UI mg<sup>-1</sup> protein at 14 d, higher (P≤0.01) than at 19 d (11.75 UI g<sup>-1</sup> DM and 102.88 UI mg<sup>-1</sup> protein). In *Trametes* sp. EUM1, the laccase activity was lower (P≤0.01) than *P. ostreatus* IE8 and similar in both fermentation times. In *A. niger* AD96.4 the laccase activity was lower (P≤0.01) than *Trametes* sp. and *P. ostreatus*. The activity of fibrolytic enzymes in *Trametes* sp. EUM1 indicates a potential use for biotechnological applications for ruminant nutrition.

**KEYWORDS:** Fibrolytic enzyme. Fungus. Times of fermentation

## INTRODUCCIÓN

Una estrategia para mejorar la utilización de los alimentos, particularmente aquellos fibrosos, por los rumiantes es el tratamiento de forrajes con enzimas fibrolíticas exógenas o su inclusión como suplemento en la ración (Dawson y Tricarico, 1999). Los complejos de enzimas fibrolíticas se obtienen principalmente de extractos de fermentación de hongos aeróbicos. Los más utilizados para elaborar productos comerciales son *Aspergillus niger*, *Trichoderma longibrachiatum* (Beauchemin *et al.*, 1995; Nadeau *et al.*, 2000) y *Penicillium funiculosum* (Liu y Orskov, 2000).

Los hongos de los géneros *Pleurotus* y *Trametes* tienen habilidad para degradar fibra, ya que producen diferentes complejos enzimáticos lignocelulolíticos (Marzullo *et al.*, 1995; Levin y Forchiassin, 1997). La mayoría de las enzimas caracterizadas en estos hongos son del tipo oxidasa (lacasas y manganeso peroxidasa) que se han utilizado principalmente en el tratamiento de aguas residuales o productos recalcitrantes (Rodríguez *et al.*, 2003; Camarero *et al.*, 2005). El tratamiento de materiales lignocelulósicos con *Pleurotus* ocasiona cambios en la composición química, reduciendo las fracciones fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, celulosa y hemicelulosa (Fazaeli *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004), efectos asociados con la producción de enzimas fibrolíticas (Villa-Cruz *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2004). En algunas especies de *Trametes* se ha identificado la enzima celobiosa deshidrogenasa, importante en la degradación de celulosa (Dumonceaux *et al.*, 2001; Ludwing *et al.*, 2004). Además, diferentes cepas de *A. niger* son reconocidas productoras de xilanasas (Park *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2005) y de celulasas (Onsori *et al.*, 2005).

El tipo y actividad de las enzimas producidas puede variar dependiendo del microorganismo y de la cepa, del sustrato de crecimiento y de las condiciones de cultivo,

así como del tiempo empleado para la producción de las enzimas (Lee *et al.*, 1998; Nsereko *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002). En fermentación sólida utilizando rastrojo de maíz como sustrato, la cepa *Pleurotus ostreatus* IE8 presentó actividad fibrolítica (Ávila, 2005). La cepa *A. niger* AD96.4 se obtuvo por un proceso de recombinación parasexual entre cepas de *A. niger* productoras de enzimas como invertasas y pectinasas en fermentación sólida (Montiel-González *et al.*, 2002). Esta misma cepa fue probada en la producción de xilanasas, mostrando su capacidad para sobreproducir estas enzimas en comparación con las cepas originales (Loera y Córdova, 2003). La cepa de *Trametes* sp. EUM1 se aisló a partir de desechos ricos en lignocelulosa y tiene capacidad de producir lacasas termotolerantes (Márquez *et al.*, 2004, 2005).

Estas cepas podrían representar una alternativa para obtener extractos enzimáticos con el fin de ser utilizados como fuentes de enzimas fibrolíticas exógenas para su uso en alimentación de rumiantes. Sin embargo, sus actividades fibrolíticas aún no están definidas, por lo que se planteó el objetivo de caracterizar la actividad de las enzimas fibrolíticas producidas por los hongos *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *A. niger* AD96.4 en dos tiempos de fermentación en bagazo de caña.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Cepas de hongos**

Se utilizaron las cepas *Pleurotus ostreatus* IE8, perteneciente a la colección del Colegio de Postgraduados de México., así como las cepas *Trametes* sp. EUM1 y *A. niger* AD96.4 de la colección de hongos del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.

### **Inóculos y medio de fermentación**

Los inóculos de los hongos *Trametes* sp. EUM1 y *P. ostreatus* IE8 se sembraron en cajas de Petri, mientras que el inóculo de *A. niger* AD96.4 se sembró en matraces de 125 mL. El medio de crecimiento para todos los hongos fue agar extracto de malta y el tiempo de crecimiento fue 7 días. Para el proceso de fermentación sólida se colocaron 12 g de bagazo de caña seco en matraces de 250 mL. El tamaño de partícula del bagazo osciló entre 0.5 y 1 cm y se ajustó la humedad al 80%. Los matraces con el bagazo se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 1034.21 milibar durante 30 min. Cada matraz fue inoculado con cinco discos de micelio-agar (6 mm diámetro) de *Trametes* o *Pleurotus*, o con una solución que contenía  $2 \times 10^7$  esporas de *A. niger* por g de bagazo. El hongo *Trametes* se incubó a 34 °C, mientras que *Pleurotus* y *Aspergillus* fueron incubados a 30 °C, durante 14 y 19 d de fermentación.

### **Extracción de las enzimas**

Al tiempo definido de fermentación, se adicionó a cada matraz 30 mL de solución amortiguadora de citrato 50 mM, pH 5.3 y se agitaron durante 15 min. Se centrifugaron por 30 min a 12,000 g para separar el sobrenadante o extracto enzimático.

### **Determinación de la actividad enzimática y concentración de proteína**

La actividad de xilanasas y celulasas se midió aplicando el procedimiento de Loera y Córdova (2003), y la concentración de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS; Miller, 1959). Como sustratos, para la actividad de xilanasas se usó xilano de avena (Sigma X-0627) y para la de celulasas, carboximetilcelulosa sal de sodio (CMC, Medium viscosity Sigma, Sigma-Aldrich C4888) al 0.5%, que fueron disueltos a razón de 2.5 g en 500 mL de solución amortiguadora de citrato (50 mM y pH 5.3). La

mezcla de reacción se hizo con 0.9 mL de sustrato y 0.1 mL de extracto enzimático en un tubo de ensayo. Los tubos se incubaron 5 min a 50 °C para xilanasas, o 1 h para celulasas. A cada tubo de ensayo se añadió 1.5 mL de solución de DNS. Los tubos se colocaron en un baño maría de agua en ebullición, se dejaron hervir 5 min, se sacaron e inmediatamente se introdujeron en un recipiente con hielo para detener la reacción. Para cada muestra se preparó un blanco en el que el extracto enzimático se agregó después de aplicar el DNS, con el fin de corregir por azúcares presentes en el extracto enzimático. El blanco de reactivos consistió de 0.9 mL sustrato y 0.1 mL solución amortiguadora de citrato y se utilizó para ajustar la absorbancia. Para cada muestra y blancos correspondientes se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (DU640 Beckman) a 540 nm. La concentración de azúcares reductores se calculó mediante una ecuación de regresión, obtenida de una curva patrón con  $\beta$ -D-glucosa y D-xilosa (para glucosa y xilosa), que relaciona la absorbancia con la cantidad de azúcares presentes en la mezcla de reacción.

La actividad enzimática de xilanasas y celulasas se reportó en Unidades Internacionales (UI), la cual se definió como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de azúcares reductores (xilosa o glucosa) por minuto en las condiciones de la reacción. Para cada fermentación la actividad se expresó en UI por gramos de MS (UI g<sup>-1</sup> MS) y como actividad específica (UI mg<sup>-1</sup> proteína). La concentración de proteína se determinó con el método de Bradford (1976).

La actividad de lacasas fue determinada en la mezcla de reacción conteniendo 0.1 mL de solución amortiguadora de acetato (0.1 mM y pH 5.0), 0.7 mL de agua destilada y 0.1 mL de extracto enzimático. Esta mezcla se incubó 1 min a 40 °C y, se adicionó 0.1 mL del sustrato ABTS (ácido 2, 2' Azinobis (3-etilbenceno-tiazolino-6-sulfónico) 0.1 M, y se registró la absorbancia a 420 nm a 0, 1, 2, 3 y 5 min (Bourbonnais *et al.*, 1997). La

concentración de substrato oxidado (C, mol) se determinó con la ecuación  $C = A/\epsilon$ , donde A es la absorbancia y  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar del substrato ( $36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La unidad de actividad (UI) se definió como la cantidad de enzima que produce  $1 \mu\text{mol min}^{-1}$  de substrato oxidado en las condiciones de la reacción.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

El diseño del experimento fue un completamente aleatorizado con arreglo factorial (Steel y Torrie, 1986) y cuatro repeticiones por tratamiento. Los factores fueron la especie de hongo (3 especies) y el tiempo de fermentación (14 y 19 d). Los datos se analizaron mediante el procedimiento GLM del SAS (2001), los promedios se compararon por la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1986).

## **RESULTADOS**

La actividad de las enzimas y la concentración de proteína de los extractos de las tres cepas de hongos estudiadas se muestran en el Cuadro 2.1. No hubo interacción especie de hongo por tiempo de fermentación sobre la actividad de xilanasas. La especie *Trametes* sp. presentó una mayor ( $P \leq 0.01$ ) actividad de xilanasas que *P. ostreatus* IE8 y *A. niger* AD96.4, no detectándose diferencias entre estas últimas. Con respecto al tiempo de fermentación, la actividad de xilanasas a los 14 y 19 d no fue diferente para ninguna de las especies.

Se observó efecto ( $P \leq 0.01$ ) de la especie de hongo en la actividad de celulasas, pero no se detectó efecto alguno del tiempo de fermentación o de la interacción especie por tiempo de fermentación. *Trametes* sp. presentó la mayor actividad, mientras que el *P.*

*ostreatus* y *A. niger* mostraron niveles similares de actividad. La actividad de celulasas fue similar a los 14 y 19 d de fermentación.

Hubo interacción especie de hongo por tiempo de fermentación para actividad de lacasas ( $P \leq 0.01$ ). En ambos tiempos de fermentación, la mayor actividad de lacasas fue expresada por *P. ostreatus*, pero su actividad disminuyó ( $P \leq 0.01$ ) a los 19 d. En contraste *Trametes* sp. mostró una actividad de lacasas menor y ésta se mantuvo igual en ambos tiempos de fermentación. El *A. niger* AD96.4 presentó la menor actividad de lacasas, y cuando fue expresada como actividad específica disminuyó ( $P \leq 0.01$ ) a los 19 d de fermentación en comparación a los 14 d.

Se observó un efecto de la interacción especie de hongo por tiempo de fermentación ( $P \leq 0.01$ ) para la concentración de proteína. El extracto de *Trametes* sp. presentó mayor concentración promedio a los 14 d, mientras que en *P. ostreatus* fue similar en los dos tiempos y en el *A. niger* fue mayor a los 19 d de fermentación. La correlación entre la concentración de proteína y la actividad de xilanasas y celulasas fue mediana ( $R=0.57$ ;  $P \leq 0.01$ ), mientras que concentración de proteína no estuvo relacionada con la actividad de lacasas ( $R=0.40$ ;  $P > 0.05$ ).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Por su estructura compleja y heterogénea, la degradación de la fibra por hongos requiere de un complejo sistema enzimático, en el que las polisacaridasas (xilanasas y celulasas) actúen en conjunto con enzimas lignolíticas (Eichlerová *et al.*, 2000). En las tres especies utilizadas se detectó actividad de celulasas, xilanasas y lacasas, aún



cuando se observaron algunas diferencias entre ellas. La mayor actividad de xilanasas fue expresada por *Trametes* sp. EUM1, con niveles similares en los dos tiempos de fermentación. Los hongos del género *Trametes* sp. son productores de enzimas celulasas y lignolíticas (Grey *et al.*, 1998; Moldes *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2005). Algunas especies como *T. versicolor*, *T. trogii* y *T. gallica* son eficientes degradadores de celulosa, hemicelulosa y lignina, los tres principales componentes de la madera (Dumonceaux *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2002).

La xilanasas, más estudiadas en estos hongos han sido las endoxilanasas y  $\beta$ -xilosidasas (Polizeli *et al.*, 2005). En la especie *T. trogii*, Levin y Forchiassin (1998) observaron las máximas actividades de  $\beta$ -xilosidasas y endoxilanasas entre los días 13 y 15 de incubación en medio líquido, reportando niveles de actividad de 423.0 mU ml<sup>-1</sup> para endoxilanasas y de 38.57 mU mL<sup>-1</sup> para  $\beta$ -xilosidasas en cultivo con xilano de avena más celulosa cristalina, indicando que la producción de xilanasas fue eficientemente inducida por la celulosa y el xilano. Sun *et al.* (2004) reportaron que la especie *T. gallica* produce al menos dos tipos de enzimas con actividad de xilanasas de 33.3 UI mL<sup>-1</sup> cuando crece en paja de trigo durante 14 d.

El bagazo de caña puede favorecer la producción de muchas enzimas lignocelulolíticas incluyendo las xilanasas (Jain, 1995) puesto que contiene cantidades significativas de celulosa y hemicelulosa (Howard *et al.*, 2003), lo que posiblemente permitió que *Trametes* sp. expresara su actividad de xilanasas en el presente estudio.

En algunos productos comerciales utilizados para alimentación de rumiantes derivados de *Trichoderma* sp. y *A. niger* se han encontrado niveles de actividad de xilanasas de 153.0, 138, 130 y 198  $\mu\text{mol g}^{-1}$  enzima min<sup>-1</sup> (Nsereko *et al.*, 2000), y de 222.16, 134.77 y 229.31  $\mu\text{mol glucosa min}^{-1}$  mg<sup>-1</sup> proteína (Ramírez *et al.*, 2005).

La actividad de celulasas en *Trametes* sp. EUM1 fue superior a *P. ostreatus* IE8 y *A. niger* AD96.4, sin diferencias en los tiempos de fermentación. La degradación de la celulasa por hongos requiere un complejo celulolítico de al menos tres enzimas que actúan en forma sinérgica:  $\beta$ -1,4 endoglucanasa,  $\beta$ -1,4 exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa. Se ha estudiado la producción de enzimas celulolíticas en varias especies y cepas de *Trametes*, encontrándose que el *T. trogii* produce un sistema celulolítico complejo cuando crece en medio con celulosa (Levin y Forchiassin 1995; 1997), la cual se considera esencial para la inducción de la síntesis de celulasas (Yoshida *et al.*, 2002; Ludwing *et al.*, 2004).

Ludwing *et al.* (2004) reportaron niveles de actividad de celobiosa deshidrogenasa en 11 cepas de *Trametes* y se destacaron las cepas *T. pubescens* MB89 con  $2.10 \text{ U mL}^{-1}$  a los 13 d, *T. versicolor* MB52 con  $2.03 \text{ U mL}^{-1}$  a los 11 d, *T. hirsuta* MB50 con  $0.95 \text{ U mL}^{-1}$  a los 10 d y *T. villosa* CBS 334.49 con  $759 \text{ U L}^{-1}$  a los 13 d, en medio de crecimiento a base de celulosa.

El hongo *P. ostreatus* también es reconocido como productor de enzimas lignolíticas (Guillén-Navarro *et al.*, 1998; Eichlerová *et al.*, 2000), más que de celulasas y xilanasas. En el presente estudio la actividad de xilanasas y celulasas expresada por *P. ostreatus* IE8 fue superior a los reportados para la misma cepa por Ávila (2005), quien encontró la máxima actividad de xilanasas de  $0.195 \text{ UI g}^{-1} \text{ MS}$  y de celulasas de  $0.073 \text{ UI g}^{-1} \text{ MS}$  a los 12 días de fermentación en rastrojo de maíz. Ghosh *et al.* (2004) señalaron que la actividad de carboximetilcelulasa,  $\beta$ -glicosidasa y xilanasas alcanzaron su máximo a los 16 d de crecimiento de *P. ostreatus* en pseudotallo de banano ( $1.1$ ,  $0.09$  y  $1.1 \text{ U mL}^{-1}$ ). En las cepas P19 y F6 de *P. ostreatus* se encontró actividades de celulasas de  $11.4$  y  $10.14 \text{ U mg}^{-1} \text{ MS}$ , mientras que las de xilanasas fueron más altas:  $19.02$  y  $0.22 \text{ U mg}^{-1} \text{ MS}$  para P19 y F6 (Eichlerová *et al.*, 2000).

Las actividades de xilanasas y celulasas observadas en *A. niger* AD96.4 fueron menores con respecto a *Trametes* sp. EUM1 y a otros estudios con la misma especie. Se ha reportado que algunas especies de *Aspergillus* son eficientes productores de xilanasas (Pandey y Pandey, 2002; Wu *et al.*, 2005), y se utilizan para producir enzimas comerciales. La baja actividad observada en el presente estudio puede estar relacionada con la duración de la fermentación, ya que en algunos reportes se indica que la máxima actividad de xilanasas se expresa entre los 3 y 5 d (Deschamps y Huet, 1985; Lenartovicz *et al.*, 2002; Loera y Córdova, 2003). En la presente investigación esta actividad pudo decaer a los niveles observados a los 14 y 19 d de fermentación. Park *et al.* (2002) señalaron que el tiempo de cultivo y la concentración del medio fueron los factores que más influyeron en la actividad xilanásica de *A. niger* KK2, al encontrar valores entre 168 y 1177 UI g<sup>-1</sup>, con máximos niveles de actividad a los 5 d de fermentación en paja de arroz como medio de cultivo.

Las enzimas lacasas (fenol oxidasas) producidas por hongos participan en la degradación de lignina (Johannes y Majcherczyk, 2000) y el genero *Pleurotus* sp. produce una variedad de enzimas hidrolíticas y oxidativas (Bajpai, 1997; Mandel *et al.*, 2005). En este estudio el *P. ostreatus* IE8 presentó la mayor actividad de lacasas a los 14 d. En un estudio con la misma cepa, Ávila (2005) detectó la máxima actividad al día 8 de la fermentación (5.38 U g<sup>-1</sup> MS), la cual fue menor a la observada en este estudio. Mikiashvili *et al.* (2006) observaron que *P. ostreatus* 98 y *P. ostreatus* 108 expresaron sus máximas actividades de lacasas a los 5 y 8 d de cultivo, mientras que según Ghosh *et al.* (2004) el *P. ostreatus* expresó la máxima actividad (3.0 U mL<sup>-1</sup>) a los 24 d. Estos resultados sugieren que varios factores pueden afectar la actividad de las lacasas, como el tipo de cepa, el sustrato y el tiempo de fermentación.

La actividad de lacasas en varias especies de *Trametes* sp. se relaciona con las condiciones de cultivo y se destaca la fuente de carbonos, el pH del caldo de fermentación, la presencia de inductores y de materiales lignocelulósicos (Ardon *et al.*, 1998; Sethuraman *et al.*, 1999; Krishna Prasad *et al.*, 2005) y el tiempo de fermentación. De manera similar a lo obtenido en el presente estudio, Moldes *et al.* (2003) observaron que los niveles de lacasas aumentan durante el crecimiento del *T. hirsuta* alcanzando su máximo a los 15 d de crecimiento. En *T. trogii* (CTM 10156) Dhouib *et al.* (2005) encontraron la máxima actividad de lacasas (110 U mL<sup>-1</sup>) el día 15 en condiciones óptimas de cultivo, a diferencia de Machado *et al.* (2005) que reportan la máxima actividad de lacasas para *T. versicolor* (CCB202), *T. Villosa* (CCB165), *T. villosa* (CCB213) de 10.7, 12.5, 2.3 y 3.1 U L<sup>-1</sup> a los 7 días de crecimiento. En *A. niger* la actividad de lacasas fue significativamente muy baja.

En conclusión, se observó que el *Trametes* sp. EUM1 produjo mayor cantidad de xilanasas que *P. ostreatus* IE8 y *A. niger* AD94.6, con valores similares a los 14 y 19 d de fermentación, lo que permite considerar a esta especie de hongo con potencial para producir enzimas con posible aplicación comercial, particularmente como enzimas exógenas para la alimentación de rumiantes.

**AGRADECIMIENTOS:** Se agradece el apoyo del CONACYT (Proyecto J42782-Z) por el financiamiento parcial de la investigación.

## REFERENCIAS

- Ardon, O., Z. Kerem and Y. Hadar. 1998. Enhancement of lignin degradation and laccase activity in *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *Can. J. Microbiol.* 44:676-680.
- Ávila, H. 2005. Enzimas fibrolíticas de *Pleurotus ostreatus* y su actividad en rastrojo de maíz. (Tesis de Maestría). Colegio de Posgraduados de México. Montecillo, Edo. de México. 92 p.

- Bajpai, P. 1997. Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 43:141–194.
- Beauchemin, K.A., L.M. Rode and V.J. Sewalt. 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. *Can. J. Anim. Sci.* 75:641-644.
- Bourbonnais, R., M.G. Pice, B. Freiermuth, E. Bodie and S. Borneman. 1997. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4627-4632.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-252.
- Camarero, S., D. Ibarra, M.J. Martínez and A.T. Martínez. 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1775-1784.
- Castro A.L., P.C. De Aguiar Paiva, E. Souza Dias, J. Dos Santos. 2004. Avaliação das alterações bromatológicas e degradabilidade do resíduo de lixiviadora do algodão após tratamento biológico com *Pleurotus sajor-caju*. *Cienc. Agrotec. Lavras* 28:608-613.
- Dawson, K.A. and J.M. Tricarico. 1999. The use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance microbial activities in the rumen and the performance on ruminant animals. *In*: Lyons, TP Jacques KA (Eds.). *Biotechnology in the Feed Industry. Proc. 15<sup>th</sup> Ann. Symp.* Nottingham University Press. Loughborough, Leics, Ru. pp. 303-312.
- Deschamps, F. and M.C. Huet. 1985. Xylanase production in solid-state fermentation: a study of its property. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22:177-180.
- Dhouib, A., M. Hamza, H. Zouari, T. Mechichi, R. H'midi, M. Labat, M. Martínez, S. Sayadi. 2005. Autochthonous fungal strains with high ligninolytic activities from Tunisian biotopes. *African J. Biotechnol.* 4:431-436.
- Dumonceaux, T., K. Bartholomew, L. Valeanu, T. Charles, and A. Archibald. 2001. Cellobiose dehydrogenase is essential for wood invasion and nonessential for kraft pulp delignification by *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* 29:478-489.
- Eichlerová, I., K. Ruel, L. Homolka, J.-P. Joseleau and F. Nerud. 2000. Ligninolytic characteristics of *Pleurotus ostreatus* strain F6 and its monokariotic protoplast derivative P19. *Can. J. Microbiol.* 46:1153-1158.
- Fazaeli, H., A. Azizi, Z.A. Jelan and S.A. Mirhadi. 2003. Effect of fungal treatment on the chemical composition, *in vitro* digestibility and *in sacco* degradability of wheat straw. *Proc. Br. Soc. Anim. Sci.* 166 p.
- Grey, R., C. Hofer and D. Schlosser. 1998. Degradation of 2-chlorophenol and formation of 2-chloro 1,4-benzoquinona by mycelia and cell-free crude culture liquids of *Trametes versicolor* in relation to extracellular laccase activity. *J. Basic Microbiol.* 5-6:371-382.

- Ghosh, M., R. Mukherjee and B. Nandi. 2004. Production of extracellular enzymes by two *Pleurotus* species using banana pseudostem biomass. *Acta Biotechnologica*. 18:243-254.
- Guillén-Navarro, G.K., F. Márquez-Rocha y J.E. Sánchez Vázquez. 1998. Producción de biomasa y enzimas lignolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Rev. Iberoam. Micol.* 15:302-306.
- Howard, R.L., E. Abotsi, E.L. Jansen van Rensburg and S. Howard. 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African J. Biotechnol.* 2:602-619.
- Jain, A. 1995. Production of xylanase by thermophilic *Melanocarpus albomyces* PS-68. *Process Biochem.* 30:705–709.
- Johannes, C. and A. Majcherczyk. 2000. Laccase activity test and laccase inhibitor. *J. Biotechnol.* 78:193-199.
- Krishna Prasad, K., S. Venkata Mohan, R. Sreenivas Rao, B. Ranjan Pati and P.N. Sarma. 2005. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* 1804: Optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. *Biochem. Eng. J.* 24:17–26.
- Lee, B., A.L. Pometto, A. Demici and P.N. Hinz. 1998. Media evaluation for the production of microbial enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 46:4775-4778.
- Lenartovicz, V., C.G, Marques De Souza, F. Guillen Moreira and R.M Peralta. 2002. Temperature effect in the production of multiple xylanases by *Aspergillus fumigatus*. *J. Basic Microbiol.* 42:388-395.
- Levin, L. y F. Forchiassin. 1995. Influencia de fuentes carbonadas y nitrogenadas sobre la actividad celulolítica de *Trametes trogii*. *Rev. Arg. Microbiol.* 27:11-20.
- Levin, L. y F. Forchiassin. 1997. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de celulasas por *Trametes trogii*. *Rev. Arg. Microbiol.* 29:16-23.
- Levin, L. and F. Forchiassin. 1998. Influence of growth conditions on the production of xylanolytic enzymes by *Trametes trogii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14:443-446.
- Liu, J.X. and E.R. Orskov. 2000. Cellulase treatment of untreated and steam pre-treated rice straw effect on *in vitro* fermentation characteristics. *Anim Feed Sci. Technol.* 88:189-200.
- Loera, O. and J. Córdova. 2003. Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strains. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46:177–181.
- Ludwing, R., A. Salomón, J. Varga, M. Zamocky, C.K Peterauber, K.D. Kulbe and D. Haltrich. 2004. Characterization of cellobiose dehydrogenase from the white-rot fungi *Trametes pubescens* and *Trametes villosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:213-222.

- Machado, K.M., D.R. Matheus and V.L. Bononi. 2005. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical Brazilian basidiomycetes fungi. *Braz. J. Microbiol.* 36:246-252.
- Mandel, Q.A., A.A. Al-Laith and S.A. Mohamed. 2005. Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus spp.*) on various lignocellulosic wastes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21:601–607.
- Márquez. A.E., A. Arana, G. Viniegra-González and O. Loera. 2004. Identification of a thermotolerant fungal strain and inducing patterns of its laccases. 7<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics, Copenhagen, Denmark. p.194.
- Márquez, A.E., R. Torres, A. Arana, A. Téllez, G. Viniegra-González y O. Loera. 2005. Condiciones de producción de lacasas termoestables de *Trametes*. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Mérida, México. p.CVII1.
- Marzullo, L., R. Canio, P. Giardina, M.T. Sartini and G. Sania. 1995. Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevent polymerization of laccase-oxidized substrates. *J. Biol. Chem.* 270:3823-3827.
- Mikiashvili, N., S.P. Wasser, E. Nevo, V. Vladimir Elisashvili. 2006. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* Pg 1-4. URL. <http://dx.doi.org/DOI.10.1007/s11274-006-9132-6>.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-48.
- Moldes, D., P.P. Gallego, S. Rodriguez Couto and A. Sanrom. 2003. Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsute*. *Biotechnol. Lett.* 25: 491–495.
- Montiel-González, A.M., F.J. Fernández, G. Viniegra- González and O. Loera. 2002. Invertase production on solid state fermentation by *Aspergillus niger* strains improved by parasexual recombination. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102-103: 63-70.
- Nadeau, E.M., J.R. Rusell and D.R Buxton. 2000. Intake, digestibility and composition of orchardgrass and alfalfa silages treated with cellulase, inoculants, and formic acid fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 78:2980-2989.
- Nsereko, V.L., D.P. Morgavi, L.M. Rode, K.A. Beauchemin and T.A. McAllister. 2000. Effects of fungal preparation on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganism *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 88:153-170.
- Onsori, H., M. Raza Zamani, M. Motallebi and N. Zarghami. 2005. Identification of over producer strain of endo-1,4-glucanase in *Aspergillus Species*: Characterization of crude carboxymethyl cellulose. *African J. Biotechnol.* 4:26-30.
- Pandey, P. and A.K. Pandey. 2002. Production of cellulase-free thermostable xylanases by an isolated strain of *Aspergillus niger* PPI, utilizing various lignocellulosic wastes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18:281–283.

Park, Y.S., S.W. Kang, J.S. Lee, S.I. Hong and S.W. Kim. 2002. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58:762-766.

Polizeli, M.L., A.C. Rizzatti, R. Monti, H.F. Terenzi, J.A. Jorge and D.S. Amorin. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:577-591.

Ramírez, L., E. Aranda, G.D. Mendoza, L. Landois, L.A. Miranda y M.M. Crosby. 2005. Caracterización de productos fibrolíticos comerciales utilizados en la alimentación de rumiantes. *Vet. Mex.* 36:1-9.

Rodríguez, S., M. Fernández, R.C. Bermúdez and H. Horris. 2003. Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp. *Rev. Iberoam. Micol.* 20:164-168.

Sethuraman, A., D.E. Akin and K.L. Ericsson. 1999. Production of ligninolytic enzymes and synthetic lignin mineralization by the birds nest fungus *Cyathus stercoreus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:689-697.

SAS. 2001. SAS<sup>®</sup> Software, Version 8.2. SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA .CD

Steel, R.G. y H.J. Torrie. 1986. Bioestadística. Principios y Procedimientos. (2<sup>nd</sup> Ed.). McGraw-Hill Book Co., México. pp. 620.

Sun, X., S. Ren and R. Bi. 2002. Lignocelulose degradation of wheat straw by *Trametes gallica*. *J. Microbiol.* 22:24-26.

Sun, X., R. Zhang and Y. Zhang. 2004. Production of lignocellulolytic enzymes by *Trametes gallica* and detection of polysaccharide hydrolase and laccase activities in polyacrylamida gels. *J. Basic Microbiol.* 44:220-231.

Yoshida, M., T. Ohira, K. Igarashi, H. Nagasawa and M. Samejima. 2002. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding cellobiose dehydrogenase from the wood-rotting fungus *Grifola frondosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 217:225-230.

Villa-Cruz, V., G. Huerta-Palacios and J.E. Sánchez-Vázquez. 1999. Fermentation of a mixture of corn-cobs and coffee pulp for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Micol. Neotrop. Appl.* 12:67-74.

Wu, M., L. Shi Chang, Y. Jian Ming, P. Ren Rui and Y. Zeng Liang. 2005. Mutant of a xylanase-producing strain of *Aspergillus niger* in solid state fermentation by low energy ion implantation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21:1045–1049.



Cuadro 2.1. Efecto de la especie de hongo y del tiempo de fermentación sobre la actividad enzimática y concentración de proteína de los extractos enzimáticos

Concepto	Especies <sup>a</sup>						Efectos principales					EEM
	<i>Trametes sp.</i>		<i>P. ostreatus</i>		<i>A. niger</i>		Especie			Tiempo (d)		
	Tiempo (d)		Tiempo (d)		Tiempo (d)		<i>Trametes sp.</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>A. niger</i>	14	19	
	14	19	14	19	14	19						
Actividad enzimática												
Xilanasas												
UI g <sup>-1</sup> MS	147.27	137.63	27.41	18.96	18.69	27.20	141.7 <sup>g</sup>	23.79 <sup>h</sup>	22.95 <sup>h</sup>	60.75	68.91	7.46
UI mg <sup>-1</sup> proteína	1001.55	1145.89	255.28	165.71	331.78	315.71	1073.8 <sup>g</sup>	199.80 <sup>h</sup>	323.70 <sup>h</sup>	483.00	602.8	61.78
Celulasas												
UI g <sup>-1</sup> MS	8.51	9.56	0.96	1.16	0.93	0.95	9.04 <sup>g</sup>	1.06 <sup>h</sup>	0.94 <sup>h</sup>	3.46	4.15	0.32
UI mg <sup>-1</sup> proteína	57.60	80.72	7.89	10.00	16.60	11.56	69.16 <sup>g</sup>	8.79 <sup>h</sup>	14.44 <sup>h</sup>	27.36	38.75	3.02
Lacasas												
UI g <sup>-1</sup> MS	3.45 <sup>d</sup>	2.03 <sup>de</sup>	15.54 <sup>b</sup>	11.75 <sup>c</sup>	0.18 <sup>ef</sup>	0.03 <sup>e</sup>	3.07 <sup>h</sup>	13.90 <sup>g</sup>	0.087 <sup>i</sup>	6.37 <sup>j</sup>	5.0 <sup>k</sup>	0.18
UI mg <sup>-1</sup> proteína	22.71 <sup>d</sup>	17.25 <sup>d</sup>	128.75 <sup>b</sup>	102.88 <sup>c</sup>	3.46 <sup>d</sup>	0.40 <sup>f</sup>	22.87 <sup>h</sup>	110.67 <sup>g</sup>	1.37 <sup>i</sup>	51.26 <sup>j</sup>	38.67 <sup>k</sup>	1.75
Concentración de												
Proteína (mg g <sup>-1</sup> MS)	0.147 <sup>b</sup>	0.119 <sup>c</sup>	0.122 <sup>c</sup>	0.114 <sup>c</sup>	0.056 <sup>e</sup>	0.083 <sup>d</sup>	0.13 <sup>g</sup>	0.11 <sup>g</sup>	0.07 <sup>h</sup>	0.109	0.106	0.0003

<sup>a</sup> Cepas: *Trametes sp.* EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4

<sup>b,c,d,e,f</sup> Letras distintas en una hilera indican diferencias (efecto de la interacción especie por tiempo de fermentación, P≤0.01)

<sup>g,h,i</sup> Letras distintas en una hilera indican diferencias (efecto de especie, P≤0.01)

<sup>k,j</sup> Letras distintas en una hilera indican diferencias (efecto del tiempo de fermentación, P≤0.01)

EEM= error estándar de la media. UI= μmol de azúcares reductores por minuto. MS= materia seca

### CAPITULO III

## DETERMINACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE LAS ENZIMAS DE *Trametes sp.* EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y DE UN PRODUCTO FIBROLÍTICO COMERCIAL EN LÍQUIDO RUMINAL

### RESUMEN

Se determinó la degradación en líquido ruminal de las enzimas producidas por los hongos *Trametes sp.* EUM1, *P. ostreatus* IE8 y de las presentes en un producto comercial (Fibrozyme®, Alltech) mediante la medición del nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) liberado. Se realizó el análisis por separado para cada fuente de enzima y cada sustrato con un diseño de bloques al azar generalizado. Para cada enzima se analizó como un experimento factorial (3 x 2 x 2) con los factores: sustrato (xilano, carboximetilcelulosa (CMC) y sin sustrato), nivel de proteína de la enzima (1 o 2) y el tiempo de contacto de la enzima con el sustrato previo a la incubación (0 y 1 h). La concentración de N-NH<sub>3</sub> en el líquido ruminal con enzimas de *Trametes sp.*, *P. ostreatus* e incubadas con xilano o CMC, y Fibrozyme con xilano fueron menores ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a la enzima sin sustrato en todos los tiempos de incubación, mientras que en Fibrozyme con CMC la concentración de N-NH<sub>3</sub> sólo fue mayor que sin sustrato a las 3 h de incubación. Entre sustratos, la concentración de N-NH<sub>3</sub> fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) en la enzima de *Trametes sp.* sin sustrato que con xilano o con CMC, pero similar entre estos dos últimos a las 3 y 6 h; y a las 12 h se observaron diferencias entre los sustratos (sin sustrato > xilano > CMC). Con el nivel 1 de proteína hubo mayor ( $P \leq 0.05$ ) promedio de N-NH<sub>3</sub> que con el nivel 2. La interacción sustrato\*nivel de proteína fue significativa a las 6 y 12 h. Para la enzima de *P. ostreatus* la concentración de N-NH<sub>3</sub> fue diferente ( $P \leq 0.05$ ) entre sin sustrato, xilano y CMC a las 3 h, pero a las 6 y 12 h la menor concentración de N-NH<sub>3</sub> se obtuvo con xilano. Al nivel 1 de proteína de la enzima la concentración de N-NH<sub>3</sub> fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) que en el nivel 2 a las 3 y 12 h. La interacción sustrato\*nivel de proteína fue significativa a las 6 h de incubación. Con la enzima de Fibrozyme y xilano la concentración de N-NH<sub>3</sub> fue menor ( $P \leq 0.05$ ) que con CMC y sin sustrato en todos los tiempos de incubación, y no hubo efecto del nivel de proteína ni de las interacciones. El tiempo de contacto de la enzima con el sustrato no fue significativo en ninguna de las fuentes de enzimas estudiadas. En conclusión, debido a que se observaron menores concentraciones de N-NH<sub>3</sub> cuando se incubaron las enzimas con un sustrato, la degradación de las enzimas de *Trametes sp.* EUM1, *P. ostreatus* IE8 y Fibrozyme en líquido ruminal fue menor en presencia de un sustrato. Por tanto se considera al sustrato un factor importante en la estabilidad de las enzimas estudiadas.

**Palabras claves:** Degradación ruminal. Enzimas fibrolíticas. Hongos. Nitrógeno amoniacal. Sustrato.

Artículo enviado a la Revista: Archivos de Zootecnia

## ABSTRACT

The ruminal degradation of enzymes produced by fungi *Trametes* sp. EUM1 and *Pleurotus ostreatus* IE8, and enzymes derived from a commercial product (Fibrozyme®, Alltech) was estimated through the release of ammonia nitrogen (NH<sub>3</sub>-N). The effect of protein level (1 and 2) of the enzymatic extract and the time of enzyme-substrate contact before incubation with ruminal fluid (0 and 1 h of contact) for each enzyme source and each substrate were analyzed as a generalized block design. Each enzyme was analyzed as a factorial experiment (3 x 2 x 2), factors being: substrate (xylan, carboxymethylcellulose (CMC) and without substrate), protein level of enzyme (1 or 2) and time of contact (0 and 1 h). The NH<sub>3</sub>-N concentration in ruminal fluid with enzymes from *Trametes* sp., *P. ostreatus* incubated with xylan or CMC, and Fibrozyme with xylan were lower (P≤0.05) than enzyme without substrate in all incubation times, whereas in the case of Fibrozyme with CMC, the NH<sub>3</sub>-N concentration was greater than without substrate at 3 h of incubation. For the *Trametes* sp. enzymes without substrate, the NH<sub>3</sub>-N concentration was greater (P≤0.05) than with xylan or CMC, which were not different at 3 and 6 h; but at 12 h differences were among substrates (without substrate > xylan > CMC). The NH<sub>3</sub>-N concentration was greater (P≤0.05) at protein level 1 than level 2. The substrate by protein level interaction was significant at 6 and 12 h. For the enzymes from *P. ostreatus*, the NH<sub>3</sub>-N concentration was different (P≤0.05) with xylan, CMC and without substrate at 3 h, and at 6 and 12 h the lowest NH<sub>3</sub>-N concentration was with xylan and CMC. At level 1 of protein the NH<sub>3</sub>-N concentration was greater (P≤0.05) than in level 2 at 3 and 12 h of incubation. The substrate by protein level interaction was significant at 6 h incubation. Fibrozyme enzyme with xylan had lower (P≤0.05) NH<sub>3</sub>-N concentration than with CMC and without substrate in all incubation times and there was not effect of protein level neither the interactions. The time of contact enzyme-substrate effect was not significant for any of studied enzymes. In conclusion, since NH<sub>3</sub>-N concentration was lowest when enzymes were incubated with a substrate, degradation of enzymes from *Trametes* sp. EUM1, *P. ostreatus* IE8 and Fibrozyme in ruminal liquid was reduced in presence of a substrate. Therefore, the substrate is considered an important factor in the stability of the studied enzymes.

**Keywords:** Ruminal degradation. Fibrolytic enzymes. Fungus. Ammonia nitrogen Substrate.

## INTRODUCCIÓN

En diversos sistemas de producción con rumiantes, la base de la alimentación corresponde a los forrajes y una característica nutricional importante es la alta proporción de la pared celular, en la cual la celulosa, hemicelulosa y lignina están presentes en mayor proporción (Van Soest, 1982; Akin, 1986). Una estrategia para mejorar la utilización de los alimentos y, en particular, de materiales fibrosos es el uso de enzimas fibrolíticas exógenas para el tratamiento de forraje o incluidas como suplemento en la ración (Dawson y Tricarico, 1999).

Los principales efectos de las enzimas fibrolíticas exógenas (xilanasas y celulasas) se relacionan con la reducción de la cantidad de la fibra detergente neutro y de la fibra detergente ácido (Sheperd y Kung, 1996; Krause *et al.* (1998), el aumento en la digestibilidad de los forrajes (Krause *et al.*, 1998; Pinos-Rodríguez *et al.*, 2001), la mejoría en la ganancia de peso (Beauchemin *et al.*, 1995; 1997) y el aumento de la producción de leche (Rode *et al.*, 1999). La actividad de las enzimas puede estar influida por factores como la especie de forraje, el contenido de humedad del forraje o del alimento, el tiempo de contacto de la enzima con el material, la temperatura, la concentración de la enzima y el tiempo de incubación en el rumen (Beauchemin *et al.*, 1995; Pinos-Rodríguez *et al.*, 2001; 2002); por tanto, los efectos de las enzimas y la respuesta a su aplicación pueden variar.

La estabilidad de las enzimas en el rumen podría estar comprometida y ser degradadas por las proteasas microbianas. Sin embargo, las enzimas parecen ser relativamente estables en el rumen (Hristov *et al.*, 1998b; Morgavi *et al.*, 2001) y complementar la actividad fibrolítica microbiana ruminal o incluso incrementarla, debido posiblemente a un efecto sinérgico entre las enzimas microbianas y las enzimas

fibrolíticas exógenas (Morgavi *et al.*, 2000a). La formación del complejo enzima con el sustrato puede ser un factor que contribuya a la estabilidad de las enzimas en el líquido ruminal y el contacto previo aparentemente es importante para que se manifieste el efecto benéfico de la enzima (Fontes *et al.*, 1995; McAllister *et al.*, 1999). Al respecto, se ha sugerido que la aplicación de la enzima al alimento antes de la ingestión incrementa su resistencia a la proteólisis y prolonga su tiempo de permanencia en el rumen (Beauchemin *et al.*, 2003).

La importancia de que las enzimas permanezcan activas en el rumen radica en que aumenta la posibilidad de que puedan mejorar la digestión mediante la hidrólisis directa del alimento ingerido (McAllister *et al.*, 2001). Si son efectivas como modificadores de la fermentación ruminal, las enzimas deben ser resistentes a la proteólisis y permanecer en el rumen por un tiempo suficientemente largo para alterar la digestión (Morgavi *et al.*, 2000<sup>b</sup>).

Las especies de hongos *Trametes* sp. EUM1 y *P. ostreatus* IE8 producen enzimas fibrolíticas, las cuales se podrían utilizar en la alimentación de los rumiantes. Por ello se planteó como objetivo del presente estudio evaluar el efecto del sustrato, nivel de proteína y tiempo de contacto de la enzima con el sustrato sobre la degradación en líquido ruminal de las enzimas producidas por los hongos *Trametes* sp. EUM1 y *P. ostreatus* IE8 y de las presentes en un producto fibrolítico comercial.

## MATERIAL Y METODOS

### Preparación de las enzimas y procedimiento de incubación

Las enzimas de *Trametes* sp. EUM1 y *P. ostreatus* IE8 se obtuvieron en el laboratorio de Biología Celular de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (México, D.F) y se produjeron mediante un proceso de fermentación sólida en bagazo de caña de azúcar, durante 14 d a 34 y 30 °C. La extracción de las enzimas se realizó con solución amortiguadora de citrato, 50 Mmol, y a pH 5.3. Debido a que la concentración de proteína en los extractos fue baja, se procesó hasta obtener una concentración de proteína igual o mayor a 0.15 mg mL<sup>-1</sup>. Para obtener el extracto concentrado, se colocó el extracto líquido con las enzimas en membranas de celulosa sobre cama de sacarosa a 4 °C, durante aproximadamente 4 h, con recambio continuo de la sacarosa; luego se lavaron las membranas con agua destilada hasta retirar por completo la sacarosa. El producto comercial (Fibrozyme, Alltech) se preparó a razón de 1 g 100 mL<sup>-1</sup> de agua destilada. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976). Los niveles de proteína fueron diferentes en cada fuente de enzima (Cuadro 3.1) y las enzimas se aplicaron en forma líquida 1 y 2 mL para los niveles de proteína 1 y 2.

Se utilizaron como sustratos 50 mg de xilano de avena (Sigma-Aldrich X0627; Alemania) y de carboximetilcelulosa sal de sodio (CMC; Sigma-Aldrich C4888; Alemania). El medio de incubación estaba compuesto por 20 mL de líquido ruminal mezclado con saliva artificial de McDougall's (1:4 v/v). Los tiempos de incubación fueron 3, 6 y 12 horas, incubándose por triplicado y con los respectivos blancos (líquido ruminal, líquido ruminal más sustrato). El líquido ruminal fue recolectado de una vaca seca Holstein, de 650 kg de peso con cánula ruminal, la cual recibió una dieta con forraje de alfalfa (*Medicago sativa*) y pasto ovilla (*Dactylis glomerata*), la cual fue similar durante el periodo

de recolección. La recolección del líquido ruminal se realizó a las 08.00 h antes del suministro del alimento.

Al completar el tiempo de incubación, en cada tubo se adicionó 10 mL de solución de ácido benzoico (0.2%) en amortiguador de acetato 1 M y pH 5.0. Los tubos se enfriaron inmediatamente para detener la reacción. Del medio de incubación en cada tiempo se tomaron 5 mL, se centrifugaron 10 min a 10.000 G a 4 °C, se separó el sobrenadante y se conservaron las muestras a -20 °C. La concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) como indicador de la degradación de la proteína en el líquido ruminal se midió utilizando el método de Indofenol (McCulloug, 1967).

Los tratamientos (T) se definieron en función del nivel de proteína y del tiempo de contacto entre el sustrato y la enzima, quedando de la siguiente manera: T1: enzima con sustrato (nivel 1 proteína-0 h contacto); T2: enzima con sustrato (nivel 1 proteína-1 h de contacto); T3: enzima con sustrato (nivel 2 proteína-0 h contacto); T4: enzima con sustrato (nivel 2 proteína-1 h contacto); T5: enzima sin sustrato-nivel 1 proteína; T6: enzima sin sustrato -nivel 2 proteína.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

Se utilizó un diseño de bloques al azar generalizado, con la incubación como bloque (dos incubaciones por enzima). Los datos se analizaron por separado para cada fuente de enzima, y cada sustrato en cada fuente de enzima. La comparación de la concentración de N-NH<sub>3</sub> se realizó con los siguientes contrastes ortogonales (Steel y Torrie, 1986): 1= enzima con sustrato vs. enzima sin sustrato; 2= enzima con sustrato nivel 1 proteína (0 h vs. 1 h contacto); 3= enzima con sustrato nivel 2 proteína (0 h vs. 1 h contacto); 4= enzima con sustrato (nivel 1 proteína vs. nivel 2 proteína); 5= enzima sin sustrato (nivel 1 proteína vs. nivel 2 proteína).

Para detectar diferencias entre los sustratos (xilano, CMC y sin sustrato), niveles de proteína (1 y 2), tiempos de contacto (0 y 1 h) e interacciones, cada enzima se analizó como un experimento factorial (3x2x2). Los promedios de la concentración de N-NH<sub>3</sub> se compararon mediante la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1986). Para el análisis de los datos se utilizó el procedimiento GLM (SAS (2001)).

## RESULTADOS

### Degradación de las enzimas en líquido ruminal

#### Enzimas de *Trametes* sp. EUM1

La concentración de N-NH<sub>3</sub> en los tratamientos enzima con xilano fueron menores ( $P \leq 0.05$ ) a los de enzima sin sustrato a las 3, 6 y 12 h de incubación (Cuadro 3.2). En el nivel 1 de proteína de los tratamientos enzima con xilano, los niveles de N-NH<sub>3</sub> fueron similares entre 0 y 1 h de contacto en todos los tiempos de incubación. Lo mismo se observa en el nivel 2 de proteína. En el tratamiento enzima con xilano en el nivel 1 de proteína se observó mayor ( $P \leq 0.05$ ) concentración de N-NH<sub>3</sub> que en el nivel 2 en todos los tiempos de incubación. En el tratamiento enzima sin xilano, el promedio de N-NH<sub>3</sub> en el nivel 2 de proteína fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) que con el nivel 1 a las 3 horas, pero a las 6 y 12 h se observan mayores promedios en el nivel 1.

Al utilizar CMC como sustrato, la concentración de N-NH<sub>3</sub> fue menor ( $P \leq 0.05$ ) que en los tratamientos enzima sin sustrato en todos los tiempos de incubación (Cuadro 3.3). En el nivel 1 de proteína de los tratamientos enzima con CMC el promedio de N-NH<sub>3</sub> fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) con 1 h de contacto a las 12 h de incubación, y similar a las 3 y 6 h de incubación, y en el nivel 2 de proteína no hubo diferencias entre los tiempos de contacto.



Entre niveles de proteína de enzima con CMC se observaron mayores ( $P \leq 0.05$ ) concentraciones de N-NH<sub>3</sub> en el nivel 1 a las 3, 6 y 12 h. Similar respuesta ocurrió entre los niveles de proteína de enzima sin CMC a las 6 y 12 h de incubación.

Para la enzima de *Trametes* sp. EUM1 la concentración de N-NH<sub>3</sub> fue diferente ( $P \leq 0.05$ ) entre sustratos, niveles de proteína y se evidenció el efecto de la interacción sustrato\*nivel de proteína (Figura 3.1). En la enzima sin sustrato la concentración de N-NH<sub>3</sub> fue mayor que con xilano o CMC y similar entre estos dos últimos a las 3 y 6 h, pero a las 12 h fue diferente entre los sustratos (sin sustrato > xilano > CMC). Al aplicar la enzima con el mayor nivel de proteína (0.55 mg) se presentaron menores promedios de N-NH<sub>3</sub> con respecto al menor nivel (0.28 mg). Este efecto se mantuvo en todos los tiempos de incubación y disminuyó la concentración de N-NH<sub>3</sub> de las 3 a las 6 h en el mayor nivel de proteína. A las 12 h, en el mayor nivel de proteína, la concentración de N amoniacal fue casi la mitad de la observada en el menor nivel. La interacción sustrato\*proteína fue significativa a las 6 y 12 h. En todos los tiempos de incubación las menores concentraciones de N amoniacal se observaron en la enzima con xilano, CMC y sin sustrato en el nivel 2 de proteína. Los efectos del tiempo de contacto y del resto de interacciones fueron no significativos.

### **Enzimas de *Pleurotus ostreatus* IE8**

Al incubar la enzima con xilano como sustrato se presentaron menores ( $P \leq 0.05$ ) concentraciones de N-NH<sub>3</sub> a las 3, 6 y 12 h con respecto a la enzima sin sustrato (Cuadro 3.4). En la enzima con xilano hubo diferencias en la concentración de N-NH<sub>3</sub> entre el nivel 1 y 2 de proteína a las 3 y 12 h de incubación. Con el sustrato CMC sólo se presentó mayor concentración de N-NH<sub>3</sub> respecto a sin sustrato a las 3 h (Cuadro 3.5). Con CMC y enzima al mayor nivel de proteína (0.28 mg) con 0 h de contacto, la

concentración de  $\text{N-NH}_3$  fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) que con 1 h de contacto a las 12 h de incubación.

La concentración de  $\text{N-NH}_3$  fue diferente entre enzima con xilano, enzima con CMC y enzima sin sustrato a las 3 h, pero a las 6 y 12 h la concentración  $\text{N-NH}_3$  en la enzima con CMC y sin sustrato fueron similares entre ellos y mayores con respecto a enzima con xilano (Figura 3.2). Las diferencias en la concentración de  $\text{N-NH}_3$  entre el nivel 2 (0.28 mg) y el nivel 1 (0.14 mg) de proteína fueron significativas a las 3 y 12 h de incubación, siendo mayor al nivel 1 de proteína. Sólo la interacción sustrato\*nivel de proteína fue significativa a las 6 h de incubación; tanto en la enzima con CMC como en la enzima sin sustrato en el nivel 1 de proteína la concentración de  $\text{N-NH}_3$  fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) respecto al nivel 2, pero con xilano fue menor en el nivel 1. El tiempo de contacto y el resto de interacciones fueron no significantes.

### **Enzimas de Fibrozyme**

En el tratamiento enzima con xilano como sustrato se presentaron menores ( $P \leq 0.05$ ) concentraciones de  $\text{N-NH}_3$  a las 3, 6 y 12 h de incubación con respecto al tratamiento enzima sin sustrato (Cuadro 3.6). Al nivel 1 de proteína (0.19 mg) se observó mayor ( $P \leq 0.05$ ) concentración de N amoniacal con 0 h de contacto que con 1 h de contacto a las 3 h de incubación. Con CMC sólo hubo una mayor ( $P \leq 0.05$ ) concentración de  $\text{N-NH}_3$  que con la enzima sin sustrato a las 3 h de incubación (Cuadro 3.7). El resto de los contrastes no fueron significativos. Entre sustratos, la concentración de  $\text{N-NH}_3$  en enzima con xilano fue menor ( $P \leq 0.05$ ) que con enzima con CMC y enzima sin sustrato en todos los tiempos de incubación (Figura 3.3). No hubo efecto del nivel de proteína, del tiempo de contacto ni de las interacciones.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Un punto clave en la utilización de enzimas como aditivos en alimentos para rumiantes es su estabilidad en el rumen, ya que son proteínas susceptibles de degradación y hay efectos de factores externos como el pH, condiciones hidrotérmicas y metales pesados (Bedford *et al.*, 2001). Además, en el rumen hay proteasas de origen microbiano, que pueden actuar sobre las enzimas y afectar su estabilidad y actividad.

En el presente estudio se evaluaron tres factores relacionados con la estabilidad: la presencia de sustrato, la concentración de proteína y el tiempo de contacto de la enzima con el sustrato. En relación con la presencia de sustrato, la menor concentración de N amoniacal en el medio cuando se incluyó la enzima con sustrato, en comparación con la no inclusión de sustrato, indica que la presencia del sustrato favoreció una menor degradación o confirió mayor estabilidad a la enzima.

Las enzimas que componen los productos comerciales usados como aditivos para rumiantes presentan estabilidad en el rumen (Hristov *et al.*, 1998<sup>a,b</sup>; 2000). En parte, esa estabilidad se atribuye a la presencia de un sustrato, efecto asociado con la disminución de la sensibilidad de las enzimas (principalmente xilanasas) a la inactivación por proteasas (Fontes *et al.*, 1995). Hay una mejor adhesión enzima-sustrato, en particular cuando se aplica al alimento seco, lo que incrementa la resistencia de la enzima a la proteólisis y prolonga el tiempo de permanencia en el rumen (Beauchemin *et al.*, 1999; 2003). También ocurren cambios conformacionales debido a la unión de la enzima con el sustrato, que hacen a la enzima más resistente a la proteólisis (Kung *et al.*, 2000). Sin embargo, en este estudio el tiempo de contacto de la enzima con el sustrato no presentó efectos consistentes.

Aun cuando el análisis se hizo por separado para cada enzima, se observa que el tipo de sustrato puede ejercer efectos diferentes según el tipo de enzima. Esto se manifiesta cuando se analiza la concentración de N amoniacal en los tratamientos con enzimas de *Trametes* sp. EUM1, que fue mayor con xilano, contrario a la enzima de *P. ostreatus* IE8 y a la enzima comercial, en los cuales la mayor concentración de N amoniacal se obtuvo con el sustrato CMC.

En relación con el efecto de la concentración de proteína, el mayor nivel de proteína de las enzimas de *Trametes* sp. EUM1 y *P. ostreatus* IE8 produjo menor concentración de N-NH<sub>3</sub>, pero este efecto no se observó con la enzima comercial. Al respecto, Morgavi *et al.* (2001) indican que una elevada concentración de enzimas incrementa la estabilidad de las polisacaridasas (medida en términos de actividad residual de celulasas y xilanasas) ante las proteasas del rumen, con diferencias entre los productos enzimáticos evaluados, lo que se atribuye al origen y a la estructura de las proteínas.

La menor concentración de N amoniacal en el medio de incubación cuando se incluyó la enzima con sustrato, también puede ser el resultado de una mayor captación de nitrógeno por los microorganismos. Así, lo indican Hristov y Broderick (1994) observaron que la presencia de carbohidratos puede estimular la incorporación directa de aminoácidos en la proteína microbiana debido a que el crecimiento microbiano y la captación de amoniaco ocurren simultáneamente con la degradación de la proteína y la liberación de amoniaco, aun cuando la velocidad de captación es menor en presencia de carbohidratos de lenta degradación, como los utilizados en el presente estudio.

En general se observa que las diferencias en la concentración de nitrógeno amoniacal son más acentuadas a las 12 h, lo cual puede indicar que la mayor degradación de las enzimas ocurre después de las 6 h de incubación. La estabilidad de

las enzimas de productos comerciales se ha evaluado midiendo la actividad enzimática residual en el medio de incubación (Morgavi *et al.*, 2000<sup>b</sup>; Morgavi *et al.*, 2001; van de Vyver *et al.*, 2004). A pesar de las condiciones experimentales diferentes, estos resultados indican que las enzimas pueden permanecer activas o estables hasta por lo menos 6 h de incubación con líquido ruminal. Ramírez Cancino *et al.* (2005) encontraron que la concentración de N-NH<sub>3</sub> se mantuvo constante hasta las 12 horas cuando se incubó Fibrozyme® con líquido ruminal.

De acuerdo con los resultados del presente estudio se concluye que debido a que se observaron menores concentraciones de N-NH<sub>3</sub> cuando se incubaron las enzimas con un sustrato, la degradación de las enzimas de *Trametes* sp. EUM1, *P. ostreatus* IE8 y Fibrozyme en líquido ruminal fue menor en presencia de un sustrato. Por tanto se considera al sustrato un factor importante en la estabilidad de las enzimas estudiadas. Asimismo, los efectos fueron variables entre sustratos y tipos de enzima.

## REFERENCIAS

Akin, D.E. 1986. Chemical and biological structure in plants related to microbial degradation of forage cell walls. *In*: Milligan, L.P., W.L. Gicovun and D. Dobson, editors. Control of Digestion and Metabolism in Ruminants. Prentice-Hall Englewood Cliff. New Jersey. pp. 139-157.

Bedford, M.R., F.G. Silversides and W.D. Cowan. 2001. Process stability and methods of detection of feed enzymes in complete diets. *In*: Bedford M.R. and G.G. Partridge, editors. Enzymes in Farm Animal Nutrition. CAB International. pp. 337-387.

Beauchemin, K.A., L.M. Rode and V.J. Sewalt. 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. *Can. J. Anim. Sci.* 75:641-644.

Beauchemin, K.A., S.D. Jones, L.M. Rode and V.J. Sewalt. 1997. Effects of fibrolytic enzymes in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. *Can. Anim. Sci.* 77:645- 653.

- Beauchemin, K.A., W.Z. Yang and L.M. Rode. 1999. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:378-390.
- Beauchemin, K.A., D. Colombatto, D.P. Morgavi and W.Z. Yang. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81 (E. Suppl. 2):E37-E47.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-252.
- Dawson, K.A. and J.M. Tricarico. 1999. The use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance microbial activities in the rumen and the performance on ruminant animals. *In: Lyons, T.P. and K.A. Jacques, editors. Biotechnology in the Feed Industry. Proc. 15<sup>th</sup> Ann. Symp. Nottingham University Press.* pp. 303-312.
- Fontes, C.M., J. Hall., B.H. Hirst, G.P. Hazlewood and H.J. Gilbert. 1995. The resistance of cellulases and xylanases to proteolytic inactivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:52-57.
- Hristov, A.N. and G.A. Broderick. 1994. *In vitro* determination of ruminal protein degradability using <sup>15</sup>N ammonia to correct from microbial nitrogen uptake. *J. Anim.Sci.* 72:1344-354.
- Hristov, A.N., T.A. McAllister and K-J. Cheng. 1998a. Stability of exogenous polysaccharide-degrading enzymes in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 76:161-168.
- Hristov, A.N., T.A. McAllister and K-J. Cheng. 1998b. Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharide-degrading enzymes on rumen fermentation and nutrient digestibility. *J. Anim. Sci.* 76:3146-3156.
- Hristov, A.N., T.A. McAllister and K-J. Cheng. 2000. Intraruminal supplementation with increasing of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: Effects on nutrient digestion in cattle fed a barley grain diet. *J. Anim. Sci.* 78:477-487.
- Krause, M., K.A. Beauchemin, L.M. Rode, B.I. Farr and P. Norgaard. 1998. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets to growing cattle. *J. Anim. Sci.* 76:2912-2929.
- Kung, L., R.J. Treacher, G.A. Nauman, A.M. Smagala, K.M. Endres and M.A. Cohen. 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. 83:115-122.
- McAllister, T.A., S.J. Oosting, J.D. Popp, Z. Mir, L.J. Yake, A.N. Hristov, R.J. Treacher and K.J. Cheng. 1999. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 79:353-360.
- McAllister, T.A., A.N. Hristov, K.A. Beauchemin, L.M. Rode and K.-J.Cheng. 2001. Enzymes in ruminant diets. *In: Bedford, M.R. and C.G. Patridge, editors. Enzymes in Farm Animal Nutrition. CAB, International.* pp. 273-298.

- McCoulloug, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin. Chem. Acta.* 17:297-304.
- Morgavi, D.P., K.A. Beauchemin, V.L. Nsereko, L.M. Rode., A.D. Iwaasa, W.Z. Yang, T.A. McAllister and Y. Wang. 2000a. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Dairy Sci.* 83:1310-1321.
- Morgavi, D.P., C.J. Newbold, D.E. Beever and R.J. Wallace. 2000b. Stability and stabilization of potential feed additive enzymes in rumen fluid. *Enz. Microb. Technol.* 26:171-177.
- Morgavi, D.P., K.A. Beauchemin, V.L. Nsereko, L. Rode, T.A. McAllister, A.D. Iwaasa, Y. Wang and W.Z. Yang. 2001. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganism and gastrointestinal proteases. *J. Anim. Sci.* 79:1621-1630.
- Pinos-Rodríguez, J. M., S.S. González Muñoz, G. Mendoza Martínez, R. Barcena Gama y M. Cobos Peralta. 2001. Efecto de enzimas fibrolíticas glucosiladas en la digestibilidad *in vitro* de MS y MO de alfalfa (*Medicago sativa*) y ballico (*Lolium perenne*). *Rev. Cient. FCV-LUZ.* XI:505-509.
- Pinos-Rodríguez, J.M., S.S. González, G.D. Mendoza, R. Bárcena, M.A. Cobos, A. Hernández and M. E. Ortega. 2002. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 80:3016-3020.
- Ramírez Cancino, L., E. Aranda Ibañez, G.D. Mendoza Martínez, L. Landois Palencia, L.A. Miranda Romero y M.M. Crosby Galvan. 2005. Caracterización de productos fibrolíticos comerciales utilizados en la alimentación de rumiantes. *Vet. Méx.* 36:1-9.
- Rode, L.M., W.Z. Yang and K.A. Beauchemin. 1999. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 82:2121-2126.
- SAS. 2001. SAS<sup>®</sup> Software, Version 8.2. SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA. CD.
- Sheperd, A.C. and L. Kung. 1996. Effects of an enzyme additive on composition of corn silage ensiled at various stages of maturity. *J. Dairy Sci.* 79:1767-1773.
- Steel, R.G. y J.H. Torrie. 1986. Bioestadística. Principios y Procedimientos. (2<sup>nd</sup> Ed.). McGraw-Hill Book Co., México. pp. 620.
- van de Vyver, W.F.J., K.A. Dawson, N.H. Casey and J.M. Tricarico. 2004. Effect of glycosylation on the stability of fungal xylanase exposed to proteases or rumen fluid *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 116:259-269.
- Van Soest, P.J. 1982. Nutritional Ecology of Ruminant. (1<sup>nd</sup> Ed.) Cornell University Press. Ithaca, NY. 374 p.

Cuadro 3.1. Niveles de proteína de las fuentes de enzimas en los tratamientos

Fuentes de enzima	Proteína (mg)	
	Nivel 1	Nivel 2
<i>Trametes</i> sp. EUM1	0.28	0.56
<i>P. ostreatus</i> IE8	0.14	0.28
Fibrozyme	0.19	0.38

Cuadro 3.2. Contrastes ortogonales para la concentración de nitrógeno amoniacal ( $\text{mg dL}^{-1}$ ) en líquido ruminal con enzima de *Trametes* sp. EUM1 incubada con xilano

Contrastes	Tiempo de incubación (h)		
	3	6	12
1 Enzimas con sustrato	3.24 *	4.03 *	5.64*
Enzimas sin sustrato	5.16	4.43	7.09
2 Enzima con sustrato-nivel 1 proteína			
0 h contacto	4.33 <sup>NS</sup>	5.62 <sup>NS</sup>	7.34 <sup>NS</sup>
1 h contacto	4.48	5.75	7.51
3 Enzima con sustrato-nivel 2 proteína			
0 h contacto	2.06 <sup>NS</sup>	2.50 <sup>NS</sup>	3.88 <sup>NS</sup>
1 h contacto	2.10	2.25	3.84
4 Enzima con sustrato			
Nivel 1 de proteína	4.41*	5.69*	7.44*
Nivel 2 de proteína	2.08	4.40	7.09
5 Enzima sin sustrato			
Nivel 1 de proteína	4.80*	6.55*	9.50*
Nivel 2 de proteína	5.52	2.21	4.68
EEM	0.15	0.15	0.55

\*  $P \leq 0.05$ ; NS: no significativo

EEM= Error estándar de la media.



Cuadro 3.3. Contrastes ortogonales para la concentración de nitrógeno amoniacal (mg dL<sup>-1</sup>) en líquido ruminal con enzima de *Trametes sp.* EUM1 incubada con carboximetilcelulosa

Contrastes	Tiempo de incubación (h)		
	3	6	12
1 Enzimas con sustrato	3.82 *	3.11 *	4.13 <sup>NS</sup>
Enzimas sin sustrato	5.16	4.43	7.09
2 Enzima con sustrato-nivel 1 proteína			
0 h contacto	2.86 <sup>NS</sup>	3.89 <sup>NS</sup>	4.34*
1 h contacto	3.30	4.23	5.72
3 Enzima con sustrato-nivel 2 proteína			
0 h contacto	2.13 <sup>NS</sup>	2.19 <sup>NS</sup>	3.18 <sup>NS</sup>
1 h contacto	2.18	2.15	3.30
4 Enzima con sustrato			
Nivel 1 de proteína	3.08 *	4.06*	5.03*
Nivel 2 de proteína	2.15	2.17	3.24
5 Enzima sin sustrato			
Nivel 1 de proteína	4.80 <sup>NS</sup>	6.55*	9.50*
Nivel 2 de proteína	5.52	2.21	4.68
EEM	0.22	0.18	0.58

\*P ≤ 0.05; NS: no significativo

EEM= Error estándar de la media.

Cuadro 3.4. Contrastes ortogonales para la concentración de nitrógeno amoniacal (mg dL<sup>-1</sup>) en líquido ruminal con enzima de *P. ostreatus* IE8 incubada con xilano

Contrastes	Tiempo de incubación (h)		
	3	6	12
1 Enzimas con sustrato	7.18 *	7.69 *	7.64 *
Enzimas sin sustrato	8.62	10.21	10.26
2 Enzima con sustrato-nivel 1 proteína			
0 h contacto	7.25 <sup>NS</sup>	7.29 <sup>NS</sup>	8.08 <sup>NS</sup>
1 h contacto	7.95	7.32	8.09
3 Enzima con sustrato-nivel 2 proteína			
0 h contacto	6.58 <sup>NS</sup>	8.50 <sup>NS</sup>	7.21 <sup>NS</sup>
1 h contacto	6.95	7.67	7.18
4 Enzima con sustrato			
Nivel 1 de proteína	7.60 *	7.31 <sup>NS</sup>	8.08*
Nivel 2 de proteína	6.76	8.08	7.19
5 Enzima sin sustrato			
Nivel 1 de proteína	8.98 <sup>NS</sup>	10.23 <sup>NS</sup>	10.87 <sup>NS</sup>
Nivel 2 de proteína	8.27	10.19	9.65
EEM	0.35	0.38	0.43

\*P≤ 0.05; NS: no significativo

EEM= Error estándar de la media.

Cuadro 3.5. Contrastes ortogonales para la concentración de nitrógeno amoniacal (mg dL<sup>-1</sup>) en líquido ruminal con enzima de *P. ostreatus* IE8 incubada con carboximetilcelulosa

Contrastes	Tiempo de incubación (h)		
	3	6	12
1 Enzimas con sustrato	9.72*	9.91 <sup>NS</sup>	10.33 <sup>NS</sup>
Enzimas sin sustrato	8.62	10.21	10.26
2 Enzima con sustrato-nivel 1 proteína			
0 h contacto	10.57 <sup>NS</sup>	10.66 <sup>NS</sup>	10.11 <sup>NS</sup>
1 h contacto	10.33	10.26	10.77
3 Enzima con sustrato-nivel 2 proteína			
0 h contacto	8.72 <sup>NS</sup>	9.73 <sup>NS</sup>	11.11*
1 h contacto	9.78	8.99	9.34
4 Enzima con sustrato			
Nivel 1 de proteína	10.45 <sup>NS</sup>	10.46 <sup>NS</sup>	10.44 <sup>NS</sup>
Nivel 2 de proteína	9.25	9.36	10.22
5 Enzima sin sustrato			
Nivel 1 de proteína	8.98 <sup>NS</sup>	10.23 <sup>NS</sup>	10.87 <sup>NS</sup>
Nivel 2 de proteína	8.27	10.19	9.66
EEM	0.46	0.34	0.49

\*P ≤ 0.05; NS: no significativo

EEM= Error estándar de la media.

Cuadro 3.6. Contrastes ortogonales para la concentración de nitrógeno amoniacal (mg dL<sup>-1</sup>) en líquido ruminal con enzimas de un producto fibrolítico comercial (Fibrozyme®) incubado con xilano.

Contrastes	Tiempo de incubación (h)		
	3	6	12
1 Enzimas con sustrato	1.16 *	1.55 *	4.25 *
Enzimas sin sustrato	2.74	4.51	6.92
2 Enzima con sustrato-nivel 1 proteína			
0 h contacto	1.42 *	1.66 <sup>NS</sup>	4.03 <sup>NS</sup>
1 h contacto	1.03	1.55	4.00
3 Enzima con sustrato-nivel 2 proteína			
0 h contacto	1.20 <sup>NS</sup>	1.50 <sup>NS</sup>	3.85 <sup>NS</sup>
1 h contacto	0.97	1.49	5.10
4 Enzima con sustrato			
Nivel 1 de proteína	1.23 <sup>NS</sup>	1.61 <sup>NS</sup>	4.03 <sup>NS</sup>
Nivel 2 de proteína	1.08	1.50	4.28
5 Enzima sin sustrato			
Nivel 1 de proteína	2.83 <sup>NS</sup>	4.49 <sup>NS</sup>	6.46 <sup>NS</sup>
Nivel 2 de proteína	2.65	4.53	7.38
EEM	0.10	0.18	0.43

\*P≤ 0.05; NS: no significativo

EEM= Error estándar de la media.

Cuadro 3.7. Contrastes ortogonales para la concentración de nitrógeno amoniacal (mg dL<sup>-1</sup>) en líquido ruminal con enzimas de un producto fibrolítico comercial (Fibrozyme®,) incubado con carboximetilcelulosa

Contrastes	Tiempo de incubación (h)		
	3	6	12
1 Enzimas con sustrato	3.02 *	4.48 <sup>NS</sup>	6.34 <sup>NS</sup>
Enzimas sin sustrato	2.74	4.51	6.91
2 Enzima con sustrato-nivel 1 proteína			
0 h contacto	3.37 <sup>NS</sup>	4.82 <sup>NS</sup>	6.26 <sup>NS</sup>
1 h contacto	2.99	4.44	7.04
3 Enzima con sustrato-nivel 2 proteína			
0 h contacto	2.70 <sup>NS</sup>	4.19 <sup>NS</sup>	6.11 <sup>NS</sup>
1 h contacto	3.02	4.47	5.94
4 Enzima con sustrato			
Nivel 1 de proteína	3.18 <sup>NS</sup>	4.63 <sup>NS</sup>	6.65 <sup>NS</sup>
Nivel 2 de proteína	2.86	4.33	6.03
5 Enzima sin sustrato			
Nivel 1 de proteína	2.83 <sup>NS</sup>	4.49 <sup>NS</sup>	6.45 <sup>NS</sup>
Nivel 2 de proteína	2.65	4.53	7.38
EEM	0.20	0.21	0.26

\*P≤ 0.05; NS: no significativo

EEM= Error estándar de la media.

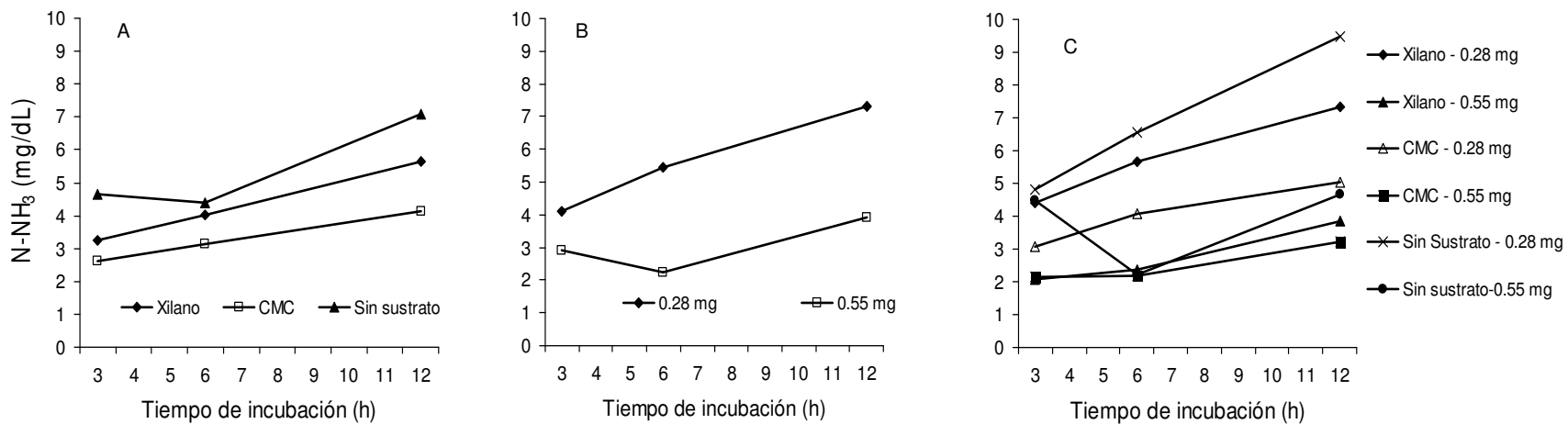


Figura 3.1. Concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) en líquido ruminal con enzimas de *Trametes* sp. EUM1: A: efecto del sustrato ( $P \leq 0.05$ ); B: efecto del nivel de proteína de la enzima ( $P \leq 0.05$ ); C: efecto de la interacción sustrato\*proteína ( $P \leq 0.05$ , a 6 y 12 h).

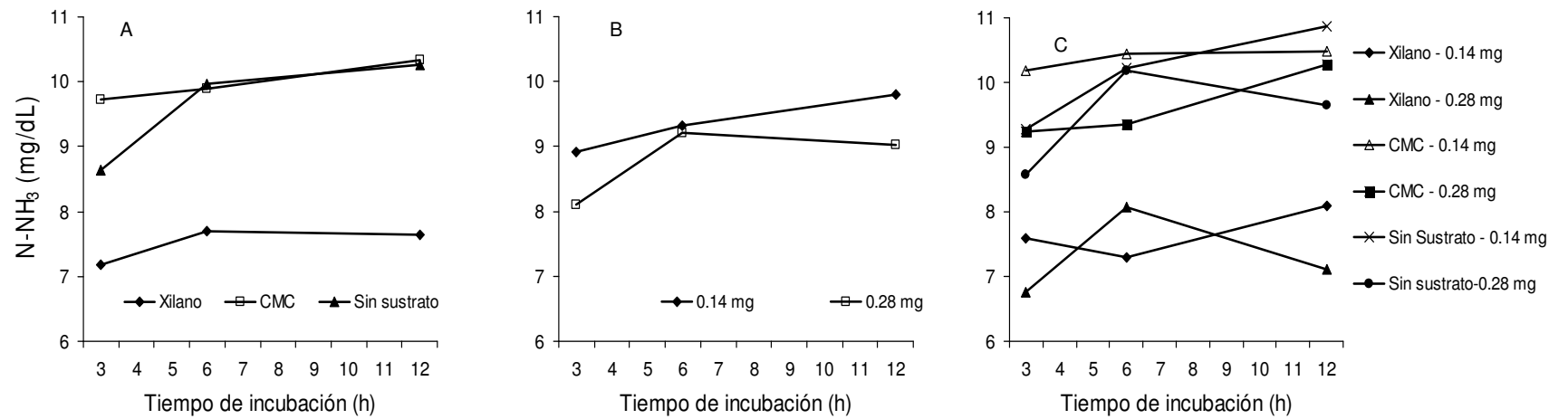


Figura 3.2. Concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) en líquido ruminal con enzimas de *P. ostreatus* IE8: A: efecto del sustrato (P≤0.05); B: efecto del nivel de proteína de la enzima (P≤0.05, a 3 y 12 h); C: efecto de la interacción sustrato\*proteína (P≤0.05, a 6 h)

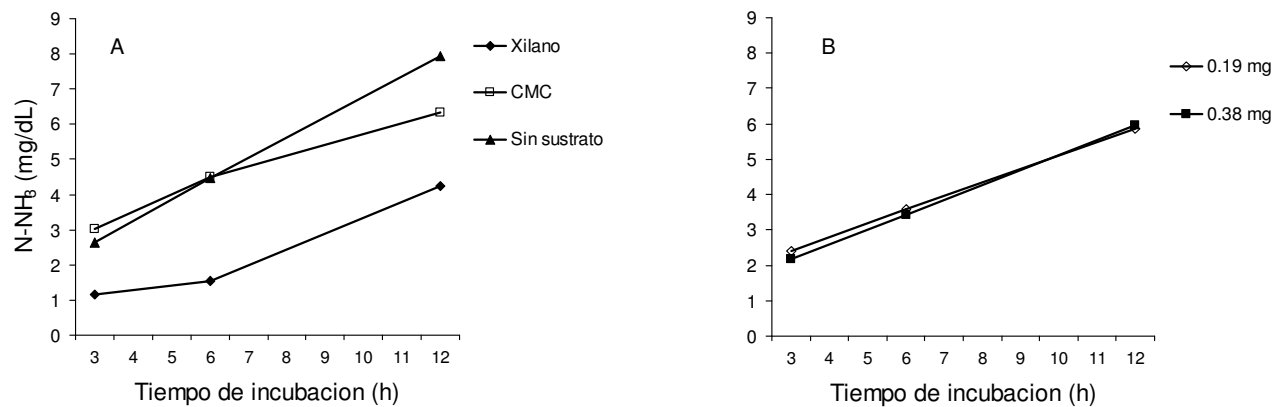


Figura 3.3. Concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) en líquido ruminal con enzimas de un producto fibrolítico comercial (Fibrozyme®): A: efecto del sustrato (P≤0.05), B: efecto del nivel de proteína de la enzima (no significativo).



## CAPITULO IV

### EFFECTO DE LAS ENZIMAS DE UN PRODUCTO FIBROLÍTICO COMERCIAL Y DEL pH INICIAL DEL LÍQUIDO RUMINAL SOBRE LA DEGRADACIÓN DE LA FIBRA DETERGENTE NEUTRO DE HENO DE ALFALFA (*Medicago sativa*) Y PASTO OVILLO (*Dactylis glomerata*)

#### RESUMEN

Se estudió el efecto de las enzimas fibrolíticas (Fibrozyme®, Alltech) y del pH inicial (pHi) del medio de incubación sobre la degradación de la fibra detergente neutro (DFDN), tasa de degradación (*kd*), fase lag y fracción FDN indigestible (FDNi) de heno de alfalfa (*Medicago sativa*) y pasto ovillo (*Dactylis glomerata*) en líquido ruminal. El diseño experimental fue de bloques al azar generalizado con arreglo factorial (2x3). Los factores fueron la enzima: con enzima (CENZ) y sin enzima (SENZ) y el pH inicial (5.6, 6.2 y 6.8). La DFDN del heno de alfalfa fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) en CENZ. El efecto del pHi sobre la DFDN fue lineal ( $P \leq 0.05$ ) a las 3, 9 y 12 h y cuadrático a las 24, 48 y 72 h de incubación. La interacción enzima por pHi tuvo efecto ( $P \leq 0.05$ ) sobre la DFDN a partir de las 6 h. La *kd* fue similar entre CENZ y SENZ. En SENZ se observó la mayor ( $P \leq 0.05$ ) fase lag y la mayor ( $P \leq 0.05$ ) FDNi. El pHi tuvo efectos cuadráticos ( $P \leq 0.05$ ) sobre la *kd* y la fase lag, con mayores promedios a pHi 6.2. El pHi no tuvo efecto significativo sobre la FDNi. La interacción enzima por pHi fue significativa para *kd*, fase lag y FDNi. Se encontró la mayor *kd* en SENZ a pHi 6.2, y la menor en SENZ a pHi 5.6. La mayor ( $P \leq 0.05$ ) fase lag correspondió a SENZ a pHi 6.2. El mayor promedio ( $P \leq 0.05$ ) de la FDNi se obtuvo en SENZ a pHi 5.6. En el pasto ovillo, la DFDN fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) en CENZ a las 24 y 48 h de incubación. El efecto ( $P \leq 0.05$ ) del pHi sobre la DFDN del pasto ovillo sólo se observó a las 3 h de incubación. El efecto de la interacción enzima por pHi sobre la DFDN no fue significativo en ninguno de los tiempos de incubación. La *kd*, la fase lag y FDNi fueron similares entre CENZ y SENZ y en los diferentes pHi. Se concluye que la aplicación de Fibrozyme mejoró la degradación de la FDN de la alfalfa de las 6 a las 72 h de incubación, con el mayor incremento a pHi de 6.8. En el pasto ovillo la degradación de la FDN fue mayor en los tratados con enzima a las 24 y 48 h de incubación. La enzima y el pH inicial del líquido ruminal modificaron las variables de la cinética de degradación de la FDN del heno de alfalfa, pero no las de la degradación de la FDN del pasto ovillo.

**Palabras claves:** Cinética. Enzimas fibrolíticas. FDN degradación. pH. Líquido ruminal.

## ABSTRACT

The effect of fibrolytic enzymes (Fibrozyme®, Alltech) and initial pH (pHi) on the degradation of neutral detergent fiber (DNDF), rate of degradation (*kd*), lag time and indigestible NDF (NDFi) of alfalfa hay (*Medicago sativa*) and orchardgrass (*Dactylis glomerata*) in ruminal fluid was studied. A generalized blocks design was used with a 2 x 3 factorial arrangement of treatments. The factors were the enzyme: with enzyme (ENZ) and without enzyme (NENZ) and pHi (5.6, 6.2 and 6.8). The DNDF of alfalfa hay was greater ( $P < 0.05$ ) in ENZ than NENZ. The pHi effect on DNDF was linear ( $P \leq 0.05$ ) at 3, 9 and 12 h and quadratic at 24, 48 and 72 h of incubation. The enzyme by pHi interaction was significant ( $P \leq 0.05$ ) at 6 h of incubation. The *kd* was similar between ENZ and NENZ. The greatest ( $P \leq 0.05$ ) lag time and NDFi was observed in ENZ. A quadratic effect ( $P \leq 0.05$ ) of pHi on *kd* and lag time was observed, with the greatest *kd* and lag time at pHi 6.2. The pHi effect on NDFi was not significant. The enzyme by pHi interaction was significant for *kd*, lag time and NDFi. The greatest *kd* was observed in NENZ at pHi 6.2, and the lowest in NENZ at pHi 5.6. The greatest ( $P \leq 0.05$ ) lag time corresponded to NENZ at pHi 6.2. The greatest average ( $P \leq 0.05$ ) of NDFi was obtained in NENZ at pHi 5.6. The DNDF of orchardgrass was greater ( $P \leq 0.05$ ) in ENZ than NENZ at 24 and 48 h of incubation. The pHi effect ( $P \leq 0.05$ ) on DNDF was only observed at 3 h of incubation. The orchardgrass DNDF degradation was not affected by the interaction. The *kd*, lag time and FDNi were similar between ENZ and NENZ, and at the different pHi. In conclusion, enzyme increased the degradation of alfalfa hay NDF from 6 to 72 h of incubation, with the greatest increase at pHi 6.8. The degradation of orchardgrass NDF was greatest with enzyme at 24 and 48 h of incubation. The application of enzymes and ruminal fluid with different initial pH, modified the kinetic variables in alfalfa hay NDF but not in orchardgrass.

**Key words:** Kinetics, Fibrolytic enzyme. NDF degradation. pH. Ruminal liquid.

## INTRODUCCIÓN

Los forrajes representan la principal fuente de nutrientes para los rumiantes. La degradación de la fibra en el rumen es realizada por complejos enzimáticos microbianos; sin embargo, ésta puede ser baja e incompleta y limitar el valor nutritivo de los forrajes. La aplicación de alguna estrategia que incremente la desaparición de la fibra en el rumen puede conducir a mejorar las variables productivas (Oba y Allen, 1999).

Las enzimas fibrolíticas obtenidas de hongos aeróbicos potencian la digestión de los alimentos (Morgavi *et al.*, 2004), debido a su capacidad para hidrolizar los carbohidratos de la pared celular y aumentar su disponibilidad (Beauchemin *et al.*, 2004). Estudios *in vitro* e *in vivo* con enzimas fibrolíticas indican que se mejora la degradación de la fibra (Caton *et al.*, 1993; Beauchemin *et al.* 1995). Aunque Yoon y Stern (1996) señalan que la aplicación o la suplementación con enzimas fibrolíticas tiene poco efecto en la fermentación ruminal y en el aporte de nutrientes al intestino. La digestión verdadera de la materia orgánica (MO), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) no fue alterada por la aplicación de enzimas fibrolíticas (Bouattour *et al.*, 2004). La degradación de la FDN y FDA del pasto bromo fue similar con y sin enzimas (Varel y Kreikemeier, 1994). Además, no se observaron cambios en la digestibilidad de la materia seca (MS), FDN y FDA de paja de cebada y rastrojo de maíz tratados con enzimas fibrolíticas (Yescas-Yescas *et al.*, 2004).

Wang *et al.* (2004) señalan que las enzimas fibrolíticas incrementan la velocidad y digestión total *in vitro*. También se incrementa la tasa pero no el grado de digestión cuando se usan enzimas fibrolíticas en dietas para rumiantes (Feng *et al.*, 1996; Wang y McAllister, 2002). En el rumen, el pH puede tener un importante efecto en la acción de la enzima sobre la degradación de la fibra; así, el mayor efecto sinérgico entre las enzimas

exógenas y las microbianas ocurre en un intervalos de pH entre 5.5 y 6.0 (Morgavi *et al.*, 2000), aun cuando estos valores de pH son mayores que los sugeridos como óptimos para la actividad de las enzimas (Colombatto *et al.* 2004). En consecuencia, el pH inicial del medio de incubación puede influir en la actividad hidrolítica y en el sinergismo entre las enzimas microbianas y las exógenas, modificando la degradación de la fibra.

El objetivo del presente experimento evaluar el efecto de las enzimas de un producto fibrolítico comercial y del pH inicial del líquido ruminal sobre la degradación de la fibra detergente neutro de heno de alfalfa (*Medicago sativa*) y del pasto ovilla (*Dactylis glomerata*).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Preparación de los sustratos y procedimiento de incubación

Los sustratos heno de alfalfa (*Medicago sativa*) y pasto ovilla (*Dactylis glomerata*) se secaron a 65 °C y se molieron a un tamaño de partícula de 2 mm. El residuo insoluble en solución detergente neutro (FDN) se preparó de acuerdo con la técnica de Van Soest *et al.* (1991). En el residuo FDN se determinó la materia seca (MS), proteína cruda (PC) y cenizas (C) (AOAC, 1990). Las concentraciones de FDN, FDA, celulosa, hemicelulosa y lignina se determinaron por la técnica de Van Soest *et al.* (1991; Cuadro 4.1). El producto enzimático Fibrozyme® (Alltech) se preparó para proporcionar una actividad enzimática de xilanasas equivalente a 300 UI g<sup>-1</sup> MS de la fibra. En tubos de propileno se colocaron 500 mg de sustrato. En los tratamientos con enzima se adicionaron 2 mL del extracto del producto enzimático 1 h antes de la incubación con líquido ruminal; en las muestras sin enzima se colocó similar cantidad de agua destilada.

Para el estudio de la degradación de la FDN en líquido ruminal se utilizó la primera parte de la técnica descrita por Tilley y Terry (1963). El líquido ruminal fue recolectado de

una vaca seca Holstein de 650 kg de peso con cánula ruminal, la cual recibió una dieta de heno de alfalfa y ensilado de maíz durante el periodo de recolección. La extracción del líquido ruminal se realizó a las 08:00 h, antes de suministrar alimento. La saliva de McDougall se preparó para tener pH inicial de 5.6, 6.2 y 6.8. El pH de la saliva se ajustó con ácido acético glacial. En cada tubo con muestra más enzima se adicionaron 50 mL de una mezcla de saliva de McDougall y líquido ruminal (4:1 v/v); se agregó CO<sub>2</sub> a los tubos, se taparon e incubaron a 39 °C durante 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 h para el heno de alfalfa y 3, 6, 9, 12, 24 y 48 h para el pasto ovillo. La fermentación se detuvo por congelación. Luego se filtró usando papel filtro (Whatman # 541) y el papel con el residuo se secó 12 h a 100 °C.

La degradación de la FDN en líquido ruminal se determinó mediante la siguiente ecuación:

FDN degradada (g kg<sup>-1</sup> MS) = ((FDN inicial – FDN residual)/FDN inicial). Se realizaron dos procedimientos de incubación, cada uno por triplicado y con el respectivo blanco (líquido ruminal para corrección). Para el estudio de la cinética de la degradación de la FDN se utilizó el modelo descrito por Mertens y Loften (1980):

$$Y = PED e^{-kd(t-L)} + FDNi$$

Donde: Y = FDN residual al tiempo t; PED = FDN potencialmente digestible; kd = tasa fraccional constante de digestión (% h<sup>-1</sup>); L = fase lag discreta (h); T = tiempo (h); FDNi = fibra detergente neutro indigestible (g kg<sup>-1</sup> MS). La tasa de degradación (kd, % h<sup>-1</sup>) se calculó por regresión lineal del logaritmo natural del residuo de FDN contra el tiempo de incubación (Smith *et al.*, 1971). El valor absoluto de la pendiente se consideró la tasa de degradación.

## **Diseño experimental y análisis estadístico**

La degradación de la FDN (DFDN), la tasa de degradación ( $kd$ ), la fase lag ( $L$ ) y la fracción FDN indigestible (FDNi) se analizaron utilizando un diseño de bloques generalizados con arreglo factorial 2x3 (Steel y Torrie, 1986) para cada sustrato. Los factores de estudio fueron la enzima (con enzima y sin enzima) y el pHi del medio de incubación (6.8, 6.2 y 5.6), con dos incubaciones las cuales fueron consideradas los bloques. Para el análisis de la varianza se utilizó el procedimiento GLM (SAS, 2001). Los efectos lineales y cuadráticos del pHi se probaron mediante polinomios ortogonales y la comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1986).

## **RESULTADOS**

### **Degradación de la fibra detergente neutro de heno de alfalfa y pasto ovillo**

La degradación de la FDN (DFND) del heno de alfalfa en líquido ruminal fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) en el tratamiento con enzima desde las 6 hasta las 72 h de incubación (Cuadro 4.2). El pHi cambió ( $P \leq 0.05$ ) la DFND con efectos lineales a las 3, 9 y 12 h y cuadráticos a las 24, 48 y 72 h. A las 3 h la mayor degradación se observó a pHi 6.8, pero a las 9 y 12 h fue mayor a pHi 5.6 y a partir de las 24 h la mayor DFND se obtuvo a pHi 6.2 (Cuadro 4.2). La interacción enzima por pHi fue significativa ( $P \leq 0.05$ ) a partir de las 6 h de incubación (Figura 4.1). A las 9 h de incubación la DFND fue mayor para el tratamiento con enzima a pHi 5.6. A las 12 h los tratamientos con enzima a pHi 5.6 y 6.2 presentaron mayor DFND que los tratamientos sin enzima y a pHi de 6.8 la DFND fue similar entre con y sin enzima. A las 72 h de incubación a pHi 5.6 los tratados y no tratados con enzima presentaron similar DFND, mientras que a pHi 6.2 y 6.8 en los tratados con enzima la

DFND fue mayor que en el tratamiento sin enzima. El mayor incremento en la DFDN por efecto de la enzima ocurrió a pHi 6.8 a las 72 h.

El tratamiento con enzima aumentó ( $P \leq 0.05$ ) la DFDN del pasto ovido en el líquido ruminal a las 24 y 48 h incubación (Cuadro 4.3). El pHi sólo cambió ( $P \leq 0.05$ ) la DFDN a las 3 h de incubación, y fue mayor a pHi 5.6; a pH 6.2 y 6.8 se encontraron valores de DFDN similares. La interacción enzima por pHi no tuvo efecto sobre la DFDN en ninguno de los tiempos de incubación (Figura 4.2).

### **Cinética de degradación de la FDN del heno de alfalfa y del pasto ovido**

La tasa de degradación ( $kd$ ) de la FDN de heno de alfalfa fue similar entre los tratamientos con y sin enzima (Cuadro 4.4). En el tratamiento sin enzima se observó una mayor ( $P \leq 0.05$ ) fase lag (h) y una mayor ( $P \leq 0.05$ ) cantidad de la fracción FDNi. El pHi tuvo efectos cuadráticos ( $P \leq 0.05$ ) sobre la  $kd$  y la fase lag, pero no se observó efecto del pHi sobre la FDN indigestible. A pHi 6.2 se observaron los mayores ( $P \leq 0.05$ ) promedios de la  $kd$  y la fase lag. La interacción enzima por pHi fue significativa para la  $kd$ , la fase lag y la FDN indigestible. Se encontró la mayor  $kd$  en el tratamiento sin enzima a pHi 6.2 y la menor en el tratamiento sin enzima a pHi 5.6. El mayor ( $P \leq 0.05$ ) promedio de la fase lag correspondió al tratamiento sin enzima a pHi 6.2. Los demás tratamientos y pHi presentaron similar fase lag. La cantidad de la fracción FDNi por el contrario fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) en el tratamiento sin enzima a pHi 5.6.

En el pasto ovido, la tasa de degradación ( $kd$ ), la fase lag y la fracción FDNi fueron similares entre tratamiento con enzima y sin enzima y en los diferentes pHi. No hubo efecto de la interacción enzima por pHi (Cuadro 4.5).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

### Degradación de la FDN del heno de alfalfa y pasto ovillo

En el presente estudio la aplicación de la enzima aumentó la degradación de la FDN del heno de alfalfa en líquido ruminal a partir de las 6 hasta las 72 h, con el mayor incremento (24.52%) a las 24 h de incubación, mientras que en el pasto ovillo el aumento de la degradación de la FDN se observó a las 24 y 48 h (16.58 y 15.0%). Estos resultados sugieren que durante las primeras horas de la incubación las enzimas exógenas pueden ejercer una acción catalítica directa sobre los componentes de la fibra (Morgavi *et al.*, 2000) o remueven barreras estructurales, lo que contribuye a facilitar el acceso de los microorganismos a la fibra degradable de la alfalfa (Nsereko *et al.*, 2000). Posteriormente, a las 12 o 24 h de incubación se puede presentar algún efecto sinérgico que potencie la degradación de la FDN del heno de alfalfa y pasto ovillo (Morgavi *et al.* 2000).

Las diferencias en la degradación de la fibra entre forrajes se deben a las diferencias en la estructura y composición de la pared celular (Buxton y Redfearn, 1997), las cuales pueden ocasionar variación en la respuesta a la enzima (Beauchemin *et al.*, 2003). Además, el tiempo de incubación puede tener una influencia sobre el efecto de la enzimas (Eun *et al.* 2007<sup>a</sup>) y la respuesta puede ser diferente entre los forrajes en los distintos tiempos de incubación, ya que en este estudio la desaparición de la FDN del heno de alfalfa se incrementó a partir de las 6 h, pero en ovillo fue a las 24 y 48 h.

Con el mismo producto enzimático Pinos-Rodríguez *et al.* (2002) encontraron aumentos en la desaparición de la FDN de heno de alfalfa y del pasto ballico (*Lolium perenne*) desde las 24 hasta las 72 h de incubación. Eun *et al.* (2007<sup>b</sup>) reportaron 14.4 y 20.6% de aumento en la degradación de la FDN de alfalfa a las 24 h de incubación por efecto de dos diferentes productos fibrolíticos. La digestibilidad a las 48 h de incubación de la



celulosa y hemicelulosa del heno de *Dactylis glomerata* pretratado con una mezcla de enzimas fibrolíticas se incrementó en 15.35 y 19.50%, con respecto al heno no tratado (Dong *et al.*, 1999).

Las enzimas comerciales tienen su máxima actividad con un pH (4.5-5.5) menor al pH óptimo para la degradación de la fibra en el rumen (Morgavi *et al.*, 2000). En el presente estudio el mayor incremento (19.33%) en la degradación de la FDN del heno de alfalfa se observó a pH<sub>i</sub> de 6.8 a las 72 h de incubación. Yang *et al.* (2002) observaron que a las 12 h de incubación, el mayor incremento (18%) en la degradación de la fibra por efectos de las enzimas ocurrió a un pH superior a 6.0, y hubo 8% de aumento a un pH 5.5. Colombatto *et al.* (2003) indican que la adición de enzima incrementó la degradación de la FDN de la dieta en 43% a pH 6.0-6.6 y en 25% a pH 5.4-6.0 con respecto a los testigos, efecto asociado con el aumento de la actividad de xilanasas y celulasas en la fase líquida de los fermentadores. La degradación de la FDN de tallos de alfalfa tratados con enzimas a las 24 h de fermentación aumentó a pH 6.5 y 6.72 pero no hubo diferencias a pH 5.72 y 6.20 (Colombatto *et al.*, 2007). Los efectos de las enzimas pueden ser variados y estar relacionados con diferentes factores como la fuente y la dosis de enzimas (McAllister *et al.*, 1999; Nsereko *et al.*, 2000; Morgavi *et al.*, 2001), el tipo de forraje y el método de aplicación (Yang *et al.*, 2000; Wallace *et al.*, 2001), además de las condiciones experimentales y el pH del medio, que originan diferentes respuestas.

### **Variables de la cinética de la degradación de la FDN**

La tasa de degradación y la fase lag son variables útiles para predecir el valor nutritivo de los forrajes. Aun cuando la tasa de degradación de la FDN de heno de alfalfa fue similar entre tratamientos con enzima y sin enzima, la interacción con el pH<sub>i</sub> fue significativa y favoreció una mayor tasa de degradación en los pH<sub>i</sub> 5.6 y 6.8. Por el

contrario, la tasa de degradación de la FDN del pasto ovillo no fue modificada por el tratamiento con enzima ni por el pH<sub>i</sub> del medio de incubación. Al respecto, Mertens (1993) señala que las diferencias entre los tipos de células y la morfología de la planta son factores importantes que influyen en la tasa de degradación de la fibra, por lo que el efecto de la enzima sobre esta variable puede diferir entre especies de forrajes.

La fase lag de la degradación de la FDN de alfalfa fue reducida por el tratamiento con enzimas; posiblemente las enzimas exógenas acceden al sustrato antes que las enzimas microbianas e inician la degradación de la fibra en las primeras horas de incubación (Colombatto *et al.*, 2003). Sin embargo, en el pasto ovillo la fase lag no fue diferente entre los tratamientos ni en los pH<sub>i</sub>, pero presentó mayores tiempos lag que los observados en la FDN de heno de alfalfa.

La menor fracción de FDN indigestible del heno de alfalfa tratado con enzima puede indicar que las celulasas y hemicelulasas exógenas contribuyeron a degradar mayor cantidad de estos constituyentes. Sin embargo, en el pasto ovillo la fracción FDN no presentó variación entre tratamientos. La fracción FDN indigestible a las 72 h de incubación se asocia principalmente con la concentración de lignina (Smith *et al* 1972). Según Nadeu *et al.* (1996), las celulasas podrían modificar el complejo ligno-hemicelulosa durante la hidrólisis de la celulosa y facilitar la degradación por los microorganismo del rumen. En ese sentido se puede inferir que en la FDN del heno de alfalfa, el tratamiento con enzima pudo favorecer una parcial solubilización de la lignina, reflejándose en un menor residuo indigestible.

En lo que respecta a los efectos de las enzimas sobre las variables de la cinética de la degradación de la fibra, Varel *et al.* (1993) indican que se incrementa la tasa, pero no la degradación de la fibra. Zahiroddini *et al.* (2004) señalan que la mezcla de enzimas de *A. oryzae* y *Bacillus subtilis* no tuvo efecto sobre las variables de la cinética de

degradación de la FDN de planta de cebada. En condiciones *in situ*, la fase lag de la degradación de la FDN de alfalfa fue menor en los tratamientos con enzimas de *A. oryzae*, pero no se presentó efecto de la enzima sobre la tasa de degradación (Siervert y Shaver, 1993).

En conclusión, la aplicación de las enzimas de Fibrozyme mejoró la degradación en líquido ruminal de la FDN del heno de alfalfa en todos los tiempos de incubación, con el mayor incremento a pH inicial 6.8 a las 72 horas. La tasa de degradación de la FDN, fase lag y la fracción FDN indigestible fueron similares en los tratamientos con enzima en todos los niveles de pH inicial. En el pasto ovillo el efecto de la enzima en la degradación en líquido ruminal de la FDN se observó a las 24 y 48 h de incubación, sin efectos del pH. La tasa de degradación de la FDN, la fase lag y la fracción indigestible de la FDN de pasto ovillo fueron similares en los tratamientos con y sin enzima en todos los niveles de pH inicial.

## REFERENCIAS

- Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> Edition. AOAC, Washington, DC.
- Beauchemin, K.A., L.M. Rode and V.J. Sewalt. 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. *Can. J. Anim. Sci.* 75:641-644.
- Beauchemin, K.A., D. Colombatto, D.P. Morgavi and W.Z. Yang. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81 (E. Suppl.2) E37-E47.
- Beauchemin, K.A., D. Colombatto and D.P. Morgavi. 2004. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 84:23-16.
- Boutatour, A., L. Castillejos, R. Casals and S. Casamiglia. 2004. Effects of fibrolytic enzymes and fat supplementation on fiber digestibility, nitrogen metabolism and fermentation profile in continuous culture system. *J. Anim. Sci.* 82:49. Suppl. 1.

- Buxton, R.D. and D.D. Redfearn. 1997. Plant limitations to fiber digestion and utilization. J. Nutr. <http://www.jn.nutrition.org/>
- Caton, J.S., D.D. Ericsson, D.A. Carey, and L.L. Ulmer. 1993. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on forage intake, site of digestion, *in situ* degradability, and duodenal aminoacid flow in steers grazing cool-season pasture. J. Anim. Sci. 71:779-787.
- Colombatto, D., G. Hervás, W.Y. Yang and K.A. Beauchemin. 2003. Effects of enzyme supplementation of total mixed ration on microbial fermentation in continuous culture, maintained at high and low pH. J. Anim. Sci. 81:2617-2627.
- Colombatto, D., F.L. Mould, M.K. Bath and E. Owen. 2007. Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and incubation pH on the *in vitro* ruminal fermentation of alfalfa stems. Anim. Feed Sci. Technol. 137:150-162.
- Colombatto, D., F.L. Mould, M.K. Bath, R.H. Phipps and E. Owen. 2004. *In vitro* evaluation of fibrolytic enzymes as additive for maize (*Zea mays* L.) silage. I. Effects of ensiling temperature enzyme source and addition level. Anim. Feed Sci. Technol. 111:111-128.
- Dong, Y., H.D. Bae, T.A. McAllister, G.W. Mathison and K.-J. Cheng. 1999. Effects of exogenous fibrolytic enzymes,  $\alpha$ -bromoethanosulfonate and monensin on fermentation in a rumen simulation (RUSITEC) system. Can. J. Anim. Sci. 79:491-498.
- Eun, J.-S., K.A. Beauchemin and H. Schulze. 2007a. Use of an *in vitro* fermentation bioassay to evaluate improvements in degradation of alfalfa hay due to exogenous feed enzymes. Anim. Feed Sci. Technol. 135:315-328.
- Eun, J.-S., K.A. Beauchemin and H. Schulze. 2007b. Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance *in vitro* fermentation of alfalfa hay and corn silage. J. Dairy Sci. 90:1440-1451.
- Feng, P., C.W. Hunt, G.T. Pritchard and W.E. Julien. 1996. Effect of enzyme preparations on *in situ* and *in vitro* degradation and *in vivo* digestive characteristic of mature cool-season grass forage in beef steers. J. Anim. Sci. 74:1349-1357.
- Mertens, D.R. 1993. Kinetics of cell wall digestion and passage in ruminants. *In*: Hung, H.G., D.R. Buxton, R.D. Hatfield and J. Ralph (editors). Forage Cell Wall Structure and Digestibility. ASA-CSSA-SSSA, Madison, Wi. pp. 535-570.
- Mertens, D.R. and J.R. Lofton. 1980. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro*. J. Dairy Sci. 63:1437-1446.
- McAllister, T.A., S.J. Oosting, J.D. Popp, Z. Mir, L.J. Yake, A.N. Hristov, R.J. Treacher and K.J. Cheng. 1999. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. Can. J. Anim. Sci. 79:353-360.
- Morgavi, D.P., Beauchemin, K.A., Nsereko, V.L, Rode, L.M., Iwaasa, A.D., Yang, W.Z., McAllister, T.A. and Wang, Y. 2000. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. J. Dairy Sci. 83:1310-1321.

Morgavi, D.P., K.A. Beauchemin, V.L. Nsereko, L. Rode, T.A. McAllister, A.D. Iwaasa, Y. Wang and W.Z. Yang. 2001. Resistance of feed enzymes to proteolytic activation by rumen microorganism and gastrointestinal proteases. *J. Anim. Sci.* 79:1621-1630.

Morgavi, D.P., K.A. Beauchemin, V.L. Nsereko, L.L. Rode, T.A. McAllister and Y. Wang. 2004. *Trichoderma* enzymes promote *Fibrobacter succinogenes* S85 adhesion to, and degradation of complex substrates but not pure cellulose. *J. Sci. Food Agric.* 84:1083-1090.

Nadeau, E.M., D.R. Buxton, E. Lindgren and P. Lingvall. 1996. Kinetics of cell-wall digestion of orchardgrass and alfalfa silages treated with cellulase and formic acid. *J. Dairy Sci.* 79:2207-2216.

Nsereko, V.L., D.P. Morgavi, L.M. Rode, K.A. Beauchemin and T.A. McAllister. 2000. Effects of fungal preparation on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganism *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 88:153-170.

Oba, M. and M.S. Allen. 1999. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. *J. Dairy sci.* 82:589-596.

Pinos-Rodríguez., J.A., S.S. González Muñoz, G.D. Mendoza Martínez, R. Bárcena Gama y M. Cobos Peralta. 2002. Efecto de las enzimas fibrolíticas exógenas en la digestibilidad *in vitro* de la pared celular de heno de alfalfa (*Medicago sativa*) o de ballico (*Lolium perenne*). *Interciencia.* 27:28-32.

Sievert, S.J. and R.D. Shaver. 1993. Effect of nonfiber carbohydrate level and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on intake, digestion, and milk production in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 71:1032-1040.

Smith, L.W., H.K. Goering, D.R. Waldo and C.H. Gordon. 1971. *In vitro* digestion rate forage cell components. *J. Dairy Sci.* 54:71-79.

Smith, L.W., H.K. Goering and C.H. Gordon. 1972. Relationships of forage compositions with rate of cell wall digestion and indigestibility of cell walls. *J. Dairy Sc.* 55:1140-1147.

SAS. 2001. SAS<sup>®</sup> Software, Version 8.2. SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA. CD.

Steel, R.G. y J.H. Torrie. 1986. Bioestadística. Principios y Procedimientos. (2<sup>nd</sup> Ed.). McGraw-Hill Book Co., Mexico. 620 p.

Tilley, L.M. and R.A. Terry. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grass.Soc.* 28:104-111.

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

Varel, V.H. and K.K. Kreikemeier. 1994. Response to various amounts of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal metabolism in cattle. *J. Dairy Sci.* 77:3081-3086.

- Varel, V.H, K.K. Kreikemeier, H.-J.G Jung and R.D. Hatfield. 1993. *In vitro* stimulation of forage fiber degradation by ruminal microorganisms with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. Appl. Environ. Microbiol. 59:3171-3176.
- Wang, Y. and T.A. McAllister. 2002. Investigation of exogenous fibrolytic enzyme activity on barley straw using *in vitro* incubations. J. Anim. Sci. 80 (Suppl. 1):p. 316.
- Wang, Y., B.M. Spratling, D.R. ZoBell, R.D. Wiedmeier and T.A. McAllister. 2004. Effect of alkali pretreatment of wheat straw on the efficacy of exogenous fibrolytic enzymes. J. Anim. Sci. 82:198-208.
- Wallace, R.J., S.J. Wallace, N. McKain, V.L. Nsereko and G.I. Hartnell. 2001. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silage by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. J. Anim. Sci. 79:1905-1916.
- Yang, W.Z., K.A. Beauchemin and L.M. Rode. 2000. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. J. Dairy Sci. 83:2512-2520.
- Yang, W.Z., K.A. Beauchemin and D.D. Vedres. 2002. Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial synthesis, and fermentation in continuous culture. Anim. Feed Sci. Technol. 102:137-150.
- Yescas Yescas, R., R. Bárcena Gama, G.D. Mendoza Martínez, S.S. González Muñoz, M. Cobos Peralta y M.E. Ortega Cerilla. 2004. Digestibilidad *in situ* de dietas con rastrojo maíz o paja de avena con enzimas fibrolíticas. Agrociencia. 38:23-31.
- Yoon, I.K. and M.D. Stern. 1996. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* cultures on ruminal fermentation in dairy cows. J. Dairy Sci. 79:411-417.
- Zahiroddinini, H., J. Baah, W. Absalom and T.A. McAllister. 2004. Effect of an inoculant and hydrolytic enzymes on fermentation and nutritive value of whole crop barley silage. Anim. Feed Sci. Technol. 117:317-330.

Cuadro 4.1. Composición de la fibra detergente neutro del heno de alfalfa (*Medicago sativa*) y pasto ovillo (*Dactylis glomerata*)

Forraje	Componente (g kg <sup>-1</sup> MS)							
	MS	PC	FDN	FDA	C	HC	L	Cenizas
Heno de alfalfa	892.1	55.0	933.4	735.9	534.7	197.5	201.1	18.4
Pasto ovillo	884.2	79.2	944.2	525.0	390.2	419.2	104.1	59.3

MS= materia seca; PC= proteína cruda; FDN= fibra detergente neutro; FDA= fibra detergente ácido; C= celulosa; HC= hemicelulosa; L= lignina.

Cuadro 4.2. Degradación de la fibra detergente neutro (g kg<sup>-1</sup>) del heno de alfalfa (*Medicago sativa*) con y sin enzima de Fibrozyme en líquido ruminal con diferentes pH inicial

	Tiempo de incubación (h)						
	3	6	9	12	24	48	72
Enzima							
Con enzima	26.9	57.7 <sup>a</sup>	121.0 <sup>a</sup>	142.6 <sup>a</sup>	320.4 <sup>a</sup>	351.7 <sup>a</sup>	412.1 <sup>a</sup>
Sin enzima	29.5	44.9 <sup>b</sup>	81.8 <sup>b</sup>	116.5 <sup>b</sup>	257.3 <sup>b</sup>	318.7 <sup>b</sup>	381.5 <sup>b</sup>
EEM	1.2	2.0	2.3	2.9	4.1	3.3	6.2
pHi							
5.6	19.4 <sup>b</sup>	51.9	115.6 <sup>a</sup>	145.6 <sup>a</sup>	273.4 <sup>b</sup>	313.5 <sup>b</sup>	389.5 <sup>b</sup>
6.2	29.9 <sup>b</sup>	56.6	99.5 <sup>b</sup>	132.2 <sup>b</sup>	314.4 <sup>a</sup>	395.6 <sup>a</sup>	438.5 <sup>a</sup>
6.8	35.2 <sup>a</sup>	52.1	89.2 <sup>c</sup>	115.4 <sup>c</sup>	282.9 <sup>b</sup>	295.6 <sup>c</sup>	362.5 <sup>c</sup>
EEM	1.5	2.4	2.8	3.6	5.0	4.1	7.6
Pr<F							
Enzima	0.404	<0.001	<0.001	0.001	<.001	<.001	<0.001
pHi	<.018	0.002	<0.001	0.065	<.001	<.001	<.001
Enzima*pHi	0.674	<0.001	<0.001	0.019	0.016	<.001	0.002
Efectos del pHi (Pr >F)							
Lineal	<0.001	0.955	0.012	0.001	0.57	0.155	0.043
Cuadrático	0.331	0.271	0.737	0.799	0.016	<0.001	<0.001

<sup>a,b,c</sup>: letras distintas en una columna dentro de efectos principales indican diferencias (P≤ 0.05)  
EEM = Error estándar de la media.

Cuadro 4.3. Degradación de la fibra detergente neutro ( $\text{g kg}^{-1}$ ) del pasto ovillo (*Dactylis glomerata*) con y sin enzima de Fibrozyme en líquido ruminal con diferentes pH inicial

	Tiempo de incubación (h)					
	3	6	9	12	24	48
Enzima						
Con enzima	14.3	28.2	41.7	97.4	184.9 <sup>a</sup>	211.2 <sup>a</sup>
Sin enzima	14.0	21.5	42.6	85.1	158.6 <sup>b</sup>	183.5 <sup>b</sup>
EEM	1.4	2.0	2.2	3.5	3.5	6.8
pHi						
5.6	18.9 <sup>a</sup>	29.6	53.0	98.5	180.6	198.3
6.2	15.7 <sup>a</sup>	25.3	40.5	90.7	169.8	188.1
6.8	7.9 <sup>b</sup>	19.5	33.0	84.6	164.8	205.7
EEM	1.8	1.9	2.8	4.3	5.0	4.1
Pr<F						
Enzima	0.904	0.124	0.874	0.245	0.040	0.027
pHi	0.036	0.160	0.078	0.526	0.449	0.353
Enzima*pH	0.271	0.760	0.873	0.550	0.355	0.500
Efectos del pHi (Pr >F)						
Lineal	<0.008	0.009	0.001	0.085	0.420	0.542
Cuadrático	0.269	0.942	0.485	0.900	0.866	0.375

<sup>a,b,c</sup>: letras distintas en una columna dentro de efectos principales indican diferencias ( $P \leq 0.05$ )

EEM = Error estándar de la media.



Cuadro 4.4. Cinética de la degradación de la fibra detergente neutro del heno de alfalfa (*Medicago sativa*) con y sin enzima de Fibrozyme en líquido ruminal con diferentes pH inicial

	$k_d$ (% h <sup>-1</sup> )	Lag (h)	FDN indigestible (g kg <sup>-1</sup> )
Enzima			
Con enzima	4.81	0.71 <sup>b</sup>	145.1 <sup>b</sup>
Sin enzima	4.27	1.62 <sup>a</sup>	200.9 <sup>a</sup>
EEM	0.21	0.20	15.0
pHi			
5.6	3.93 <sup>b</sup>	0.47 <sup>b</sup>	139.7
6.2	5.26 <sup>a</sup>	2.49 <sup>a</sup>	150.5
6.8	4.41 <sup>ab</sup>	0.54 <sup>b</sup>	174.8
EEM	0.26	0.24	14.8
Enzima*pHi			
CENZ-5.6	4.94 <sup>b</sup>	0.93 <sup>b</sup>	116.7 <sup>b</sup>
SENZ-5.6	2.93 <sup>c</sup>	0.00 <sup>b</sup>	270.8 <sup>a</sup>
CENZ-6.2	4.56 <sup>b</sup>	0.32 <sup>b</sup>	149.5 <sup>b</sup>
SENZ-6.2	5.97 <sup>a</sup>	4.67 <sup>a</sup>	153.1 <sup>b</sup>
CENZ-6.8	4.93 <sup>b</sup>	0.89 <sup>b</sup>	169.0 <sup>b</sup>
SENZ-6.8	3.90 <sup>bc</sup>	0.20 <sup>b</sup>	180.6 <sup>b</sup>
EEM	0.38	0.34	26.1
Pr<F			
Enzima	0.095	0.003	0.015
pHi	0.006	<0.001	0.270
Enzima*pHi	0.000	<0.001	0.012
Efectos del pHi (Pr<F)			
Lineal	0.341	0.902	0.591
Cuadrático	0.016	0.001	0.271

<sup>a,b,c</sup>: letras distintas en una columna dentro de efectos principales e interacción indican diferencias (P ≤ 0.05)

EEM = Error estándar de la media.

$k_d$  = tasa de degradación

CENZ=con enzima; SENZ=sin enzima.

Cuadro 4.5. Cinética de la degradación de la fibra detergente neutro del pasto ovillo (*Dactylis glomerata*) con y sin enzima de Fibrozyme en líquido ruminal con diferentes pH inicial

	$k_d$ (% h <sup>-1</sup> )	Lag (h)	FDN indigestible (g kg <sup>-1</sup> )
Enzima			
Con enzima	11.1	3.83	136.9
Sin enzima	12.5	3.84	134.6
EEM	1.1	0.33	24.2
pHi			
5.6	13.1	3.73	93.0
6.2	11.6	3.55	129.0
6.8	10.5	4.23	185.4
EEM	1.3	0.40	29.7
Enzima*pHi			
CENZ-5.6	14.1	4.18	78.0
SEnz-5.6	12.8	4.27	108.0
CENZ-6.2	12.8	4.15	109.1
SEnz-6.2	10.5	2.94	148.8
CENZ-6.8	10.5	4.18	216.8
SEnz-6.8	10.6	4.27	154.0
EEM	1.9	0.42	42.0
Pr<F			
Enzima	0.577	0.466	0.967
pHi	0.688	0.396	0.444
Enzima*pHi	0.806	0.229	0.422

EEM= error estándar de la media

$k_d$  = tasa de degradación

CENZ=con enzima; SENZ= sin enzima.

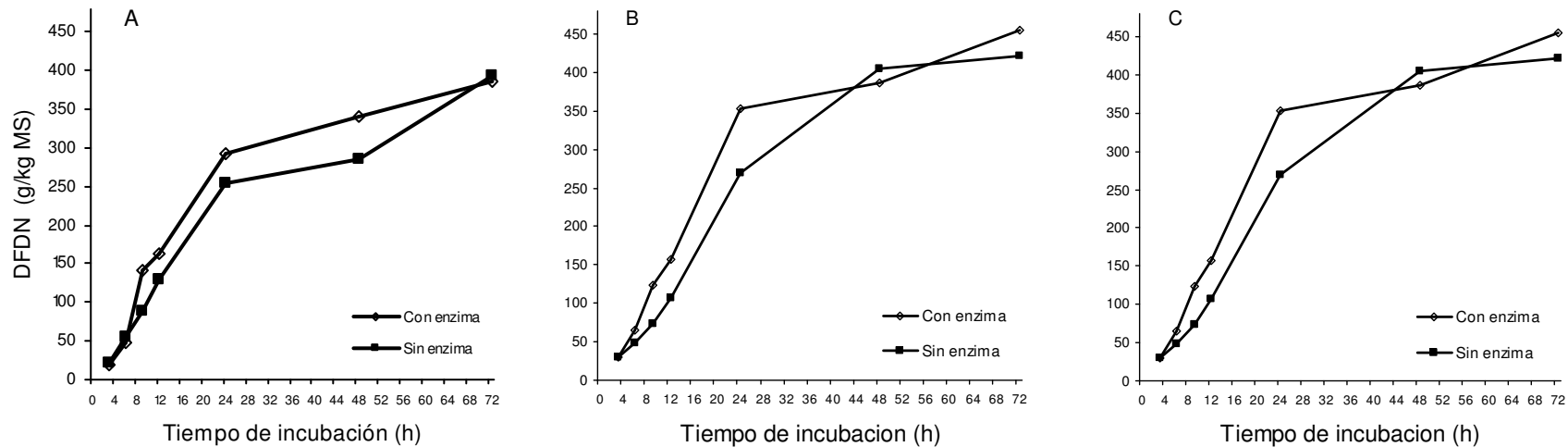


Figura 4.1. Degradación de la fibra detergente neutro (DFDN) del heno de alfalfa (*Medicago sativa*) con y sin enzima de Fibrozyme en líquido ruminal con diferentes pH inicial: A: pH 5.6; B: pH 6.2; C: pH 6.8 ( $P < 0.05$ , de 6 a 72 h incubación)

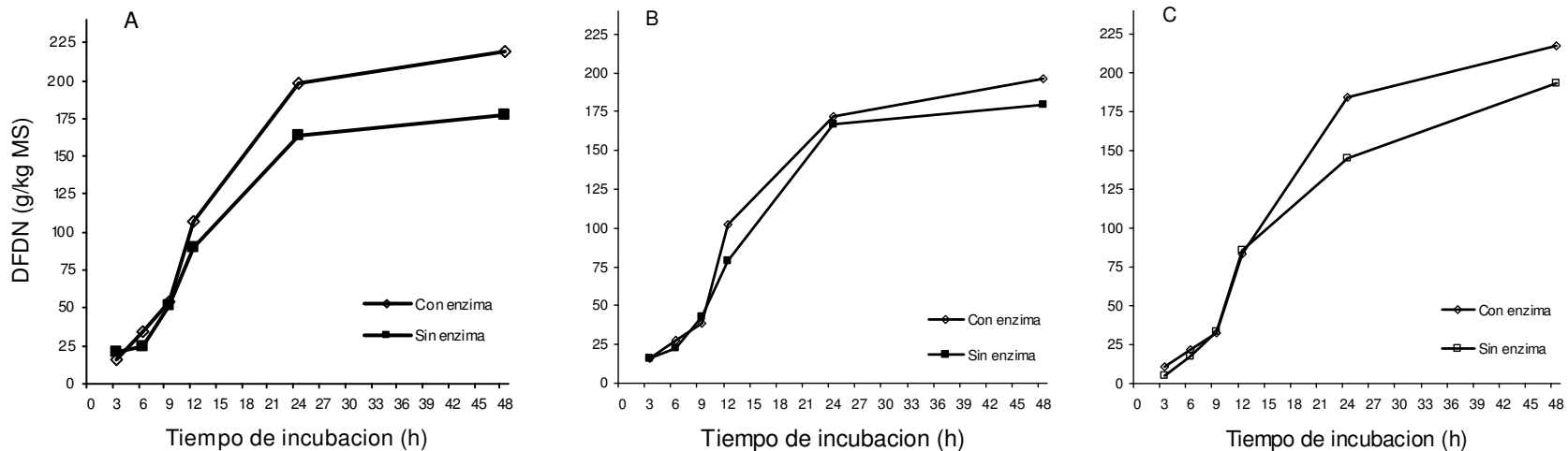


Figura 4.2. Degradación de la fibra detergente neutro (DFDN) del pasto ovillo (*Dactylis glomerata*) con y sin enzima de Fibrozyme en líquido ruminal con diferentes pH inicial: A: pH 5.6; B: pH 6.2; C: pH 6.8 ( $P < 0.05$ , a 24 y 48 h de incubación).

## CONCLUSIONES FINALES

En general, de los resultados de los tres experimentos se concluye:

1. El hongo el *Trametes* sp. EUM1 produjo mayor cantidad de xilanasas que *P. ostreatus* IE8 y *A. niger* AD94.6, con valores similares a los 14 y 19 d de fermentación, lo que permite considerar a esta especie de hongo con potencial para producir enzimas con posible aplicación comercial, particularmente como enzimas exógenas para la alimentación de rumiantes.
2. Las menores concentraciones de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) en el líquido ruminal cuando se incubaron las enzimas con un sustrato, permite inferir que la degradación de las enzimas de *Trametes* sp. EUM1, *P. ostreatus* IE8 y Fibrozyme fue menor en presencia de un sustrato y por tanto se considera al sustrato un factor importante en la estabilidad de las enzimas estudiadas, aun cuando, los efectos fueron variables entre sustratos y tipos de enzima.
3. La aplicación de las enzimas de Fibrozyme mejoró la degradación en líquido ruminal de la FDN del heno de alfalfa en todos los tiempos de incubación, con el mayor incremento a pH inicial 6.8 a las 72 horas, pero la tasa de degradación de la FDN, fase lag y la fracción FDN indigestible fueron similares en los tratamientos con enzima en todos los niveles de pH inicial, mientras que en el pasto ovillo el efecto de la enzima en la degradación de la FDN se observó a las 24 y 48 h de incubación y el pH inicial no tuvo efecto sobre esta variable. La tasa de degradación de la FDN, la fase lag y la fracción indigestible de la FDN de pasto ovillo fueron similares en los tratamientos con y sin enzima en todos los niveles de pH inicial.