

SOBRE EL EFECTO DE ENZIMAS FÚNGICAS EN LA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES

DELI NAZMÍN TIRADO-GONZÁLEZ, GUSTAVO TIRADO-ESTRADA y LUIS ALBERTO MIRANDA-ROMERO

RESUMEN

Se realizó una revisión acerca de los efectos potenciales de xilanasas y celulasas en la alimentación de rumiantes. Se encontró que éstas incrementan las digestibilidades de la materia seca (MS) y de la fibra detergente neutro (FDN), la producción de gases y de ácidos grasos volátiles totales (AGVi), en la mayoría de las evaluaciones realizadas *in vitro*. Algunas actividades enzimáticas incrementaron la población de bacterias ruminales y mostraron sinergismo con las enzimas de microorganismos del rumen; en comportamiento animal, pueden incrementarse la ingesta de MS, ganancia diaria de peso (GDP), conversión alimenticia (CA) y producción de leche. En algunos casos se han observado efectos nulos o negativos en la pro-

porción acetato:propionato y en componentes de la leche. Los resultados son mejores utilizando dosis adecuadas de enzimas, y más consistentes en dietas que incluyen forrajes de leguminosas que de gramíneas. Las xilanasas parecen ser más estables que las celulasas en condiciones ruminales, pero con alimentos con bajo contenido de taninos; la correcta relación celulasas: xilanasas depende de la dieta base. Los procesos de ensilaje y pretratamiento con enzimas fibrolíticas disminuyen las proporciones de FDN y FDA, incrementan los azúcares reducidos y mejoran las digestibilidades de la MS y FDN de los forrajes, aunque ello no siempre se refleja en el comportamiento productivo del animal.

El empleo de alimentos con alto contenido de FDN en rumiantes sin el auxilio de suplementos principalmente proteicos no siempre cubre los requerimientos nutricionales de mantenimiento (Coleman y Moore, 2002; Nuñez *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2003) debido a su baja digestibilidad y disponibilidad de nutrientes en el rumen (Delgado *et al.*, 2002). Estos factores impactan el potencial de la ingesta del ganado, al que se le atribuye gran parte de la variación en la producción animal (Stendal *et al.*, 2006). En la última década se han desarrollado y probado productos enzimáticos de extractos principalmente de celulasas y xilanasas exógenas de hongos para mejorar la

composición de los forrajes (Colombatto *et al.*, 2004b, c) y su digestibilidad en el interior del rumen (Tricarico y Dawson, 2005; Eun y Beauchemin, 2007a). Algunos trabajos han mostrado que la adición de enzimas fibrolíticas exógenas incrementa la digestibilidad *in vitro*, *in situ* e *in vivo* de la materia seca y de la fibra detergente neutro (FDN) en alimentos fibrosos (Colombatto *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2007), produce cambios en la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y en los patrones de fermentación (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002; Tricarico y Dawson, 2005), modifican el pH ruminal (Yang *et al.*, 2002) o mejora el consumo y la ganancia diaria en peso (Gómez-Vázquez *et al.*, 2003). Pero otros

trabajos muestran que las enzimas fibrolíticas exógenas no afectan el comportamiento animal, ni la producción de AGV (Dosualdo *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2006a; Souza *et al.*, 2006b). De acuerdo a Beauchemin *et al.* (2003), estas discrepancias pueden deberse a: 1) la complejidad del líquido ruminal (Colombatto *et al.*, 2003a); 2) las diferentes estructuras de los alimentos que componen las dietas; y 3) los preparados enzimáticos, que pueden contener diferentes actividades y condiciones óptimas. Los procesos de caracterización productiva, bioquímica y genética (Wang *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2009) podrían permitir la obtención de productos estables en las condiciones del rumen y específicos para la degradación

PALABRAS CLAVE / Comportamiento Animal / Digestibilidad de MS y FDN / Enzimas Fúngicas / Patrones de Fermentación / Rumiantes /

Recibido: 29/08/2014. Modificado: 28/09/2015. Aceptado: 30/09/2015.

Deli Nazmín Tirado-González. Doctora en Innovación Ganadera, Universidad Autónoma de Chapingo (UACH), México. e-mail: deli_gym@hotmail.com

Gustavo Tirado-Estrada. Doctor en Ciencia Biológicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. Profesor Investigador, Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes, México. Dirección: Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes. Km 17.5 Carretera San Luis Potosí-Aguascalientes. C.P. 20330, México. e-mail: gtiradoes@hotmail.com

Luis Alberto Miranda-Romero. Químico Bacteriólogo y Parasitólogo, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México. Doctor en Ciencias de la Ganadería, Colegio de Postgraduados, México. Profesor, UACH, México. e-mail: microbiologia.pecuaria08@gmail.com

de la fibra (Deng *et al.*, 2006; Eun y Beauchemin, 2007a). La presente revisión muestra algunos avances en la producción de xilanasas y celulasas fúngicas y sus potenciales efectos al ser incluidas en dietas para rumiantes.

Enzimas Producidas por Hongos

Paredes celulares y tipos de enzimas que hidrolizan sus componentes

La celulosa es el polímero de glucosa más abundante en la pared celular y constituye la mayor parte de desechos vegetales; la hemicelulosa es un heteropolímero formado por residuos β -1,4-xilopiranosil. La celulosa y la hemicelulosa son fuentes potenciales de energía cuya limitante son los enlaces β -1,4 que unen sus monómeros. Además, durante el desarrollo de las plantas el proceso de lignificación involucra la deshidrogenación enzimática de alcoholes derivados del fenilpropano (p-cumarílico, coniferílico y sinapílico) y la formación de estructuras de enlaces cruzados que atrapan tanto a la celulosa como al heteropolímero de la hemicelulosa (Hatfiel y Fukushima, 2005). La lignina es difícilmente hidrolizable. Los hongos ligninolíticos secretan enzimas extracelulares oxidativas esenciales en la mineralización de lignina, tales como: 1) lignina-peroxidasa (LiP), que por síntesis endógena de H_2O_2 oxida al alcohol veratrílico y, a la vez, a compuestos aromáticos no fenólicos; 2) manganeso-peroxidasa (MnP), que oxida componentes fenólicos de la lignina mediante la reacción de oxidación del Mn^{2+} a Mn^{3+} , la cual es dependiente del H_2O_2 ; y 3) lacasa (Lac), una fenol oxidasa con cobre que oxida anillos de la lignina. Otras enzimas indirectamente asociadas con la mineralización de lignina son la glioxal oxidasa y la superóxidodismutasa, que sintetiza el H_2O_2 necesario para la actividad de la LiP y la MnP (Gonzalo *et al.*, 2005). Algunos hongos también producen celulasas (endo- β -glucanasas, exo- β -glucanasas o celobiohidrolasas, y β -glucosidasas) y xilanasas (arabinofurosidasas, acetil-xilanas-terasas, glucoronidasas, β -xilosidasas, y endo- β -xilanasas), que les permiten acceder y utilizar la celulosa y la hemicelulosa como fuentes de energía para su adaptación a sustratos lignocelulósicos. Estas enzimas tienen dominios de unión con los sustratos, y dominios catalíticos y no catalíticos, cuyo papel es permitir el reconocimiento y contacto con las fibras de la pared celular (Mikán y Castellanos, 2004).

Existe una gran variedad de celulasas y xilanasas producidas por organismos (Min *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2007) y en hongos hay numerosas

isoformas para actividades xilanolítica y celulolítica, con distintas condiciones óptimas (Moriya *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2010). En la última década la caracterización y uso de marcadores bioquímicos como isoformas (Moriya *et al.*, 2003; Damiano *et al.*, 2006) ha permitido la selección y producción de enzimas más específicas para sustratos de interés (Levin *et al.*, 2004; Mikán y Castellanos, 2004), estables en rangos amplios de pH y temperatura (Subramaniyan y Prema, 2000; Murray *et al.*, 2004) y con mayor tiempo de retención de su actividad máxima (Parry *et al.*, 2001). También, los procesos de secuenciación (Cheng *et al.*, 2005; Comlekcioglu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011) y expresión de genes (Kataeva *et al.*, 1999; Ogasawara *et al.*, 2006) han permitido diferenciar la acción de enzimas específicas de complejos de isoformas o enzimas similares (Yi *et al.*, 2010).

La especie de hongo y las condiciones de los cultivos (Cavallazzi *et al.*, 2004; Mata y Waliszewski, 2005) son factores que afectan la expresión de genes que codifican para la producción de enzimas (Cohen *et al.*, 2002). Principalmente, la fuente de carbono regula la expresión de genes de celulasas y hemicelulasas; por otro lado, a nivel transcripcional los genes de celulasas y xilanasas se reprimen ante la presencia de glucosa; sin embargo, son estimulados ante la presencia de otras fuentes de carbono tales como el glicerol, el sorbitol y la celulosa (Rauscher *et al.*, 2006; Saadia *et al.*, 2008). Cada hongo se comporta diferente, porque con los genes que codifican para enzimas extracelulares hay promotores con sus reguladores específicos para cada sistema (March y Zeilinger, 2003); en el caso de las xilanasas, algunos inductores presentes en ciertos hongos son inhibidores en otros (Min *et al.*, 2002). La ingeniería genética ha permitido la identificación de secuencias específicas de enzimas, promotores, represores, activadores e inductores con una función particular (Deng *et al.*, 2006; Rauscher *et al.*, 2006) y realizar arreglos por fusión de genes o fragmentos de ellos para obtener enzimas con más de una función (An *et al.*, 2005), inhibir o sobre-estimular la producción de enzimas. Por ejemplo, Rahman *et al.* (2009) utilizaron los promotores *egl3* y *xyn3* para estimular la expresión del gen de β -glucosidasa (*bg11*) en *Trichoderma reesei*, logrando que cadenas de *bg1* fueran sobreproducidas de 4 a 7,5 veces, sin disminuir la cantidad de celulasas.

En el área agronómica, el tratamiento de materiales fibrosos con hongos ligninolíticos ha mostrado resultados alentadores, puesto que muchos hongos se adaptan a materiales con altos

contenidos de paredes celulares y su uso como tratamiento puede mejorar la calidad nutritiva de forrajes fibrosos (Obodai *et al.*, 2003; Okano *et al.*, 2006) y eliminar elementos tóxicos de algunos desperdicios de cosecha (Murrieta *et al.*, 2002).

Efecto de la Aplicación de Enzimas en la Alimentación de Rumiantes

Se analizaron 53 experimentos de 47 artículos seleccionados al azar para la presente revisión (Tabla I). Los factores evaluados con mayor frecuencia fueron: 1) tipo de estudio (in vitro, *in situ* o *in vivo*), 2) fuente del inóculo ruminal, 3) tipo de preparado enzimático fibrolítico y su actividad enzimática predominante, 4) composición principal de la dieta y efecto combinado con otros aditivos y suplementos, 5) dosis del preparado enzimático, y 6) método de aplicación y tiempo de aplicación del aditivo enzimático. El 88,7% de los experimentos incluidos muestran al menos un efecto derivado del uso de enzimas en alguna de las variables estudiadas, mientras que en el 11,3% de los casos, no hubo efecto del tratamiento con extractos enzimáticos. El 92% de los efectos reportados en estos artículos son positivos y el 8% negativos.

Tipo de estudio

La caracterización bioquímica y las capacidades hidrolíticas de los productos enzimáticos no permite predecir el comportamiento que tendrán en las condiciones que ofrece el líquido ruminal y su interacción con la complejidad de la pared celular de los alimentos (Beauchemin *et al.*, 2003). Kung *et al.* (2000), al comparar dos diferentes productos comerciales con actividades similares de celulasas y xilanasas en dietas para vacas productoras de leche, encontraron que sólo una de las dos podía incrementar la producción de leche. Algunos trabajos concuerdan en que la adición de enzimas fibrolíticas incrementa la digestibilidad *in vitro*, *in situ* e *in vivo* de la materia seca (MS) y fibra detergente neutro (FDN) de los alimentos fibrosos (Colombatto *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2007). El 32% de los artículos de la Tabla I correspondieron a experimentos realizados *in vivo*, 42% *in vitro* y 26% incluían más de un tipo de estudio. Las variables más reportadas en estos trabajos son digestibilidad de la MS y FDN, en las que el uso de enzimas fibrolíticas tiene resultados consistentemente positivos. Algunos preparados de enzimas con endo- β -1,4-glucanasas pueden desprender más gas *in vitro* que algunos alimentos

TABLA I
NÚMERO DE EXPERIMENTOS QUE REFIEREN ALGÚN EFECTO RELACIONADO AL TRATAMIENTO CON ENZIMAS FIBROLÍTICAS EXÓGENAS *IN VITRO*, *IN SITU* O *IN VIVO*, APLICADAS EN DIFERENTES TIEMPOS

Factor	Efecto	Digestibilidad							Patrones de fermentación				Comportamiento animal				Composición del alimento			
		MS	MO	PC	FDN	FDA	Cel	Hem	AGVt	pH	N-NH ₃	Rel. A:P	P. Leche	Ingesta	CA	GDP	MS	PC	FDN	FDA
Ensilado	Positivo	2	NR	NR	1	1	1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1	0	3	3
	Negativo	0	NR	NR	0	0	0	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0	2	0	0
Pretratamiento	Positivo	3	1	1	1	1	NR	NR	NR	1	NR	1	NR	NR	NR	NR	1	2	1	
	Negativo	0	0	0	0	0	NR	NR	NR	0	NR	0	NR	NR	NR	NR	0	0	0	
Sin pretratamiento	Positivo	18	7	3	10	4	NR	1	6	0	2	6	4	4	3	4	NR	NR	1	1
	Negativo	1	0	0	2	1	NR	0	0	1	0	3	0	0	0	0	NR	NR	0	0
<i>In vivo</i>	Positivo	5	3	2	3	3	1	NR	2	NR	NR	0	4	4	3	4				
	Negativo	1	0	0	2	1	0	NR	0	NR	NR	1	0	0	0	0				
<i>In situ</i>	Positivo	7	4	NR	3	2	NR	1	3	0	1	2					1	3	5	4
	Negativo	0	0	NR	0	0	NR	0	0	1	0	2					0	0	0	0
<i>In vitro</i>	Positivo	11	1	2	6	1	NR	NR	1	1	1	5					NR	NR	1	1
	Negativo	0	0	0	0	1	NR	NR	0	0	0	0					NR	NR	0	0

MS: materia seca, MO: materia orgánica, PC: proteína cruda, FDN: fibra detergente neutro, FDA: fibra detergente ácido, Cel: celulosa, Hem: hemicelulosa, AGVt: ácidos grasos volátiles totales, pH: pH ruminal, N-NH₃: nitrógeno amoniacal, Rel. A:P: relación acetato: propionato, P. Leche: producción de leche, Ingesta: ingesta de la MS, CA: conversión alimenticia, GDP: ganancia diaria de peso, NR: dato no reportado.

Fuentes de información: McAllister *et al.*, 1999; Rode *et al.*, 1999; Hirstov *et al.*, 2000; Kung *et al.*, 2000; Wallace *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001, 2002, 2004; Dhiman *et al.*, 2002; Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002, 2005, 2008; Yang *et al.*, 2002; Colombatto *et al.*, 2003a, 2004a, b, 2007; Gómez-Vázquez *et al.*, 2003; González *et al.*, 2003; Cruywagen y Goosen, 2004; Yescas-Yescas *et al.*, 2004; Baah *et al.*, 2005; Dean *et al.*, 2005; Tricarico y Dawson, 2005; Yu *et al.*, 2005; Bergamaschine *et al.*, 2006; Dosualdo *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2006b; Medina-Romo *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2006a; Muwalla *et al.*, 2007; Elwakeel *et al.*, 2007; Eun y Beauchemin, 2007a; Eun *et al.*, 2007; Giraldo *et al.*, 2007, 2008, 2009; Redisch y Kung, 2007; Dean *et al.*, 2008; Krueger *et al.*, 2008; Krueger y Adesogan, 2008; Ranilla *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2009; Bassiouni *et al.*, 2010.

(Wallace *et al.*, 2001), lo que hace difícil comparar datos obtenidos de experimentos *in vitro* con los obtenidos *in situ* e *in vivo*. Jung *et al.* (2004) encontraron que cada unidad de aumento en la digestibilidad de la FDN mejora la ingesta de la MS (0,12kg/día) e incrementa 3,5% la grasa corregida en leche. En la Tabla I, el 70,6% de los artículos de estudios realizados *in vivo*, reportan algún tipo de efecto relacionado al uso de preparados enzimáticos: como incrementos en la ingesta de la MS, producción de leche, ganancia diaria de peso y conversión alimenticia. Bassiouni *et al.* (2010) observaron que el uso de enzimas fibrolíticas en vacas lecheras incrementó la producción de leche y sus contenidos de grasa, proteína y lactosa. Sin embargo, no en todos los casos los incrementos en la producción de leche se acompañan de efectos positivos en la proporción de grasa y proteína en su composición (Kung *et al.*, 2000). Por ejemplo, Rode *et al.* (1999) al probar el preparado enzimático 'Promote' (NET, Cargill Inc., de Agribrands Int., EEUU; Balci *et al.*, 2007) en vacas Holstein multiparas en lactancia temprana con una dieta base de 24% de ensilado de maíz, 15% heno de alfalfa y 61% de concentrado de cebada, encontraron que la adición del preparado enzimático a la dieta no afectó el consumo alimenticio en comparación con la dieta testigo (sin preparado enzimático), pero la digestibilidad total de los

nutrientes aumentó por el tratamiento con preparados enzimáticos (digestibilidades de las fracciones de la dieta testigo vs la dieta tratada: 61 vs 69% en MS, 43 vs 51% en FDN, y 32 vs 42% en FDA) y consecuentemente la producción de leche se incrementó (de 36kg/día a 40kg/día), aunque los componentes de proteína y grasa de la leche fueron similares o inferiores. Los autores (Balci *et al.*, 2007) señalaron que la combinación de xilanasas y celulasas puede mejorar la ingesta en vacas lecheras, pero mayores producciones de leche asociadas a mayor ingesta sólo se observaron en la temprana lactancia cuando hay desbalance energético; además los incrementos en el ácido propiónico y glucosa derivados del aumento en la digestibilidad por el uso de enzimas exógenas puede estimular incrementos de insulina, pero su efecto podría ser la depresión en la síntesis de grasa de leche por incremento en tejido adiposo debido a lipogénesis.

Otros autores apoyan la posibilidad de que a mayor demanda energética de los animales, los efectos de la adición de enzima pueden ser mejores (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2005), o que hay más efectos positivos por el tratamiento enzimático en dietas con menor disponibilidad de energía (Beauchemin *et al.*, 2003). Tirado-Estrada *et al.* (2011), al evaluar los efectos de los preparados enzimáticos 'Promote' y 'Fibrozyme' (Alltech,

Inc.) en el comportamiento de engorda de borregos alimentados con una dieta que contenía el 60% de rastrojo de maíz, encontraron que la suplementación con enzimas mejoró la digestibilidad de la MS, los patrones de fermentación, la ingesta de la MS y la GDP. González *et al.* (2003) al evaluar el uso de 'Promote' en cabras productoras de leche Murciano-Granadina, con una dieta base 65% forraje de alfalfa y de maíz (50-50%) y 35% concentrado con enzima, encontraron que la ingesta, la producción y la composición de la leche no fueron afectados, pero la ganancia de peso mejoró con la adición de la enzima.

Por lo general, el uso de enzimas puede incrementar la cantidad de gas producido en las fermentaciones *in vitro*, la digestibilidad de las fibras (Wang *et al.*, 2001, 2002; Eun *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2008) y la eficiencia fermentativa de los alimentos (Wallace *et al.*, 2001; Colombatto *et al.*, 2004b); pero no siempre hay efectos positivos en la producción de AGV totales y relación A:P (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002, 2008; Giraldo *et al.*, 2007; Krueger y Adesogan, 2008) e incluso algunos son negativos (Yang *et al.*, 2002; Ranilla *et al.*, 2008). Yescas-Yescas *et al.* (2004) al utilizar 'Fibrozyme' en rastrojo de maíz y avena, encontraron que incrementó la concentración de acetato y butirato, aunque no la de propionato; no obstante, Giraldo *et al.* (2009) al evaluar

'Fibrozyme' en la alimentación de borregos Merino, observaron que entre 4 y 8h postprandial las proporciones molares de propionato fueron mayores.

Fuente del inóculo ruminal

Los posibles efectos sinérgicos e interacciones entre las actividades enzimáticas suplementadas (exógenas) y las endógenas, afectan las respuestas del tratamiento con enzimas fibrolíticas. La inclusión de enzimas puede incrementar el número de bacterias ruminales fibrolíticas y no fibrolíticas, que utilizan la hemicelulosa y segundos productos de la digestión de la celulosa (Wang *et al.*, 2001; Nsereko *et al.*, 2002; Giraldo *et al.*, 2007). Giraldo *et al.* (2009) encontraron cambios en las poblaciones bacterianas del rumen y sinergismo positivo con las endoglucanasas y xilanasas endógenas, y sugieren una relación entre los cambios en los patrones de fermentación y las poblaciones de bacterias a largo plazo. Otros estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado sinergismo entre enzimas exógenas de *Trichoderma longibrachiatum* y las enzimas producidas por los microorganismos del rumen (Morgavi *et al.*, 2000a). Hirstov *et al.* (2000) observaron que la suplementación con enzimas incrementó linealmente las actividades endógenas de carboximetilcelulosa y xilanasas, mientras que elevados niveles de enzima resultaron en un incremento cuadrático de la carboximetilcelulosa, xilanasas y β -glucanasas en la digesta duodenal. Morgavi *et al.* (2000a) examinaron el efecto de la interacción entre 11 preparados de enzimas de *T. longibrachiatum* sobre la degradación de la fibra en cinco niveles de pH (entre 5 y 6), encontrando sinergismo entre actividades enzimáticas exógenas y las producidas por los microorganismos del rumen en la degradación de la celulosa soluble, xilano y fibras del ensilado de maíz (la hidrólisis incrementó en 35, 100 y 40%, respectivamente).

Tipo de preparado enzimático

Cada tipo de enzima requiere un conjunto de condiciones óptimas para expresar su máxima actividad. Algunos preparados enzimáticos comerciales se muestran más estables cuando el pH es más cercano al neutro (Yang *et al.*, 2002; Colombatto *et al.*, 2007); sin embargo, las condiciones óptimas de pH, temperatura y tiempo de retención varían de acuerdo a la enzima. Por ejemplo, (Colombatto 2004 a, b, c) midieron la estabilidad de 'Depol 40' (Biocatalysts Ltd., Pontypridd, RU) y 'Liquicell 2500' (Specialty Enzymes and Biochemicals,

Fresno, CA, EEUU) a diferentes pH (4; 5,6 y 6,8) y condiciones de temperatura (15 y 39°C), donde las xilanasas de ambos productos mostraron pH óptimo alrededor de 5,6 en su actividad enzimática, pero la actividad de las endoglucanasas estuvo inversamente relacionada al pH. En el interior del rumen, la estabilidad de los productos enzimáticos es muy variable. Algunos han demostrado sobrevivir en el rumen y durante el pasaje hacia el duodeno; sin embargo, otros permanecen activos por menos tiempo (Ranilla *et al.*, 2008). Morgavi *et al.* (2000b) señalan que la estabilidad de las xilanasas pudiera ser mayor a la de las endoglucanasas. Colombatto *et al.* (2003b) probaron en líquido ruminal tres dosis (0,5; 2,55 y 5,1 $\mu\text{l}\cdot\text{g}^{-1}$ de MS) del producto enzimático 'Liquicell 2500', derivado de fermentaciones de *Trichoderma reesei* con actividad xilanasas y celulasas, sobre celulosa (Avicel PH-101, Fluka Chemicals), xilano (X-0627, Sigma Chemicals) y una combinación celulosa y xilano (relación 1:1) y encontraron que la actividad de las xilanasas ocurría entre 0 y 6h pero la de endoglucanasas sólo ocurría en el momento inmediato de su aplicación, lo cual indicaba menor estabilidad de endoglucanasas exógenas en comparación con la de xilanasas. Deng *et al.* (2006) aislaron y secuenciaron una xilanasas de *Aspergillus niger* (endo- β -1,4-xilanasas) que podría ser utilizada como aditivo para los animales debido a que mantiene el 95% de su actividad máxima a la temperatura del rumen; incluso, la enzima retiene por 30min a 37°C el 76% de su actividad máxima cuando el pH es de 2.

Interacción enzima por componentes de la dieta

La eficiencia de los preparados fibrolíticos varía de acuerdo a la dieta. Ciertos componentes de la dieta o aditivos pueden tener efectos sinérgicos o interacciones negativas con las enzimas que muestran diferentes grados de afinidad con cada sustrato (Wang *et al.*, 2001; Colombatto *et al.*, 2003a; Barahona *et al.*, 2006). Eun y Beauchemin (2007a) añadieron dosis similares (unidades de enzima) de 23 productos con sólo un tipo de actividad fibrolítica; en condiciones óptimas y en combinación con el sustrato todas ellas mostraron diferentes actividades de endoglucanasas y xilanasas. En ensilados y henos de pastos, maíz y alfalfa, los efectos de la aplicación de endoglucanasas sobre la degradación y digestibilidad de la FDN y MS han sido contradictorios (Nsereko *et al.*, 2000; Wallace *et al.*, 2001; Tricarico y Dawson, 2005; Eun *et al.*, 2007). Sin embargo, Eun y

Beauchemin (2007b, c) al probar endoglucanasas encontraron efectos positivos de la suplementación con la degradabilidad del heno de alfalfa. Por otra parte, el uso de xilanasas puede mejorar la degradabilidad de las fibras en alfalfa (Nsereko *et al.*, 2000; Colombatto *et al.*, 2003a, b; Tricarico y Dawson, 2005), aunque de acuerdo a Eun y Beauchemin (2007a) es importante considerar el tipo y características de la enzima al evaluar también xilanasas en heno de alfalfa. No obstante, el uso de xilanasas podría tener efectos negativos en la digestibilidad del ensilado de maíz (Colombatto *et al.*, 2003a, b).

Lo anterior sugiere que el uso de xilanasas y celulasas de hongos podría ser más consistente en dietas que incluyen forrajes de leguminosas que de gramíneas. Algunos componentes de los alimentos pueden afectar la estabilidad de los preparados enzimáticos; por ejemplo, Barahona *et al.* (2006) encontraron que la adición de taninos a la dieta podía inhibir la actividad de enzimas fibrolíticas y, en particular, a las xilanasas que parecen ser más susceptibles a la inhibición por taninos que las carboximetilcelulasas, mientras que las β -D-glucosidasas y β -D-xilosidasas son las menos sensibles. Asimismo, la estabilidad de ciertos preparados de enzimas pueden ser más sensibles a las interacciones con otros preparados. Algunos autores reportan efectos sinérgicos positivos en las diversas actividades de productos enzimáticos: entre celulasas y xilanasas (Nsereko *et al.*, 2000; Bhat y Hazlewood, 2001), y entre celulasas y proteasas (Colombatto *et al.*, 2003a, b). Por ejemplo, Nsereko *et al.* (2000) probaron 14 ensilados de cebada en un rumiante suplementado con el preparado enzimático 'Promote'. En ningún caso se encontró actividad sinérgica con endo-1,4- β -xilanasas (1-50%) y α -amilasa (23-53%); sin embargo, en 11 ensilados sí se observó actividad de celulasas.

En la naturaleza ciertas enzimas se expresan de forma coordinada para la degradación de la celulosa (Shida *et al.*, 2008). Algunos autores han encontrado que el efecto de la combinación de xilanasas y endoglucanasas en la alimentación de rumiantes es mejor al de la aplicación de las enzimas individuales (Tricarico y Dawson, 2005). Yu *et al.* (2005) encontraron que la combinación de ácido ferúlicoesterasas de *A. niger* y xilanasas de *Trichoderma* actuó sinérgicamente para liberar el ácido ferúlico de los ferulo-polisacáridos, logrando que los restos de polisacáridos se encontraran más accesibles y disponibles para posterior hidrólisis, por lo que la aplicación del 'coctel multienzimático' mejoró la

digestibilidad de la MS. Algunos hongos, como *T. reesei*, tienen alta actividad de celobiohidrolasas y endoglucanasas, y baja de β -glucosidasas, lo cual es la principal limitante para una mejor degradación de celulosa, (Rahman *et al.*, 2009). Trabajos con enzimas puras, utilizando la tecnología del ADN recombinante, han mostrado que el uso de ciertas combinaciones de enzimas puede tener un efecto negativo y que se debe buscar una relación ideal de endoglucanasas: xilanasas dependiendo del sustrato, previo al uso de productos fibrolíticos exógenos no puros (Eun y Beauchemin, 2007a).

Dosis de la enzima

El 8% de los experimentos reportados en la Tabla I muestran efectos negativos por la aplicación de productos enzimáticos. Algunos de estos efectos podrían explicarse por la dosis de suplementación, insuficiente o excesiva. Estudios realizados *in vitro*, *in situ* e *in vivo* muestran que en muchas ocasiones las respuestas por la adición de enzimas no son lineales (Colombatto *et al.*, 2002; Beauchemin *et al.*, 2003; Medina-Romo *et al.*, 2006). Dosis moderadas de celulasas y xilanasas, causan rupturas en la superficie de la estructura de los alimentos antes o después de su ingestión, pero en altas cantidades pueden competir con los sitios de unión a la celulosa viables y afectar negativamente la adherencia microbiana (Morgavi *et al.*, 2000c; Nsereko *et al.*, 2002). Mayor capacidad fermentativa de los sustratos en el líquido ruminal también se debe al incremento de bacterias promovido por la adición de complejos exógenos; Nsereko *et al.* (2002) observaron tendencias cuadráticas en el conteo de bacterias con respecto a dosis suplementada de un producto enzimático de *T. logibrachiatum*.

Kung *et al.* (2000), al añadir a una dieta para vacas lecheras 60% ensilado de maíz: 40% alfalfa a cuatro niveles (0; 1; 2,5ml·kg⁻¹ de MS de un producto enzimático de Finn Feeds, Int.), encontraron que los animales suplementados con niveles bajos tendieron a producir más leche (39,5kg/día), que aquellos con el tratamiento testigo (37kg/día), o bien con dietas altas en enzimas (36,2kg/d;ia). McAllister *et al.* (1999) encontraron un efecto cuadrático en el consumo, ganancia de peso y eficiencia alimenticia al probar enzimas exógenas en becerros evaluados por 56 días. Otros autores han encontrado efectos cuadráticos en las concentraciones de acetato, propionato, butirato y AGV totales (Colombatto *et al.*, 2003a; Eun y Beauchemin, 2007b, c).

Tiempo de aplicación

En el 77,6% de los experimentos reportados en la Tabla I la enzima fue añadida al momento de iniciar la evaluación con líquido ruminal; en estos trabajos se observa que el uso de enzimas afectó positivamente las digestibilidades de la MS, MO y FDN; hay evidencias de que la adición de la enzima durante el proceso de ensilaje o pretratamiento (tiempo de aplicación previo a la evaluación *in vitro*, *in situ* o *in vivo*) puede mejorar la composición de los alimentos al disminuir las proporciones de FDN y FDA. Algunos trabajos han mostrado que las digestibilidades de la MS y FDN fueron menores cuando un preparado enzimático comercial fue aplicado en el rumen directamente, en comparación con la aplicación durante el proceso de ensilado (McAllister *et al.*, 1999). La acción hidrolítica de las enzimas en los alimentos ocurre antes de su consumo, cuando hay incorporación de nitrógeno a las partículas, mayor actividad celolítica (Wang *et al.*, 2012) y liberación de azúcares reducidos (Wang *et al.*, 2001, 2002; Colombatto *et al.*, 2003b). Estos eventos afectan la tasa inicial de fermentación, las actividades enzimáticas endógenas de las fracciones líquidas y sólidas del líquido ruminal (Yu *et al.*, 2005), y pueden mejorar la digestibilidad *in vitro* de la MS y FDN (Wang *et al.*, 2001, 2002; Elwakeel *et al.*, 2007). Álvarez *et al.* (2009) encontraron que el pretratamiento con enzimas incrementó la MS y proteína cruda (PC) soluble de la dieta. Además, esta práctica puede ser recomendable cuando se utilizan extractos de enzimas de hongos ligninolíticos no puros, ya que éstos, además de xilanasas y celulasas, contienen actividades de ligninasas que catalizan la oxidación de la lignina en presencia de oxígeno. Según Delgado *et al.* (2002) cada unidad de lignina disminuye unas dos unidades la degradabilidad de la pared celular, pero esto depende del tipo y estado fenológico de las plantas (Jung y Casler, 2006a, b).

Además, el tratamiento con celulasas y xilanasas durante el proceso de ensilado permite la liberación de mayor cantidad de azúcares reducidos y la disminución de las concentraciones de amoníaco y ácido acético, confiriéndole mayor estabilidad al producto (Wang *et al.*, 2001; Colombatto *et al.*, 2004a, b, c; Dean *et al.*, 2005). Dosualdo *et al.* (2006) aplicaron enzimas fibrolíticas durante un proceso de ensilado y encontraron que el tratamiento y el tiempo de fermentación afectaron positivamente los contenidos de MS, PC, FDN y FDA. Esto es importante, pues algunos programas de mejoramiento genético han centrado su atención de la disminución de la

FDN de los forrajes (Casler *et al.*, 2005) como una alternativa para incrementar el grado de disponibilidad de los nutrientes en los forrajes (Núñez *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2003), pues existen altas correlaciones negativas entre la digestibilidad *in vitro* de la MS y la proporción de FDA y FDN ($r = -0,70$; $r = -0,90$; Coleman y Moore, 2002). En alfalfa (*Medicago sativa*) la disminución de la proporción de FDN se relaciona con el incremento de la proporción de pectinas y mejor digestibilidad de la MS y utilización de las proteínas de la dieta.

Por otra parte, diversos estudios muestran poco o ningún efecto relacionado al pretratamiento (Colombatto *et al.*, 2007; Giraldo *et al.*, 2008) y en la mayoría no se observan cambios en los patrones de fermentación (Hong *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2012). Wang *et al.* (2012) probaron la aplicación de un producto enzimático (2:1 xilanasas:celulasas) a 0 y 24h previas a la evaluación en heno de alfalfa y paja de cebada, y encontraron que el pretratamiento incrementó la colonización de los sustratos 4h después de su consumo debido a la mayor cantidad de azúcares reducidas, producto de la actividad enzimática, pero tal tasa inicial de colonización no se mantuvo posteriormente; en contraste, en aquellos alimentos en los que el producto enzimático se aplicó justo antes de la evaluación, la digestibilidad de MS se mantuvo de 4 a 48h. Estos investigadores probaron lavar los alimentos pretratados con el fin de remover productos solubles; este proceso mejoró la colonización bacteriana, pero disminuyó la digestibilidad. Elwakeel *et al.* (2007) aunque observaron que la DMS *in vitro* mejoró por el uso de enzimas aplicadas en pretratamiento, no encontraron efectos en la producción de leche.

Algunas inconsistencias

Algunos autores concluyeron que no hubo efectos derivados del uso de enzimas fibrolíticas (Dhiman *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2006a; Redish y Kung, 2007) o bien, tales efectos fueron negativos. Sin embargo, en algunos de los experimentos revisados en el presente trabajo, los autores también concluyen que el uso de enzimas tiene efectos inconsistentes al observar efectos positivos en algunas variables, pero acompañados de efectos negativos en otras (Kung *et al.*, 2000; Bassiouni *et al.*, 2010).

Conclusiones

Los hongos ligninolíticos producen una gran cantidad de formas e isoformas de enzimas que degradan la

lignina, la hemicelulosa y la celulosa, y cuyas características bioquímicas, estructurales y condiciones óptimas varían de acuerdo al medio y método en que son producidas por los hongos. El uso de xilanasas y celulasas en experimentos *in vitro* con líquido ruminal muestra efectos positivos en las digestibilidades de la MS y FDN en la mayoría de los trabajos realizados *in vitro* incluidos en la presente revisión; aunque las enzimas por lo general incrementan la cantidad de AGV totales producidos, no en todos los casos hay mejora en los patrones de fermentación. También se observan efectos positivos por la suplementación con enzimas fibrolíticas en las variables de comportamiento animal: ingesta de la MS, GDP, CA y producción de leche, pero en muchos casos hay efectos nulos o negativos en la composición de la leche. La adición de enzimas puede incrementar el número de bacterias ruminales y tener efectos sinérgicos con las actividades enzimáticas del líquido ruminal. Los resultados obtenidos dependen del rango de temperatura y pH óptimos a los que las enzimas pueden trabajar. Parece que las xilanasas pueden ser más estables que las endoglucanasas en presencia de líquido ruminal y que ambos tipos de enzimas funcionan mejor en la degradación de las fibras de la alfalfa que del maíz, aunque las actividades de xilanasas pueden ser inhibidas en alimentos con alta cantidad de taninos. Los cocteles multienzimáticos pueden tener mayor potencial que las enzimas puras, pero lo más importante es encontrar las relaciones celulasas: xilanasas ideales en combinación con los alimentos. En el 11% de los experimentos analizados de una muestra de 53 artículos no hubo ningún efecto del uso de enzimas fibrolíticas y en el 10% de la misma muestra tales efectos fueron negativos. Una de las razones para observar efectos nulos o negativos es la dosis de enzima suplementada, ya que se han encontrado efectos cuadráticos en las relaciones entre niveles de éste factor y las respuestas en tendencias, algunas variables. La aplicación de las enzimas durante el proceso de ensilado u horas previas a la incubación ruminal (pretratamiento) disminuye las proporciones de FDN y FDA, incrementa la cantidad inicial de azúcares reducidos de los alimentos y aumenta las digestibilidades de MS y FDN, aunque no en todos los casos estos beneficios se ven reflejados *in vivo*. Algunos autores concluyen que el uso de enzimas fibrolíticas tiene resultados inconsistentes al haber resultados positivos en variables acompañados de efectos nulos o negativos en otras.

Los avances en el conocimiento sobre producción de enzimas fúngicas, métodos de caracterización

bioquímica y molecular, e ingeniería genética, en combinación con la información derivada de los resultados de experimentos con enzimas fibrolíticas exógenas en rumiantes, puede ayudar a la búsqueda y diseño de productos enzimáticos más adecuados a las necesidades de los rumiantes y sus dietas.

AGRADECIMIENTOS

El presente artículo fue desarrollado bajo la dirección y supervisión de Luis Alberto Miranda Romero. Los autores agradecen el soporte técnico otorgado por la Universidad Autónoma Chapingo y el Instituto Tecnológico de El Llano Aguascalientes.

REFERENCIAS

- Álvarez G, Pinos-Rodríguez JM, Herrera JG, García JC, González SS, Bárcena R (2009) Effect of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal digestibility in steers fed high fiber rations. *Livest. Sci.* 121: 150-154.
- An JM, Kim YK, Lim WJ, Hong SY, An CL, Shin EC, Cho KM, Choi BR, Kang JM, Lee SM, Kim H, Yun HD (2005) Evaluation of a novel bifunctional xylanase-cellulase constructed by gene fusion. *Enz. Microb. Technol.* 36: 989-995.
- Baah J, Shelford JA, Hirstov AN, McAllister TA, Cheng KJ (2005) Effect of Tween 80 and fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and digestibility of feeds in Holstein cows. *Asian-Austr. J. Anim. Sci.* 18: 816-824.
- Balci F, Dikmen S, Gencoglu H, Orman A, Turkmen II, Biricik H (2007) The effect of fibrolytic exogenous enzyme on fattening performance of steers. *Bulg. J. Vet. Med.* 10: 113-118.
- Barahona R, Sanchez S, Lascano CA, Owen E, Morris P, Theodorou MK (2006) Effect of condensed tannins from tropical legumes on the activity of fibrolytic enzymes from the rumen fungus *Neocallimastix hurleyensis*. *Enz. Microb. Technol.* 39: 281-288.
- Bassiouni MI, Gaafar HMA, Mohi AMA, Metwally AM, Elshora MAH (2010) Evaluation of rations supplemented with fibrolytic enzyme on dairy cows performance 3. Productive performance of lactating Friesian cows. *Livest. Res. Rural Devel.* 22: 117.
- Beauchemin, KA, Colombatto D, Morgavi DP, Yang WZ (2003) Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Ani. Sci.* 81: E37-E47.
- Bergamaschine AF, Passipieri M, Veriano FW, Isepon O, Almeida CL (2006) Calidad y valor nutritivo del capim-marandu (*B. brizantha* cv.) con aditivos o forrajes enmohecidos. *Rev. Bras. Zootecn.* 35: 1454-1462.
- Bhat MK, Hazlewood GP (2001) Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. En Bedford MR, Partridge GG (Eds.) *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. CABI. Wallingford, RU, pp. 11-60.
- Casler MD, Diaby M, Stendal C (2005) Heterosis and inbreeding depression for forage yield and fiber concentration. *Crop Sci.* 45: 44-50.
- Cavallazzi P, Almeida M, Megumi M (2004) Laccase production by *Lepista sordida*. *Braz. J. Microbiol.* 35: 261-253.
- Chen M, Yao S, Zhang H, Liang X (2010) Purification and characterization of a versatile peroxidase from edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Chin. J. Chem. Eng.* 18: 824-829.
- Cheng Y, Yang C, Liu W (2005) Cloning and expression of *Thermobifida* xylanase gene in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Enz. Microb. Technol.* 37: 541-546.
- Cohen R, Yarden O, Yitzhak H (2002) Lignocellulose affects Mn²⁺ regulation of peroxidase transcript levels in solid-state cultures of *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3156-3158.
- Coleman SW, Moore E (2002) Variability in relationships among forage intake digestibility, NDF and ADF. *J. Anim. Sci.* 80 (Suppl. 1): 94(Abstr.).
- Colombatto D, Mould FL, Bhat MK, Owen E (2002) The effect of fibrolytic enzyme application on rate and extent of alfalfa stem fermentation, assessed *in vitro*. *Proc. Br. Soc. Anim. Sci. Annu. Mtg. Penicuik, RU.* p. 209.
- Colombatto D, Mould FL, Bhat MK, Morgavi DP, Beauchemin KA, Owen E (2003a) Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentation of pure cellulose and xylan by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 81: 1040-1050.
- Colombatto D, Morgavi DP, Furtado AF, Beauchemin KA (2003b) Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: Relationship between biochemical characteristics and *in vitro* ruminal degradation. *J. Anim. Sci.* 81: 2628-2638.
- Colombatto D, Mould F, Bhat M, Philipps R, Owen E (2004a) *In vitro* evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage: I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level. *Anim. Feed Sci. Technol.* 111: 111-129.
- Colombatto D, Mould F, Bhat M, Phipps R, Owen E (2004b) Evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage: II. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level. *Anim. Feed Sci. Technol.* 111: 129-144.
- Colombatto D, Mould F, Bhat M, Phipps R, Owen E (2004c) Evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage: III. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level. *Anim. Feed Sci. Technol.* 111: 145-160.
- Colombatto D, Mould FL, Bhat MK, 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.
- Comlekcioglu U, Ozcose E, Tutus A, Akyol I, Ekinci MS (2010) Cloning and characterization of cellulase and xylanase coding genes from anaerobic fungus *Neocallimastix* sp. *J. Agric. Biol.* 12: 691-696.
- Cruywagen CW, Goosen L (2004) Effect of an exogenous fibrolytic enzyme on growth rate, feed intake and feed conversion ratio in growing lambs. *S.Afr. J. Anim. Sci.* 34 (Suppl. 2): 71-73.

- Damiano VB, Ward R, Gomes E, Alves-Prado HF, Da Silva R (2006) Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic and thermophilic *Bacillus licheniformis* 77-2. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129-132: 289-302.
- Dean BD, Adesogan AT, Krueger N, Littell RC (2005) Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, aerobic stability, and digestibility of bermudagrass silage. *J. Dairy Sci.* 88: 994-1003.
- Dean BD, Adesogan AT, Krueger NA, Littell RC (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.
- Delgado NJ, Casler MD, Grau CR, Jung HG (2002) Reactions of smooth Bromegrass clones with divergent lignin or etherified ferulic acid concentration to three fungal pathogens. *Crop Sci.* 42: 1824-1831.
- Deng P, Li D, Cao Y, Lu W, Wang C (2006) Cloning of a gene encoding an acidophilic endo- β -1,4-xylanase obtained from *Aspergillus niger* CGMCC1067 and constitutive expression in *Pichia pastoris*. *Enz. Microb. Technol.* 39: 1096-1102.
- Dhiman TR, Zaman MS, Gimenez RR, Walters JL, Treacher R (2002) Performance of dairy cows fed forage treated with fibrolytic enzymes prior to feeding. *Anim. Feed Sci. Technol.* 101: 115-125.
- Dosualdo RK, Gomes PO, Campos VS, Prates OA, Bastos PL, Martins CF (2006) Valor nutritivo del ensilado de maíz (*Zea mays* L.) producido con inoculantes enzimo-bacterianos. *Rev. Bras. Zootecn.* 35: 389-395.
- Elwakeel EA, Titgemeyer EC, Johnson BJ, Armendiz CK, Shirley JE (2007) Fibrolytic enzymes to increase the nutritive value of dairy feedstuffs. *J. Dairy Sci.* 90: 5226-5236.
- Eun LS, Beauchemin KA (2007a) Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using *in vitro* fermentation characteristics. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132: 298-315.
- Eun JS, Beauchemin KA (2007b) Enhancing *in vitro* degradation of alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. *J. Dairy Sci.* 90: 2839-2851.
- Eun JS, Beauchemin KA (2007c) Use of an *in vitro* fermentation bioassay to evaluate improvements in degradation of alfalfa hay due to exogenous feed enzymes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 135: 315-328.
- Eun JS, Beauchemin KA, 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.
- Ferreira CG, Nussio GL, Maluf HC, Prudencio de Campos F, Michelini Coelho R, Mari LJ, Almeida P (2006a) Características de fermentação e composicao químico-bromatológica de silangens de capim-tifton 85 confeccionadas com cinco teores de materia seca. *Rev. Bras. Zootecn.* 35: 7-20.
- Ferreira CG, Nussio GL, Maluf HC, Prudencio de Campos F, Michelini Coelho R, Mari LJ, Almeida P (2006b) Perfil microbiológico, parámetros físicos e estabilidad aeróbica de silangens de capim-tifton 85 (*Cynodon* sp.) confeccionadas com distintas concentracoes de materia seca e aplicacao de aditivos. *Rev. Bras. Zootecn.* 35: 358-371.
- Giraldo LA, Tejido ML, Ranilla MJ, Ramos S, Mantecón AR, Carro MD (2009) Influence of direct-fed exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fibrolytic activity sheep. *Opt. Méditerran. A* 85: 297-302.
- Giraldo LA, Tejido ML, Ranilla MJ, Ramos S, Carro MD (2008) Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay based diet. *J. Anim. Sci.* 03/2008. <http://jas.fas.org>.
- Giraldo LA, Ranilla MJ, Tejido ML, Carro MD (2007). Influence of exogenous fibrolytic enzyme and fumarate on methane production, microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters. *Br. J. Nutr.* 98: 753-761.
- Gómez-Vázquez A, Pérez J, Mendoza GD, Aranda E, Hernández A (2003) Fibrolytic exogenous enzymes improve performance in steers fed sugar cane and stargrass. *Livest. Prod. Sci.* 82: 249-255.
- González E, Caja G, Albanell E, Flores C, Castro A, Casals R, Such X, Bach A, Torre C (2003) Effects of fibrolytic enzyme supplementation for dairy goats in mid lactation. *J. Dairy Sci.* 85(Suppl. 1): 355.
- Gonzalo R, Díaz MC, Durán N (2005) Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Crit. Rev. Microbiol.* 31: 197-212.
- Hatfield R, Fukushima RS (2005) Can lignin be accurately measured? *Crop Sci.* 45: 832-839.
- Hirstov AN, McAllister TA, Cheng KJ (2000) Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle fed a barley grain diet. *J. Anim. Sci.* 78: 477-487.
- Hong SH, Lee BK, Choi NJ, Lee SS, Yung G, Ha JK (2003) Effects of enzyme application method and levels and pre-treatment times on rumen fermentation, nutrient degradation and digestion in goats and steers. *Asian-Austr. J. Anim. Sci.* 16: 389-393.
- Jung HG, Casler MD (2006a) Maize stem tissues: cell wall concentration and composition during development. *Crop Sci.* 46: 1793-1800.
- Jung HG, Casler MD (2006b) Maize stem tissues: impact of development on cell wall degradability. *Crop Sci.* 46: 1801-1809.
- Jung HG, Raeth-Knight M, Linn JG (2004) Forage fiber digestibility: measurement, variability, and impact. *Proc. 65th Minnesota Nutr. Conf.* St. Paul, MN, EEUU. pp. 105-125
- Kataeva I, Li X, Chen H, Choi S, Ljungdahl LG (1999) Cloning and sequence analysis of a new cellulose gene encoding CelK, a mayor cellulosome component of *Clostridium thermocellum*: evidence for gene duplication and recombination. *J. Bacteriol.* 181: 5288-5295.
- Krueger NA, Adesogan AT (2008) Effects of different mixtures of fibrolytic enzymes digestion and fermentation of bahiagrass hay. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 84-94.
- Krueger NA, Adesogan AT, Staples CR, Krueger WK, Dean BD, Littell RC (2008) The potential to increase digestibility of tropical grasses with a fungal, ferulic acid esterase enzyme preparation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 98-108.
- Kung L, Treacher RJ, Nauman GA, Smagala AM, Endres KM, Cohen MA (2000) The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83: 115-122.
- Levin L, Papinutti L, Forchiassin F (2004) Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technol.* 94: 169-176.
- March RL, Zelinger S (2003) Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Microbiol. Biotechnol.* 60: 515-522.
- Mata G, Waliszewski KN (2005) Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource Technol.* 96: 537-544.
- McAllister TA, Oosting SJ, Popp JD, Mir Z, Yanke LJ, Hristov AN, Treacher RJ, Cheng KJ (1999) Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 79: 353-360.
- Medina-Romo M, Tirado-Estrada G, Mejia-Haro I, Camarillo-Solis I, Cruz-Vázquez C (2006) Digestibilidad *in situ* de dietas con harina de nopal deshidratado conteniendo un preparado de enzimas fibrolíticas exógenas. *Pesq. Agropec. Bras.* 41: 1173-1177.
- Mikán JF, Castellanos DE (2004) Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 6: 58-71.
- Min SY, Kim BG, Lee C, Hur HG, Ahn J (2002) Purification, characterization, and cDNA cloning of xylanase from fungus *Trichoderma strain SY*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 890-894.
- Moreno R, Pino RJ, González S, Álvarez G, García JC, Mendoza G, Bárcena R (2007) Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación ruminal *in vitro* de dietas para vacas lecheras. *Interciencia* 32: 850-853.
- Morgavi DP, Beauchemin KA, Nsereko LM, Iwaasa AD, Yang WZ, McAllister TA, Wang Y (2000a) Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Dairy Sci.* 83: 1310-1321.
- Morgavi DP, Newbold CJ, Beever DE, Wallace RJ (2000b) Stability and stabilization of potential feed additive enzymes in rumen fluid. *Enz. Microbiol. Technol.* 26: 171-177.
- Morgavi DP, Nsereko VL, Rode LM, Beauchemin KA, McAllister TA, Wang YA (2000c) *Trichoderma* feed enzyme preparation enhances adhesion of *Fibrobacter succinogenes* to complex substrates but not to pure cellulose. *Proc. Chicago Rumen Function Conf.* Chicago, IL, EEUU. p. 33.
- Moriya T, Murasima K, Nakane A, Yanai K, Sumida N, Koga J, Murakami T, Kono T (2003) Molecular cloning of endo- β -D-1,4-glucanase genes, Rce1, Rce2, and Rce3, from *Rhizopus oryzae*. *J. Bacteriol.* 185: 1749-1756.
- Murray P, Aro N, Collins C, Grassick A, Penttilä M, Saloheimo M, Touhy M (2004) Expression in *Trichoderma reesei* and characterization of a thermostable family 3 β -glucosidase from the moderately

- thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. *Prot. Express. Purif.* 38: 248-257.
- Murrieta D, Mata G, Iglesias LG (2002) Cambios en la producción de lacasa por el hongo *Pleurotus pulmonarius* cultivado en pulpa de café en confrontación con *Trichoderma viride* Pers., un moho contaminante. *Foresta Veracruz.* 4: 47-52.
- Muwalla MM, Haddad SG, Hijazeen MA (2007) Effect of fibrolytic enzyme inclusion in high concentrate fattening diets on nutrient digestibility and growth performance of Awassi lambs. *Livest. Sci.* 111: 255-258.
- Nsereko VL, Morgavi DP, Rode LM, Beauchemin KA, McAllister TA (2000) Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 88: 153-170.
- Nsereko VL, Beauchemin KA, Morgavi DP, Rode LM, Furtado AF, McAllister TA, Iwaasa AD, Yang WZ, Wang Y (2002) Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. *Can. J. Microbiol.* 48: 14-20.
- Núñez G, Contreras EF, Contreras R (2003) Características agronómicas y químicas importantes en híbridos de maíz para forraje con alto valor energético. *Téc. Pec. Mex.* 41: 37-48.
- Obodai M, Cleland-Okine J, Vowotor KA (2003) Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-products. *J. Microbiol. Biotechnol.* 30: 146-149.
- Ogasawara W, Shida Y, Furukawa T, Shimada R, Nakagawa S, Kawamura M, Yagyu T, Kosuge A, Xu J, Nogawa M, Okada H, Morikawa Y (2006) Cloning, functional expression and promoter analysis of xylanase III gene from *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 995-1003.
- Okano K, Lida Y, Samsuri M, Prasetya B, Usagawa T, Watanabe T (2006) Comparison of *in vitro* digestibility and chemical composition among sugarcane bagasses treated by four white-rot fungi. *J. Anim. Sci.* 77: 308-313.
- Parry NJ, Beever DE, Owen E, Vandenberghe I, Van Beeumen J, Bhat MK (2001) Biochemical characterization and mechanism of action of a thermoestable B-glucosidase purified from *Thermoascus auranticus*. *Biochem. J.* 353: 117-127.
- Peña A, Núñez G, González F (2003) Importancia de la planta y el elote en poblaciones de maíz para el mejoramiento genético de la calidad forrajera. *Téc. Pec. Mex.* 41: 63-74.
- Pinos-Rodríguez JM, González SS, Mendoza GD, Bárcena R, Cobos MA, Hernández A, Ortega ME (2002) Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 80: 3016-3021.
- Pinos-Rodríguez JM, González SS, Mendoza GD, García JC, Miranda LA, De La Cruz VA (2005) Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación *in vitro* de ingredientes alimenticios, y en la producción de leche de vacas Holstein. *Interciencia* 30: 752-757.
- Pinos-Rodríguez JM, Moreno R, González SS, Robinson PH, Mendoza G, Álvarez GA (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.
- Rahman Z, Shida Y, Furukawa T, Suzuki Y, Okada H, Ogasawara W, Morikawa Y (2009) Evaluation and characterization of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters. *Appl. Genet. Molec. Biotechnol.* 82: 899-908.
- Ranilla MJ, Tejido ML, Giraldo LA, Tricárico JM, Carro MD (2008) Effects of an exogenous fibrolytic enzyme preparation on *in vitro* ruminal fermentation of three forages and their isolated cell walls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 109-121.
- Rauscher R, Würleitner E, Wacenovsky C, Aro N, Stricker AR, Zeilinger S, Kubicek CP, Penttilä M, March RL (2006) Transcriptional regulation of Xyn1, encoding Xylanase I, in *Hypocrea jecorina*. *Eukar. Cell* 5: 447-456.
- Redish MA, Kung L (2007) The effect of feeding a dry enzyme mixture with fibrolytic activity on the performance of lactating cows and digestibility of a diet for sheep. *J. Dairy Sci.* 90: 4724-4729.
- Rode LM, Yang WZ, Beauchemin KA (1999) Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 82: 2121-2126.
- Saadia M, Ahmed S, Jamil A (2008) Isolation of a xylan degrading gene from genomic DNA library of a thermophilic fungus *Chaetomium thermophile* ATCC 28076. *Pak. J. Bot.* 40: 1225-1230.
- Shida Y, Furukawa T, Ogasawara W, Kato M, Kobayashi T, Okada H, Morikawa Y (2008) Functional analysis of the Egl3 upstream region in filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78: 515-524.
- Souza MA, Figueiredo VP, Teresinha BT, Nunes PI, Moletta JL (2006a) Consumo y digestibilidad aparente total en bovinos suplementados con enzimas fibrolíticas. *Rev. Bras. Zootec.* 35: 2118-2124.
- Souza MA, Figueiredo VP, Teresinha BT, Nunes PI, Soares GJ (2006b) Eficiencia de síntesis microbiana y actividad enzimática en bovinos sometidos a suplementación con enzimas fibrolíticas. *Rev. Bras. Zootec.* 35: 1194-1200.
- Stendal C, Casler MD, Jung G (2006) Marker-assisted selection for neutral detergent fiber in smooth Bromegrass. *Crop Sci.* 46: 303-311.
- Subramaniyan S, Prema P (2000) Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 183: 1-7.
- Tang SX, Tayo GO, Tan ZL, Sun ZH, Shen LX, Zhou CS, Xiao WJ, Ren GP, Han XF, Shen SB (2008) Effects of yeast culture and fibrolytic enzyme supplementation on *in vitro* fermentation characteristics of low-quality cereal straws. *J. Anim. Sci.* 86: 1164-1172.
- Tirado-Estrada G, Mendoza-Martínez GD, Pinos-Rodríguez JM, Quezada-Tristán T, Guevara-Lara F (2011) Effects of two fibrolytic enzyme mixture on growth performance, digestion and ruminal fermentation in lambs fed corn stover based diets. *J. Appl. Anim. Res.* 39: 158-160.
- Tricarico JM, Dawson KA (2005) Influence of supplemental endoglucanase or xylanase on volatile fatty acid production from ruminant feed by ruminal *in vitro* cultures. *Arch. Anim. Nutr.* 59: 325-334.
- Wallace RJ, Wallace SJ, McKain N, Nsereko VL, Hartnell GF (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, Ramírez-Briebesca JE, Yanke LJ, Tsang A, McAllister TA (2012) Effect of exogenous fibrolytic enzyme application on the microbial attachment and digestion of barley straw *in vitro*. *Asian-Austr. J. Anim. Sci.* 25: 66-74.
- Wang J, Zhang H, Wu M, Tang C (2011) Cloning and sequence analysis of a novel xylanase gene, Auxyn10A, from *Aspergillus usarii*. *Biotechnol. Lett.* 33: 1029-1038.
- Wang Y, Spratling BM, Zobell DR, Wiedmeier RD, McAllister TA (2004) Effect of alkali pretreatment of wheat straw on the efficacy of exogenous fibrolytic enzymes. *J. Anim. Sci.* 82: 198-208.
- Wang Y, McAllister T, Rode L, Beauchemin K, Morgavi D, Nsereko V, Iwaasa A, Yang W (2002) Effects of exogenous fibrolytic enzymes on epiphytic microbial populations and digestion of silage. *J. Sci. Food Agric.* 82: 760-768.
- Wang Y, McAllister TA, Rode LM, Beauchemin KA, Morgavi DP, Neresko VL, Iwaasa AD, Yang WZ (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.
- Yang WZ, Beauchemin KA, Vedres DD (2002) Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and fermentation in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 102: 137-151.
- Yescas-Yescas R, Bárcena-Gama R, Mendoza-Martínez GD, González-Muñoz SS, Cobos-Peralta M, Ortega-Cerrilla ME (2004) Digestibilidad *in situ* de dietas con rastrojo de maíz o paja de avena con enzimas fibrolíticas. *Agrociencia* 38: 23-31.
- Yi X, Shi Y, Xu H, Li W, Xie J, Yu R, Zhu J, Cao J, Qiao D (2010) Hyperexpression of two *Aspergillus niger* xylanase genes in *Escherichia coli* and characterization of the gene products. *Braz. J. Microbiol.* 41: 778-786.
- Yu P, McKinnon JJ, Christensen DA (2005) Improving the nutritional value of oat hulls for ruminant animals with pretreatment of mitienzyme cocktail: *In vitro* studies. *J. Anim. Sci.* 83: 1133-1141.
- Zhou X, Smith JA, Oi FM, Koehler PG, Bennett GW, Scharf ME (2007) Correlation of cellulase gene expression and cellulolytic activity throughout the gut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Gene* 395: 29-39.

ANALYSIS OF THE EFFECT OF FUNGAL ENZYMES IN RUMINANT FEED

Deli Nazmín Tirado-González, Gustavo Tirado-Estrada and Luis Alberto Miranda-Romero

SUMMARY

A review of the potential effects of xylanases and cellulases supplementation on ruminants was carried out. Most of in vitro studies included in this article support that application of exogenous fibrolytic enzymes (EFE) increase the dry matter degradability (DMD), neutral detergent fiber degradability (NDFD), gas and fatty volatile acids (FVA) production. The use of some EFE increased ruminal bacteria population and acted synergistically with endogenous enzymes. In performance traits of ruminants, EFE generally improve the dry matter intake (DMI), average daily gain (ADG), feed conversion (FC) and milk production. However, sometimes EFE supplementation had negative or null effects on the acetate:propionate ratio and milk contents.

Appropriate EFE dose increases the consistency of positive effects, whereas the adequate cellulases: xylanases ratio in EFE depends on the diet ingredients. Using EFE in legume-based diets could have better results than in grass-based diets. Besides, in ruminal conditions, if tannins content in diet is low, xylanases EFE seem to be more stables than cellulases EFE. Adding EFE during the ensiling process or forage pre-treatment with EFE decrease the proportion of neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF), increase reduced sugars, and improve the DMD and NDFD of the forages, although this quality improvement does not always affect the productive animal performance.

SOBRE O EFEITO DE ENZIMAS FÚNGICAS NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES

Deli Nazmín Tirado-González, Gustavo Tirado-Estrada e Luis Alberto Miranda-Romero

RESUMO

Realizou-se uma revisão sobre os efeitos potenciais de xilanases e celulasas na alimentação de ruminantes. Encontrou-se que estas incrementam a digestibilidade da matéria seca (MS) e da fibra detergente neutro (FDN), assim como a produção de gases e de ácidos graxos voláteis totais (AGVt), na maioria das avaliações realizadas in vitro. Algumas atividades enzimáticas incrementaram a população de bactérias ruminais e mostraram sinergismo com as enzimas de microrganismos do rúmen; em comportamento animal, podem incrementar-se a ingesta de MS, ganho diário de peso (GDP), conversão alimentícia (CA) e produção de leite. Em alguns casos tem sido observado efeitos nulos ou negativos na pro-

porção acetato:propionato e em componentes do leite. Os resultados são melhores utilizando doses adequadas de enzimas e, mais consistentes em dietas que incluem forragens de leguminosas que de gramíneas. As xilanases parecem ser mais estáveis que as celulasas em condições ruminais, mas com alimentos com baixo conteúdo de taninos; a correta relação celulasas: xilanases depende da dieta base. Os processos de ensilagem e pré-tratamento com enzimas fibrolíticas diminuem as proporções de FDN e FDA, incrementam os açúcares reduzidos e melhoram a digestibilidade da MS e FDN das forragens, mesmo que isto não sempre se reflète no comportamento produtivo do animal.