



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**EXTRACTOS ENZIMÁTICOS FIBROLÍTICOS DE *Fomes* sp. EUM1
Y *Cellulomonas flavigena* EN LA ALIMENTACIÓN DE CORDEROS**

NICOLÁS TORRES SALADO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2013

La presente tesis titulada: **Extractos enzimáticos fibrolíticos de *Fomes* sp. EUM1 y *Cellulomonas flavigena* en la alimentación de corderos** realizada por el alumno: **Nicolás Torres Salado**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:


Dr. José Ricardo Barcena Gama

DIRECTOR DE TESIS:


Dr. Germán David Mendoza Martínez

ASESOR:


Dr. Sergio Segundo González Muñoz

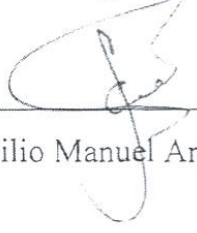
ASESOR:


Dr. Octavio Loera Corral

ASESORA:


Dra. María Magdalena Crosby Galván

ASESOR:


Dr. Emilio Manuel Aranda Ibáñez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 18 enero de 2013

EXTRACTOS ENZIMÁTICOS FIBROLÍTICOS DE *Fomes* sp. EUM1 Y *Cellulomonas flavigena* EN LA ALIMENTACIÓN DE CORDEROS

Resumen general

Se realizaron tres experimentos para evaluar el efecto de extractos enzimáticos fibrolíticos en el forraje de una dieta integral para corderos. En el primer experimento se evaluaron tres extractos de por su efecto en el crecimiento y la digestibilidad del alimento en corderos, utilizando dietas con 60 % de forraje (30 % rastrojo de maíz y 30 % heno de alfalfa). El diseño experimental fue completamente al azar, se usaron 20 corderos Pelibuey (peso inicial 26.14 kg) y para los tratamientos se adicionaron extractos enzimáticos (mL kg⁻¹ materia seca, MS, de alimento): testigo (0 mL), 3.5 mL de extracto comercial de *Trichoderma longibrachiatum*, 21.1 mL de extracto de *Fomes* sp. EUM1 y 2.47 mL de extracto de *Cellulomonas flavigena*. Se realizó un ANOVA y las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey. No hubo efectos (P>0.05) en el peso final y en el consumo de materia seca, pero la adición del extracto de *C. flavigena* afectó negativamente (P<0.05) la ganancia diaria de peso, la conversión alimenticia y la digestibilidad. La adición de extractos de enzimas exógenas aumentó el porcentaje de butirato en el fluido ruminal (P<0.05), pero no cambió la digestión ni la respuesta productiva de los corderos (P>0.05). En el segundo experimento se evaluó el extracto de *Cellulomonas flavigena* en la respuesta productiva, digestibilidad y variables ruminales en corderos alimentados con una dieta con 60% de forraje. El diseño experimental fue completamente al azar con tres tratamientos: 0, 5.0 y 7.5 mL de extracto kg⁻¹ MS de alimento y se usaron 24 corderos Pelibuey-Kathadin (23.28 kg de peso vivo inicial). Se realizó un ANOVA con contrastes polinomiales no ortogonales y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey. No hubo efecto (P>0.05) en el consumo de MS, ganancia diaria de peso y conversión alimenticia. El incremento en la dosis enzimática disminuyó linealmente la digestibilidad aparente de la MS (P=0.06), FDN (P=0.10) y FDA (P=0.06). La concentración de N-NH₃ presentó una disminución lineal (P<0.05) y la concentración de AGV aumentó linealmente (P<0.05), mientras que el ácido butírico mostró una respuesta cuadrática (P<0.05). La incorporación del extracto de *C. flavigena* en la dieta no aumentó la digestión ni la respuesta productiva en corderos con las dosis evaluadas. En el tercer experimento se evaluó el extracto de *C. flavigena* (0, 2.5, 7.5, 12.5 mL kg⁻¹ MS de alimento) en la degradación *in vitro* de la MS (DMS), fibra detergente neutra (DFDN) y ácida (DFDA) de una

dieta con 60 % de forraje, usando la primera fase de la técnica de Tilley y Terry a las 6, 12, 24, 48 y 72 h de incubación. El diseño experimental fue bloques al azar generalizado y se realizó un ANOVA con contrastes polinomiales no ortogonales y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey. El incremento en la dosis enzimática tuvo un efecto lineal en la DIVMS a las 6 h. La DIVFDN no se afectó por el extracto desde las 6 a las 24 h, pero presentó una disminución cuadrática ($P=0.06$) a la dosis enzimática a las 48 h. La DIVFDA mostró una respuesta lineal de 6 a 72 h. El extracto de *C. flavigena* incrementa la degradación *in vitro* principalmente de la celulosa de rastrojo de maíz y heno de alfalfa.

Palabras clave: enzimas fibrolíticas exógenas, *Cellulomonas flavigena*, *Fomes* sp. EUM1, consumo materia seca, digestibilidad, forraje, ovinos.

FIBROLYTICS ENZYMATIC EXTRACTS OF *Fomes* sp. EUM1 AND *Cellulomonas flavigena* ON FEEDING OF LAMBS

General abstract

Three experiments were performed to evaluate the effect of fibrolytic enzymatic extracts on forage of an integral diet for lambs. In the first experiment three fibrolytic enzyme extracts were evaluated on lamb growth and feed digestibility, using diets with 60 % forage (30 % corn stover and 30 % alfalfa hay). The experimental design was completely randomised, twenty Pelibuey lambs were used (initial weight 26.14 kg) and by treatments were added enzymatic extracts (mL kg⁻¹ of dry matter, DM, of feed): control (0 mL), 3.5 mL of *Trichoderma longibrachiatum* commercial extract, 21.1 mL of *Fomes* sp. EUM1 extract and 2.47 mL of *Cellulomonas flavigena* extract. ANOVA was performed and means were compared with Tukey test. There were no effects on the final weight and dry matter intake, but daily weight gain and feed conversion was shown to be negatively affected when *Cellulomonas flavigena* extract was added (P<0.05). The addition of exogenous enzyme extracts increased the percentage of butyrate in rumen fluid (P<0.05). Digestibility was negatively affected with *C. flavigena* extract. There were no beneficial effects to digestion or in productive performance of lambs with the evaluated extracts. In the second experiment, an enzymatic extract from *Cellulomonas flavigena* was evaluated regarding productive performance, digestibility and ruminal variables of lambs fed a diet with 60 % forage. Twenty-four Pelibuey-Kathadin lambs (23.28 kg initial weight) were distributed in a completely randomized design with three treatments: 0, 5.0 and 7.5 mL of extract kg⁻¹ DM of feed. ANOVA was performed with polynomial non-orthogonal contrasts and means were compared by tukey test. There was no effect (P>0.05) on DM intake, daily gain or feed conversion. An increase in the enzymatic dose linearly decreased the apparent digestibility of DM (P=0.06), NDF (P=0.10) and ADF (P=0.06). The N-NH₃ concentration showed a linear decrease (P<0.05) and the VFA concentration was linearly increased (P<0.05), whereas butyric acid showed a quadratic response (P<0.05). The incorporation of extract of *Cellulomonas flavigena* in the diet did not increase the digestion or productive performance of lambs at the evaluated doses. In the third experiment, an enzymatic extract of *Cellulomonas flavigena* was evaluated (0, 2.5, 7.5, 12.5 mL kg⁻¹ DM of feed) on *in vitro* degradation of dry matter (DMD),

neutral detergent fiber (NDFD) and acid detergent fiber (ADFD) of a diet with 60 % forage. The degradation was determined with the Tilley and Terry technique at 6, 12, 24, 48 and 72 h of incubation. Experimental design was a generalized randomized block and ANOVA was performed with polynomial non-orthogonal contrasts and means were compared by tukey test. Increasing enzymatic dose had a linear effect ($P=0.03$) on DMD at 6 h. The NDFD was not affected ($P=0.49$) by extract from 6 to 24 h, but presented a quadratic response ($P=0.06$) to enzymatic dose at 48 h. The ADFD showed a linear response from 6 to 72 h ($P=0.01$). The extract *Cellulomonas flavigena* increases *in vitro* degradation principally of the cellulose from forages, as corn stover and alfalfa hay, used in ruminants feeding.

Key words: exogenous fibrolytic enzymes, *Cellulomonas flavigena*, *Fomes* sp. EUM1, dry matter intake, degradation, forage, sheep.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Guerrero por la confianza y el apoyo económico para continuar con mi proceso de formación académica.

Al Dr. José Ricardo Bárcena Gama en primer lugar por su confianza, amistad, asesoría y disponibilidad para conducir mi formación académica en el Colegio de Posgraduados.

Al Dr. Germán David Mendoza Martínez por haber dirigido este proyecto de investigación, por su disponibilidad, confianza y amistad para concluir el posgrado.

A los Drs. Sergio Segundo González Muñoz, Octavio Loera Corral, María Magdalena Crosby Galván y Emilio Manuel Aranda Ibáñez por su asesoría y amistad durante el posgrado.

Al Dr. Daniel Martínez por su colaboración y asesoría en Laboratorio de Microbiología Pecuaria en la UAM-Xochimilco.

Al Dr. Omar Hernández Mendo por participar como sinodal, por sus observaciones en el escrito final y por su amistad.

Al personal técnico del laboratorio de Nutrición de rumiantes del Colegio de Posgraduados por su apoyo, colaboración y amistad.

A mis compañeros y amigos del programa de Ganadería del Colegio de Posgraduados, de la UAM Iztapalapa y Xochimilco, por su apoyo y amistad durante el desarrollo del posgrado.

A la línea de investigación LPI-11 "Sistemas de producción agrícola, pecuaria, forestal y acuícola" del Colegio de Posgraduados por los recursos económicos otorgados para la realización de esta investigación.

Dedicatoria

A mis dos amores, mis hijos Annika y Nicolás, por ser el motor más importante que me impulso para concluir el posgrado; por ustedes.

A mi esposa, compañera y amiga Guadalupe con quien he compartido estos diez penúltimos años de mi vida; por tu amor, por tu confianza y por tu apoyo mujer, gracias.

A mi padres Odilia y Nicolás por su amor y dedicación para que su servidor llegara a ser un profesionista.

A mi abuela Filadelfa que en estos momentos está pasando por una etapa difícil de la vida, pero a quien siempre le he expresado mi amor y mi más sincera gratitud; por ti abuelita.

A mis hermanos Mireya, Salvador, Corina, Carlos Alberto, Concepción por su cariño, comprensión y respeto.

A mis sobrinas y sobrinos a quienes sin distinción les comento, que esto es una muestra de algo que se puede hacer en la vida, y que espero con gran ilusión que la mayoría de ustedes lleguen a graduarse de una carrera universitaria.

Contenido

1.	Introducción general	1
1.1.	Revisión de literatura	3
1.1.1.	Estructura de la pared celular de los forrajes	3
1.1.2.	Polisacáridos de las paredes celulares de las gramíneas y leguminosas	3
1.1.3.	Hidrólisis enzimática de la pared celular de los forrajes	5
1.1.4.	Enzimas fibrolíticas exógenas.....	5
1.1.5.	Mecanismo de acción.....	6
1.1.6.	Efecto de las enzimas fibrolíticas exógenas en la productividad de los ovinos.....	7
1.2.	Literatura citada.....	7
2.	Efecto de extractos enzimáticos fibrolíticos de <i>Cellulomonas flavigena</i> , <i>Fomes</i> sp. EUM1 y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> en la respuesta productiva y en la digestibilidad de corderos	15
2.1.	Resumen.....	15
2.2.	Abstract	15
2.3.	Introducción	16
2.4.	Materiales y métodos	17
2.4.1.	Animales y alimentación.....	17
2.4.2.	Enzimas.....	17
2.4.3.	Tratamientos	18
2.4.4.	Respuesta productiva	18
2.4.5.	Variables ruminales	18
2.4.6.	Análisis estadístico.....	19
2.5.	Resultados	19
2.5.1.	Respuesta productiva y digestibilidad	19
2.5.2.	Fermentación ruminal	19
2.6.	Discusión.....	20

2.7.	Conclusión.....	21
2.8.	Literatura citada.....	21
3.	Efecto del extracto enzimático fibrolítico de <i>Cellulomonas flavigena</i> en la respuesta productiva, digestibilidad y variables ruminales en corderos	30
3.1.	Resumen	30
3.2.	Abstract	30
3.3.	Introducción	31
3.4.	Materiales y métodos	32
3.4.1.	Animales y alimentación.....	32
3.4.2.	Enzimas.....	32
3.4.3.	Tratamientos	33
3.4.4.	Respuesta productiva y digestibilidad	33
3.4.5.	Variables ruminales	33
3.4.6.	Análisis estadístico.....	34
3.5.	Resultados	34
3.5.1.	Respuesta productiva y digestibilidad	34
3.5.2.	Variables ruminales	34
3.6.	Discusión.....	34
3.7.	Conclusión.....	36
3.8.	Literatura citada.....	36
4.	Efecto del extracto enzimático de <i>Cellulomonas flavigena</i> en la degradación <i>in vitro</i> de una dieta totalmente mezclada con 60 % de forraje	44
4.1.	Resumen	44
4.2.	Abstract	44
4.3.	Introducción	45
4.4.	Materiales y métodos	45

4.4.1.	Extracto enzimático y dieta.....	45
4.4.2.	Degradación <i>in vitro</i>	46
4.4.3.	Análisis estadístico.....	47
4.5.	Resultados	47
4.6.	Discusión.....	47
4.7.	Conclusión.....	48
4.8.	Literatura citada.....	48
5.	Conclusiones generales.....	53

Contenido de Cuadros

Cuadro 1.1 Respuesta productiva de corderos alimentados con dietas adicionadas con enzimas fibrolíticas exógenas	13
Cuadro 2.1 Actividad enzimática y contenido de proteína de los extractos enzimáticos fibrolíticos	27
Cuadro 2.2 Efecto de enzimas fibrolíticas en la respuesta productiva de corderos	27
Cuadro 2.3 Efecto de enzimas fibrolíticas en la digestibilidad de la dieta consumida por los corderos	28
Cuadro 2.4 Efecto de enzimas fibrolíticas en las variables de fermentación ruminal en los corderos	28
Cuadro 3.1 Efecto del extracto enzimático de <i>Cellulomonas flavigena</i> en la respuesta productiva de corderos 	41
Cuadro 3.2 Efecto del extracto enzimático de <i>Cellulomonas flavigena</i> en la digestibilidad de la dieta consumida por los corderos	41
Cuadro 3.3 Efecto del extracto enzimático de <i>Cellulomonas flavigena</i> en las variables ruminales en corderos	42
Cuadro 4.1 Coeficiente de degradación (g degradados g incubados ⁻¹) <i>in vitro</i> de la materia seca de una dieta con 60% de forraje adicionada con extracto enzimático de <i>Cellulomonas flavigena</i>	51
Cuadro 4.2 Coeficiente de degradación (g degradados g incubados ⁻¹) <i>in vitro</i> de la fibra detergente neutro de una dieta con 60% de forraje adicionada con extracto enzimático de <i>Cellulomonas flavigena</i>	51
Cuadro 4.3 Coeficiente de degradación (g degradados g incubados ⁻¹) <i>in vitro</i> de la fibra detergente ácido de una dieta con 60% de forraje adicionada con extracto enzimático de <i>Cellulomonas flavigena</i>	52

1. Introducción general

Los carbohidratos estructurales de las paredes celulares de los forrajes y granos, generalmente son hidrolizados por celulasas, xilanasas (Bhat y Hazlewood, 2001) producidas por los microorganismos ruminales. Sin embargo, la digestibilidad total de la pared celular en el tubo digestivo sólo llega a 65 % (Van Soest, 1982). Por ello, se ha propuesto utilizar enzimas fibrolíticas exógenas (EFE) de origen micótico o bacteriano como xilanasas, celulasas, esterases y lacasas (Bhat y Hazlewood, 2001; Beauchemin *et al.*, 2003; Niamke y Sun, 2004; Adenosogan *et al.*, 2007; Krueger y Adesogan, 2007; Graminha *et al.*, 2008) para incrementar la hidrólisis de la pared celular de los forrajes en la alimentación en rumiantes.

Las EFE son aditivos que pueden mejorar la digestibilidad de los componentes fibrosos de los alimentos y con ello incrementar la energía digestible en la producción de rumiantes (Beauchemin y Holtshausen, 2010). Hay varios resultados favorables por efecto de las EFE en la producción de leche (Adesogan *et al.*, 2007; Gado *et al.*, 2009) y carne tanto en bovinos (McAllister *et al.*, 1999; Balci *et al.*, 2007) como en ovinos (Cruywagen y Zyl, 2008; Gado *et al.*, 2011; Salem *et al.*, 2011). Lo anterior se debe a una mayor digestibilidad de la materia seca y de la fracción fibrosa de los forrajes tanto *in vitro* (Colombatto *et al.*, 2007; Eun *et al.*, 2007; Dean *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2008; Gallardo *et al.*, 2010) *in situ* (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2008; Hernández, 2009; Gallardo *et al.*, 2010) e *in vivo* (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002; Gado *et al.*, 2009; 2011; Álvarez *et al.*, 2009; Salem *et al.*, 2011; 2012). Pero los resultados no han sido consistentes, debido a la amplia diversidad de productos enzimáticos comerciales y de condiciones experimentales.

En México, se han realizado estudios con productos enzimáticos comerciales adicionados a forrajes convencionales como heno de alfalfa, pastos del género *Brachiaria*, heno de avena y rastrojo de maíz (Pinos *et al.*, 2002; 2008; Avellaneda *et al.*, 2009; Álvarez *et al.*, 2009; Hernández, 2009; Márquez-Araque *et al.*, 2007) y no convencionales como caña de azúcar (Cano *et al.*, 2003; Gómez-Vázquez *et al.*, 2003; Peláez-Acero *et al.*, 2008; 2011; Aranda *et al.*, 2010) utilizados en la alimentación de los rumiantes. Los resultados son variables tanto en la digestión de la fibra como en la respuesta productiva.

Por ello algunos investigadores han evaluado nuevas alternativas potenciales de productos enzimáticos provenientes de hongos de la pudrición blanca como *Fomes fomentarius* (Villegas-Castañeda *et al.*, 2010), o de bacterias como *Cellulomonas flavigena* (Hernández *et al.*, 2011).

Estos estudios sugieren que la degradación *in vitro* o *in situ* de pajas se puede aumentar mediante la adición de extractos de estos organismos (Márquez *et al.*, 2007; Hernández, 2009; Villegas-Castañeda *et al.*, 2010). Sin embargo, en la literatura revisada se encontraron pocos experimentos con rumiantes, por lo cual los objetivos del presente estudio fueron: 1) determinar el efecto del extracto enzimático de *Fomes* sp. EUM1 y *Cellulomonas flavigena* en la respuesta productiva, consumo y digestibilidad de nutrientes y en las variables ruminales en corderos alimentados con una dieta con 60% de forraje; 2) evaluar el efecto de dosis crecientes de extracto de *Cellulomonas flavigena* en la degradación *in vitro* de la materia seca, fibra detergente neutro y ácida de una dieta con 60% de forraje.

1.1. Revisión de literatura

1.1.1. Estructura de la pared celular de los forrajes

En los sistemas de producción de rumiantes para obtener la mayor producción de leche o carne no solamente se requiere de un elevado consumo de forraje sino también una alta digestibilidad de sus paredes celulares (Wilson, 1993). Ello se debe debido a que los rumiantes cubren la mayor parte de sus requerimientos energéticos a través de la fermentación de las paredes celulares de los forrajes realizada por los microorganismos ruminales (Aman, 1993; Wilson, 1993). Así, Wilson (1993) y Jung y Allen (1995) han señalado que la estructura morfológica de tejidos de los forrajes pueden ser los principales factores que limitan el consumo, la digestibilidad y la energía disponible en los rumiantes.

Las células de los forrajes están rodeadas por estructuras bioquímicas complejas que le proporcionan rigidez física, permiten el transporte de agua, y protegen contra el ataque de plagas, conocidas como paredes celulares primarias y secundarias (Paulson *et al.*, 2008). Según Cárpita y McCann (2008), en las plantas con floración se generan paredes primarias cuya estructura básica consiste en microfibrillas de celulosa recubiertas con glucanos entrecruzados, algunos de los cuales se extienden y se interconectan con las microfibrillas vecinas; embebidas en una matriz de polisacáridos ácidos, que sirven como residencia para numerosas proteínas y enzimas que funcionan en el establecimiento y degradación de la pared celular; mientras que los rastrojos o pajas de gramíneas contienen principalmente paredes celulares secundarias que son rígidas y resistentes a la degradación microbiana (Aman, 1993).

1.1.2. Polisacáridos de las paredes celulares de las gramíneas y leguminosas

El forraje de gramíneas y leguminosas tiene características diferentes en la pared celular que se reflejan en diferencias en los tipos de tejidos, partes de plantas, y en los cambios que se producen durante la maduración (Paulson *et al.*, 2008). Según Aman (1993), las paredes celulares de los forrajes en términos generales están compuestas por polisacáridos, proteínas, lignina, grupos acetilos y componentes fenólicos; constituidas por pentosas (arabinosa y xilosa), hexosas (glucosa, galactosa y manosa), 6-deoxi hexosas (ramanosa y fucosa) y ácidos urónicos (galacturónico, glucorónico y 4-O-metil glucorónico).

En términos generales los carbohidratos más abundantes de la pared celular de los forrajes son la celulosa, hemicelulosa y pectinas (Wilson, 1993; Jung, 2011). La hemicelulosa está integrada por xilanos, xiloglucanos y mananos (Aman, 1993). Las pectinas son más abundantes en las leguminosas que en las gramíneas (Jung, 2011), mientras que la lignina está compuesta por unidades fenilpropanoides de monolignol (guaicil, siringil y hidroxifenil) además de los ácidos hidroxicinámicos, ferúlico y p-cumárico los cuales están prácticamente ausentes en las paredes celulares de las leguminosas (Hartley y Ford, 1989).

Pero cuando se aíslan los polisacáridos de la pared celular, a través de extracciones secuenciales con solventes acuosos, se obtienen polisacáridos o fracciones de polisacáridos con diferencias mínimas en su estructura química; las cuales son divididas en cinco grupos: i) glucanos, que incluyen a la celulosa, a los β -glucanos con enlaces 1,3 y 1,4 y a los xiloglucanos; ii) rhamnogalacturonanos, arabinanos y arabinogalactanos; iii) mananos que incluyen a los glucomananos y galactoglucomananos; iv) xilanos y v) glucoromananos.

Las gramíneas generalmente están integradas por arabinoxilanos, xilanos, β -glucanos y celulosa y un bajo contenido de sustancias pépticas (Aman, 1993); los cuales están compuestos principalmente por glucosa, xilosa, arabinosa y ácidos urónicos. Según Aman (1993) durante el crecimiento y desarrollo de los pastos se incrementa el contenido de los carbohidratos estructurales principalmente de celulosa, xilanos y lignina; disminuyendo el contenido de proteína cruda y cenizas. Asimismo, en la fase de maduración además del incremento en glucanos, xilanos y lignina se suman en importancia los β -glucanos y arabinoxilanos, mientras que las sustancias pépticas disminuyen.

En las leguminosas, como el heno de alfalfa, los ácidos urónicos, la glucosa, arabinosa y galactosa son los residuos fibrosos más importantes en una planta joven, mientras que la glucosa, ácido urónico, xilosa y lignina son los principales componente de una planta adulta. Es importante destacar que el contenido de xilosa se incrementa hasta en seis veces durante la etapa de madurez en las leguminosas (Aman, 1993).

Adicionalmente, otro componente estructural importante que limita el aprovechamiento de las paredes celulares en las gramíneas son los ferulatos ó enlaces cruzados del ácido ferúlico (Ralph *et al.*, 1998). Según Jung (2011) la esterificación del ácido ferúlico entre la hemicelulosa (arabinoxilosa) y la lignina en las gramíneas, puede llegar a tener un efecto negativo mayor en la digestibilidad que la propia concentración de lignina. Por ello, en estudios *in vitro* realizados por

Yang y Xie (2010); Yang y Yue (2012ab) se encontró una mayor biodegradación de las paredes celulares del rastrojo de maíz en el rumen por la acción sinérgica de esterases endógenas del hongo *Neocallimastix* sp. YQ1 que liberan ácido ferúlico y por la participación de hidrolasas de los polisacáridos (celulasas y xilanasas).

En el caso de las leguminosas se sugiere la existencia de los enlaces cruzados del ácido ferúlico entre la hemicelulosa y la lignina, pero no están químicamente caracterizados (Jung, 2011).

1.1.3. Hidrólisis enzimática de la pared celular de los forrajes

En la hidrólisis de la pared celular de los forrajes en el tubo digestivo de los rumiantes participan celulasas, xilanasas (Bhat y Hazlewood, 2001) producidas por los microorganismos ruminales. Las celulasas más importantes son las endocelulasas (β -1,4 endoglucanasa, carboximetil celulosa o β -1,4 glucanohidrolasa; E.C.3.2.1.4), exocelulasas (exoglucanasa, exo β -1,4 glucanasa, celulosa β -1,4 celobiosidasa; E.C.3.2.1.91), y β glucosidasas (celobiasa o glucohidrolasa, E.C.3.2.1.21). En general, las endoglucanasas hidrolizan los polímeros a oligómeros de celulosa. Las exoglucanasas hidrolizan la celulosa a celobiosa y las β glucosidasas rompen los oligómeros de celulosa o celobiosa a glucosa (Bhat y Hazlewood, 2001). Asimismo Bhat y Hazlewood (2001) reportaron que las hemicelulasas más importantes involucradas en la degradación de la hemicelulosa son las xilanasas (E.C.3.2.1.8) y las β -1-4 xilosidasas (E.C.3.2.1.37). Las xilanasas incluyen las endoxilanasas, las cuales generan oligómeros de xilosa y las β -1-4 xilosidasas, que hidrolizan las xilosas. Otras enzimas hemicelulolíticas como la β -manosidasa (E.C.3.2.1.25), α -L-arabinofuranosidasa (E.C.3.2.1.55), α -D-glucoronidasa (E.C.3.2.1.139), α -D-galactosidasa (E.C.3.2.1.22), acetil xilano esterasa (E.C.3.2.1.72), y la ácido ferúlico esterasa (E.C.3.1.1.73).

1.1.4. Enzimas fibrolíticas exógenas

Según Van Soest (1982) la hidrólisis total de la pared celular de los forrajes en el tubo digestivo sólo llega a 65 %. Por ello se ha propuesto la utilización de enzimas fibrolíticas exógenas (EFE) como xilanasas, celulasas, esterases y lacasas de origen fúngico o bacteriano (Bhat y Hazlewood, 2001; Beauchemin *et al.*, 2003; Niamke y Sun, 2004; Adenosogan *et al.*, 2007; Márquez-Araque *et al.*, 2007; Krueger y Adesogan, 2007; Graminha *et al.*, 2008) para incrementar la hidrólisis de las paredes celulares principalmente de los forrajes. Las EFE generalmente son obtenidas a

través de fermentaciones en estado líquido y sólido por bacterias (*Bacillus* spp.) u hongos aeróbicos como *Trichoderma* spp., *Aspergillus oryzae*, *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus niger*, *Trametes* spp. (Bhat y Hazlewood, 2001; Beauchemin *et al.*, 2003; Niamke y Sun, 2004; Márquez-Araque *et al.*, 2007; Graminha *et al.*, 2008).

1.1.5. Mecanismo de acción

Beauchemin *et al.* (2004) resumieron los efectos más importantes que pueden explicar la respuesta favorable generada por la acción de las enzimas fibrolíticas exógenas en rumiantes:

1. Efectos previos a la ingesta. Las enzimas son más eficaces cuando se aplican en forma líquida al alimento antes de la ingestión. Previo a la ingestión las EFE pueden ayudar a eliminar las barreras estructurales que limitan la digestión microbiana del alimento en el rumen lo cual favorece la liberación de carbohidratos solubles. Además, la aplicación previa de las EFE puede aumentar la unión de la enzima con el sustrato, lo cual puede aumentar su resistencia a la proteólisis ruminal.
2. Efectos ruminales. La adición de enzimas fibrolíticas exógenas en la dieta aumenta la capacidad hidrolítica del rumen debido a un incremento en el ataque bacteriano, a la estimulación de poblaciones microbianas del rumen y a un efecto sinérgico con las hidrolasas de los microorganismos ruminales. El efecto general es un aumento de la actividad enzimática en el rumen mejorando la digestibilidad de los componentes fibrosos y no fibrosos de la dieta.
3. Efectos post-ruminales. Las EFE pueden permanecer viables en el intestino delgado durante un tiempo suficiente para tener un efecto hidrolítico. Estos efectos son significativos cuando las enzimas se administran directamente en el rumen o cuando son adicionadas en alimentos húmedos o en concentrados de una manera que permite una fácil solubilidad en el alimento y una rápida tasa de pasaje en el rumen.

Aunque el origen biológico de los productos enzimáticos puede ser similar, el tipo y actividad enzimática es variable, dependiendo del microorganismo y del sustrato o medio de cultivo utilizado (Beauchemin *et al.*, 2003). Al respecto, McCallister *et al.* (2001) y Beauchemin *et al.* (2003) han señalado que la variabilidad de la respuesta enzimática depende de la actividad enzimática, cantidad o proporción de enzima, especificidad

enzimática, estructura intrínseca de la pared celular de los forrajes (Jalilvand *et al.*, 2008), método de administración de la enzima y nivel de productividad del animal.

1.1.6. Efecto de las enzimas fibrolíticas exógenas en la productividad de los ovinos

Aunque las enzimas fibrolíticas exógenas adicionadas en la dieta en ovinos no han modificado la respuesta productiva (Giraldo *et al.*, 2008; Pinos-Rodríguez *et al.*, 2008; Almaraz *et al.*, 2010). Algunos estudios han reportado resultados favorables por efecto de las EFE en la producción de carne en ovinos (Cruywagen y Goosen, 2004; Cruywagen y Zyl, 2008; Gado *et al.*, 2011; Salem *et al.*, 2011; Tirado-Estrada *et al.*, 2011) obteniendo una ganancia diaria de peso mayor del 80 % en comparación con el tratamiento testigo. Las anteriores investigaciones señalan que la respuesta productiva favorable de las EFE en los ovinos se debe a un incremento en el consumo de materia seca (Tirado *et al.*, 2011), ocasionado por una mayor digestibilidad de la MS y de la fracción fibrosa de la dieta (Gado *et al.*, 2011; Salem *et al.*, 2011; Tirado-Estrada *et al.*, 2011), que se manifestó en una mayor ganancia diaria de peso y en una mejor conversión alimenticia (Cruywagen y Goosen, 2004; Cruywagen y Zyl, 2008; Gado *et al.*, 2011; Salem *et al.*, 2011; Tirado-Estrada *et al.*, 2011).

1.2. Literatura citada

- Adesogan, A.T., Kathi, S.-C.K., Arriola, G., Dean, D.B., Staples, Ch.R., 2007. Strategic addition of dietary fibrolytic enzymes for improved performance of lactating dairy cows. Florida Ruminant Nutrition Symposium. University of Florida. pp: 1-19.
- Almaraz, I., González, S.S., Pinos-Rodríguez, J.M., Miranda, L.A., 2010. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in sacco* and *in vitro* degradation of diets and on growth performance of lambs. Italian J. Anim. Sci. 9: 6-9.
- Álvarez, G., Pinos-Rodríguez, J.M., Herrera, J.G., García, J.C., González, S.S., Bárcena, R., 2009. Livest. Sci. 121: 150-154.
- Aman, P., 1993. Composition and structure of cell wall polysaccharides in forages. *In: Forage Cell Wall Estructure and Digestibility*. H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield, J. Ralph (Eds.). ASA-CSSA-SSSA, Madison, Wisconsin, USA. pp: 183-199.

- Aranda, E., Mendoza, G.D., Ramos, J.A., Da Silva, I.C., Vitti, A.C., 2010. Effect of fibrolytic enzymes on rumen microbial degradation of sugarcane fiber. *Ci. Anim. Bras. Goiania*. 11: 488-495.
- Balci, F., Dikmen, S., Gencoglu, H., Orman, A., Turkmen, I.I., Biricik, H., 2007., The effect of fibrolytic exogenous enzyme on fattening performance of steers. *BJVM*. 10: 113-118.
- Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P., Yang, W.Z., 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81: E37-47.
- Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P., Yang W.Z., Rode, L.M., 2004. Mode of action of exogenous cell wall degrading enzymes for ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 84: 13-22.
- Beauchemin, K.A., Holstshausen, L., 2011. Developments in enzyme usage in ruminants. *In: Enzymes in Farm Animal Nutrition*. M. R. Bedford, G. G. Partridge. CABI Publishing (2nd Ed.), UK. pp: 206-230.
- Bhat, K.M., Hazlewood, G.P., 2003. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. *In: Enzymes in Farm Animal Nutrition*. M. R. Bedford, G. G. Partridge. CABI Publishing (Ed.), UK. pp: 11-60.
- Cano, L.A., Aranda, E.M., Mendoza, G.D., Pérez, J., Ramos, J., 2003. Performance of steers grazing bigalta grass supplemented with sugar cane and fibrolytic enzymes. *Téc. Pec. Mex.* 41: 153-164.
- Carpita, N.C., McCann, M.C., 2008. Maize and sorghum: genetic resources for bioenergy grasses. *Trends Plant Sci.* 13: 415-420.
- Colombatto, D., Mould, F.L., Bhat, M.K., Owen, E., 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.
- Cruywagen, C.W., Goosen, L., 2004. Effect of an exogenous fibrolytic enzyme on growth rate, feed intake and feed conversion ratio in growing lambs. *South Afr. J. Anim. Sci.* 34 (Suppl. 2): 71-73.
- Cruywagen, C.W., van Zyl, W.H., 2008. Effects of a fungal enzyme cocktail treatment of high and low forage diets on lamb growth. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 151-158.

- Dean, B.D., Adesogan A.T., Krueger, N.A., Littell, R.C., 2008. Effects of treatment with ammonia or fibrolytic enzymes on chemical composition and ruminal degradability of hays produced from tropical grasses. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 68-83.
- Eun, J.S., Beauchemin, K.A., Schulze, H., 2007. Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance *in vitro* fermentation of alfalfa hay and corn silage. *J. Dairy Sci.* 90: 1440-1451.
- Gado, M. H., Salem, A.Z.M., Robinson, P.H., Hassan, M., 2009. Influence of exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk production and composition in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 154: 36-46.
- Gado, M.H, Salem, A.Z.M., Odongo, N.E., Borhami. B.E., 2011. Influence of exogenous enzymes ensiled with orange pulp on digestion and growth performance in lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 165: 131-136.
- Gallardo, I., Bárcena, R., Pinos-Rodríguez, J.M., Cobos, M., Carreón, L., Ortega, M.E. 2010. Influence of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* and *in sacco* degradation of forages for ruminants. *Italian J. Anim. Sci.* 9:e8 doi:10.4081/ijas.2010.e8.
- Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Ramos, S., Carro, M.D., 2008. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay-based diet. *J. Anim. Sci.* 86: 1617-1623.
- Gómez-Vázquez, A., Pérez, J., Mendoza, G.D., Aranda, E., Hernández, A., 2003. Fibrolytic exogenous enzymes improve performance in steers fed sugar cane and stargrass. *Livest. Prod. Sci.* 82: 249-254.
- Graminha, N.E.B., Goncalves, A.Z.L., Pirota, R.D.P.B., Balsalobre, M.A.A., Da Silva, R., Gomes, E., 2008. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 144: 1-22.
- Hartley, R.D., Ford, C.W., 1989. Phenolic constituents of plant cell walls and wall biodegradability. *In: N.G. Lewis and M.G. Paice (eds.). Plant Cell Wall Polymers: Biogenesis and Biodegradation.* American Chemical Society, Washington, DC. pp: 137-145.
- Hernández, G.P.A., 2009. Caracterización del extracto enzimático xilanolítico exógeno de *Cellulomonas flavigena* en condiciones ruminales Doctor en Ciencias, disertación. Área de Nutrición de Rumiantes. Colegio de Postgraduados, México. pp: 102.

- Hernández, P.A., Bárcena, J.R., Mendoza, G.D., Montes, M.C., González, S.S., Rojo, R., 2011. Xylanase activity from *Cellulomonas flavigena* extracts as affected by temperature and its degradation under *in vitro* ruminal conditions. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5 (7): 961-964.
- Jalilvand, G., Odongo, N.E., López, S., Naserian, A., Valizadeh, R., Eftekhari Shahrodi, F., Kebreab, E., France, J., Effects of different levels of an enzyme mixture on *in vitro* gas production parameters of contrasting forages. 2008. *Anim. Feed Sci. Technol.* 146: 289-301.
- Jung, H.G., Allen, M.S., 1995. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J. Anim. Sci.* 73: 2774-2790.
- Jung, H.G., 2011. Forage digestibility: the intersection of cell wall lignification and plant tissue anatomy. *In: III International Symposium Advances on Research Techniques for Ruminant Nutrition*, March 24-25, 2011, Pirassununga, Brazil. pp: 137-160.
- Krueger, A.N., Adesogan, A.T., 2007. Effects of different mixtures of fibrolytic enzymes on digestion and fermentation of bahiagrass hay. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 84-94.
- Márquez-Araque, A.T., Mendoza, G.D., González, S.S., Buntix, S.E., Loera, O., 2007. Actividad fibrolítica enzimas producidas por *Trametes* sp EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96 en fermentación sólida. *Interciencia.* 32: 780-785.
- McAllister, A.T., Oosting S.J., Popp, J.D., Mir, Z., Yanke, L.J., Hristov, A.N., Treacher, R.J., Cheng, K.-J., 1999. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 79: 353-360.
- McAllister, A.T., Hristov, A.N., Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Cheng, K.J., 2001. Enzymes in ruminant diets *In: Enzymes in Farm Animal Nutrition*. M. R. Bedford, G. G. Partridge. CABI Publishing (Ed.), UK. pp: 145-160.
- Niamke, N.J., Sun, N., 2004. Cellulose degradation by fungi. *In: Fungal biotechnology in agricultural, Food and Environment Applications*. D. K. Arora (ed). Marcel Dekker, Inc. New Delhi, India. 31: 363-373.
- Paulson, J., Jung, H., Raeth-Knight, M., Linn, J., 2008. Grass vs. legume forages for dairy cattle. Minnesota Nutrition Conference, USA. pp: 1-3.
- Peláez-Acero, A., Meneses-Mayo, M., Miranda-Romero, L.A., Megías-Rivas, M.D., Loera-Corral, O., 2008. Ventajas de la fermentación sólida con *Pleurotus sapidus* en ensilajes de caña de azúcar. *Arch. Zootec.* 57: 25-33.

- Peláez-Acero, A., Meneses-Mayo, M., Miranda-Romero, L.A., Ayala-Martínez, M., Crosby-Galván, M.M., Loera-Corral, O., Megías-Rivas, M.D., 2011. Enzimas fibrolíticas producidas por fermentación en estado sólido para mejorar los ensilajes de caña de azúcar. *Agrociencia*. 45: 675-685.
- Pinos-Rodríguez, J.M., González, S.S., Mendoza, G.D., Bárcena, R., Cobos, M.A., Hernández, A., Ortega, M.E., 2002. Effects of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 80: 3016-3020.
- Pinos-Rodríguez, J.M., Moreno, R., González, S.S., Robinson, P.H., Mendoza, G., Álvarez, G., 2008. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and digestibility of total mixed rations fed to lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 142: 210-219.
- Ralph, J., Hatfield, R.D., Grabber, J.H., Jung, H.G., Quideau, S., Helm, R.F., 1998. Cell wall cross-linking in grasses by ferulates and diferulates. *In: N.G. Lewis, S. Sarkanen (eds.). Lignin and Lignan Biosynthesis.* ACS, Washington, DC. pp: 209-236.
- Rodrigues, M.A.M., Pinto, P., Bezerra, R.M.F., Dias, A.A., Guedes, C.V.M., Cardoso, V.M.G., Cone, J.W., Ferreira, L.M.M., Colaco, J., Sequeira, C.A., 2008. Effect of enzyme extracts isolated from white-rot fungi on chemical composition and *in vitro* digestibility of wheat straw. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141: 326-338.
- Salem, A.Z.M., El-Adawy, M.M., Gado, H., Camacho, L.M., González-Ronquillo, M., Alsersy, H., Borhami, B., 2011. Effects of exogenous enzymes on nutrients digestibility and growth performance in sheep and goats. *Trop. Subtrop. Agroecosystems*. 14: 867-874.
- Salem, A.Z.M., Hassan, A.A., Khalil, M.S., Gado, H.M., Alsersy, H., Simbaya, J., 2012. Effects of sun-drying and exogenous enzymes on nutrients intake, digestibility and nitrogen utilization in sheep fed *Atriplex halimus* foliages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 171: 128-139.
- Tang, X S., Tayo, G.O., Tan, Z.L., Sun, Z.H., Shen, L.X., Zhou, C.S., Xiao, W.J., Ren, G.P., Han, X.F., Shen, S.B., 2008. Effects of yeast culture and fibrolytic enzyme supplementation on *in vitro* fermentation characteristics of low-quality cereal straws. *J. Anim. Sci.* 86: 1164-117.
- Tirado-Estrada, G., Mendoza-Martínez, G.D., Pinos-Rodríguez, J.M., Quezada-Tristán, T., Guevara-Lara, F., 2011. Effects of two fibrolytic enzyme mixtures on growth

- performance, digestion and ruminal fermentation in lambs fed corn stover based diets. *J. Appl. Anim. Res.* 39: 158-160.
- Van Soest, P.J., 1982. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press, Ithaca, N.Y. USA. pp: 374.
- Villegas-Castañeda, M., Meneses-Mayo, M., Miranda-Romero, L.A., Loera-Corral, O., 2010. Producción de gas *in vitro* y desaparición de la materia seca del cultivo sólido con hongos ligninolíticos. *Agrociencia*. 44: 917-929.
- Wilson, J.R., 1993. Organization of forage plant tissues. *In* H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield, and J. Ralph (eds.). *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, USA. pp: 1-32.
- Yang, H.J., Xie, C.Y., 2010. Assessment of fibrolytic activities of 18 commercial enzyme products and their abilities to degrade the cell wall fraction of corn stalks in *in vitro* enzymatic and ruminal batch cultures. *Anim. feed Sci. Technol.* 159: 110-121.
- Yang, H.J., Yue, Q., 2012a. Effect of glucose addition and N sources in defined media on fibrolytic activity profiles of *Neocallimastix* sp. YQ1 grown on corn stover. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 96: 554-562.
- Yang, H.J., Yue, Q., 2012b. The modification of glucose levels and N source in the Hungate's medium to stimulates the production of fibrolytic enzymes of *Anaeromyces* sp. YQ3 grown on corn stalks. *Anim. feed Sci. Technol.* 171: 146-153.

Cuadro 1.1 Respuesta productiva de corderos alimentados con dietas adicionadas con enzimas fibrolíticas exógenas

Fuente	Variable	Testigo	Enzima	Referencia
Forraje:concentrado 67:33	GDP (g d ⁻¹)	129	170*	Cruywagen y Goosen, 2004 [¶]
	CMS (g d ⁻¹)	1014	1079	
	CA (CMS GDP ⁻¹)	7.87	6.35*	
Forraje:concentrado 60:40	GDP (g d ⁻¹)	99	118**	Cruywagen y Zyl, 2008
	CMS (g d ⁻¹)	1054	1031	
	CA (CMS GDP ⁻¹)	10.7	8.75*	
Forraje <i>ad libitum</i> + concentrado	GDP (g d ⁻¹)	72	103*	Salem <i>et al.</i> , 2011
	CMS (g d ⁻¹)	742	744	
	CA (CMS GDP ⁻¹)	10.4	7.3*	
Forraje:concentrado 40:60	GDP (g d ⁻¹)	130	250*	Gado <i>et al.</i> , 2011
	CMS (g d ⁻¹)	780	820	
	CA (CMS GDP ⁻¹)	6.20	3.20*	
Forraje:concentrado 56:44	GDP (g d ⁻¹)	115	177*	Tirado <i>et al.</i> , 2011 [¶]
	CMS (g d ⁻¹)	817	911*	
	CA (CMS GDP ⁻¹)	7.10	5.15*	
Promedio ¹				Incremento %
	GDP (g d ⁻¹)	89	163	83.2
	CMS, (g d ⁻¹)	670	917	36.7
	CA (CMS GDP ⁻¹)	8.4	6.1	27.2

¹Promedio del total de las medias

** , * = P<0.01; P<0.05; respectivamente

[¶]Los valores del efecto con enzima fueron calculados con dos valores de medias.

Efecto de extractos enzimáticos fibrolíticos de *Cellulomonas flavigena*, *Fomes* sp. EUM1 y *Trichoderma longibrachiatum* en la respuesta productiva y en la digestibilidad de corderos

Effects of fibrolytic enzyme extracts from *Cellulomonas flavigena*, *Fomes* sp. EUM1 and *Trichoderma longibrachiatum* on digestibility and productive performance of lambs

2. Efecto de extractos enzimáticos fibrolíticos de *Cellulomonas flavigena*, *Fomes* sp. EUM1 y *Trichoderma longibrachiatum* en la respuesta productiva y en la digestibilidad de corderos¹

2.1. Resumen

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de tres extractos de enzimas fibrolíticas por su efecto en el crecimiento y la digestibilidad del alimento en corderos, utilizando dietas con 60 % de forraje. Veinte corderos Pelibuey (peso inicial \pm 26.14 kg), fueron distribuidos en un diseño completamente al azar. El experimento consistió en la adición de extractos enzimáticos (mL kg^{-1} de materia seca de alimento): testigo (0 mL), 3.5 mL de extracto comercial de *Trichoderma longibrachiatum*, 21.1 mL de extracto de *Fomes* sp. EUM1 y 2.47 mL de extracto de *Cellulomonas flavigena*. No hubo efectos en el peso final y en el consumo de materia seca, pero la ganancia diaria de peso y la conversión alimenticia se afectó negativamente cuando se adicionó extracto de *Cellulomonas flavigena* ($P < 0.05$). La adición de extractos de enzimas exógenos aumentó el porcentaje de butirato en el fluido ruminal ($P < 0.05$). La digestibilidad se vio afectada negativamente con el extracto de *C. flavigena*. No se observaron efectos benéficos en la digestión ni en el comportamiento productivo de los corderos con los extractos evaluados.

2.2. Abstract

The objective of this experiment was to evaluate the effect of extracts of three fibrolytic enzymatics for their effect on lamb growth and feed digestibility, using diets with 60 % forage. Twenty Pelibuey lambs were used (initial weight 26.14 kg), distributed in a completely randomised design. The experiment involved the addition of enzymatics extracts (mL kg^{-1} of dry matter (DM) of feed: control (0 mL), 3.5 mL of *Trichoderma longibrachiatum* commercial extract, 21.1 mL of *Fomes* sp. EUM1 extract and 2.47 mL of *Cellulomonas flavigena* extract. There were no effects on the final weight and dry matter intake, but daily weight gain and feed

¹ Enviado a Journal of Animal Feed Science for special issue "Exogenous Enzymes in Animal Nutrition: Benefits and limitations". Recibido 5 de octubre del 2012.

conversion was shown to be negatively affected when *Cellulomonas flavigena* extract was added ($P < 0.05$). The addition of exogenous enzyme extracts increased the percentage of butyrate in rumen fluid ($P < 0.05$). Digestibility was negatively affected with *C. flavigena* extract. There were no beneficial effects to digestion or in productive performance of lambs with the evaluated extracts.

Palabras claves: enzimas fibrolíticas, digestibilidad, *Cellulomonas flavigena*, *Fomes* sp. EUM1, *Trichoderma longibrachiatum*.

2.3. Introducción

Una de las aplicaciones de la biotecnología en nutrición de rumiantes ha sido la adición de enzimas fibrolíticas exógenas para mejorar la digestibilidad de carbohidratos estructurales en forrajes de alta calidad (Pinos *et al.*, 2002; Colombatto *et al.*, 2003; Amadou *et al.*, 2004; Dean *et al.*, 2008). Estas enzimas son producidas comercialmente mediante fermentación sólida o líquida de cepas de hongos como *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* y *Trichoderma viride* (Nadeau *et al.*, 2000; McAllister *et al.*, 2001). Pero los resultados son variables e inconsistentes cuando estos productos son adicionados a forrajes de mala calidad (Avellaneda *et al.*, 2009; Carreón *et al.*, 2010; Gallardo *et al.*, 2010), los cuales se caracterizan por un alto contenido de FDN y una digestibilidad ruminal reducida (Tan *et al.*, 1996; Álvarez y Combellas, 2005). Por lo tanto, es necesario identificar extractos enzimáticos capaces de mejorar la digestión de este tipo de sustrato lignocelulósico. Algunas enzimas potenciales previamente evaluadas provienen de hongos de la pudrición blanca como *Fomes fomentarius* (Villegas-Castañeda *et al.*, 2010), o de bacterias como *Cellulomonas flavigena* (Hernández *et al.*, 2011). Estos estudios sugieren que la digestión *in vitro* o *in situ* ruminal de pajas se puede aumentar mediante la adición de extractos de estos organismos (Márquez *et al.*, 2007; Hernández, 2009; Villegas-Castañeda *et al.*, 2010). En la literatura revisada se encontraron pocos estudios realizados con rumiantes, por lo cual el objetivo de este experimento fue evaluar los extractos enzimáticos de *C. flavigena*, *F.* sp. EUM1 y un producto comercial de *Trichoderma longibrachiatum* en la respuesta productiva, consumo y digestibilidad de nutrientes y en las variables ruminales en corderos alimentados con una dieta con 60 % de forraje.

2.4. Materiales y métodos

2.4.1. Animales y alimentación

El estudio se realizó de diciembre a febrero del 2010 en la Granja Experimental de Ganadería del Colegio de Postgraduados en el Campus Montecillo, Estado de México, México; bajo la supervisión del Comité Académico del Colegio de Postgraduados, de acuerdo con la regulación establecida en la Ley de Protección Animal decretada por el Estado de México, México. Se utilizaron 20 corderos Pelibuey (26.14 ± 1.73 kg de peso vivo inicial), los cuales fueron distribuidos al azar en jaulas metabólicas individuales para evaluar los extractos enzimáticos (tratamientos). Previo al inicio de la prueba, todos los animales fueron desparasitados con Ivermectina, y vitaminas (A, D y E), las cuales fueron proporcionadas en el período de 10 días de adaptación a la dieta. La dieta se suministró a las 08:00 h y 16:00 h y se formuló de acuerdo con las recomendaciones del NRC (1985); y contenía 60 % de forraje (30 % de rastrojo de maíz y 30 % de heno de alfalfa) y 40 % de concentrado (15 % de maíz, 10 % de sorgo, 6 % de pasta soya, 7 % melaza, 1 % de urea y 1 % de una premezcla de minerales). La composición de la dieta en MS (ID 934.01) fue de 918.8 g kg^{-1} y de proteína cruda 156.4 g kg^{-1} (AOAC, 2005; ID 954.01), 420.4 g kg^{-1} de FDNa (FDNa analizada con amilasa termoestable sin sulfito de sodio y expresada incluyendo cenizas residuales) y 247.4 g kg^{-1} de FDA (expresada incluyendo cenizas residuales) de acuerdo con el procedimiento descrito por Van Soest *et al.* (1991).

2.4.2. Enzimas

Las enzimas utilizadas fueron de *T. longibrachiatum* (Promote NET, Cargill Corp., Minneapolis, MN, USA), *F. sp.* EUM1 y *C. flavigena*. El extracto de *F. sp.* EUM1 se obtuvo a través de una fermentación sólida con rastrojo de maíz (Villegas-Castañeda *et al.*, 2010) y *C. flavigena* fue obtenida a través de una fermentación líquida realizada con bagazo de caña de azúcar (Vega-Estrada *et al.*, 2002). El contenido de proteína (Bradford, 1976) y la actividad celulolítica y xilanolítica (Loera y Cordova, 2003) se determinaron mediante la expresión de la actividad (UI) por mL del extracto, definiendo la UI como la cantidad de enzima que libera $1 \mu\text{mol}$ de xilosa (xilanasas) o glucosa (celulasas) por mL min^{-1} (Cuadro 1.1). Con esta información, la dosis

enzimática se seleccionó (mL de extracto kg⁻¹ MS de alimento) con base en la actividad xilanolítica correspondiente.

2.4.3. Tratamientos

Los tratamientos fueron dosis equivalentes a 47.50 UI mL⁻¹ de actividad xilanolítica del extracto por kg MS de alimento: testigo (0 mL), 3.5 mL de extracto de *T. longibrachiatum*, 21.1 mL of extracto de *F. sp.* EUM1 y 2.47 mL of extracto de *C. flavigena*. Los extractos se diluyeron en 300 mL de agua destilada. Dicha solución se asperjó en el forraje, antes de ser mezclada con los otros alimentos de la dieta, previo a la alimentación de los corderos.

2.4.4. Respuesta productiva

La prueba fue de 42 días, en la cual cada cordero se pesaba cada 14 días después de un ayuno de 12 h para determinar la ganancia diaria de peso (GDP, g d⁻¹). El consumo de materia seca de alimento (CMS, kg d⁻¹ MS) se registró diariamente, y la conversión alimenticia (CA) se calculó dividiendo el CMS entre la GDP. A la mitad de la prueba, se recolectaron heces directamente de cada cordero por 5 días consecutivos, para determinar la digestibilidad de la MS con respecto a la concentración de cenizas insolubles en ácido que se utilizó como un marcador interno (Keulen y Young, 1977). Además se determinó la digestibilidad de la FDN y FDA (Van Soest *et al.*, 1991).

2.4.5. Variables ruminales

Una muestra de 50 mL de fluido ruminal se recolectó utilizando una sonda esofágica en cada cordero durante el último día de la prueba. El pH se midió inmediatamente con un potenciómetro portátil (ORION, modelo SA 210, USA) y el resto del fluido ruminal se conservó acidificándolo con 2 mL de ácido metafosfórico al 25%. Las muestras se mantuvieron en congelación (-20°C) hasta realizar el análisis de los AGV por cromatografía de gases (Erwin *et al.*, 1961) usando 2 µL inyectados a un cromatógrafo de gases Perkin Elmer (modelo Claurus 500, USA) con automuestreador y equipado con una columna capilar FFAP (15 m longitud), temperatura de inyector de 240 °C, detector de ionización de flama (FID) de 250 °C y de horno de 80 °C (1 min)

con incrementos de $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta alcanzar $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3 min) y una velocidad de gases (H y N) de 40 mL min^{-1} y 400 mL min^{-1} para el aire. La concentración N-NH₃ se determinó por espectrofotometría (McCullough, 1967). Una muestra (2 mL) del líquido ruminal descongelado se centrifugó 10 min a 3000 rpm, del sobrenadante se colectaron 20 μL y se depositaron en tubos de ensaye (10 mL) adicionando 1 mL de fenol y 1 mL de hipoclorito de sodio. Las muestras se incubaron 30 min en baño maría a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se adicionaron 5 mL de agua destilada para su dilución, se agitaron en un vortex (Genie 2, modelo G-560, USA) y se leyó en un espectrofotómetro de luz ultravioleta visible CARY 1-E VARIAN (Perkin Elmer, modelo lamda-40, USA) a una DO de 630nm.

2.4.6. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados de acuerdo con un diseño experimental completamente al azar considerando cuatro tratamientos y cinco repeticiones. Se utilizó el programa GLM del SAS 9.0 (2002) y las medias se compararon con la prueba de Tukey (Steel *et al.*, 1997).

2.5. Resultados

2.5.1. Respuesta productiva y digestibilidad

No se observaron cambios ($P>0.10$) en los pesos finales y en el consumo de materia seca. Las ganancias diarias de peso y la conversión alimenticia sólo mostró diferencias ($P<0.05$), con la mejor tasa observada en el tratamiento testigo (Cuadro 2.2). La digestibilidad de la MS, FDN y FDA se redujo ($P <0.01$) con el extracto de *C. flavigena* mientras que los demás extractos no tuvieron ningún efecto (Cuadro 2.3).

2.5.2. Fermentación ruminal

Los extractos de *C. flavigena* y *T. longibrachiatum* mostraron un incremento ($P<0.05$) en el contenido de butirato, mientras que el de *F. sp.* EUM1 fue intermedio, y el testigo fue aún menor (Cuadro 2.4). Las demás variables (pH, N-NH₃, acetato y propionato) ruminales no fueron modificadas por las enzimas exógenas.

2.6. Discusión

Los resultados de consumo de alimento, ganancia de peso y conversión alimenticia son similares a los reportados por autores que utilizaron enzimas fibrolíticas exógenas, sin observar cambios en el consumo y en la respuesta productiva en rumiantes (Krause *et al.*, 1998; Pinos *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; Pinos *et al.*, 2008). En experimentos con corderos usando dietas con una alta proporción de forraje con dosis de 12 g⁻¹ d de enzima obtenidos a partir de *Aspergillus niger* y *T. longibrachiatum* no se presentó ningún efecto en la digestibilidad ni en el consumo de alimento (Giraldo *et al.*, 2008). Sin embargo, en otros estudios con dosis más elevadas de enzima (60 g⁻¹ d) de *T. longibrachiatum* en novillos, hubo un aumento de peso y mejor conversión alimenticia (Balci *et al.*, 2007); lo que indica que la dosis puede ser un factor en la respuesta productiva.

El uso de enzimas de *Trichoderma* en pruebas *in vitro* e *in vivo* mostraron un aumento en la actividad microbiana en función del sustrato y la dosis utilizada (Wallace *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2006; Giraldo *et al.*, 2008; Gómez-Vázquez *et al.*, 2011), y cuando las enzimas afectaron la pared celular, la digestibilidad de los forrajes se incrementó (Castro *et al.*, 2004; Gómez-Vázquez *et al.*, 2011). El efecto de la adición de las enzimas producidas por el hongo *F. fomentarius* en dietas para rumiantes se ha evaluado *in vivo*, y también hay registros que muestran efectos beneficiosos de las enzimas exógenas de este hongo en incubaciones *in vitro* (Levin y Forchiassin, 1997; Márquez-Araque *et al.*, 2007). Asimismo, en condiciones *in situ* hay incrementos en la digestibilidad cuando el extracto de *C. flavigena* se ha adicionado en heno de alfalfa y en subproductos agrícolas como rastrojo de maíz y caña de azúcar (Hernández, 2009). Sin embargo, los resultados del presente estudio no mostraron efectos benéficos *in vivo* por la adición de ambos productos enzimáticos.

Varios autores coinciden con las observaciones de este experimento con respecto a la falta de respuesta en pH, N-NH₃ y AGV (Hristov *et al.*, 2000; Pinos *et al.*, 2002; Beauchemin *et al.*, 2003), por efecto de enzimas fibrolíticas de *A. niger* y enzimas *T. longibrachiatum*. Sin embargo, Giraldo *et al.* (2007) reportaron incrementos en la producción de ácido acético y butírico *in vitro* al adicionar enzimas de *T. longibrachiatum* en una dieta con 70 % de heno de gramínea y 30 % de concentrado, pero sin cambios en pH ni en la producción de ácido propiónico. Además, Villegas-Castañeda *et al.* (2010) al adicionar extracto de *F. fomentarius* en paja de sorgo, en una evaluación de producción de gas *in vitro*, no observaron cambios en la producción total de AGV ni en la concentración de N-NH₃ después de 12 y 24 h de incubación.

El incremento de ácido butírico reportado en este experimento, se pudo generar por la liberación de carbohidratos sencillos como glucosa, posiblemente como resultado de la presencia de enzimas fibrolíticas de *T. longibrachiatum* y *C. flavigena*. Estas enzimas han aumentado las poblaciones de protozoos que producen butirato (Luther *et al.*, 1966; Williams *et al.*, 1986), en particular *Dasytricha ruminantium* (Yarlett *et al.*, 1985). Considerando que un aumento en la digestibilidad de la fibra no está asociada con la producción de butirato, un incremento en la actividad de la bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* (Diez-González *et al.*, 1999; Marounek y Duskova, 1999), también puede aumentar el ácido butírico en el rumen. La disminución en la digestibilidad por el extracto de *C. flavigena* podría estar asociada con la liberación de glucosa, la cual inhibió la actividad de las enzimas celulolíticas de algunos microorganismos micóticos del rumen (Barichievich y Calza, 1990). Adicionalmente varios autores (Martínez-Trujillo *et al.*, 2003; Barrera-Islas *et al.*, 2007; Mejía-Castillo *et al.*, 2008; Pérez-Ávalos *et al.*, 2008) también han reportado contenidos de endo-1,4- β -xilanasas, β -glucosidasas y glucoronoarabinoxilanas en el extracto de *C. flavigena*, las cuales también pudieron contribuir en la inhibición enzimática.

2.7. Conclusión

La adición de enzimas obtenidas de *Fomes* sp. EUM1 y *Cellulomonas flavigena* en el forraje de la dieta no incrementa la digestión ni el comportamiento productivo en corderos en las dosis evaluadas. El extracto de *Cellulomonas flavigena* puede afectar negativamente la digestibilidad *in vivo*.

2.8. Literatura citada

- Álvarez, R., Combellas, J., 2005. Evaluation of poultry litter on sorghum straw intake and dry matter disappearance using dry cows. Rev. Bras. Zootec. 34: 584-588.
- AOAC., 2005. Official Methods of Analytical (18th Ed.) Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC. pp: 1298.
- Avellaneda, J.H., Pinos-Rodríguez, J.M., González-Muñoz, S.S., Bárcena R., Hernández, A., Cobos, M., Hernández, D., Montañez, D.O., 2009. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and digestion of guineas grass hay. Anim. Feed Sci. Technol. 149: 70-77.

- Balci, F., Dikmen, S., Gencoglu, H., Orman, A., Turkmen, I.I., Biricik, H., 2007. The effect of fibrolytic exogenous enzymes on fattening performance of steers. *Blg. J. Vet. Met.* 10: 113-118.
- Barichievich, E.M., Calza, R.E., 1990. Supernatant protein and cellulase activities of the anaerobic ruminal fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 43-48.
- Barrera-Islas, G.A., Ramos-Valdivia, A.C., Salgado, L.M., Ponce-Noyola, T., 2007. Characterisation of a beta-glucosidase produced by a high-specific growth-rate mutant of *Cellulomonas flavigena*. *Curr. Microbiol.* 54: 266-270.
- Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P., Yang, W.Z., 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilisation by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81: E37-47.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-252.
- Carreón, L., Pinos-Rodríguez, J., Bárcena, R., González, S., Mendoza, G., 2010. Influence of fibrolytic enzymes on ruminal disappearance and fermentation in steers fed diets with short and long particle length of forage. *Italian J. Anim. Sci.* 9: e17.
- Castro, A.L. De Aguiar Paiva, P.A., Souza Dias, E., Dos Santos, J., 2004. Nutritional value and degradability alterations of cotton textile mill waste after biological treatment with *Pleurotus sajorcaju*. *Cienc. Agrotec. Lavras.* 28: 608-613.
- Colombatto, D., Morgavi, D.P., Furtado, A.F., Beauchemin, K.A., 2003. Screening of exogenous enzymes for ruminant diet: relationship between biochemical characteristics and *in vitro* ruminal degradation. *J. Anim. Sci.* 81: 2628-2638.
- Dean, D.B., Adesogan, A.T., Krueger, N.A., Littell, R.C., 2008. Effects of treatment with ammonia or fibrolytic enzymes on chemical composition and ruminal degradability of hays produced from tropical grasses. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 68-83.
- Diez-Gonzalez, F., Bond, D.R., Jennings, E. Russell J.B., 1999. Alternative schemes of butyrate production in *Butyrivibrio fibrisolvens* and their relationship to acetate utilisation lactate production, and phylogeny. *Arch. Microbiol.* 171: 324-330.
- Erwin, E.S., Marco, G.T., Emery, E.M., 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44: 1768-1771.

- Gallardo, I., Bárcena, R., Pinos-Rodríguez, J.M., Cobos, M., Carreón, L. Ortega, M.E., 2010. Influence of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* and *in sacco* degradation of forages for ruminants. Italian J. Anim. Sci. 9: e8.
- Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Ramos, S., Carro, M.D., 2008. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay-based diet. J. Anim. Sci. 86: 1617-1623.
- Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Carro, M.D., 2007. Effects of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in Rusitec fermenters. J. Anim. Sci. 85: 1962-1970.
- Hernández, G.P.A., 2009. Caracterización del extracto enzimático xilanolítico exógeno de *Cellulomonas flavigena* en condiciones ruminales. Doctor en Ciencias, disertación. Área de Nutrición de Rumiantes. Colegio de Postgraduados, México. pp: 102.
- Hernández, P.A., Bárcena, J.R., Mendoza, G.D., Montes, C.S., González, S.S., Rojo, R., 2011. Xylanase activity from *Cellulomonas flavigena* extracts as affected by temperature and its degradation under *in vitro* ruminal conditions. Afr. J. Microb. Res. 5: 961-964.
- Hristov, A.N., McAllister, T.A., Cheng, K.J., 2000. Intra-ruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharidase-degrading enzymes: Effects on nutrient digestion in cattle fed a barley grain diet. J. Anim. Sci. 78: 477-487.
- Gómez-Vázquez, Mendoza, G.D., Aranda, E., Pérez, J., Hernández, A., Pinos-Rodríguez, J.M., 2011. Influence of fibrolytic enzymes on growth performance and digestion in steers grazing stargrass and supplemented with fermented sugarcane. J. Appl. Anim. Res. 39: 77-79.
- Keulen, J.V., Young, B.A., 1977. Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. J. Anim. Sci. 44: 282-287.
- Krause, M., Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Farr, B.I., Norgaard, P., 1998. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. J. Anim. Sci. 76: 2912-2920.
- Levin, L., Forchiassin, F., 1997. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de celulasas por *Trametes trogii*. Rev. Arg. Microbiol. 29: 16-23.

- Lewis, G.E., Hunt, C.W., Sanchez, W.K., Treacher, R., Pritchard, G.T., Feng, P., 1996. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. *J. Anim. Sci.* 74: 3020-3028.
- Loera, O., Córdova, J., 2003. Improvement of xylanase production by a parasexual Cross between *Aspergillus niger* strains. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46: 177-181.
- Luther, R., Treacle, A., Burroughs, W., 1966. Influence of rumen protozoa on volatile acid production and ration digestibility in lambs. *J. Anim. Sci.* 25: 1116-1122.
- Márquez-Araque, A.T., Mendoza-Martínez, G.D., González-Muñoz, S.S., Búntinx-Dios, S.E., Loera-Corral, O., 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes sp.* EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. *Interciencia* 32: 780-785.
- Martínez-Trujillo, A., Pérez-Avalos, O., Ponce-Noyola, T., 2003. Enzymatic properties of a purified xylanase from mutant PN-120 of *Cellulomonas flavigena*. *Enzyme Microb. Technol.* 32: 401-406.
- Martins, A.S., Vieira, P.F., Berchielli, T.T., Prado I.N., Moletta, J.L., 2006. Intake and apparent total tract digestibility in cattle supplemented with fibrolytic enzymes. *Rev. Bras. Zootec.* 35: 2118-2124.
- Marounek, M., Duškov, D., 1999. Metabolism of pectin in rumen bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Prevotella ruminicola*. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 429-433.
- McAllister, T.A., Hristov, A.N., Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Cheng, K.Jr., 2001. Enzymes in ruminants diets. In: M. Bedford, G. Partridge. (Editors). *Enzyme in Farm Animal Nutrition*. CABI Publishing, Oxon. UK. pp: 273-298.
- McCullough, H., 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clin. Chem.* 17: 297-304.
- Mejía-Castillo, T., Hidalgo-Lara, M.E., Briebe, L.G., Ortega-López, J., 2008. Purification, characterisation and modular organisation of a cellulose-binding protein, CBP105, a processive beta-1,4-endoglucanase from *Cellulomonas flavigena*. *Biotechnol. Lett.* 30: 681-687.
- Nadeau, E.M., Rusell, J.R., Buxton, D.R., 2000. Intake, digestibility and composition of orchard grass and alfalfa silage treated with cellulase, inoculants, and formic acid fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 78: 2980-2989.

- NRC., 1985. Nutrient Requirements of Sheep. 6th Ed. National Academy Press. Washington, D.D. USA. pp: 99.
- Pérez-Avalos, O., Sánchez-Herrera, L.M., Salgado, L.M., Ponce-Noyola, T., 2008. A bifunctional endoglucanase/endoxyranase from *Cellulomonas flavigena* with potential use in industrial processes at different pH. *Curr. Microbiol.* 57: 39-44.
- Pinos-Rodríguez, J. M., González, S.S., Mendoza, G.D., Bárcena, R., Cobos, M.A., Hernández, A., Ortega, M.E., 2002. Effects of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 80: 3016-3020.
- Pinos-Rodríguez, J. M., Moreno, R., González, S.S., Robinson, P.H., Mendoza, G., Álvarez, G., 2008. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and digestibility of total mixed rations fed to lambs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 142: 210-219.
- SAS., 2002. SAS User's Guide: Statistics (Release 8.02). SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA.
- Steel, G.D.R., Torrie, J.H., Dickey, D.A., 1997. Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach. The McGraw-Hill Companies, Inc. pp: 666.
- Tan, Z.L., Chen, H.P., Xing, T.X., 1996. Comparative study on fibre characteristics of rice and wheat straw. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 9: 51-56.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition *J. Dairy. Sci.* 74: 3583-3592.
- Vega-Estrada, J., Flores-Contreras, L.B., Santiago, A., Magaña-Plaza, I., Montes-Horcasitas, C., 2002. Draw-fill batch culture mode for production of xylanases by *Cellulomonas flavigena* on sugar cane bagasse. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 435-438.
- Villegas-Castañeda, M., Meneses-Mayo, M., Miranda-Romero, L.A., Loera-Corral, O., 2010. Producción de gas *in vitro* y desaparición de la materia seca del cultivo sólido con hongos ligninolíticos. *Agrociencia.* 44: 917-929.
- Wallace, J.R., Wallace, A.J.S., McKain, N., Nsereko, L.V., Hartnell, F.G., 2001. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 79: 1905-1916.
- Wang, Y., Spratling, B.M., ZoBell, D.R., Wiedmeier, R.D., McAllister, T.A., 2004. Effect of alkali pre-treatment of wheat straw on the efficacy of exogenous fibrolytic enzymes. *J. Anim. Sci.* 82: 198-208.

- Williams, A.G., Ellis, A.B., Coleman, G.S., 1986. Subcellular distribution of polysaccharide depolymerase and glycoside hydrolase enzymes in rumen ciliate protozoa. *Curr. Microbiol.* 13: 139-147.
- Yarlett, N., Lloyd, J.D., Williams, A.G., 1985. Butyrate formation from glucose by the rumen protozoon *Dasytricha ruminantium*. *Biochem. J.* 228: 187-192

Cuadro 2.1 Actividad enzimática y contenido de proteína de los extractos enzimáticos fibrolíticos

Elementos ^(c)	Fuente enzimática			EE ^a
	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>Fomes sp.</i> EUM1	<i>Cellulomonas flavigena</i>	
Actividades enzimáticas, UI mL ⁻¹				
Celulasas ^a	3.47	2.85	2.66	1.19
Xilanasas ^b	13.57	2.25	19.19	1.04
Lacasas ^c	-	0.021	-	0.003
Proteína, mg mL ⁻¹	0.49	0.31	0.46	0.01

^a Error estándar de la media

^b μmol of glucosa liberada por mL min⁻¹

^c μmol of xilosa liberada por mL min⁻¹

^d μmol of ABTS oxidado por mL min⁻¹.

Cuadro 2.2 Efecto de enzimas fibrolíticas en la respuesta productiva de corderos

Elementos	Enzimas				EE ^a	P
	Testigo	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>Fomes sp.</i> EUM1	<i>Cellulomonas flavigena</i>		
PV inicial, kg	25.68	26.26	26.16	26.46	0.87	0.93
PV final, kg	34.24	32.94	34.74	32.62	1.14	0.52
CMS, g d ⁻¹	1082	1030	1124	1116	53	0.60
GDP, g d ⁻¹	220 ^b	158 ^c	206 ^{bc}	160 ^c	17	0.04
CA, CMS GDP ⁻¹	5.17	7.78	5.76	7.53	0.57	0.01

^a Error estándar de la media

^{b,c} Media con letra distinta entre líneas son diferentes (P<0.05).

Cuadro 2.3 Efecto de enzimas fibrolíticas en la digestibilidad de la dieta consumida por los corderos

Elementos	Enzimas			EE ^a	P	
	Testigo	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>Fomes sp.</i> EUM1			<i>Cellulomonas flavigena</i>
MS, g kg ⁻¹	770.1 ^b	744.9 ^b	724.4 ^b	605.1 ^c	18.4	0.0001
FDN, g kg ⁻¹	703.6 ^b	675.0 ^b	644.6 ^b	527.8 ^c	21.6	0.0002
FDA, g kg ⁻¹	598.7 ^b	598.8 ^b	586.7 ^b	405.4 ^c	26.67	0.0002

^aError estándar de la media

^{b,c}Media con letra distinta entre líneas son diferentes (P<0.05).

Cuadro 2.4 Efecto de enzimas fibrolíticas en las variables de fermentación ruminal en los corderos

Elementos	Enzimas			EE ^a	P	
	Testigo	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>Fomes sp.</i> EUM1			<i>Cellulomonas flavigena</i>
pH	6.74	6.59	6.83	6.86	0.11	0.32
N-NH ₃ , mg dL ⁻¹	9.48	10.22	6.96	9.98	1.82	0.58
Ácidos grasos volátiles, (mol 100 mol ⁻¹)						
Acético	62.44	60.24	63.45	60.84	0.96	0.11
Propiónico	26.86	25.27	23.16	25.11	1.05	0.14
Butírico	10.70 ^c	14.49 ^b	13.38 ^{bc}	14.05 ^b	0.91	0.04
AGV total, mM L ⁻¹	72.11	93.32	79.09	91.94	7.80	0.20

^aError estándar de la media

^{b,c}Media con letra distinta entre líneas son diferentes (P<0.05).

Efecto del extracto enzimático fibrolítico de *Cellulomonas flavigena* en la respuesta productiva, digestibilidad y variables ruminales en corderos

Effect of a fibrolytic enzymatic extract from *Cellulomonas flavigena* on productive performance, digestibility and ruminal variables in lambs

3. Efecto del extracto enzimático fibrolítico de *Cellulomonas flavigena* en la respuesta productiva, digestibilidad y variables ruminales en corderos²

3.1. Resumen

El objetivo de este experimento fue evaluar el extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena* por su efecto en la respuesta productiva, digestibilidad y variables ruminales en corderos alimentados con una dieta con 60 % de forraje. Se usaron 24 corderos Pelibuey-Kathadin (peso vivo inicial \pm 23.28 kg) y se distribuyeron en un diseño completamente al azar con tres tratamientos: 0, 5.0 y 7.5 mL de extracto kg^{-1} MS de alimento. No hubo efecto ($P>0.05$) en el consumo de MS, ganancia diaria de peso y conversión alimenticia. El incremento en la dosis enzimática disminuyó linealmente la digestibilidad aparente de la MS ($P=0.06$), FDN ($P=0.10$) y FDA ($P=0.06$). La concentración de N-NH₃ presentó una disminución lineal ($P<0.05$) y la concentración de AGV se aumentó linealmente ($P<0.05$), mientras que el ácido butírico mostró una respuesta cuadrática ($P<0.05$). La incorporación del extracto de *Cellulomonas flavigena* en la dieta no aumentó la digestión ni la respuesta productiva en corderos con las dosis evaluadas.

3.2. Abstract

The objective of this experiment was to evaluate the extract from *Cellulomonas flavigena* for their effect on productive performance, digestibility and ruminal variables of lambs fed a diet with 60 % forage. Twenty-four Pelibuey-Kathadin lambs (23.28 kg initial weight) were distributed in a completely randomised design with three treatments: 0, 5.0 and 7.5 mL of extract kg^{-1} DM of feed. There was no effect ($P>0.05$) on DM intake, daily gain or feed conversion. An increase in the enzymatic dose linearly decreased the apparent digestibility of DM ($P=0.06$), NDF ($P=0.10$) and ADF ($P=0.06$). The N-NH₃ concentration showed a linear decrease ($P<0.05$) and the VFA concentration was linearly increased ($P<0.05$), whereas butyric acid showed a

² Enviado a Journal of Animal Feed Science for special issue "Exogenous Enzymes in Animal Nutrition: Benefits and limitations". Recibido 15 de octubre del 2012.

quadratic response ($P < 0.05$). The incorporation of extract of *Cellulomonas flavigena* in the diet did not increase the digestion or productive performance of lambs at the evaluated doses.

Palabras claves: enzimas fibrolíticas exógenas, consumo materia seca, digestibilidad, fermentación ruminal, ovinos

3.3. Introducción

Las enzimas fibrolíticas exógenas (EFE) se usan para mejorar la digestibilidad de la pared celular de los forrajes e incrementar el consumo de materia seca y la energía digestible en los rumiantes (Beauchemin y Holtshausen, 2010). Sin embargo los efectos de las enzimas fibrolíticas comerciales no siempre son constantes (Beauchemin *et al.*, 2003; McAllister *et al.*, 2001; Beauchemin y Holtshausen, 2010). Por ello, se ha evaluado nuevas alternativas potenciales a partir de microorganismos utilizados en la producción de biocombustibles como *Cellulomonas flavigena* (Pérez-Avalos *et al.*, 2008; Amaya-Delgado *et al.*, 2010; Rojas-Rejón *et al.*, 2011). *Cellulomonas flavigena* es una bacteria que cultivada en fermentación líquida produce un extracto enzimático con una gran variedad de xilanasas y celulasas (Sánchez-Herrera *et al.*, 2007; Pérez-Avalos *et al.*, 2008; Abt *et al.*, 2010) que pueden hidrolizar a los carbohidratos estructurales de la pared celular de los forrajes para su utilización en la alimentación de rumiantes (Pérez-Avalos *et al.*, 2008). Según Hernández *et al.* (2011), las enzimas de *C. flavigena* tienen un tiempo medio de degradación *in vitro* de 23.9 h, lo cual le confiere resistencia a la proteólisis ruminal bacteriana. En estudios *in situ* aumentó la degradabilidad de la FDN y FDA de rastrojo de maíz y heno de alfalfa al adicionar extracto enzimático de *C. flavigena* (Hernández, 2009). Pero en la literatura revisada se encontraron pocos estudios con rumiantes, por lo cual el objetivo de esta investigación fue evaluar dosis crecientes de extracto enzimático de *C. flavigena* (EEC) en la respuesta productiva, digestibilidad y variables ruminales en corderos alimentados con una dieta con 60 % de forraje integrado por rastrojo de maíz y heno de alfalfa.

3.4. Materiales y métodos

3.4.1. Animales y alimentación

El estudio se realizó de mayo a agosto del 2011 en el Rancho El Trece de la Universidad Autónoma de Chapingo, en Huitzilac Morelos, México, bajo la supervisión del Comité Académico del Colegio de Posgraduados, de acuerdo con la regulación establecida en la Ley de Protección Animal decretada por el Estado de Morelos, México. Se utilizaron 24 corderos *FI* Pelibuey-Kathadin (23.28 ± 3.52 kg de peso inicial), los cuales fueron distribuidos al azar en jaulas metabólicas individuales para evaluar dosis crecientes de extracto (tratamientos). Previo al inicio de la prueba, todos los corderos fueron desparasitados con Ivermectina, y vitaminas (A, D y E), durante el período de 10 días de adaptación a la dieta. La dieta se suministró a las 08:00 h y 16:00 h y se formuló de acuerdo con las recomendaciones del NRC (1985); y contenía 60 % de forraje (30 % de rastrojo de maíz y 30 % de heno de alfalfa) y 40 % de concentrado (15 % de maíz, 10 % de sorgo, 6 % de pasta soya, 7 % melaza, 1 % de urea y 1 % de una premezcla de minerales). La composición de la dieta en MS (ID 934.01) fue de 953.6 g kg^{-1} y de proteína cruda 156.9 g kg^{-1} (AOAC, 2005; ID 954.01), 429.7 g kg^{-1} de FDNa (FDNa analizada con amilasa termoestable sin sulfito de sodio y expresada incluyendo cenizas residuales) y 263.7 g kg^{-1} de FDA (expresada incluyendo cenizas residuales) de acuerdo con el procedimiento descrito por Van Soest *et al.* (1991).

3.4.2. Enzimas

El extracto se obtuvo a través de una fermentación líquida realizada con bagazo de caña de azúcar (Vega-Estrada *et al.*, 2002). El extracto tuvo una actividad xilanólica y carboximetilcelulolítica (CMCasas) de 19.20 y 2.67 UI mL^{-1} (Loera y Cordova, 2003) definiendo la UI como la cantidad de enzima que libera $1 \mu\text{mol}$ de xilosa (xilanasas) o glucosa (celulasas) por mL min^{-1} . Con esta información, la dosis enzimática se seleccionó ($\text{mL de extracto kg}^{-1}$ MS de alimento) con base en la actividad xilanólica correspondiente.

3.4.3. Tratamientos

Los tratamientos fueron dosis equivalentes a 95.0 y 142.5 UI mL⁻¹ de actividad xilanolítica del extracto por kg MS de alimento: testigo (0 mL), 5.0 y 7.5 mL de extracto. El extracto se diluyó en 240 mL de agua destilada y esta solución se asperjó en el forraje antes de ser mezclada con los otros alimentos de la dieta.

3.4.4. Respuesta productiva y digestibilidad

La prueba fue de 42 días, en la cual cada cordero se pesaba cada 14 días después de un ayuno de 12 h para determinar la ganancia diaria de peso (GDP, g d⁻¹). El consumo de materia seca de alimento (kg d⁻¹ MS) se registró diariamente, y la conversión alimenticia (CA) se calculó dividiendo el CMS entre la GDP. A la mitad de la prueba, se recolectaron heces directamente de cada cordero por 5 días consecutivos, para determinar la digestibilidad de la MS con respecto a la concentración de cenizas insolubles en ácido utilizado como un marcador interno (Keulen y Young, 1977). Además se determinó la digestibilidad de la FDN y FDA (Van Soest *et al.*, 1991).

3.4.5. Variables ruminales

Una muestra de 50 mL de fluido ruminal se recolectó utilizando una sonda esofágica en cada cordero durante el último día de la prueba. El pH se midió inmediatamente con un potenciómetro portátil (ORION, modelo SA 210, USA) inmediatamente y el resto del fluido ruminal se conservó acidificándolo con 2 mL de ácido metafosfórico al 25 %. Las muestras se mantuvieron en congelación (-20°C) hasta realizar el análisis de los AGV por cromatografía de gases (Erwin *et al.*, 1961) usando 2 µL inyectados a un cromatógrafo de gases Perkin Elmer (modelo Claurus 500, USA) con automuestreador y equipado con una columna capilar FFAP (15 m longitud), temperatura de inyector de 240 °C, detector de ionización de flama (FID) de 250 °C y de horno de 80 °C (1 min) con incrementos de 20 °C min⁻¹ hasta alcanzar 140 °C (3 min) y una velocidad de gases (H y N) de 40 mL min⁻¹ y 400 mL min⁻¹ para el aire. La concentración N-NH₃ se determinó por espectrofotometría (McCullough, 1967). Una muestra (2 mL) del líquido ruminal descongelado se centrifugó 10 min a 3000 rpm, del sobrenadante se colectaron 20 µL y se depositaron en tubos de ensaye (10 mL) adicionando 1 mL de fenol y 1 mL de hipoclorito de

sodio. Las muestras se incubaron 30 min en baño maría a 37 °C y se adicionaron 5 mL de agua destilada para su dilución, se agitaron en un vortex (Genie 2, modelo G-560, USA) y se leyó en un espectrofotómetro de luz ultravioleta visible CARY 1-E VARIAN (Perkin Elmer, modelo lamda-40, USA) a una DO de 630nm.

3.4.6. Análisis estadístico

Los datos de consumo y digestibilidad aparente de la MS, FDN y FDA; PV inicial y final así como la GDP, la CA y las variables ruminales (pH, NH₃, AGV) se analizaron utilizando el programa GLM del SAS 9.0 (2002). Se utilizaron contrastes polinomiales para probar el efecto del incremento en la dosis de enzima entre los tratamientos evaluados. Los coeficientes de los contrastes no ortogonales fueron determinados utilizando el programa IML del SAS 9.0 (2002). Las medias se compararon con la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1986).

3.5. Resultados

3.5.1. Respuesta productiva y digestibilidad

No hubo efecto ($P > 0.05$) en el PV final, consumo de MS, GDP y CA (Cuadro 3.1). El incremento en la dosis del extracto disminuyó linealmente la digestibilidad aparente de la MS ($P = 0.06$), FDN ($P = 0.10$) y FDA ($P = 0.06$).

3.5.2. Variables ruminales

El incremento en la dosis del extracto disminuyó linealmente ($P = 0.002$) la concentración de N-NH₃ ($P < 0.05$), provocó una disminución cuadrática ($P < 0.05$) en la concentración de ácido butírico y un efecto lineal ($P < 0.05$) en la concentración total de AGV.

3.6. Discusión

El comportamiento productivo (Cuadro 3.1) de los corderos fue similar a otros experimentos (Giraldo *et al.*, 2008; Pinos-Rodríguez *et al.*, 2008; Almaraz *et al.*, 2010; Awawdeh y Obeidat, 2011), en los cuales utilizaron EFE sin obtener cambios en el consumo, GDP y en la conversión

alimenticia. Sin embargo los resultados de este experimento contrastan con 24 % y 19 % de incremento promedio en la GDP y conversión alimenticia reportado por Cruywagen y Goosen (2004) y Cruywagen y van Zyl (2008), en corderos alimentados con dietas con 60 % de forraje adicionada con enzimas de *Aspergillus terreus* var. *carneus* al utilizar una dosis 3.4 veces superior en actividad xilanolítica al de este experimento. Asimismo Gado *et al.* (2011) y Salem *et al.* (2011; 2012) también registraron una mayor GDP, CA y digestibilidad de la dieta en corderos por adicionar un producto enzimático comercial mixto de bacterias anaeróbicas ruminales y enzimas fibrolíticas (xilanolíticas y celulolíticas), amilolíticas y proteolíticas con una dosis xilanolítica 5 veces inferior a este experimento. Estos resultados sugieren que la variabilidad en la respuesta productiva en los rumiantes no sólo depende de la dosis enzimática, sino también del tipo y actividad enzimática, al igual que de la especificidad enzima-sustrato (Beauchemin *et al.*, 2003), estabilidad enzimática (Hristov *et al.*, 1998) o la propia naturaleza del forraje (Jalilvand *et al.*, 2008).

El uso del extracto enzimático fibrolítico de *Cellulomonas flavigena* en estudios *in situ* incrementó la digestibilidad de la FDN y FDA de rastrojo de maíz y heno de alfalfa (Hernández, 2009). Sin embargo, la disminución lineal en la digestibilidad *in vivo* que se presentó en esta investigación (Cuadro 3.2) por el incremento gradual de la dosis del extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena*, indica que pudo haber una modificación en las poblaciones microbianas fibrolíticas en el rumen (Wang *et al.*, 2001; Nsereko *et al.*, 2002) probablemente por una liberación de carbohidratos solubles (Krausse *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004) del forraje (Berthiaume *et al.*, 2010) y de los demás componentes de la dieta. El mecanismo por el cual el extracto enzimático de *C. flavigena* disminuyó la degradación del alimento en los corderos es desconocido. Sin embargo la gran diversidad de CMCasas y xilanasas presentes en el extracto enzimático (Sánchez-Herrera *et al.*, 2007; Pérez-Avalos *et al.*, 2008; Abt *et al.*, 2010) pudieron contribuir en el incremento de carbohidratos más fáciles de degradar para los microorganismos ruminales; lo cual pudo generar una represión catabólica por carbono (Forero y Sánchez, 2008) tanto en las bacterias (Moat *et al.*, 2002) como en los hongos (Suto y Tomita, 2001) ruminales que pudo inhibir la transcripción de genes estructurales relacionados con la utilización de las fuentes de carbono secundarias (Moat *et al.*, 2002; Forero y Sánchez, 2008). Adicionalmente, se ha reportado la existencia de quitinasas (Reguera y Leschine, 2001; Fleuri y Sato, 2005; Abt *et al.*, 2010;) y endo-1,3- β -D-glucosidasas (Tang-Yao *et al.*, 2002; Fleuri y Sato, 2005) en el

extracto enzimático producido por especies del género *Cellulomonas*; las cuales también pudieron afectar la quitina y los 1,3-β-D-glucanos de las paredes celulares de los hongos ruminales, lo cual sería una contribución adicional a la reducción de la digestibilidad de los nutrientes consumidos (Cuadro 3.2).

La falta de respuesta en pH y en las proporciones de ácido acético y propiónico por el incremento gradual de la dosis del extracto enzimático de *C. flavigena* (Cuadro 3.3) contrasta con lo reportado por Pinos-Rodríguez *et al.* (2002) y Gado *et al.* (2011) quienes obtuvieron una mayor producción en AGV en corderos, debido a una mayor digestibilidad de la fibra de la dieta. Leng (1993) reportó que durante el proceso de fermentación ruminal, cuando no se tiene un déficit de NH₃ amoniacal, el flujo de carbono se orienta hacia una mayor captura del ATP disponible para la síntesis de proteína microbiana. Pero la baja concentración de NH₃ amoniacal y la mayor cantidad de AGV totales obtenidos por el incremento gradual de las enzimas en este experimento (Cuadro 3.3), sugieren que se pudo presentar una disminución en la actividad proteolítica que decreció la cantidad de amoniaco en el rumen. Esta situación favoreció la mayor captura de ATP disponible para la producción de AGV.

3.7. Conclusión

La incorporación del extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena* en el forraje de la dieta no incrementa la digestión ni el comportamiento productivo en corderos en las dosis evaluadas. En futuras investigaciones es necesario determinar en el extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena* cepa CDBB-531 el posible contenido de quitinasas y proteasas y su efecto de estas enzimas junto con las xilanasas y celulasas en las poblaciones de los microorganismos ruminales.

3.8. Literatura citada

- Abt, B., Foster, B., Lapidus, A., et al. 2010. Complete genome sequence of *Cellulomonas flavigena* type strain (134T). *Stan. Genomic Sci.* 3: 15-25.
- Almaraz, I., González, S.S., Pinos-Rodríguez J.M., Miranda L.A., 2010. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in sacco* and *in vitro* degradation of diets and on growth performance of lambs. *Ita. J. Anim. Sci.* 9: 6-9.

- Amaya-Delgado, L., Mejía-Castillo, T., Santiago-Hernández, A., Vega-Estrada, J., Farrés-G.-S., A., Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R., Montes-Horcasitas, M.C., Hidalgo-Lara, M.E., 2010. Cloning and expression of a novel, moderately thermostable xylanase-encoding gene (Cfl xyn11A) from *Cellulomonas flavigena*. *Bioresour. Technol.* 101: 5539-5545.
- AOAC., 2005. Official Methods of Analytical (18th Edition) Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC. pp: 1298.
- Awawdeh, S.M., Obeidat, B.S., 2011. Effect of supplemental exogenous enzymes on performance of finishing Awassi lambs fed olive cake-containing diets. *Livest. Sci.* 138: 20-24.
- Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P., Yang, W.Z., 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81: E37-47.
- Beauchemin, K.A., Holsthausen, L., 2010. Developments in enzyme usage in ruminants. *In: M.R. Bedford, G.G. Partridge (editors), Enzymes in Farm Animal Nutrition.* CABI Publishing (2nd Edition), UK. pp: 206-230.
- Berthiaume, R., Benchaar, C., Chaves, A.V., et al. 2010. Effects of nonstructural carbohydrate concentration in alfalfa on fermentation and microbial protein synthesis in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 93: 693-700.
- Cruywagen, C.W., Goosen, L., 2004. Effect of an exogenous fibrolytic enzyme on growth rate, feed intake and feed conversion ratio in growing lambs. *South Afr. J. Anim. Sci.* 34 (Suppl. 2): 71-73.
- Cruywagen, C.W., van Zyl, W.H., 2008. Effects of a fungal enzyme cocktail treatment of high and low forage diets on lamb growth. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 151-158.
- Erwin, E.S., Marco, G.T., Emery, E.M., 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44: 1768-1771.
- Forero, A., Sánchez, S., 2008. Represión catabólica por carbono de bacterias gram-positivas: inteligencia alimenticia. *BioTecnología.* 12: 24-48.
- Fleuri, L.F., Sato, H.H., 2005. Producción, purificación, clonación y la aplicación de las enzimas líticas. *Quim. Nova.* 28: 871-879.

- Gado, M.H, Salem, A.Z.M., Odongo, N.E., Borhami, B.E., 2011. Influence of exogenous enzymes ensiled with orange pulp on digestion and growth performance in lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 165: 131-136.
- Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Ramos, S., Carro, M.D., 2008. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay-based diet. *J. Anim. Sci.* 86: 1617-1623.
- Hernández, G.P.A., 2009. Caracterización del extracto enzimático xilanolítico exógeno de *Cellulomonas flavigena* en condiciones ruminales Doctor en Ciencias, disertación. Área de Nutrición de Rumiantes. Colegio de Postgraduados, México. pp: 102.
- Hernández, P.A., Bárcena, J.R., Mendoza, G.D., Montes, M.C., González, S.S., Rojo, R., 2011. Xylanase activity from *Cellulomonas flavigena* extracts as affected by temperature and its degradation under *in vitro* ruminal conditions. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5: 961-964.
- Hristov, N.A., McAllister, T.A., Cheng, K.J., 1998. Stability of exogenous polysaccharide-degrading enzymes in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 76: 161-168.
- Jalilvand, G., Odongo, N.E., López, S., Naserian, A., Valizadeh, R., Eftekhar Shahrodi, F., Kebreab, E., France, J., 2008. Effects of different levels of an enzyme mixture on *in vitro* gas production parameters of contrasting forages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 146: 289-301.
- Keulen, J.V., Young, B.A., 1977. Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *J. Anim. Sci.* 44: 282-287.
- Krause, D.O., Denman, S.E., Mackie, R.I., Morrison, M., Rae, A.L., Attwood, G.T., McSweeney, C.S., 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 663-693.
- Leng, R.A., 1993. Quantitative ruminant nutrition - A green science. *Aust. J. Agric. Res.* 44: 363-80.
- Loera, O., Córdova, J., 2003. Improvement of xylanase production by a parasexual Cross between *Aspergillus niger* strains. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46: 177-181.
- McAllister, T.A., Hristov, A.N., Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Cheng, K.Jr., 2001., Enzymes in ruminants diets. *In: M.R Bedford, G.G. Partridge (editors), Enzyme in Farm Animal Nutrition.* CABI Publishing, UK. pp: 273-298.

- McCullough, H., 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clin. Chem.* 17: 297-304.
- Moat, A.G., Foster, J.W., Spector, M.P., 2003. Regulation of prokaryotic gene expression: *in: Microbial Physiology*. Wiley-Liss, Inc., (4^a Edition), New York, USA. pp: 194-238.
- NRC., 1985. Nutrient Requirements of Sheep. 6th Edition. National Academy Press. Washington, D.D. USA. pp: 99.
- Nsereko, V.L., Beauchemin, K.A., Morgavi, D.P., Rode, L.M., Furtado, A.F., McAllister, T.A., Iwaasa, A.D., Yang, W.Z., Wang, Y., 2002. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. *Can. J. Microbiol.* 48: 14-20.
- Peréz-Avalos, O., Sánchez-Herrera, L.M., Salgado, L.M., Ponce-Noyola, T., 2008. A bifunctional endoglucanase/endoxylanase from *Cellulomonas flavigena* with potential use in industrial processes at different pH. *Curr Microbiol.* 57: 39-44.
- Pinos-Rodríguez, J.M., González, S.S., Mendoza, G.D., Bárcena, R., Cobos, M.A., Hernández, A., Ortega, M.E., 2002. Effects of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 80: 3016-3020.
- Pinos-Rodríguez, J.M., Moreno, R., González, S.S., Robinson, P.H., Mendoza, G., Álvarez, G., 2008. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and digestibility of total mixed rations fed to lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 142: 210-219.
- Reguera, G., Leschine, S.B., 2001. Chitin degradation by cellulolytic anaerobes and facultative aerobes from soils and sediments. *FEMS Microbiol. Lett.* 204: 367-374.
- Rojas-Rejón, O.A., Poggi-Varaldo, H.M., Ramos-Valdivia, A.C., Martínez-Jiménez, A., Cristiani-Urbina, E., de la Torre, M., Ponce-Noyola, T., 2011. Production of cellulases and xylanases under catabolic repression conditions from mutant PR-22 of *Cellulomonas flavigena*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38: 257-264.
- Salem, A.Z.M., El-Adawy, M.M., Gado, H., Camacho, L.M., González-Ronquillo, M., Alsersy, H., Borhami, B., 2011. Effects of exogenous enzymes on nutrients digestibility and growth performance in sheep and goats. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 14: 867-874.
- Salem, A.Z.M., Hassan, A.A., Khalil, M.S., Gado, H.M., Alsersy, H., Simbaya, J., 2012. Effects of sun-drying and exogenous enzymes on nutrients intake, digestibility and nitrogen

- utilization in sheep fed *Atriplex halimus* foliages. Anim. Feed Sci. Technol. 171: 128-139.
- Sánchez-Herrera, L.M., Ramos-Valdivia, A.C., de la Torre, M., Salgado, L.M., Ponce-Noyola, T., 2007. Differential expression of cellulases and xylanases by *Cellulomonas flavigena* grown on different carbon sources. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77: 589-595.
- SAS., 2002. SAS User's Guide: Statistics (Release 8.02). SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA.
- Steel, G.R., Torrie, J.H. 1986. Bioestadística: Principios y Procedimientos. 2nd Edition. McGraw-Hill, México. pp: 167-171.
- Suto, M., Tomita, F., 2001. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. J. Biosci. Bioeng. 92: 305-311.
- Tang-Yao, H., Chun-Wei, Ch., Jenn-Wen, H., 2002. Isolation and biochemical characterization of an endo-1,3-*b*-glucanase from *Streptomyces sioyaensis* containing a C-terminal family 6 carbohydrate-binding module that binds to 1,3-*b*-glucan. Microbiology. 148: 1151-1159.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition J. Dairy. Sci. 74: 3583-3592.
- Vega-Estrada, J., Flores-Contreras, L.B., Santiago, A., Magaña-Plaza, I., Montes-Horcasitas, C., 2002. Draw-fill batch culture mode for production of xylanases by *Cellulomonas flavigena* on sugar cane bagasse. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58: 435-438.
- Wang, Y., McAllister, T.A., Rode, L.M., Beauchemin, K.A., Morgavi, D.P., Nsereko, V.L., Iwaasa, A.D., Yang, W., 2001. Effects of an exogenous enzyme preparation on microbial protein synthesis, enzyme activity and attachment to feed in the rumen simulation technique (Rusitec). Br. J. Nutr. 85: 325-332.
- Wang, Y., Spratling, B.M., ZoBell, D.R., Wiedmeier, R.D., McAllister, T.A., 2004. Effect of alkali pretreatment of wheat straw on the efficacy of exogenous fibrolytic enzymes. J. Anim. Sci. 82: 198-208.

Cuadro 3.1 Efecto del extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena* en la respuesta productiva de corderos

Elementos	Dosis, mL kg ⁻¹ MS de alimento			EE ^a	P ^b	
	0	5.0	7.5		Lineal	Cuadrático
PV inicial, kg	23.08	23.61	23.15	1.30	0.92	0.77
PV final, kg	32.38	32.61	31.99	1.43	0.89	0.78
CMS, g d ⁻¹	1134	1169	1143	53.56	0.84	0.67
GDP, g d ⁻¹	220	216	209	10.60	0.49	0.78
CA, CMS GDP ⁻¹	5.22	5.61	5.67	0.32	0.30	0.82

^aError estándar de la media

^bProbabilidad de un efecto significativo a la dosis de enzima (efecto lineal y cuadrático)

^cMedia con letra distinta entre líneas son diferentes (P<0.05).

Cuadro 3.2 Efecto del extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena* en la digestibilidad de la dieta consumida por los corderos

Componente	Dosis, mL kg ⁻¹ MS de alimento			EE ^a	P ^b	
	0	5.0	7.5		Lineal	Cuadrático
MS, g kg ⁻¹	696.9 ^c	644.9 ^d	672.4 ^{cd}	11.8	0.06	0.03
FDN, g kg ⁻¹	610.0	550.9	571.7	19.4	0.10	0.18
FDA, g kg ⁻¹	585.2	533.1	526.7	23.1	0.06	0.65

^aError estándar de la media

^bProbabilidad de un efecto significativo a la dosis de enzima (efecto lineal y cuadrático)

^{cd}Media con letra distinta entre líneas son diferentes (P<0.05).

Cuadro 3.3 Efecto del extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena* en las variables ruminales en corderos

Elementos	Dosis, mL kg ⁻¹ MS de alimento			EE ^a	P ^b	
	0	5.0	7.5		Lineal	Cuadrático
pH	6.97	6.78	6.87	0.09	0.33	0.31
N-NH ₃ , mg dL ⁻¹	12.67 ^c	10.07 ^{cd}	7.76 ^d	1.00	0.002	0.59
Ácidos grasos volátiles, (mol 100 mol ⁻¹)						
Acético	73.50	74.25	75.58	0.81	0.58	0.19
Propiónico	15.18	16.70	16.40	0.89	0.28	0.53
Butírico	11.32 ^c	9.06 ^d	11.02 ^{cd}	0.60	0.38	0.01
AGV total, mM L ⁻¹	37.35 ^d	46.04 ^{cd}	56.70 ^c	3.17	0.0004	0.30

^aError estándar de la media

^bProbabilidad de un efecto significativo a la dosis de enzima (efecto lineal y cuadrático)

^{cd}Media con letra distinta entre líneas son diferentes (P<0.05).

Efecto del extracto enzimático fibrolítico de *Cellulomonas flavigena* en la degradación *in vitro* de una dieta totalmente mezclada con 60% de forraje

Effect of fibrolytic enzymatic extract from *Cellulomonas flavigena* on *in vitro* degradation of total mixed ration of 60% forage

4. Efecto del extracto enzimático fibrolítico de *Cellulomonas flavigena* en la degradación *in vitro* de una dieta totalmente mezclada con 60 % de forraje³

4.1. Resumen

El objetivo de este experimento fue evaluar el extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena* (0, 2.5, 7.5, 12.5 mL kg⁻¹ MS de alimento) en la degradación *in vitro* de la materia seca (DMS), fibra detergente neutra (DFDN) y ácida (DFDA) de una dieta con 60 % de forraje. La digestión se determinó con la primera fase de la técnica de Tilley y Terry a las 6, 12, 24, 48 y 72 h de incubación utilizando un diseño experimental de bloques al azar generalizado. El incremento en la dosis enzimática tuvo un efecto lineal en la DIVMS a las 6 h. La DIVFDN no se afectó por el extracto desde las 6 a las 24 h, pero presentó una disminución cuadrática (P=0.06) a la dosis enzimática a las 48 h. La DIVFDA mostró una respuesta lineal de 6 a 72 h. El extracto de *Cellulomonas flavigena* incrementa la degradación *in vitro* principalmente de la celulosa de forrajes, como rastrojo de maíz y heno de alfalfa, utilizados en la alimentación de rumiantes.

4.2. Abstract

The objective of this experiment was to evaluate the effect of enzymatic extract of *Cellulomonas flavigena* (0, 2.5, 7.5, 12.5 mL kg⁻¹ DM of feed) on *in vitro* degradation of dry matter (DMD), neutral detergent fiber (NDFD) and acid detergent fiber (ADFD) of a diet with 60 % forage. The digestion was determined with the Tilley and Terry technique at 6, 12, 24, 48 and 72 h of incubation using an experimental design of generalized randomised block. Increasing enzymatic dose had a linear effect (P=0.03) on DMD at 6 h. The NDFD was not affected (P=0.49) by extract from 6 to 24 h, but presented a quadratic response (P=0.06) to enzymatic dose at 48 h. The ADFD showed a linear response from 6 to 72 h (P=0.01). The extract *Cellulomonas*

³ Enviado a Journal of Animal Feed Science for special issue "Exogenous Enzymes in Animal Nutrition: Benefits and limitations". Recibido 10 de octubre del 2012.

flavigena increases *in vitro* disappearance principally of the cellulose from forages, as corn stover and alfalfa hay, used in ruminants feeding.

Palabras claves: enzimas fibrolíticas exógenas, degradación, forraje, rumiantes

4.3. Introducción

Las enzimas fibrolíticas exógenas (EFE) han sido relacionadas con una mayor degradabilidad de la pared celular de los forrajes y con algunos cambios en la fermentación ruminal (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002; Giraldo *et al.*, 2008) con incrementos en la respuesta productiva en rumiantes (Cruywagen y Zyl, 2008; Gado *et al.*, 2009). Sin embargo los efectos de las enzimas comerciales en rumiantes no siempre son constantes (Beauchemin *et al.*, 2003; McAllister *et al.*, 2001). Por ello, algunos investigadores han evaluado nuevas alternativas potenciales a partir de microorganismos como *Cellulomonas flavigena* (Hernández *et al.*, 2011); debido a que su extracto contiene una gran variedad de xilanasas y celulasas (Sánchez-Herrera *et al.*, 2007; Santiago-Hernández *et al.*, 2007; Abt *et al.*, 2010); las cuales al adicionarlas al forraje pueden proporcionar monosacáridos que pueden ser utilizados en la nutrición de rumiantes (Pérez-Avalos *et al.*, 2008).

Se ha propuesto el uso de *Cellulomonas flavigena* como una alternativa biotecnológica para la producción de biocombustibles (Pérez-Avalos *et al.*, 2008; Amaya-Delgado *et al.*, 2010; Rojas-Rejón *et al.*, 2011) pero también puede ser usado en alimentación de rumiantes (Hernández *et al.*, 2011). El objetivo de este estudio fue evaluar dosis crecientes de extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena* en la degradación *in vitro* de una dieta con 60 % de forraje.

4.4. Materiales y métodos

4.4.1. Extracto enzimático y dieta

El extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena* utilizado (Hernández *et al.*, 2011) tuvo una actividad xilanolítica y carboximetilcelulolítica de 19.19 y 2.66 UI mL⁻¹, respectivamente. Las dosis (tratamientos) evaluadas fueron 0.0, 2.5, 7.5, 12.5 mL kg⁻¹ MS de alimento diluidas en 240, 237.5, 232.5 y 227.5 mL de agua destilada, respectivamente. Antes de asperjar el extracto en el

forraje se molieron cada uno de los elementos de la dieta en un molino Willey (Arthur H. Thomas Company, Philadelphia, PA, USA) con malla de 1 mm. Después de agregar la enzima a los forrajes estos se mezclaron con el concentrado elaborando una dieta integral; la cual contenía 60 % de forraje (30 % de rastrojo de maíz y 30 % de heno de alfalfa) y 40 % de concentrado (15 % de maíz, 10 % de sorgo, 6 % de pasta soya, 7 % melaza, 1 % de urea y 1 % de una premezcla de minerales). La composición de la dieta en materia seca fue de 918.8 g kg⁻¹ (ID 934.01), y de proteína cruda 156.4 g kg⁻¹ (AOAC, 2005; ID 954.01); con 420.4 g kg⁻¹ de FDNa (FDNa analizada con amilasa termoestable sin sulfito de sodio y expresada incluyendo cenizas residuales) y 274.4 g kg⁻¹ de FDA (expresada incluyendo cenizas residuales) de acuerdo con el procedimiento descrito por Van Soest *et al.* (1991).

4.4.2. Degradación *in vitro*

Después de 16 h de aplicación del extracto, se pesaron 0.5 g de dieta dentro de bolsas ANKOM[®] F57 (ANKOM Technologies, Macedon, NY, USA). Fluido ruminal fue obtenido de 3 toros Holstein (450 kg PV) con cánula ruminal, alimentados con 60 % de forraje (35 % heno de avena y 25 % de ensilado de maíz) y 40 % de concentrado con 16 % de proteína cruda; más agua a libre acceso. El manejo de los animales fue previamente aprobado por el Comité Académico del Colegio de Posgraduados, de acuerdo con la regulación establecida en la Ley de Protección Animal decretada por el Estado de México, México. La degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS) de la dieta fue determinada utilizando la primera fase de la técnica de Tilley y Terry (1963). Los períodos evaluados fueron a las 6, 12, 24, 48 y 72 h en una incubadora Daisy ANKOM[®] modelo D200 (ANKOM Technologies). La degradación *in vitro* de la fibra detergente neutro (DIVFDN) y ácido (DIVFDA) se determinaron de forma secuencial a través del análisis de los residuos obtenidos en la DIVMS determinando las concentraciones de FDN y FDA de acuerdo con la metodología de Van Soest *et al.* (1991) en un analizador de fibra ANKOM[®] modelo 200 (ANKOM Technologies) utilizando dos tubos (repeticiones) para cada tiempo de incubación; la prueba de fue repetida tres veces.

4.4.3. Análisis estadístico

Los resultados de DIVMS, DIVFDN y DIVFDA se analizaron de acuerdo con un diseño de bloques generalizados completamente al azar utilizando el programa GLM del SAS 9.0 (2002). Se utilizaron contrastes polinomiales para probar el efecto del incremento en la dosis de enzima entre los tratamientos evaluados. Los coeficientes de los contrastes no ortogonales fueron determinados utilizando el programa IML del SAS 9.0 (2002). La comparación de medias se realizó a través de Tukey (Steel y Torrie, 1986).

4.5. Resultados

La DIVMS presentó una respuesta lineal ($P < 0.05$) con el incremento en la dosis del extracto enzimático (Cuadro 4.1); presentándose una mayor desaparición a las 6 h de incubación. La DIVFDN por efecto del extracto no se modificó ($P > 0.05$) desde las 6 a las 24 h de incubación del alimento (Cuadro 4.2). A las 48 h el incremento en la dosis de enzima provocó una disminución cuadrática ($P = 0.06$) en la DIVFDN. El incremento en la dosis del extracto afectó linealmente ($P > 0.05$) la DIVFDA (Cuadro 4.3) desde las 6 a las 72 h de incubación de la dieta.

4.6. Discusión

Aunque algunas EFE no han mejorado la DIVMS con enzimas exógenas (Avellaneda-Cevallos *et al.*, 2009; González-García *et al.*, 2010); la respuesta lineal en la DIVMS obtenida a las 6 h de incubación por efecto del extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena* coincide con lo reportado por Pinos *et al.* (2001) y Moreno *et al.* (2007) cuando incubaron heno alfalfa y una dieta con 40 % del mismo forraje adicionada con 2 g kg^{-1} MS de xilanasas de *Aspergillus niger* y *Trichoderma viride*. Los resultados de este experimento confirman que las enzimas estimulan la fase inicial de degradación del sustrato (Giraldo *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2007).

Sin embargo, la DIVFDN de 6 a las 24 h de incubación de la dieta (Cuadro 4.2) contrasta con la mayor digestión reportada por Eun *et al.* (2007) y Moreno *et al.* (2007) cuando adicionaron endoglucanasas y xilanasas comerciales en heno de alfalfa y una dieta con 50 % del mismo forraje durante las primeras 24 h de incubación. La disminución cuadrática ($P = 0.06$) en la DIVFDN que se presentó a las 48 h de incubación se pudo deber a un descenso en el pH,

generado por una mayor disponibilidad de carbohidratos no estructurales (Grant, 1994; González-García *et al.*, 2010).

El efecto observado en DIVMS y en DIVFDN confirman que la respuesta por efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la digestibilidad en rumiantes puede ser variable dependiendo del tipo y cantidad de enzimas, así como de la interacción enzima-sustrato y de la proporción forraje:concentrado (McAllister *et al.*, 2001; Beauchemin *et al.*, 2003; Giraldo *et al.*, 2008).

La respuesta lineal en la DIVFDA (Cuadro 4.3) por efecto del extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena* que se presentó desde las 6 a las 72 h de incubación de la dieta, se puede explicar por la acción de las celulasas del extracto (Sánchez-Herrera *et al.*, 2007; Santiago-Hernández *et al.*, 2007; Abt *et al.*, 2010) en la hidrólisis de la pared celular; las cuales pudieron haber liberado carbohidratos solubles (Pérez-Avalos *et al.*, 2008) del forraje de la dieta incubada que pudo afectar negativamente la DIVFDN a las 48 h de incubación (Cuadro 4.2).

4.7. Conclusión

El extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena* incrementa la desaparición *in vitro* principalmente de la celulosa en forrajes, como el rastrojo de maíz y heno de alfalfa, utilizadas en la alimentación de rumiantes.

4.8. Literatura citada

Abt, B., Foster, B., Lapidus, A., Clum, A., et al. Complete genome sequence of *Cellulomonas flavigena* type strain (134T). *Stan. Genomic Sci.* 3: 15-25.

Amaya-Delgado, L., Mejía-Castillo, T., Santiago-Hernández, A., Vega-Estrada, J., Farrés-G.-S., A., Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R., Montes-Horcasitas, M.C., Hidalgo-Lara, M.E., 2010. Cloning and expression of a novel, moderately thermostable xylanase-encoding gene (Cfl xyn11A) from *Cellulomonas flavigena*. *Bioresour. Technol.* 101: 5539-5545.

AOAC., 2005. Official Methods of Analytical (18th Ed.) Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC. pp: 1298.

Avellaneda-Cevallos, J.H., Montañez-Valdez, O.D., González-Muñoz, S., Pinos-Rodríguez J., Bárcena-Gama, R., Hernández-Garay, A., 2009. Effect of exogenous fibrolytic enzymes

- on dry matter and cell wall *in vitro* digestibility of Guinea grass hay. J. Appl. Anim. Res. 36: 199-202.
- Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P., Yang, W.Z., 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. J. Anim. Sci. 81: E37-47.
- Cruywagen, C.W., van Zyl, W.H., 2008. Effects of a fungal enzyme cocktail treatment of high and low forage diets on lamb growth. Anim. Feed Sci. Technol. 145: 151-158.
- Eun, J.S., Beauchemin, K.A., Schulze, H., 2007. Use of Exogenous fibrolytic enzymes to enhance *in vitro* fermentation of alfalfa hay and corn silage. J. Dairy Sci. 90: 1440-1451.
- Gado, M.H., Salem, A.Z.M., Robinson, P.H., M. Hassan., 2009. Influence of exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk production and composition in dairy cows. Anim. Feed Sci. Technol. 154: 36-46.
- Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Carro, M.D., 2008. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratios. Anim. Feed Sci. Technol. 141: 306-325.
- González-García, E., Albanell, E., Caja, G., Casals, R., 2010. *In vitro* fermentative characteristics of ruminant diets supplemented with fibrolytic enzymes and ranges of optimal endo- β -1,4-glucanase activity. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 94: 250-263.
- Grant, R.J., 1994. Influence of corn and sorghum starch on the *in vitro* kinetics of forage fiber digestion. J. Dairy Sci. 77: 1563-1569.
- Hernández, P.A., Bárcena, J.R., Mendoza, G.D., Montes, C.S., González, S.S., Rojo, R., 2011. Xylanase activity from *Cellulomonas flavigena* extracts as affected by temperature and its degradation under *in vitro* ruminal conditions. Afr. J. Microb. Res. 5: 961-964.
- McAllister, T.A., Hristov, A.N., Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Cheng, K.Jr., 2001. Enzymes in ruminants diets. In: Bedford, M.R., Partridge, G. G. (Eds.), Enzyme in Farm Animal Nutrition. CABI Publishing, UK. pp: 273-298.
- Moreno, R., Pinos-Rodríguez, J.M., González, S., Álvarez, G., García, J.C. Mendoza, G., Bárcena, R., 2007. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal degradation of diets for dairy cows. Interciencia. 32: 850-853.
- Pérez-Avalos, O., Sánchez-Herrera., L.M., Salgado, L.M., Ponce-Noyola, T., 2008. A bifunctional endoglucanase/endoxylanase from *Cellulomonas flavigena* with potential use in industrial processes at different pH. Curr. Microbiol. 57: 39-44.

- Pinos, J.M., González, S.S., Mendoza, G., Bárcena, R., Cobos, M., 2001. Effect of fibrolytic enzymes glycosylated *in vitro* digestibility of DM and OM from alfalfa (*Medicago sativa*) and ryegrass (*Lolium perenne*). Rev. Fac. Agron. (LUZ). 18: 505-509.
- Pinos-Rodríguez, J.M., González, S.S., Mendoza, G.D., Bárcena, R., Cobos, M.A., Hernández, A., Ortega, M.E., 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.
- Rojas-Rejón, O.A., Poggi-Varaldo, H.M., Ramos-Valdivia, A.C., Martínez-Jiménez, A., Cristiani-Urbina, E., de la Torre, M., Ponce-Noyola, T., 2011. Production of cellulases and xylanases under catabolic repression conditions from mutant PR-22 of *Cellulomonas flavigena*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 38: 257-264.
- Sánchez-Herrera, L.M., Ramos-Valdivia, A.C., de la Torre, M., Salgado, L.M., Ponce-Noyola, T., 2007. Differential expression of cellulases and xylanases by *Cellulomonas flavigena* grown on different carbon sources. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77: 589-595.
- Santiago-Hernández, A., Vega-Estrada, J., Montes-Horcasitas, M.C., Hidalgo-Lara, M.E., 2007. Purification and characterization of two sugarcane bagasse-absorbable thermophilic xylanases from the mesophilic *Cellulomonas Xavigena*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 34: 331-338.
- SAS., 2002. Statistical Analysis Systems user's guide Version 9.0.0.380. SAS Institute Inc., Raleigh, North Carolina, USA.
- Tilley, M.A., Terry, R.A., 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. J. Br. Grassld. Soc. 18: 104-109.
- Steel, G.R., Torrie, J.H., 1986. Bioestadística: Principios y Procedimientos. 2nd Ed. McGraw-Hill. México. pp: 167-171.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy. Sci. 74: 3583-3592.

Cuadro 4.1 Coeficiente de degradación (g degradados g incubados⁻¹) *in vitro* de la materia seca de una dieta con 60% de forraje adicionada con extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena*

Incubación, h	Dosis, mL kg ⁻¹ MS de alimento				EE ^a	P ^b	
	0	2.5	7.5	12.5		Lineal	Cuadrático
6	0.289 ^d	0.297 ^{cd}	0.287 ^d	0.302 ^c	0.002	0.03	0.08
12	0.449	0.448	0.450	0.450	0.011	0.91	0.99
24	0.565	0.552	0.561	0.555	0.009	0.67	0.88
48	0.711	0.683	0.683	0.685	0.013	0.28	0.29
72	0.746	0.736	0.742	0.745	0.008	0.88	0.58

^aError estándar de la media

^bProbabilidad de un efecto significativo a la dosis de enzima (efecto lineal y cuadrático)

^{cd}Media con letra distinta entre líneas son diferentes (P<0.05).

Cuadro 4.2 Coeficiente de degradación (g degradados g incubados⁻¹) *in vitro* de la fibra detergente neutro de una dieta con 60% de forraje adicionada con extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena*

Incubación, h	Dosis, mL kg ⁻¹ MS de alimento				EE ^a	P ^b	
	0	2.5	7.5	12.5		Lineal	Cuadrático
6	0.272	0.283	0.263	0.258	0.016	0.43	0.84
12	0.494	0.480	0.483	0.468	0.019	0.46	0.97
24	0.519	0.515	0.538	0.503	0.010	0.58	0.13
48	0.807	0.787	0.778	0.801	0.009	0.72	0.06
72	0.762	0.717	0.766	0.773	0.013	0.12	0.30

^aError estándar de la media

^bProbabilidad de un efecto significativo a la dosis de enzima (efecto lineal y cuadrático)

^{cd}Media con letra distinta entre líneas son diferentes (P<0.05).

Cuadro 4.3 Coeficiente de degradación (g degradados g incubados⁻¹) *in vitro* de la fibra detergente ácido de una dieta con 60% de forraje adicionada con extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena*

Incubación, h	Dosis, mL kg ⁻¹ MS de alimento				EE ^a	P ^b	
	0	2.5	7.5	12.5		Lineal	Cuadrático
6	0.293	0.321	0.370	0.403	0.022	0.0094	0.69
12	0.347 ^e	0.374 ^{ed}	0.420 ^{cd}	0.473 ^c	0.013	0.0004	0.89
24	0.490 ^d	0.506 ^d	0.566 ^c	0.592 ^c	0.009	0.0001	0.37
48	0.640	0.627	0.673	0.686	0.017	0.0314	0.91
72	0.689 ^d	0.739 ^c	0.730 ^c	0.732 ^c	0.007	0.0213	0.03

^aError estándar de la media

^bProbabilidad de un efecto significativo a la dosis de enzima (efecto lineal y cuadrático)

^{cde}Media con letra distinta entre líneas son diferentes (P<0.05).

5. Conclusiones generales

Los resultados de los experimentos de ésta investigación muestran que la adición de extracto enzimático de *Fomes* sp. EUM1 y *Cellulomonas flavigena* en dietas con 60% de forraje no incrementan la digestión ni la respuesta productiva de corderos.

Existe la posibilidad de que la adición del extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena*, en ciertas dosis, pueda disminuir la digestibilidad aparente de la MS y fibra de las dietas. Sin embargo, la adición del extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena in vitro* incrementa la degradación de la celulosa proveniente de forrajes como el rastrojo de maíz y heno de alfalfa.

Las diferencias encontradas entre los efectos en la digestibilidad de la fibra de forrajes en las pruebas *in vivo* e *in vitro* con el extracto enzimático de *Cellulomonas flavigena* sugieren que además de la dosis enzimática pueden existir otros factores, como es el tipo de tipo enzimas y estructura intrínseca del sustrato, que pueden estar afectando la respuesta productiva en corderos. Por ello, es necesario continuar con estos estudios para determinar las condiciones experimentales en las cuales éstos productos enzimáticos puedan mejorar la hidrolisis de la pared celular de los forrajes.