



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN
Y SERVICIO EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

ENZIMAS FIBROLÍTICAS DE HONGOS LIGNINOLÍTICOS Y DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE FDN DE DIETAS PARA RUMIANTES

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

DELI NAZMÍN TIRADO GONZÁLEZ

Bajo la supervisión de **LUIS ALBERTO MIRANDA ROMERO**



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES



Chapingo, Texcoco, Estado de México
MAYO 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN
Y SERVICIO EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

ENZIMAS FIBROLÍTICAS DE HONGOS LIGNINOLÍTICOS Y DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE FDN EN DIETAS PARA RUMIANTES

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

DELI NAZMÍN TIRADO GONZÁLEZ

Bajo la supervisión del **Dr. LUIS ALBERTO MIRANDA ROMERO**

Asesorada por:

Dr. Juan Jáuregui Rincón
Dr. Pedro Arturo Martínez Hernández



Chapingo, Texcoco, Estado de México, **MAYO 2015**

**ENZIMAS FIBROLÍTICAS DE HONGOS LIGNINOLÍTICOS Y DIGESTIBILIDAD IN
VITRO DE FDN EN DIETAS PARA RUMIANTES**

Tesis realizada por **DELI NAZMÍN TIRADO GONZÁLEZ** bajo la supervisión del Comité Asesor
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA



Dr. Luis Alberto Miranda Romero

Director



Dr. Pedro Arturo Martínez Hernández

Asesor



Dr. Juan Jáuregui Rincón

Asesor



Dr. Héctor Silos Espino

Lector Externo

DEDICATORIA

A Dios: todo es perfecto siempre, mientras esté despierta la consciencia.

A mis padres, Martha Rosa González Bustamante y Gustavo Tirado Estrada, por su gran amor. Su incansable ejemplo de eficiencia y trabajo me inspiran a ser y dar lo mejor de mí.

A Gustavo Ernesto Tirado González y Martha Leticia Tirado González, mis hermanos y mejores amigos.

A mis amigos, que amo.

Con cariño a todos los lectores, que con su sincera crítica mejoran la calidad de mi trabajo.

AGRADECIMIENTOS

*A la **Universidad Autónoma Chapingo** por abrir sus puertas y darme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado, especialmente al Departamento de Zootecnia y al Posgrado en Producción Animal, por su amable personal, trato digno, apoyo y orientación, sin el cual no habría sido posible lograr esta importante meta.*

*A la **Universidad Autónoma de Aguascalientes**, Centro de Ciencias Básicas, por las facilidades que me otorgó en el uso de sus instalaciones. Además de facilitar parte de material biológico utilizado en la ejecución de las fases experimentales cuyos resultados se incluyen en el presente documento de Tesis.*

*Al **Centro de Investigación INIFAP**, Pabellón de Arteaga Aguascalientes, México, por proporcionar parte del material evaluado en el presente trabajo experimental.*

*Al **CONACyT**, por su apoyo económico para mi formación académica.*

*A mis tres asesores: **Dr. Luis Alberto Miranda Romero**, **Dr. Pedro Arturo Martínez Hernández** y **Dr. Juan Jáuregui Rincón**, por su guía y experiencia que hicieron posible la realización del presente proyecto doctoral.*

*A los Profesores Investigadores del Posgrado en Producción Animal, Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo: **Dr. Maximino Huerta Bravo, Dr. Rodolfo Ramírez Valverde y Dr. Agustín Ruíz Flores**, por su extraordinaria asesoría en el análisis, escritura y corrección de los documentos incluidos en la presente tesis.*

*Al **Dr. Rafael Núñez Domínguez**, Coordinador General de Estudios de Posgrado de la Universidad Autónoma Chapingo, porque su disposición, trabajo y colaboración han perfeccionado éste documento de tesis.*

*Al **Dr. Gustavo Tirado Estrada**, por su entusiasmo en las correcciones que se refleja en la calidad de éste escrito. Su experiencia, asesoría y soporte financiero hicieron posible la realización y finalización del presente documento de tesis.*

*A los **coautores Ph. D. Karen Beauchemin, Dr. Fidel Guevara Lara y Dr. Héctor Silos Espino** por su valiosa ayuda en la comprensión de los resultados.*

*A **Lic. Martha Leticia Tirado González**, por su tiempo dedicado a la corrección, edición y formato en cada sección del presente documento. Su maravillosa disposición ha hecho posible mejorar la calidad final de éste trabajo.*

*A la **M. C. María Isabel Carrillo Díaz**, por su valiosa ayuda y sugerencias tanto en la fase experimental como en la escritura de ésta tesis.*



Deli Nazmín Tirado González

CURP: TIGD800402MMCRNL02

Lugar y fecha de nacimiento: Texcoco, Estado de México, 2 de abril

FORMACIÓN ACADÉMICA

Doctorado en Ciencias: Innovación Ganadera, Posgrado en Producción Animal, Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo, enero de 2011 a mayo de 2015.

Maestría en Ciencias: Biotecnología Agropecuaria, Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes (Cédula Profesional: 5712081), septiembre de 2005 a febrero de 2008.

Ingeniería: Ingeniero Agrónomo con especialidad en Producción Pecuaria, Instituto Tecnológico El Llano, Aguascalientes (Cédula Profesional: 47057502), julio de 1999 a noviembre de 2004.

INVESTIGACIÓN

Línea de Investigación de 2005 a 2015: Caracterización y producción de enzimas fibrolíticas exógenas para Rumiantes y enzimas ligninolíticas para el mejoramiento de la calidad nutritiva de los alimentos para rumiantes.

Colaboración en proyectos de 2004 a 2010: Relacionados con el mejoramiento de la calidad de los alimentos y enzimas exógenas para rumiantes.

ÍNDICE

RESUMEN Y ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Justificación	4
1.2 Hipótesis	6
1.3 Objetivo general	7
1.4 Estructura de la tesis y objetivos particulares	7
1.4.1 Producción y potencial de enzimas fúngicas en la alimentación de rumiantes	7
1.4.2 Meta-analysis: The influence of exogenous fibrolytic enzymes in diets with different types and proportions of forage on the productive performance of ruminants	8
1.4.3 Production of cellulases and xylanases by white-rot fungi cultured in corn stover media for ruminant feed applications	8
1.4.4 Producción de enzimas fibrolíticas y ligninolías en cultivos de <i>Pleurotus ostreatus</i> en medios líquidos con rastrojo de maíz y fracciones FDN, FDA y LDA	8
1.5 Referencias	9
Producción y potencial de enzimas fúngicas en la alimentación de rumiantes	18
Resumen	18
Introducción	19

Enzimas producidas por hongos	20
Paredes celulares y tipos de enzimas que hidrolizan sus componentes	20
Efecto de la aplicación de enzimas en la alimentación de rumiantes	22
Tipo de estudio	22
Fuente del inóculo ruminal	24
Tipo de preparado enzimático	25
Interacción enzima por componentes de la dieta	26
Dosis de la enzima	27
Tiempo de aplicación	28
Algunas inconsistencias	30
Conclusiones	30
Recomendaciones	31
Referencias	32
 Meta-analysis: The influence of exogenous fibrolytic enzymes in diets with different types and proportions of forage on the productive performance of ruminants	 43
Abstract	44
1. Introduction	45
2. Material and methods	47
2.1. Sampling method	47
2.2. Evaluated variables	47
2.3. Coding of data and study factors	48
2.3.1. Experiment definition	48
2.3.2. General description of the effect of enzyme use	48
2.3.3. Classification of the experiments	48
2.4. Inclusion criteria	49
2.5 Statistical analysis	49

3. Results	51
3.1. <i>General description of the enzyme effect</i>	51
3.1.1. <i>In vitro, in situ, and in vivo digestibility</i>	51
3.1.2. <i>Animal behavior</i>	51
3.1.3. <i>Fermentation patterns</i>	511
3.2. <i>Effect of supplementation with EFE on animal performance</i>	52
3.2.1. <i>Dairy cows</i>	52
3.2.2. <i>Beef cattle</i>	52
3.2.3. <i>Sheep</i>	53
3.3. <i>Effect of type of enzyme activity</i>	53
3.3.1. <i>Effect of using EFE with different enzymatic compositions on animal productive performance</i>	53
3.3.2. <i>Effect of using EFEs with different enzymatic compositions on in vitro and in situ digestibility</i>	54
3.4. <i>Effect of time of application of the enzymatic product</i>	56
4. Discussion	56
4.1. <i>General description of the enzyme effect</i>	56
4.1.1. <i>In vitro, in situ, and in vivo digestibility</i>	56
4.1.2. <i>Animal behavior</i>	57
4.1.3. <i>Fermentation patterns</i>	57
4.2. <i>Effect of supplementation with EFE on animal performance</i>	58
4.2.1. <i>Dairy cows</i>	58
4.2.2. <i>Beef cattle</i>	59
4.2.3. <i>Sheep</i>	59
4.3. <i>Effect of type of enzyme activity</i>	60
4.3.1. <i>Effect of using EFE with different enzymatic compositions on animal productive performance</i>	60
4.3.2. <i>Effect of using EFEs with different enzymatic compositions on in vitro and in situ digestibility</i>	61
4.4. <i>Effect of time of application of the enzymatic product</i>	62

5. Conclusions	63
6. Acknowledgments	64
7. References	64
8. Apendix	87
 Production of cellulases and xylanases by white-rot fungi cultured in corn stover media for ruminant feed applications	 91
Abstract	92
1. Introduction	93
2. Materials and Methods	95
<i>2.1 Biological material</i>	95
<i>2.1.1 Corn stover hybrids</i>	95
<i>2.1.2 Bromatological analysis of corn stover hybrids</i>	95
<i>2.1.3 Fungal strains</i>	96
<i>2.2 Fungal radial growth rate and adaptability</i>	96
<i>2.3 Enzyme production</i>	97
<i>2.3.1 Fungal cultures in H324 or AS951 media</i>	97
<i>2.3.2 Fungal cultures in NDF, ADF, and ADL media</i>	97
<i>2.4 Enzyme activity assays</i>	98
<i>2.4.1 Enzyme extracts</i>	98
<i>2.4.2 Analysis of enzymatic activities</i>	98
<i>2.4.3 β-glucosidase enzyme activities</i>	99
<i>2.5 Statistical analysis</i>	99
<i>2.5.1 Fungal radial growth rate and aggressiveness</i>	100
<i>2.5.2 Enzymatic a\activities and reducing sugars in cultures</i>	100
3. Results	101
<i>3.1 Bromatological composition of corn stover hybrids</i>	101
<i>3.2 Fungal radial growth rate and adaptability to culture media</i>	102
<i>3.3 Enzymatic activity assays</i>	103

3.3.1 <i>Endoglucanases</i>	103
3.3.2 <i>Xylanases</i>	104
3.3.3 <i>Exoglucanases</i>	104
3.3.4 <i>β-glucosidases</i>	104
3.4 <i>Effect of culture medium composition on enzymatic activities</i>	105
3.5 <i>Effect of culture medium composition on the endoglucanase:xylanase ratio</i>	106
3.6 <i>Multiple linear regression models for reducing sugars released in media and individual enzymatic activities</i>	106
4. Discussion	107
4.1 <i>Corn stover hybrids bromatological composition</i>	107
4.2 <i>Relationship between radial growth rate and the fungal adaptability and enzyme activities</i>	108
4.3 <i>Effect of culture media composition on enzyme activities</i>	108
4.4 <i>Enzyme activities and their proportions affect ruminal fiber digestibility</i>	110
4.5 <i>Regression models of reducing sugars released in culture media</i>	112
5. Conclusions	113
6. Acknowledgments	114
7. References	115

Producción de enzimas fibrolíticas y ligninolicias en cultivos de <i>Pleurotus ostreatus</i> en medios líquidos con rastrojo de maíz y fracciones FDN, FDA y LDA	129
---	-----

Resumen	130
1. Introducción	131
2. Materiales y Métodos	132
2.1 Material biológico	132
2.1.2. <i>Cepas de hongos</i>	132
2.1.3. <i>Análisis bromatológicos</i>	132
2.2. Producción de enzimas	133
2.3 Ensayos de actividad enzimática	134

2.3.1. <i>Obtención del extracto enzimático</i>	134
2.3.2. <i>Determinación de azúcares reductores</i>	135
2.4 Presencia de inhibidores de Endoglucanasas, Xilanasas y Lacasas en los medios de cultivo	135
2.5 Análisis estadístico	136
2.5.1. <i>Actividades enzimáticas</i>	136
3. Resultados	137
3.1 Composición bromatológica de los rastrojos de maíz H324 y AS951	137
3.2 Actividades de enzimas fibrolíticas	137
3.3 Efecto de la composición del medio de cultivo en la proporción de Endoglucanasas: Xilanasas	140
3.4 Actividades de enzimas lacasas	141
3.5 Relación entre la liberación de azúcares reductores libres y las actividades enzimáticas	142
3.6 Efectos inhibidores de los medios de cultivo en las actividades enzimáticas	144
4. Discusión	146
4.1 Actividades enzimáticas	146
4.2. Relación endoglucanasas: xilanasas	148
4.3. Azúcares reductores liberados en los cultivos	149
4.4. Efecto de la composición del medio de cultivo en las actividades enzimáticas	150
5. Conclusiones	151
6. Agradecimientos	152
7. Referencias	153

LISTA DE CUADROS

Producción y potencial de enzimas fúngicas en la alimentación de rumiantes	18
Cuadro 1. Número de experimentos que refieren algún efecto relacionado al uso de enzimas exógenas <i>in vitro</i> , <i>in situ</i> o <i>in vivo</i> , aplicadas en diferentes tiempos.	42
Meta-analysis: The influence of exogenous fibrolytic enzymes in diets with different types and proportions of forage on the productive performance of ruminants	43
Table 1. The effects of EFE on digestibility, fermentation patterns, and animal productive behavior.	64
Table 2. Effect of using exogenous fibrolytic enzymes (EFE) in diets with high and low forage on animal productive behavior.	82
Table 3. Effects of fibrolytic enzyme type in animal productive behavior.	83
Table 4. Effect of fibrolytic enzyme type on <i>in vitro</i> and <i>in situ</i> digestibility in diets containing more than 49.9% of forage and consisting primarily of legumes.	84
Table 5. Effect of fibrolytic enzyme type on <i>in vitro</i> and <i>in situ</i> digestibility in diets containing more than 49.9% forage, primarily grasses.	85
Table 6. Effect of using fibrolytic enzymes and time of application (pre-treatment) on digestibility variables (<i>in vitro</i> , <i>in situ</i> , and <i>in vivo</i>).	86

Production of cellulases and xylanases by white-rot fungi cultured in corn stover media for

ruminant feed applications 91

Table 1. Fiber content of six corn stover hybrids used for fungal growth and enzyme production. 122

Table 2. Fungal radial growth rate linear trend (cm^2/d) in culture media elaborated with six corn stover hybrids. 123

Table 3. Multiple linear regression models associating enzymatic activities with the total of reducing sugars released in culture media ($\mu\text{Mol RS/mL EE}$) including the CSH AS951 and H324 and NDF, ADF and ADL fractions of corn stover hybrids. 124

Producción de enzimas fibrolíticas y ligninolíticas en cultivos de *Pleurotus ostreatus* en

medios líquidos con rastrojo de maíz y fracciones FDN, FDA y LDA 129

Cuadro 1. Modelos de regresión lineal múltiple, relación entre las actividades enzimáticas y la liberación de azúcares reductores totales ($\mu\text{Mol azúcares reductores/mL}$) en los medios de rastrojo H324 y AS951, y sus fracciones FDN, FDA y LDA. 143

Cuadro 2. Actividad de un concentrado de lacasa comercial (4% p/v) en extractos de sustratos con y sin pretratamiento de hongos ligninolíticos. 145

LISTA DE FIGURAS

Production of cellulases and xylanases by white-rot fungi cultured in corn stover media for ruminant feed applications 91

Figure 1. Enzymatic activities of *Sporotrichum pulverulentum* (SP), *Bjerkandera adusta* (BA), and *Trametes trogii* (TT) cultured in media supplemented with corn stover hybrid H324: A) Endoglucanases (SE = 0.325); B) Xylanases (SE = 1.74); C) Exoglucanases (SE = 7.989); and D) β -glucosidases (SE = 20.492). 125

Figure 2. Enzymatic activities of *Sporotrichum pulverulentum* (SP), *Bjerkandera adusta* (BA), and *Trametes trogii* (TT) cultured in media supplemented with CSH AS951: A) Endoglucanases (SE = 0.325); B) Xylanases (SE = 1.74); C) Exoglucanases (SE = 7.989); and D) β -glucosidases (SE = 20.492). 126

Figure 3. Average of *Bjerkandera adusta* and *Trametes trogii* enzyme activities in extracts from culture media supplemented with fractions of corn stover hybrid neutral detergent fiber, acidic detergent fiber, and acidic detergent lignin: A) Endoglucanases (SE = 0.158); B) Xylanases (SE = 0.288); and C) β -glucosidases (SE = 1.955). 127

Figure 4. Endoglucanase:xylanase ratios in cultures of A) *Sporotrichum pulverulentum*, *Bjerkandera adusta*, and *Trametes trogii* in media supplemented with corn stover hybrid H324 and AS951 (SE = 0.058); and B) *Bjerkandera adusta* and *Trametes trogii* grown in

media supplemented with neutral detergent fiber, acidic detergent lignin, and acidic detergent fiber fractions of corn stover hybrid (SE = 0.031). 128

Producción de enzimas fibrolíticas y ligninolicias en cultivos de *Pleurotus ostreatus* en medios líquidos con rastrojo de maíz y fracciones FDN, FDA y LDA 129

Figura 1. Actividades enzimáticas del hongo *Pleurotus ostreatus* (PO) en medios elaborados con la variedad de rastrojo de maíz H324 y AS951: A) Endoglucanasas (Error estándar = 0.123); B) Xilanasas (Error estándar = 0.936); C) Exoglucanasas (Error estándar = 5.488); D) β -glucosidasas (Error estándar = 17.726). 138

Figura 2. Actividades enzimáticas promedio del hongo *Pleurotus ostreatus* (PO), en medios elaborados con fracciones de rastrojo de maíz FDN, FDA y LDA: A) Endoglucanasas (Error estándar = 0.066); B) Xilanasas (Error estándar = 0.181); C) β -glucosidasas (Error estándar = 0.741). 140

Figura 3. Medias de relación de actividades enzimáticas endoglucanasas: xilanasas en de cultivos de *Pleurotus ostreatus*: A) en medios elaborados con H324 y AS951; B) en medios elaborados con FDN, FDA y LDA (Error estándar = 0.019). 141

Figura 4. Medias de relación de actividades enzimáticas endoglucanasas: xilanasas de cultivos de *Pleurotus ostreatus* cultivos: A) en medios elaborados con H324 y AS951 (Error estándar = 2.437); B) en medios elaborados con FDN, FDA y LDA (Error estándar = 1.294). 142

ENZIMAS FIBROLÍTICAS DE HONGOS LIGNINOLÍTICOS Y DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE FDN DE DIETAS PARA RUMIANTES

RESUMEN

La fermentación ruminal degrada eficientemente las paredes celulares al combinar la acción coordinada de microorganismos y enzimas. El objetivo fue encontrar enzimas fibrolíticas exógenas (EFE) que puedan mejorar la digestibilidad y el comportamiento productivo de rumiantes. Este tema se abordó en cuatro capítulos: Capítulo 1) presenta una revisión de literatura que sugiere que la suplementación con enzimas fibrolíticas exógenas (EFE) puede mejorar los procesos de fermentación y digestibilidad de alimentos fibrosos, reducir algunos costos de alimentación y mantener el comportamiento productivo de los rumiantes. Capítulo 2) muestra un meta-análisis realizado para establecer los efectos de algunas interacciones entre tipos de dietas y componentes activos de EFE en las digestibilidades *in situ* e *in vitro*, y en el comportamiento productivo de vacas lecheras, ovejas y ganado de engorda. El meta-análisis mostró que utilizar EFE incrementó la digestibilidad de la materia orgánica y seca, y de la fibra de las dietas examinadas (11-22%) y que el uso de enzimas podría permitir incrementar la cantidad de forraje en la dieta de vacas lecheras sin comprometer su comportamiento productivo, ya que tratar con EFE dietas altas en forraje mejoró la producción de leche y su contenido de proteína; Capítulos 3 y 4) se presentan los resultados de estudios realizados en laboratorio, se probó la relación entre las proporciones de fibra de híbridos de maíz (RM) presentes en medios de cultivo para hongos de pudrición blanca y la tasa de crecimiento, adaptación y actividades enzimáticas (AE). Se analizaron las AE de endoglucanasas, exoglucanasas, xilanasas, y β -glucosidasas a 39°C y pH 6.0 (condiciones ruminales), y las AE de lacasas en cultivos de hongos de pudrición blanca en medios de RM H324 y AS951, y en medios con fracciones de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y lignina detergente ácido (LDA) de RM. Los resultados muestran evidencia de que incrementar la proporción de FDA o LDA puede mejorar los picos de AE de endoglucanasas y xilanasas y la relación endoglucanasas: xilanasas. El tipo de hongo y la composición del medio de cultivo pueden promover actividades enzimáticas específicas para incrementar la digestibilidad de la FDN en determinadas condiciones ruminales.

Palabras clave: Meta-análisis, comportamiento productivo de rumiantes, híbridos de maíz, enzimas fibrolíticas, hongos de pudrición blanca.

Puntos de interés:

- La suplementación enzimática puede mejorar la degradabilidad de la fibra en alimentos para rumiantes.
- Mejorar la degradabilidad de la fibra puede reducir los requerimientos de alimento por unidad de leche o peso vivo.
- Mejorar la actividad enzimática incrementa la cantidad de azúcares reductores liberados en los medios de cultivos de hongos de pudrición blanca.
- Utilizar productos enzimáticos con alta relación celulasa:xilanasas puede mejorar la digestibilidad de los alimentos de los rumiantes.

ABSTRACT

Ruminal fermentation is an efficient way of degrading the cell walls of ingested feedstuffs by combining the coordinated actions of microorganisms and enzymes. The aim of the present manuscript was to find exogenous fibrolytic enzymes (EFE) that could improve the feedstuff digestibility and ruminant productive performance. This topic was approached in four chapters: Chapter 1) presents a literature review showed supporting evidence that supplementation with exogenous fibrolytic enzymes could enhance the fermentation and digestion process, it potentially reducing feed costs, and to sustain the productive performance of ruminants; however, the underlying mechanisms and interactions are unknown. Chapter 2) shows a meta-analysis was performed to clarify the effects of some interactions between diets and the active enzymatic component(s) of EFE on *in situ* and *in vitro* digestibility, and on the productive performance of dairy cows, sheep, and beef cattle in feedlots. This meta-analysis determined that the use of EFE increased the digestibility of dry and organic matter and fiber from 11 to 22% of the examined diets, and it also suggests that the use of EFE could allow an increase in the amount of forage for diets of dairy cows without compromising their productive performance, as EFE treatments were applied to high forage-based diets milk production and protein content got better. Chapters 3 and 4) present a performed laboratory experiment to investigate the relationship between corn stover hybrid fiber proportions in white-rot fungi culture media and radial growth rate, adaptation, and enzyme activities (EA), endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase, xylanase activities were assayed at 39°C, pH 6.0, reflecting the average temperature and pH in ruminants, and it was also analyzed the laccase activities of white-rot fungus in liquid culture media with corn stover hybrids H324 and AS951, and in medium with neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), and acid detergent lignin (ADL); the results show evidence of increasing the ADF and ADL proportion in the culture medium improved endoglucanase and xylanase peaks and the endoglucanase: xylanase ratio. We conclude that fungus and culture medium composition could promote specific enzyme activity proportions in enzyme extract products that can result in improvement of NDF degradability under certain ruminal environment conditions.

Keywords: Meta-analysis, ruminant productive behavior, corn stover hybrid, fibrolytic enzyme, white-rot fungi.

Highlight points:

- Enzymatic supplementation can improve fiber degradability in ruminant feeds.
- Improved fiber degradability can reduce feed required per unit of milk/live weight.
- Increasing lignin in culture media improves endoglucanase and xylanase activity.
- Improved enzyme activity increases total reducing sugars released in culture media.
- Using high cellulase:xylanase ratios can increase ruminant feedstuff digestibility.

1. Introducción

La fibra detergente neutro (FDN) corresponde a la proporción de pared celular de lo vegetales. La complejidad de esta estructura se relaciona con su composición química (celulosa, hemicelulosa, pectina, lignina, proteína ligada a la fibra y minerales), los tipos de enlaces químicos predominantes (β -1 $\rightarrow$ 4 y ramificados), la cristalización e hidrofobicidad de algunos de sus componentes (lignina, celulosa. La celulosa y hemicelulosa son polisacáridos cuya degradación potencial en rumen es total; no obstante, su disponibilidad para los microorganismos ruminales es baja debido principalmente con la lignificación que ocurre durante el desarrollo de las plantas (Hatfield y Fukushima, 2005). Según Delgado *et al.* (2002) cada unidad de lignina disminuye aproximadamente en dos unidades la degradabilidad de la pared celular, pero esto depende del tipo y estado fenológico de las plantas (Jung y Casler, 2006 a y b).

Los hongos de pudrición blanca tienen la capacidad de producir de celulasas (Endo- β -glucanasas, Exo- β -glucanasas o Celobiohidrolasas y β -glucosidasas) y xilanasas (Arabinofurosidasa, Acetil xilan esterasas, Glucoronidasa, β -xilosidasas y Endo- β -xilanasas) que les permiten acceder y utilizar la celulosa y hemicelulosa como fuentes de energía para su adaptación en sustratos lignocelulósicos (Velasco *et al.*, 2005), además de éstas, la mayoría de los hongos de pudrición blanca producen enzimas Lacasas, Manganese Peroxidasas y Lignina Peroxidasas (Lac, MnP y LiP) clasificadas como fenoloxidasas (Téllez-Téllez *et al.*, 2005), que les permiten despolimerizar, repolimerizar, dimetilizar y oxidar (Almansa *et al.*, 2004) compuestos fenólicos, no fenólicos, anilinas y xenobióticos (Gonzalo *et al.*, 2005). Estas se han utilizado con éxito en la industria (La Grange *et al.*, 2001; Ponce y Pérez, 2002) y en programas de biorremediación (Eibes *et al.*, 2006; Gonzalo *et al.*, 2005; Clemente *et al.*, 2001).

Una ventaja del uso de hongos para la producción de enzimas digestivas, es que éstos producen un complejo de formas e isoformas de celulasas, xilanasas y ligninasas.

Ya que el rastrojo de los cultivos es un sustrato alimenticio de alto contenido de fibra y baja digestibilidad potencial (Núñez *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2003), el uso de enzimas celulasas y xilanasas exógenas producidas por hongos ligninolíticos podría mejorar tanto la composición (Colombatto *et al.*, 2004 a y b) como la digestibilidad del rastrojo para uso en alimentación de rumiantes (Tricarico y Dawson, 2005; Eun y Beauchemin, 2007). Además, la inclusión de enzimas en las dietas de rumiantes podría mejorar la ingesta potencial del ganado que se correlaciona negativamente con el contenido de fibra y lignina del alimento.

En el área agronómica, el tratamiento directo de materiales fibrosos con hongos ligninolíticos ha mostrado resultados alentadores (Labarere y Bios, 2001; Okano *et al.*, 2006). Algunos investigadores reportan que el tratamiento de alimentos para rumiantes con diferentes preparaciones de extractos de enzimas puede tener algunos efectos marginales (Bergamaschine *et al.*, 2006; De Souza *et al.*, 2006c), moderados o importantes (McAllister *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2005; Dosualdo *et al.*, 2006; De Souza *et al.*, 2006b; Colombatto *et al.*, 2007; Eun y Beauchemin, 2007).

En dietas para rumiantes el uso de enzimas fibrolíticas exógenas puede incrementar la digestibilidad *in vitro*, *in situ* e *in vivo* de la materia seca y fibra detergente neutro de alimentos fibrosos (Colombatto *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2007), incrementar la concentración de AGV y mejora el patrón de fermentación (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002; Tricarico y Dawson, 2005), modifican el pH ruminal (Yang *et al.*, 2002) o mejorar el consumo y la ganancia diaria de peso (Gómez-Vázquez *et al.*, 2003). Sin embargo, otros estudios (Dosualdo *et al.*, 2006; De Souza *et*

al., 2006a; Ferreira *et al.*, 2006) señalan que las enzimas fibrolíticas exógenas no tiene efecto en el comportamiento animal, ni la producción de AGV.

Parte de las inconsistencias que se observan por el uso de enzimas fibrolíticas, se deben a factores externos como la condición corporal y sexo del rumiante (Rode *et al.*, 1999; Pinos-Rodríguez *et al.*, 2005), el método y tiempo de aplicación (Elwakeel *et al.*, 2007; Giraldo *et al.*, 2008), la dosis (Colombatto *et al.*, 2002; Medina-Romo *et al.*, 2006) y tipo de aditivos enzimáticos, y la dieta (Bhat y Hazlewood, 2001; Colombatto *et al.*, 2003); dentro de los factores internos se encuentran, la baja estabilidad enzimática en el rumen (Morgavi *et al.*, 2000a; Ranilla *et al.*, 2008), el sinergismo entre las enzimas endógenas y exógenas (Hristov *et al.*, 2000) y la población de microorganismos (Morgavi *et al.*, 2000b; Nsereko *et al.*, 2002).

La actividad e impacto de los productos enzimáticos no ha sido evaluado plenamente debido a variedad de productos o preparados enzimáticos existentes, formulados a partir de diferentes géneros y especies de hongos. El desconocimiento de los principios activos de los preparados enzimáticos y su forma de acción sobre los diferentes componentes de la fibra de los forrajes, considerando que interactúan de manera distinta dependiendo del tipo de sustrato (Gómez-Vázquez *et al.*, 2003) ha impedido su evaluación completa al corto plazo.

1.1 Justificación

Cuando un forraje presenta niveles de digestibilidad por debajo del 60%, o incluso en casos más críticos por debajo del 55%, con un contenido de proteína cruda (PC) menor al 5%; como es el caso de las pajas de cereales y de algunas leguminosas o bien de zacates, leguminosas y

arbustivas que al alcanzar su madurez fisiológica se vuelven sumamente fibrosas e indigestibles para los rumiantes (Riquelme, 1984; Gutiérrez, 1991; Leng, 1991), entonces el tránsito digestivo especialmente en la cámara ruminal es lento, al grado de afectar negativamente el consumo voluntario del animal, impidiendo cubrir los requerimientos nutricionales con frecuencia por debajo del nivel de mantenimiento. En este sentido, es común observar pérdidas significativas de peso en animales adultos y el cese total del crecimiento en animales jóvenes, a la vez que la salida al mercado se retarda por cinco años o más (Riquelme, 1984; Reyes *et al.*, 1997).

Al año se desperdician más de 48 millones de toneladas de rastrojo de maíz, entre muchos tipos de rastrojo (SAGARPA, 2005), además de ser ampliamente utilizado en la alimentación de rumiantes. Debido a que hay una gran variedad de ligninasas, celulasas y xilanasas producidas por hongos (Zhou *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Min *et al.*, 2002), además de numerosas isoformas con actividades y condiciones óptimas diferentes (Chen *et al.*, 2010; Moriya *et al.*, 2003), los procesos de caracterización productiva y bioquímica y avances en la secuenciación y análisis de la expresión de genes específicos (Wang *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2010; Rahman *et al.*, 2009) podrían facilitar la obtención de enzimas que se ajusten a las necesidades específicas del rumen. Algunos autores sugieren que para encontrar resultados más consistentes del uso de enzimas en rumiantes, además de identificar las condiciones y dosis óptimas, se deben buscar productos cuya actividad principal sea la degradación de la fibra (Eun y Beauchemin, 2007), con mayor estabilidad en condiciones ruminales. En la industria los avances en secuenciación y análisis de la expresión de genes específicos (Rahman *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011), han permitido obtener enzimas que se ajustan a las necesidades de cada proceso, por lo cual es necesario el uso de herramientas bioquímicas y moleculares para encontrar, purificar y caracterizar nuevos productos, con el

propósito de extraer enzimas cuyas características se ajusten a las condiciones específicas del rumen.

Por lo tanto, el aprovechamiento eficiente de los forrajes completamente maduros, con 10% o más de contenido de lignina y silicatos continúa siendo un reto para la mayoría de los investigadores en biotecnología agrícola y en nutrición de rumiantes. Existe la necesidad de realizar investigaciones que conduzcan a una mejor utilización y aprovechamiento de los esquilmos agrícolas (rastros/pajas), siendo la utilización de enzimas fúngicas (tanto de preparaciones comerciales como de preparaciones novedosas) una de las estrategias más promisorias en la actualidad, en combinación sinérgica con la actividad enzimática de las bacterias fibrolíticas del rumen.

1.2 Hipótesis

En el presente trabajo, se abordaron las siguientes hipótesis:

La producción de enzimas con afinidad a los componentes de la pared celular de los rastros puede ser promovida por el sustrato en el que se incuban los hongos ligninolíticos.

Enzimas afines a las paredes celulares de los alimentos para rumiantes puede incrementar la digestibilidad de la dieta y mejorar el comportamiento productivo de los animales.

1.3 Objetivos generales

- A.** Conocer el estado actual de conocimiento del uso de enzimas exógenas fibrolíticas y su efecto en las variables ruminales y productivas en rumiantes, para definir la importancia de la proporción celulasas:xilanasas, de los productos enzimáticos, para mejorar la digestibilidad ruminal y el comportamiento productivo de los rumiantes.
- B.** Relacionar el crecimiento fúngico en variedades de rastrojo de maíz y la actividad de enzimática con la proporción de las fracciones de la pared celular fibra detergente neutro, fibra detergente ácido y lignina detergente ácido (FDN, FDA y LDA).
- C.** Determinar la interacción hongo-variedad de rastrojo en la actividad celulásica y xilanásica, y en la degradación de las fracciones de la pared celular FDN, FDA, LDA.

1.4 Estructura de la tesis y objetivos particulares

El documento de tesis integra los documentos y aborda los objetivos particulares siguientes:

1.4.1 Producción y potencial de enzimas fúngicas en la alimentación de rumiantes

Se realizó una revisión sobre los avances en la producción y caracterización de xilanasas y celulasas provenientes de hongos y sus efectos potenciales en la alimentación de rumiantes.

1.4.2 Meta-analysis: The influence of exogenous fibrolytic enzymes in diets with different types and proportions of forage on the productive performance of ruminants

Se utilizó meta-análisis en un conjunto de datos experimentales publicados entre 2000 y 2012, con el fin de establecer los efectos de tratar dietas con diferentes proporciones de forrajes de gramíneas y leguminosas con enzimas fibrolíticas exógenas, en las digestibilidades *in situ* e *in vitro* y el comportamiento productivo de vacas lecheras, ovinos y bovinos de engorda.

1.4.3 Production of cellulases and xylanases by white-rot fungi cultured in corn stover media for ruminant feed applications

El objetivo fue relacionar las proporciones de fibra de rastrojo de híbridos de maíz en medios de cultivo, con la velocidad de crecimiento radial, adaptación y actividades enzimáticas de hongos de pudrición blanca.

1.4.4 Producción de enzimas fibrolíticas y ligninolicias en cultivos de *Pleurotus ostreatus* en medios líquidos con rastrojo de maíz y fracciones FDN, FDA y LDA

El objetivo de la presente investigación fue determinar la actividad endoglucanasa, exoglucanasa, xilanasas, β -glucosidasa y lacasa de extractos del cultivo de *Pleurotus ostreatus* en medios de cultivo líquidos con rastrojo de maíz (H324 ó AS951), y medios de cultivo con FDN, FDA y LDA del rastrojo de maíz.

1.5 Referencias

- Almansa, E., A. Kandelbauer, L. Pereira, A. Cavaco-Paulo, and G. M. Guebitz. 2004. Influence of structure on dye degradation with Laccase mediator systems. *Biocatalysis and Biotransformation* 22 (5/6): 315-324.
- Bergamaschine, A. F., M. Passipieri, F. W. Veriano, O. Isepon, y C. L. Almeida. 2006. Calidad y valor nutritivo del capim-marandu (*B. brizantha* cv.) con aditivos o forrajes enmohecidos. *R. Bras. Zootec.* 35(4):1454-1462.
- Bhat, M. K., and G. P. Hazlewood. 2001. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: Bedford, M. R., Partridge, G. G. (Eds.), *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, pp. 11–60.
- Chen, M., S. Yao, H. Zhang, and X. Liang. 2010. Purification and characterization of a versatile peroxidase from edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 18: 824-829.
- Clemente, A. R., T. A. Anazawa, and L. R. Durant. 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. *Braz. J. Microbiol.* 32(4):255-261.
- Colombatto, D., F. L. Mould, M. K. Bhat, and E. Owen. 2002. The effect of fibrolytic enzyme application on rate and extent of alfalfa stem fermentation, assessed *in vitro*. Page 209 in *Proc. Br. Soc. Anim. Sci. Annu. Mtg. Penicuik, U.K.*

- Colombatto, D., D. P. Morgavi, A. F. Furtado, and K. A. Beauchemin. 2003. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: Relationship between biochemical characteristics and *in vitro* ruminal degradation. *Journal of Animal Science* 81(10): 2628-2638.
- Colombatto, D., F. Mould, M. Bhat, R. Phipps, and E. Owen. 2004a. 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. and Tech.* 111(1-4): 145-160.
- Colombatto, D., F. Mould, M. Bhat, R. Phipps, and E. Owen. 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. and Tech.* 111(1-4): 129-144.
- Colombatto, D., F. L. Mould, M. K. Bhat, and E. Owen. 2007. Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and incubation pH on the *in vitro* ruminal fermentation of alfalfa stems. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 137:150-162.
- Delgado, N. J., M. D. Casler, C. R. Grau, and H. G. Jung. 2002. Reactions of smooth Bromegrass clones with divergent lignin or etherified ferulic acid concentration to three fungal pathogens. *Crop Sci.* 42: 1824-1831.
- De Souza, M. A., V. P. Figueiredo, T. T. Berchielli, P. I. Nunes, y G. J. Soares. 2006a. Eficiência de síntese microbiana e atividade enzimática em bovinos submetidos à suplementação com enzimas fibrolíticas. *Rev. Bras. Zootec.* 35(3): 1194-1200.
- De Souza, M. A., V. P. Figueiredo, B. T. Teresinha, P. I. Nuñez, y J. L. Moletta. 2006b. Consumo e digestibilidade aparente total em bovinos sob suplementação com enzimas fibrolíticas. *R. Bras. Zootec.* 35(5): 2118-2124.

- De Souza, M. A., V. P. Figueiredo, B. T. Teresinha, P. I. Nuñez, C. R. Carrilho, y M. C. Setti. 2006c. Taxa de passagem e parámetros ruminais em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas. R. Bras. Zootec. 35(3): 1186-1193.
- Dosualdo, R. K., P. O. Gomes, V. S. Campos, O. A. Prates, P. L. Bastos, y R. C. F. Martins. 2006. Valor nutritivo del ensilado de maíz (*Zea mays* L.) producido con inoculantes enzimo-bacterianos. R. Bras. Zootec. 35(2): 389-395.
- Eibes, G., T. Cajthaml, M. Moreira, G. Feijoo, and J. M. Lema. 2006. Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothophene y pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. Chemosphere 64: 408-414.
- Elwakeel, E. A., E. C. Titgemeyer, B. J. Johnson, C. K. Armendiz, and J. E. Shirley. 2007. Fibrolytic enzymes to increase the nutritive value of dairy feedstuffs. J. Dairy Sci. 90:5226–5236.
- Eun, L. S., and K. A. Beauchemin. 2007. Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using *in vitro* fermentation characteristics. Anim. Feed Sci. and Tech. 132:298-315.
- Ferreira, C. G., G. L. Nussio, H. C. Maluf, F. Prudencio-de Campos, R. Michelini-Coelho, L. J. Marí, y P. Almeida. 2006. Perfil microbiológico, parámetros físicos e estabilidad aeróbia de silangens de capim-tifton 85 (*Cynodon* sp.) confeccionadas com distintas concentracoes de materia seca e aplicacao de aditivos. Rev. Brasileira de Zootecnia 35(2): 358-371.
- Giraldo, L. A., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, S. Ramos, and M. D. Carro. 2008. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay based diet. J. Anim. Sci. Published on line march, 2008. Available in: <http://jas.fas.org>.

- Gómez-Vázquez, A., J. Pérez, G. D. Mendoza, E. Aranda, and A. Hernández. 2003. Fibrolytic exogenous enzymes improve performance in steers fed sugar cane and stargrass. *Livestock Production Science* 82(2/3): 249-255.
- Gonzalo, R., M. C. Díaz, and N. Durán. 2005. Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Critical Reviews in Microbiology* 31:197-212.
- Gutiérrez, A. J. L. 1991. *Nutrición de Rumiantes en Pastoreo*. Departamento Editorial de la Universidad Autónoma de Chihuahua. México. Pp: 33-63.
- Hatfield, R., and R. S. Fukushima. 2005. Can lignin be accurately measured? *Crop Sci.* 45:832-839.
- Hristov, A. N., T. A. McAllister, and K. J. Cheng. 2000. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle fed a barley grain diet. 2000. *J. Anim. Sci.* 78:477-487.
- Jung, H. G., and M. D. Casler. 2006a. Maize stem tissues: Cell wall concentration and composition during development. *Crop. Sci.* 46:1793-1800.
- Jung, H. G., and M. D. Casler. 2006b. Maize stem tissues: Impact of development on cell wall degradability. *Crop. Sci.* 46:1801-1809.
- La Grange, D. C., I. S. Pretorius, M. Claeysens, and W. H. Van Zyl. 2001. Degradation of xylan to D-xilose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* coexpressing the *Aspergillus niger* β -xilosidase (xlnD) and the *Trichoderma reesei* xinalase II (xyn2) genes. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (12): 5512-5519.

- Labarere, J., y F. Bois. 2001. La biología y el cultivo de *Pleurotus spp.* Capítulo V. Ed. ECOSUR-LIMUSA. México. pp. 86-87.
- Leng, R. A. 1991. Application of biotechnology to nutrition of animals in developing countries. FAO 1(1): 146 p.
- Li, R. W., E. E. Connor, C. Li, R. L. Baldwin Vi, and M. E. Sparks. 2012. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomics tools. Environ. Microbiol. 14(1):129-139.
- McAllister, T. A., S. J. Oosting, J. D. Popp, Z. Mir, L. J. Yanke, A. N. Hristov R. J. Treacher, and K. J. Cheng. 1999. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. Can. J. Anim. Sci. 79:353-360.
- Medina R., M., G. Tirado E., I. Mejía H., I. Camarillo S., y C. Cruz V. 2006. Digestibilidad in situ de dietas con harina de nopal deshidratado conteniendo un preparado de enzimas fibrolíticas exógenas. Pesq. Agropec. Bras. Brasília 41(7): 1173-1177.
- Min, S. Y., B. G. Kim, C. Lee, H. G. Hur, and J. Ahn. 2002. Purification, characterization, and cDNA cloning of xylanase from fungus *Trichoderma* strain SY. J. Microbiol. Biotechnol. 12(6): 890-894.
- Moreno, R., R. J. Pinos, S. González, G. Álvarez, J. C. García, G. Mendoza, y R. Bárcena. 2007. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación ruminal *in vitro* de dietas para vacas lecheras. Interciencia 32(12):850-853.
- Morgavi, D. P., C. J. Newbold, D. E. Beever, and R. J. Wallace. 2000a. Stability and stabilization of potential feed additive enzymes in rumen fluid. Enz. Microb. Technol. 26:171–177.

- Morgavi, D. P., V. L. Nsereko, L. M. Rode, K. A. Beauchemin, T. A. McAllister, and Y. A. Wang. 2000b. *Trichoderma* feed enzyme preparation enhances adhesion of *Fibrobacter succinogenes* to complex substrates but not to pure cellulose. Page 33 in Proc. Chicago Rumen Function Conf., Chicago, IL.
- Moriya, T., K. Murasima, A. Nakane, K. Yanai, N. Sumida, J. Koga, T. Murakami, and T. Kono (2003). Molecular cloning of endo-B-D-1,4-Glucanase genes, *rce1*, *rce2*, and *rce3*, from *Rhizopus oryzae*. *Journal of Bacteriology* 185(5):1749-1756.
- Nsereko, V. L., K. A. Beauchemin, D. P. Morgavi, L. M. Rode, A. F. Furtado, T. A. McAllister, A. D. Iwaasa, W. Z. Yang, and Y. Wang. 2002. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. *Can. J. Microbiol.* 48, 14–20.
- Núñez, G., E. F. Contreras, y R. Contreras. 2003. Características agronómicas y químicas importantes en híbridos de maíz para forraje con alto valor energético. *Tec. Pecu. Méx.* 41(1): 37-48.
- Okano, K., Y. Lida, M. Samsuri, B. Prasetya, T. Usagawa, and T. Watanabe. 2006. Comparison of in vitro digestibility and chemical composition among sugarcane bagasses treated by four white-rot fungi. *Animal Science* 77 (3): 308-313.
- Peña, A., G. Núñez, y F. González. 2003. Importancia de la planta y el elote en poblaciones de maíz para el mejoramiento genético de la calidad forrajera. *Tec. Pecu. Méx.* 41(1): 63-74.

- Pinos-Rodríguez, J. M., S. S. González, G. D. Mendoza, R. Bárcena, M. A. Cobos, A. Hernández, and M. E. Ortega. 2002. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 80(11): 3016-3021.
- Pinos-Rodríguez J. M., S. S. González, G. D. Mendoza, J. C. García, L. A. Miranda, y V. A. De La Cruz. 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(12): 752-757.
- Ponce, T., y A. O. Pérez. 2002. Celulasas y xilanasas en la industria. *Avance y Perspectiva* 21. pp. 273-277.
- Rahman, Z., Y. Shida, T. Furukawa, Y. Suzuki, H. Okada, W. Ogasawara, and Y. Morikawa. 2009. Evaluation and characterization of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters. *App. Genetics and molecular biotechnology* 82:899-908.
- Ranilla, M. J., M. L. Tejido, L. A. Giraldo, J. M. Tricárico, and M. D. Carro. 2008. Effects of an exogenous fibrolytic enzyme preparation on in vitro ruminal fermentation of three forages and their isolated cell walls. *Animal Feed Sci. and Tech.* 145: 109-121.
- Reyes, M. L., H. O. Rubio, L. F. Peña, G. Tirado, E. Esparza, A. López, E. Ballín, y A. Rivera. 1997. Evaluación socioeconómica y técnica de los sistemas ganaderos de carne de bovino en cuatro estados del centro de México. En: IV Simposio Estatal La Investigación y Desarrollo Tecnológico en Aguascalientes (resúmenes). CONACyT, Aguascalientes, Ags. 145 p.
- Riquelme, V. E. 1984. Suplementación y efectos asociativos en dietas basadas en subproductos agrícolas. En: González, S. y M. Cuca (eds.). *Utilización de Subproductos Agroindustriales en*

- la Alimentación de Rumiantes. Centro de Ganadería, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Edo. de México. pp. 1-24.
- Rode, L. M., W. Z. Yang, and K. A. Beauchemin. 1999. Fibrolytic Enzyme Supplements for Dairy Cows in Early Lactation. *J. Dairy Sci.* 82(10):2121-2126.
- Téllez-Téllez, M., C. Sánchez, O. Loera, and G. Díaz-Godínez. 2005. Differential patterns of constitutive intracellular laccases of the vegetative phase for *Pleurotus* species. *Biotech. Letters* 27: 1391-1394.
- Tricarico, J. M., and K. A. Dawson. 2005. Influence of supplemental endoglucanase or xylanase on volatile fatty acid production from ruminant feed by ruminal *in vitro* cultures. *Archives of Animal Nutrition* 59(5): 325-334.
- Wang, J., H. Zhang, M. Wu, and C. Tang. 2011. Cloning and sequence analysis of a novel xylanase gene, Auxyn10A, from *Aspergillus usarii*. *Biotechnol Lett.* 33(5):1029-1038.
- Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, and D. D. Vedres. 2002. Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and fermentation in continuous culture. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 102(1-4): 137-151.
- Yi, X., Y. Shi, H. Xu, W. Li, J. Xie, R. Yu, J. Zhu, J. Cao, and D. Qiao. 2010. Hyperexpression of two *Aspergillus niger* xylanase genes in *Escherichia coli* and characterization of the gene products. *Brazilian Journal of Microbiology* 41(3): 778-786.

Yu P., J. J. McKinnon, and D. A. Christensen. 2005. Improving the nutritional value of oat hulls for ruminant animals with pretreatment of multienzyme cocktail: *In vitro* studies. J. Anim. Sci. 83:1133-1141.

Zhou, M., Y. H. Chung, K. A. Beauchemin, L. Holsthausen, M. Oba, T. A. McAllister, and L. L. Guan. 2011. Relationship between rumen methanogens and methane production in dairy cows fed diets supplemented with a feed enzyme additive. Journal of Applied Microbiology 111(5): 1148-1158.

Formato INTERCIENCIA

Producción y potencial de enzimas fúngicas en la alimentación de rumiantesTirado-González D.N.^{1*}, Tirado-Estrada G.^{2**}, Miranda-Romero L.A.^{3*}¹deli_gym@hotmail.com ²gtiradoes@hotmail.com ³Autor de correspondencia: microbiologia.pecuaria08@gmail.com.

* Universidad Autónoma Chapingo (km. 38.5 Carr. Texcoco-Edo. Méx. C.P. 56230). **Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes (km 17.5 Carr. SLP-Ags. C.P. 20330).

Resumen

Se realizó una revisión sobre los avances en la producción y caracterización de xilanasas y celulasas provenientes de hongos y sus efectos potenciales en la alimentación de rumiantes. Utilizar enzimas en dietas para rumiantes, afectó positivamente las digestibilidades de la MS y FDN, producción de gases y AGVt, en la mayoría de las evaluaciones *in vitro*. Algunas actividades enzimáticas incrementaron la población de bacterias ruminales y mostraron sinergismo con las enzimas de microorganismos del rumen; en comportamiento animal, puede haber mayor ingesta de la 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 proporción acetato:propionato y 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. Parece que las xilanasas son 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 no siempre se refleja en el comportamiento productivo animal. Algunos autores concluyen que hay inconsistencias, pero los avances en la caracterización bioquímica y molecular de enzimas fúngicas pueden ayudar a encontrar y diseñar productos que se ajusten a las necesidades de los rumiantes y sus dietas.

Palabras clave: enzimas fúngicas, rumiantes, digestibilidad de la MS y FDN, patrones de fermentación, comportamiento animal.

Introducción

El uso 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; Núñez *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 cual 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, utilizados para mejorar tanto la composición de los forrajes (Colombatto *et al.*, 2004 a y b) como su digestibilidad en el interior del rumen (Tricarico y Dawson, 2005; Eun y Beauchemin, 2007). 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 en alimentos fibrosos (Moreno *et al.*, 2007), produce cambios en la concentración de AGV y 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 de 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; Souza *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2006). De acuerdo a Beauchemin *et al.* (2003), estas discrepancias pueden deberse a: 1) a la complejidad del líquido ruminal (Colombatto *et al.*, 2003); 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 (Rahman *et al.*, 2009; Wrang *et al.*, 2011) podrían permitir la obtención de productos estables en las condiciones del rumen y específicos para la degradación de la fibra (Deng *et al.*, 2006; Eun y Beauchemin, 2007). La presente revisión muestra algunos avances en la producción de xilanasas y celulasas fúngicas y sus efectos potenciales 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 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: 1) lignina-peroxidasa (LiP) que por síntesis endógena de H_2O_2 oxida al alcohol veratrílico y a la vez, compuestos aromáticos no fenólicos; 2) manganoso-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 superóxido dismutasa 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 xilan esterasas, Glucoronidasas, β -xilosidasas y Endo- β -xilanasas) que les permiten acceder y utilizar la celulosa y 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. Existe una gran variedad de celulasas y xilanasas producidas por microorganismos (Min *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2010); y en los 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), 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 (Kataeva *et al.*, 1992; Parry *et al.*, 2001). También los procesos de secuenciación (Cheng *et al.*, 2004; Comlekciogluc *et al.*, 2010; Wrang *et al.*, 2011) y expresión de genes (Ogasawara *et al.*, 2006) han permitido diferenciar el rol de enzimas particulares de complejos de isoformas o enzimas similares (Yi *et al.*, 2010).

La especie de hongo, y tiempo y condiciones de los cultivos (Cavallazzi *et al.*, 2004; Mata *et al.*, 2005) son factores que afectan la expresión de genes que codifican para la producción de enzimas como respuesta adaptativa del hongo (Cohen *et al.*, 2002). Principalmente la fuente de carbono regula la expresión de genes de celulasas y hemicelulasas; a nivel transcripcional los genes de celulasas y xilanasas se reprimen ante la presencia de glucosa, pero son estimulados ante la presencia de otras fuentes de carbono 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 sobreestimar 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 *bg11* fueran sobreproducidas de 4 a 7.5 veces, sin disminuir la cantidad de celulasas, Aro *et al.* (2003) encontraron que *ace1* es un represor de la mayoría de las enzimas celulasas y de algunas xilanasas. 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 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.*, 2001).

Efecto de la aplicación de enzimas en la alimentación de rumiantes

Se analizaron 53 experimentos de 47 artículos seleccionados al azar de la presente revisión (Cuadro 1). 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, 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, encontró que sólo una de ambas 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 MS y FDN de los alimentos fibrosos (Moreno *et al.*, 2007). El 32% de los artículos del Cuadro 1 correspondieron a experimentos realizados *in vivo*, 42% *in vitro* y 26% incluían más de un tipo de estudio. Las variables más reportadas en estos artículos son digestibilidad de la MS y FDN, en las cuales 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 (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 (0.12 kg/d) e incrementa 3.5% la grasa corregida en leche. En el Cuadro 1, el 70.6% de los artículos de estudios realizados *in vivo*, reportan algún tipo de efecto

relacionado al uso de preparados enzimáticos: 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 Promote en vacas Holstein multíparas 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 de la enzima no afectó el consumo alimenticio, pero la digestibilidad total de los nutrientes aumentó por el tratamiento (61 vs. 69% MS; 43 vs. 51% FDN; 32 mejora vs. 42% en FDA) y consecuentemente la producción de leche se incrementó (36 vs. 40 kg/d), pero los componentes de proteína y grasa de la leche fueron similares o inferiores. Tales autores 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 la grasa de leche por el incremento en el tejido adiposo debido a la lipogénesis.

Otros autores apoyan la posibilidad de que a mayor demanda de energía 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 Promote y Fibrozyme 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, patrones de fermentación, ingesta de la MS y 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.

A través de los artículos observamos que los efectos del uso de enzimas en variables de patrones de fermentación suelen ser más inconsistentes. 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.*, 2004; Eun *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2008) y la eficiencia fermentativa de los alimentos (Wallace *et al.*, 2001; Colombatto *et al.*, 2004 a); pero no siempre hay efectos positivos en la producción de AGV totales y relación A:P (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002; 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 la adición de éste preparado 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 8 h 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) y pueden alterar las actividades fisiológicas de las bacterias ruminales (Tricárico, 2001). 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 (provenientes de *Trichoderma*

longibrachiatum) sobre la degradación de la fibra en 5 niveles de pH (en un rango de pH entre 5 y 6), encontraron 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. Parece que 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 *et al.* (2004) midieron la estabilidad de Depol 40 (D, Biocatalysts Ltd., Pontypridd, UK) y Liquicell 2500 (L, Specialty Enzymes and Biochemicals, Fresno, CA, USA) a diferentes pH (pH= 4, 5.6 y 6.8) y condiciones de temperatura (15 y 39 °C), 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 $\mu\text{L g}^{-1}$ de MS) de un producto enzimático (Liquicell 2500); derivado de fermentaciones de *Trichoderma reesei* con actividad xilanasas y celulasas, sobre celulosa (CEL, Avicel PH-101, Fluka Chemicals), xilano (XYL, X-0627, Sigma Chemicals) y una combinación celulosa y xilano (relación 1:1); en éste trabajo la actividad de las xilanasas ocurría entre 0 y 6h pero la de endoglucanasas sólo ocurría a 0h, 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-xylanasa: XynB) que podría ser utilizada como aditivo para los animales debido a que mantiene el 95% de su actividad máxima en el rango de la temperatura

corporal; pero más importante aún, aunque su pH óptimo es de 5, la enzima retiene por 30 min 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 (Barahona *et al.*, 2003; Colombatto *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). Eun y Beauchemin (2007) 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 (2007) 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.*, 2003; Tricarico y Dawson, 2005), aunque de acuerdo a Eun y Beauchemin (2007), 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.*, 2003). 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.* (2003), 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 enzimas carboximetilcelulasas, mientras que las β -D-glucosidasa y β -D-xilosidasas son las menos sensibles. Así mismo, 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 (Bhat y Hazlewood,

2001; Nsereko *et al.*, 2000), entre celulasas y proteasas (Colombatto *et al.*, 2003). Por ejemplo, Nsereko *et al.* (2000) probaron 14 ensilados de cebada en un rumiante suplementado con el preparado enzimático Promote, en todos los casos no hubo actividad sinérgica con endo-1,4- β -xilanasas (1-50%) y α -amilasa (23-53%), sin embargo, en 11 ensilados hubo actividad de celulasas.

En la naturaleza, ciertas enzimas se expresan de forma coordinada para la degradación de la celulosa (Shida *et al.*, 2008). Ciertos 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 enzimas ácido ferúlico esterases de *Aspergillus niger* y xilanasas de *Trichoderma*, actuaron sinérgicamente para liberar el ácido ferúlico de los ferulo-polisacáridos, logrando que los restos de polisacáridos se encontraran más accesibles y disponibles para posteriores hidrólisis, por lo que la aplicación del coctel multienzimático mejoró la digestibilidad de la materia seca. Algunos hongos, como *Trichoderma reesei*, tienen alta actividad celobiohidrolasas y endoglucanasas y baja de enzimas 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, 2007).

Dosis de la enzima

El 8% de los experimentos reportados en el Cuadro 1, muestran efectos negativos. 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, por lo que es posible sobresuplementar la actividad enzimática (Beauchemin *et al.*, 2003; 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 (Nsereko *et al.*, 2002; Morgavi *et al.*, 2000a, b). Mayor capacidad

fermentativa de los sustratos en 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 *Trichoderma logibrachiatum*.

Kung *et al.* (2000) al añadir a una dieta para vacas lecheras 60% ensilado de maíz: 40% alfalfa cuatro niveles: 0, 1, 2.5 mL kg⁻¹ de MS de un producto enzimático (Finn Feeds, Int.), encontraron que los animales suplementados con niveles bajos tendieron a producir más leche (39.5 kg d⁻¹), que aquellos con el tratamiento testigo (37 kg d⁻¹), o bien con dietas altas en enzimas (36.2 kg d⁻¹). 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 d. Otros autores han encontrado efectos cuadráticos en las concentraciones de Ac, Pr, Bu y AGVt (Colombatto *et al.*, 2003; Eun y Beauchemin, 2007b y c).

Tiempo de aplicación

En el 77.6% de los experimentos reportados en el Cuadro 1, la enzima se añadió al momento de iniciar la evaluación con líquido ruminal, en estos trabajos se observa que el uso de enzimas tuvo resultados favorables principalmente en las digestibilidades de la MS, MO y FDN; hay evidencias de que la adición de la enzima durante el proceso de ensilaje o pretratamiento puede mejorar la composición de los alimentos al disminuir las proporciones de FDN y FDA. Algunos trabajos han mostrado que en algunos casos, 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 N a las partículas, mayor actividad celulolítica (Wang *et al.*, 2012) y liberación de azúcares reducidos (Wang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002; Colombatto *et al.*, 2003); éstos 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; Wang *et al.*, 2002; Elwakeel *et al.*, 2007). Álvarez *et al.* (2009) encontraron que el pretratamiento con enzimas incrementó la MS y PC soluble de la dieta. Además, ésta práctica puede ser más 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 O₂. Según Delgado *et al.* (2002) cada unidad de lignina disminuye aproximadamente en dos unidades la degradabilidad de la pared celular, pero esto depende del tipo y estado fenológico de las plantas (Jung y Casler, 2006 a y 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.*, 2004; Dean *et al.*, 2005). Dosualdo *et al.* (2006) aplicaron enzimas fibrolíticas durante un proceso de ensilado, 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 ($r=-0.70$ y $r=-0.90$) (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) 0 y 24 h previas a la evaluación (en heno de alfalfa y paja de cebada), el pretratamiento incrementó la colonización de los sustratos 4 h después de su consumo debido a la mayor cantidad de azúcares reducidos producto de la actividad enzimática previa, 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 DMS se mantuvo de 4 a 48 h. Estos investigadores probaron lavar los alimentos pretratados con el fin de remover productos solubles; éste proceso mejoró la colonización bacteriana, pero disminuyó la DMS.

Elwakeel *et al.* (2007) aunque observaron que la digestibilidad *in vitro* de la MS mejoró por el uso de enzimas aplicadas en un pretratamiento, no hubo 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.*, 2006; Redish y Kung, 2007) o bien, tales efectos fueron negativos. Sin embargo, en algunos de los experimentos revisados en el presente trabajo, los autores 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; González *et al.*, 2010; Bassiouni *et al.*, 2010).

Conclusiones

Los hongos ligninolíticos producen una gran cantidad de formas e isoformas de enzimas que degradan la lignina, hemicelulosa y celulosa, cuyas características bioquímicas, estructurales y condiciones óptimas varían de acuerdo al medio y método en el que son producidas por los hongos. El uso de xilanasas y celulasas en experimentos *in vitro* con líquido ruminal muestran 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 *mejorías* 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 tendencias algunas variables. La aplicación de las enzimas durante el proceso de ensilado u horas previas a la incubación ruminal (pretratamiento), disminuyen las proporciones de FDN y FDA, incrementan la cantidad inicial de azúcares reducidos de los alimentos y aumentan sus digestibilidades de la 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.

Recomendaciones

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.

Referencias

- Álvarez G, Pinos-Rodríguez JM, Herrera JG, García JC, González SS, Bárcena R (2009). Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal digestibility in steers fed high fiber rations. *Livestock 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. *Enzyme and Microbial Technology* 36(7):989-995.
- Aro N, Ilmén M, Saloheimo A, Penttilä M (2003). ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. *Applied and Environmental Microbiology* 69(1): 56-65.
- Baah J, Shelford JA, Hirstov AN, McAllister TA, Cheng KJ (2005). Effects of Tween 80 and Fibrolytic Enzymes on Ruminal Fermentation and Digestibility of Feeds in Holstein Cows. *Asian-Aust.J. Anim. Sci.* 18: 816-824.
- Barahona R, Sanchez S, Lascano CA, Owen E, Morris P, Theororou MK (2005). Effect of condensed tannins from tropical legumes on the activity of fibrolytic enzymes from the rumen fungus *Neocallimastix hurleyensis*. *Enzyme and Microbial Tech.* 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. *Livestock Research for Rural Development* 22(6): Artículo 117.
- Beauchemin, KA, Colombatto D, Morgavi DP, Yang WZ (2003). Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81(2): 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. *R. Bras. Zootec.* 35(4):1454-1462.
- Bhat MK, Hazlewood GP (2001). Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: Bedford, M.R., Partridge, G.G. (Eds.), *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, 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*. *Brazilian Journal Microbiology* 35: 261-253.

- Chen M, Yao S, Zhang H, Liang X (2010). Purification and characterization of a versatile peroxidase from edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 18: 824-829.
- Cheng Y, Yang C, Liu W (2005). Cloning and expression of *Thermobifida* xylanase gene in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology* 37(5): 541-546.
- Cohen R, Yarden O, Yitzhak H (2002). Lignicellulose affects Mn^{2+} regulation of peroxidase transcript levels in solid-state cultures of *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (6): 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, Morgavi DP (2003). Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentation of pure cellulose xylan by mixed ruminal microorganism *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 81:1040-1050.
- Colombatto D, Mould FL, Bhatt 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(4): 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. of Anim. Sci.* 81(10), 2628-2638.
- Colombatto D, Mould F, Bhat M, Philipps R, Owen E (2004). *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. and Tech.* 111(1-4): 111-129.
- Colombatto D, Mould F, Bhat M, Phipps R, Owen E (2004a). 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. and Tech.* 111(1-4): 129-144.
- Colombatto D, Mould F, Bhat M, Phipps R, Owen E (2004b). 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. and Tech.* 111(1-4): 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. and Tech.* 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 (5): 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 (Supp. 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. of Dairy Sci.* 88(3):994-1003.
- Dean DB, 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. *Animal Feed Sci. and Tech.* 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*. *Enzyme and Microbial Tech.* 39(5):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. and Tech.* 101(1-4): 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. *R. Bras. Zootec.* 35(2): 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 (2007). Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using in vitro fermentation characteristics. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 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(6): 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. *Animal Feed Sci. & Tech.* 135(3): 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.* 2007 90: 1440-1451.
- Ferreira CG, Nussio GL, Maluf HC, Prudencio de Campos F, Michelini Coelho R, Marí LJ, Almeida P (2006a). Características de fermentação e composição químico-bromatológica de silagens de capim-tifton 85 confeccionadas com cinco teores de matéria seca. *Rev. Brasileira de Zootec.* 35(1):7-20.
- Ferreira CG, Nussio GL, Maluf HC, Prudencio de Campos F, Michelini Coelho R, Marí LJ, Almeida P (2006b). Perfil microbiológico, parâmetros físicos e estabilidade aeróbia de silagens de capim-tifton 85 (*Cynodon* sp.) confeccionadas com distintas concentrações de matéria seca e aplicação de aditivos. *Rev. Brasileira de Zootecnia* 35(2):358-371.
- 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. *Bt. J. Nutr.* 98:753.761.
- 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.* Published on line march, 2008. Available in: <http://jas.fas.org>.
- 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. *Option Méditerranéennes A.* 85: 297- 302.
- Gómez-Vázquez A, Pérez J, Mendoza GD, Aranda E, Hernández A (2003). Fibrolytic exogenous enzymes improve performance in steers fed sugar cane and stargrass. *Livestock Production Science* 82(2/3): 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. *Dairy Sci. Vol. 85 (Suppl. 1):* 355.
- 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- Aust. 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. P. 105-125 in *Proc. 65th Minnesota Nutr. Conf., St. Paul, MN. Univ. Minnesota, Minneapolis, MN.*
- Kataeva I, Li X, Chen H, Choi S, Ljungdahl LG (1999). Cloning and sequence analysis of a new cellulose gene encoding Ce1K, a mayor cellulosoma component of *Clostridium thermocellum*: Evidence for gene duplication and recombination. *Journal of Bacteriology* 181(17):5288-5295.
- Krueger NA, Adesogan AT (2008). Effects of different mixtures of fibrolytic enzymes digestion and fermentation of bahiagrass hay. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 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. and Tech.* 145(1-4): 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 Tech.* 94(2): 169-176.
- March RL, Zelinger S (2003). Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Microbiology and Biotechnology* 60 (5):515-22.
- Mata G, Waliszewski KN (2005). Comparative culturing of *Pleurotus* spp. On coffee pulp and wheat straw: Biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource Technology* 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..

- 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(6):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(12):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. Microb. Technol.* 26:171-177.
- Moriya T, Murasima K, Nakane A, Yanai K, Sumida N, Koga J, Murakami T, Kono T (2003). Molecular cloning of endo-B-D-1,4-Glucanase genes, *rce1*, *rce2*, and *rce3*, from *Rhizopus oryzae*. *Journal of bacteriology* 185(5):1749-1756.
- Murray P, Aro N, Collins C, Grassick A, Penttilä M, Saloheimo M, Touhy M (2004). Expression in *Trichoderma reesei* and characterisation of a thermostable family 3 β -glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. *Protein Expression and Purification* 38 (2): 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 Veracruzana*. 4(1): 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. *Livestock Science* 111(3): 255-258.
- Nsereko VL, Morgavi DP, Beauchemin KA, Rode LM (2000). Inhibition of ruminant feed enzyme polysaccharidase activities by extracts from silages. *Can. J. Anim. Sci.* 80: 523-526.
- 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. *Tec. Pecu. Méx.* 41(1): 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. Microbiology Biotechnol.* 2003(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. *Animal Sci.* 77 (3): 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. *Tec. Pecu. Méx.* 41(1): 63-74.
- Pinos-Rodríguez J M, 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(11): 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(12): 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. *Animal Feed Science and Technology* 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. *App. Genetics and Molecular Biotechnology* 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. *Animal Feed Sci. and Tech.* 145: 109-121.
- Rauscher R, Würleitner E, Waczenovsky C, Aro N, Stricker AR, Zeilinger S, Kubicek CP, Penttilä M, March RL (2006). Transcriptional Regulation of Xyn1, encoding Xylanase I, in *Hypocrea jecorina*. *Eukariotic cell* 5(3): 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. *Journal of Dairy Science* 82(10):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.
- Saqan-Naqvi SM, Harper A, Carter C, Ren G, Guirgis A, York WS, Thornburg RW (2005). Nectarin IV, a Potent Endoglucanase Inhibitor Secreted into the Nectar of Ornamental Tobacco Plants. Isolation, Cloning, and Characterization. *Plant Physiology*, November 2005, Vol. 139, pp. 1389–1400.
- 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, Carrillo CR, Setti MC (2006). Tasa de paso y parámetros ruminales en bovinos suplementados con enzimas fibrolíticas. *R. Bras. Zootec.* 35(3): 1186-1193.
- Souza MA, Figueiredo VP, Teresinha BT, Nunes PI, Moletta JL (2006a). Consumo y digestibilidad aparente total en bovinos suplementados con enzimas fibrolíticas. *R. Bras. Zootec.* 35(5): 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. *R. Bras. Zootec.* 35(3): 1194-1200.
- Srhnivas D, Savitha G, Ravirajan K, Ramchandra-Naik G (2010). A Highly thermostable Alkaline Cellulase-Free Xylanase from Thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB 99 Suitable for Paper and Pulp Industry: Purification and Characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162:2049–2057.
- 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):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-Tristan 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. Applied Animal Research* 39:2, 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. *Archives of Animal Nutrition* 59(5): 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 J, Zhang H, Wu M, Tang C (2011). Cloning and sequence analysis of a novel xylanase gene, Auxyn10A, from *Aspergillus usamii*. *Biotechnol Lett.* 33(5):1029-38.
- 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 *in vitro* digestion of silage. *J. Sci. Food Agric.* 82: 760-768.
- Wang Y, McAllister T, Rode L, Beauchemin K, Morgavi D, Nsereko V, Iwaasa A, Yang W (2008). 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.
- Wang Y, Ramirez-Bribiesca 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- Aust. J. Anim. Sci.* 25: 66-74.
- 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.

- Yang WZ, Beauchemin KA, Vedres DD (2002). Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and fermentation in continuous culture. *Animal Feed Science and Technology* 102(1-4): 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(1): 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. *Brazilian J. of Micr.* 41(3): 778-786.
- Yu P, McKinnon JJ, Christensen DA (2005). Improving the nutritional value of oat hulls for ruminant animals with pretreatment of multienzyme 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(1-2):29-39.

Cuadro 1. Número de experimentos que refieren algún efecto relacionado al uso de enzimas 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	Prod. 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	NR	1	2	1
	Negativo	0	0	0	0	0	NR	NR	NR	0	NR	0	NR	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 vitro</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, in situ</i>	Positivo	11	1	2	6	1	NR	NR	1	1	1	5	1	NR	NR	NR	NR	NR	1	1
	Negativo	0	0	0	0	1	NR	NR	0	0	0	0	0	NR	NR	NR	NR	NR	0	0

*NR: No Reportado; **CITAS: McAllister *et al.*, 1999; Rode *et al.*, 1999; Hirstov *et al.*, 2000; Kung *et al.*, 2000; Wallace *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Dhiman *et al.*, 2002; Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002; Colombatto *et al.*, 2003; Gómez-Vázquez *et al.*, 2003; González *et al.*, 2003; Baah *et al.*, 2005; Colombatto *et al.*, 2004; Cruywagen y Goosen, 2004; Wang *et al.*, 2004; Yescas-Yescas *et al.*, 2004; Dean *et al.*, 2005; Pinos-Rodríguez *et al.*, 2005; Tricarico y Dawson, 2005; Yu *et al.*, 2005; Bergamaschine *et al.*, 2006; Dosualdo *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2006; Romo *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2006; Muwalla *et al.*, 2007; Colombatto *et al.*, 2007; Elwakeel *et al.*, 2007; Eun *et al.*, 2007; Eun y Beauchemin, 2007; Giraldo *et al.*, 2007; Reddisch y Kung, 2007; Dean *et al.*, 2008; Giraldo *et al.*, 2008; Krueger *et al.*, 2008; Krueger y Adesogan, 2008; Pinos-Rodríguez *et al.*, 2008; Ranilla *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2009; Giraldo *et al.*, 2009; Bassiouni *et al.*, 2010.

Meta-analysis: The influence of exogenous fibrolytic enzymes in diets with different types and proportions of forage on the productive performance of ruminants¹

Deli Nazmín Tirado-González^a, Gustavo Tirado-Estrada^{b*}, Luis Alberto Miranda-Romero^a, Karen Beauchemin^c, Rodolfo Ramírez-Valverde^a, Agustín Ruiz-Flores^a

^a *Posgrado en Producción Animal, Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. km 38.5, Carretera México-Texcoco, Chapingo, México, CP 56230*

^b *Posgrado en Biotecnología Agropecuaria, Dirección general de Investigación y Posgrado, Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes. Km 18.5 Carretera Aguascalientes-S.L.P., El Llano, Aguascalientes, México, CP 20330*

^c *Agriculture and Agri-Food Canada Research Centre, Lethbridge, Alberta T1J 4B1, 5403 - 1 Avenue South. PO Box 3000*

**Corresponding author: Gustavo Tirado Estrada (Ph.D.); e-mail: gtiradoes@hotmail.com; tel: +52 4499161251, fax: +52 4499161251.*

¹ **Abbreviations**

DMD, dry matter digestibility; OMD, organic matter digestibility; ADFD, acid detergent fiber digestibility; NDFD, neutral detergent fiber digestibility; IVDMD, *in vitro* dry matter digestibility; IVNDFD, *in vitro* neutral detergent fiber digestibility; IVADFD, *in vitro* acid detergent digestibility; ISDMD, *in situ* dry matter digestibility; ISNDFD, *in situ* neutral detergent fiber digestibility; IVADFD, *in situ* acid detergent digestibility; VFA, volatile fat acids; GP, gas production, A:P, acetate:propionate ratio; DMI, dry matter intake; ADG, average daily gain; FC, feed conversion; TP, type of plant; F:C, forage to concentrate ratio; EA, enzyme activities; Cel:Xyl, cellulases:xylanases; EFE, exogenous fibrolytic enzymes.

Abstract

The interactions between exogenous fibrolytic enzymes (EFE) provided as supplements and the cell walls of ruminant feedstuff in ruminal conditions are currently unknown. Using meta-analysis, the aim of this study was to establish the effect of EFE in diets with different types and proportions of forage on the productive performance of ruminants. A representative sample among the articles published between 2000 and 2012 reported 636 experiments, which were classified into subgroups. Statistical analyses were performed considering models with fixed (type of forage based diet, forage:concentrate ratio, and primary enzyme activities (EA) in the EFE) and random effects (article). EFE increased the dry matter (DMD), organic matter, acid detergent fiber (ADFD), and neutral detergent fiber (NDFD) digestibility, *in vitro* gas, and total fat volatile acids and N-ammonia. EFE also improved the ruminal pH and acetate:propionate ratio. *In vivo*, dry matter intake was positively affected by the inclusion of EFE in diets for dairy cows and beef cattle. EFE supplementation of primarily cellulases:xylanases (Cel:Xyl: 0.25:1 to 1:1) or Xyl increased the milk production and composition of dairy cows fed high-forage legume- or grass-based diets, and the average daily gain of beef cattle fed high-grain grass-based diets. Primarily, Xyl EFE decreased the feed conversion of sheep fed high-grain diets. In high forage grass-based diets, EFE pre-treatment enhanced the EFE effect on DMD, NDFD, and ADFD. *In vitro*, the EA of primarily Cel EFE improved the DMD; however, NDFD and ADFD improvement depended on the Cel:Xyl ratio.

Keywords: Meta-analysis, Exogenous fibrolytic enzymes, Diet composition, Ruminal dynamics, Productive behavior, Ruminants.

1. Introduction

Ruminal fermentation is an efficient way of degrading the cell walls of ingested feedstuff by combining the coordinated actions of microorganisms and enzymes (Krause et al., 2003). Supplementing fibrolytic enzymes to ruminants helps to increase the degradability of cell walls (NDF) and the digestible energy of the diet. Some studies have suggested that such increase in the *in vitro* digestibility of forage neutral detergent fiber (NDF) is associated with a higher production of fat corrected milk and the increment of dry matter intake (DMI) (Jung et al., 2004; Oba and Allen, 1999). Thus, the use of exogenous fibrolytic enzymes (EFEs) to treat forage could reduce feed costs, sustain the productive performance of ruminants (Oba and Allen, 2000; Oba and Allen, 2005), and improve animal welfare (Petri et al., 2013; Saleem et al., 2012; Saleem et al., 2013).

Inside the rumen, EFEs hydrolyze certain components of the cell wall and produce substrates that favor selected populations of microorganisms, justifying EFE use even with low-forage diets (Beauchemin et al., 2004; Bedford and Cowieson, 2012). For example, the use of xylanases (Xyl) (Medina-Romo et al., 2006; Colombatto et al., 2007; Giraldo et al., 2008), ferulic acid esterases (Krueger et al., 2008), β -glucosidases (Dean et al., 2005), a mixture of cellulases (Cel) and Xyl (Eun et al., 2007; Eun and Beauchemin, 2007b), and Cel alone (Dean et al., 2008) can improve the *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) and IVNDFD.

In animal productive performance, the use of enzymes can improve the DMI (Billik et al., 2009; Granzin et al., 2005; Saleem et al., 2012.), gross energy intake (Chung et al., 2012), milk yield and composition (Arriola et al., 2011; Granzin et al., 2005; Knowlton et al.,

2007) in various stages of lactation (Lopuszanka et al., 2011), average daily gain (ADG), and feed conversion (FC) (Gado et al., 2011; Gómez-Vázquez et al., 2011; Tirado-Estrada et al., 2011). However, in some cases EFE supplementation does not have positive effects on DMD, NDFD (Assoumaya et al., 2007), DMI (Arriola et al., 2011; Knowlton et al., 2007), milk production (Elwakeel et al., 2007; Holtshausen et al., 2007; Miller et al., 2008), or ADG (Alvarez et al., 2008; Awawdeh and Obeidat, 2011; Miller et al., 2008; Ware et al., 2005).

Although it is difficult to relate specific enzymatic activities with results obtained in ruminal conditions (Mohamed et al., 2013), according to Meale et al. (2014), in order to improve the consistency of such results it is important establish the interactions between the ruminal ecosystem, the plant cell walls, and the type of EFE. Previously, authors have considered factors such as different Cel:Xyl ratios (Beauchemin et al., 2008; Eun and Beauchemin, 2007b), and doses (Dean et al., 2008), stability, and structure of the enzymes in the EFE preparations (Morgavi et al., 2000) along with their interactions with the different types of forage material (Jililvand et al., 2008). There is evidence supporting the possible beneficial effects of using enzymes with both legume- and grass-based diets (Hussain et al., 2008), even though their cell walls are quite different (Jung and Casler, 2006a,b) and some feedstuffs contain anti-nutritional compounds that inhibit enzymatic activities (Bedford and Cowieson, 2012; Igawa et al., 2004; Igawa et al., 2005).

Using meta-analysis of experimental data published between 2000 and 2012, the aim of the present study was to establish the effects of using EFE to treat diets with different

proportions of legumes and grasses on *in situ* and *in vitro* digestibility, and on the productive behavior of dairy cows, sheep, and beef cattle in feedlots.

2. Material and methods

2.1. Sampling method

A list of the articles published between 2000 and 2012 was generated as follows: five combinations of words were introduced as the search criteria in the CabAbstracts browser: 1) “fibrolytic” and “enzymes”; 2) “cellulases” and “xylanases” and “ruminant”; 3) “exogenous” and “fibrolytic” and “enzymes” and “ruminant”; 4) “exogenous” and “fibrolytic” and “enzymes”; and 5) “exogenous” and “enzymes” and “ruminant”. The search procedure identified 226 articles after a list of non-recurring items was generated. These articles were published in the Journal of Dairy Science (48), Journal of Animal Science (44), Canadian Journal of Animal Science (19), Asian-Australasian Journal of Animal Science (14), Animal Feed Science and Technology (8), and other journals (93). The final analysis was performed with 93 articles from the list, after removal of studies that did not address the required zootechnical species, factors, or variables of interest for this study.

2.2. Evaluated variables

From the articles considered, the means of the following variables were extracted and entered into a database: DMD, NDFD, digestibility of organic matter (OMD), crude protein, and acid detergent fiber (ADFD); *in vitro* gas production (GP), proportion of

volatile fatty acids (VFA), N-ammonia, ruminal pH, acetate: propionate ratio (A:P), and proportion of acetate to propionic acid (evaluated at 24 and 48 h). We also considered the DM intake, feed conversion, average daily gain, and milk production and composition.

2.3. Coding of data and study factors

2.3.1. Experiment definition. Each individual treatment included in the articles was defined as an experiment; among the 93 sampled papers, we coded 636 means that were independently reported from different experiments.

2.3.2. General description of the effect of enzyme use. We coded 358 ratios resulting from the division of the reported data for treatments with EFE by that of the respective controls (C) (without EFE). EFE/C corresponded to the means of the differences of the variables considered in the present study. Because of some articles included treatments which means induce quadratic effects, we avoided inclusion of these data. The means of the EFE/C ratios were classified as statistically different or not different (affected or not affected by EFE treatments) according to the analyses reported by the authors of the respective studies; subsequently, the data previously classified as statistically different was then subdivided into groups according the presence of positive or negative effects related to the use of enzymes (EFE).

2.3.3. Classification of the experiments. Inclusive of all doses and enzyme preparations evaluated, the 636 experiments were classified according to: 1) type of study: *in situ*, *in vitro*, or *in vivo*; 2) animal species used in the experiment: sheep, goats, dairy cows, fattening steers, or buffalos; 3) primary ingredient of the diet: grasses or legumes; 4) either

of two levels of dietary forage to concentrate ratio (F:C): a) $< 50\%$; or b) $\geq 50\%$; 5) type of enzyme product: commercial, non-commercial, or without EFE; 6) primary supplemented EA: no enzyme, Cel, Xyl, or a combination of both (Cel: Xyl ratio from 1:1 to 1:4); and 7) application time of enzymes: < 1 h, or from 1 to 24 h prior to evaluation (pre-treatment).

2.4. Inclusion criteria

To categorize the included factors, multiple linear regression analysis was performed (Stepwise) using Proc REG (SAS, 2013). Data was subdivided to generate subgroups of studies carried out under the same conditions but with varying levels of the factors: 1) type of plant: legume or grass; 2) F:C: a) $< 50\%$; and b) $\geq 50\%$; and 3) primary type of supplemented enzyme activity: Cel, Cel:Xyl (0.25:1 to 1:1), Xyl, and without enzymes (control). Treatments carried out an insufficient number of times (with minimal experimental representation) were not included in the analyses. The final analysis included 146 *in vivo*, 307 *in vitro*, and 122 *in situ* experiments of the 636 experiments initially coded (90.4%).

2.5 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SAS (SAS, 2013). Distribution of the information for all variables was checked using the Shapiro-Wilk, Kolmogorov Smirnov, Cramer Van Mises, and Anderson Darling tests, using a univariate procedure. Analyses of variance were performed according to model (1) as described below. The GLM procedure was used to obtain the coefficients of variation and of determination. Correct standard errors were obtained from the adjusted means (LsMeans/pdiff) and the significance values

for the model fixed effects were obtained using the GLIMMIX procedure (SAS, 2013), considering the random effects of the means of the experiments within the article in which they were originally published (Exp (A)) and the number of experimental means per article minus one as a weight factor. The numbers of means included are cited in the appendix. Considering model (1) and the significance of the covariates, the adjusted means were estimated (LSMEANS) and reported.

(Model 1)

$$Y = \mu + [\text{Exp}(A)]_{i(j)} + \text{En}_k + \text{TP}_l + \text{RFC}_m + (\text{En} * \text{TP})_{kl} + (\text{En} * \text{RFC})_{km} + (\text{TP} * \text{RFC})_{lm} + (\text{Ex} * \text{TP} * \text{RFC})_{klm} + \beta 1_{(x-x_i)} + E_{ijklmn}$$

Where: Y = response variable; μ = general mean; $[\text{Exp}(A)]_{i(j)}$ = random effects of the i^{th} experiment within the j^{th} article; En_k = effects of the k^{th} enzyme extract; TP_l = effects of the l^{th} type of plant effect; RFC_m = effects of the m^{th} forage:concentrate ratio; $(\text{En} * \text{TP})_{kl}$ = interaction between the k^{th} enzyme extract by the l^{th} type of plant; $(\text{En} * \text{RFC})_{km}$ = interaction between the k^{th} enzyme extract by the m^{th} forage:concentrate ratio; $(\text{TP} * \text{RFC})_{lm}$ = interaction between the l^{th} type of plant by the m^{th} forage:concentrate ratio; $(\text{Ex} * \text{TP} * \text{RFC})_{klm}$ = interaction among the k^{th} enzyme extract, the l^{th} type of plant, and the m^{th} forage:concentrate ratio; $\beta 1_{(x-x_i)}$ = effect of the covariate (initial weight, days in milk production, or the initial NDF in experimental diets); and E_{ijklmn} = experimental error.

3. Results

3.1. General description of the enzyme effect

Table 1 presents the general effects of EFE on the improvement of digestibility, animal behavior, and fermentation patterns.

3.1.1. In vitro, in situ, and in vivo digestibility. The use of EFE increased the digestibility of the diet components in 58% of the experiments (Table 1). The average of the improvement in DMD was 11% for the 55% of cases showing positive response. In over 40% of experiments, EFE also improved the OMD, NDFD, and ADFD (10.7, 15.2, and 22.6%, respectively

3.1.2. Animal behavior. Our analysis identified that EFE positively affected the DMI in 32% of experiments (11.8%) and the ADG in 50% of the studies (21.7%). Furthermore, not only was the milk production improved by 12.92% because of EFE use (in 35% of experiments), but the fat and crude protein contents were also increased by 11.1 and 5.4% (in 25 and 64% of experiments), respectively.

3.1.3. Fermentation patterns. Over 76% of the data included in this analysis supported that EFE treatment of diets increased both the *in vitro* GP (27.7%) and the proportion of VFA (33.2%). Accordingly, of the experiments analyzed in the present study, 36.7% showed increments in propionic acid (19.8%) and in 55%, the A:P ratio decreased by 8.8%; furthermore, 10% of studies demonstrated increased N-ammonia (13.3%) and pH (0.028, 1.5–2%).

3.2. Effect of supplementation with EFE on animal performance

The proportions and populations of ruminal bacteria vary according to the type of diet (Petri et al., 2013, Zhao et al., 2014), stage of production (Li et al., 2012), and type of ruminant (Lee et al., 2012). Therefore, we analyzed the productive performance separately in dairy cows, beef cattle, and sheep fed with four different diets: < 50 and $\geq 50\%$ grasses or legumes.

3.2.1. *Dairy cows.* Table 2 shows that *in situ* DMD improved when EFE was added in diets containing more than 49.9% of forage (573.21 vs. 512.31%) ($P = 0.0003$).

EFE supplementation increased milk production and milk solids (fat and protein) with high forage-based diets ($P < 0.02$). Our data suggested that EFE had a positive effect on milk production and milk protein when fibrolytic enzymes were applied to high forage based diets (1.96 kg/d and 99.44 g/d, respectively) ($P = 0.06$). In this analysis the effect of EFE on DMI was negative ($P = 0.0034$), and linear regressions between DMI and the production of milk, fat, and protein were $r^2 = 0.58$, $r^2 = 0.61$, and $r^2 = 0.60$, respectively ($P < 0.0001$).

3.2.2. *Beef cattle.* Table 2 presents data from experiments performed using diets based on grasses. In our study, the ADG increased by 0.304 kg/d (1.97%) ($P < 0.01$) in animals fed diets treated with EFE containing less than 50% grasses.

However, unlike in dairy cows, in beef cattle experiments improvements were seen in both DMI and FC when EFE were included in diets containing $> 50\%$ grasses (13.94 and

4.06%, respectively) ($P < 0.03$). The simple linear regression between DM intake and ADG was $r^2 = 0.49$ ($P < 0.0001$).

3.2.3. Sheep. The results reported in sheep are not consistent (Table 2). However, in sheep, *in vivo* DMD improved because of the addition of EFE to diets based on legumes and grasses (0.77 ± 1.15 units in legume-based diets, and 0.38 ± 1.08 units in grass-based diets) ($P = 0.002$).

3.3. Effect of type of enzyme activity

3.3.1. Effect of using EFE with different enzymatic compositions on animal productive performance. Table 3 shows that the addition of Cel:Xyl (from 0.25:1 to 1:1) in diets with more than 49% legume forage increased the DMI by 1.83 kg/d (6.9%), and increased milk production and its fat and protein content by 2.24, 0.118, and 0.082 kg/d, respectively ($P < 0.0005$). Furthermore, the addition of EFE consisting primarily of Xyl enzymatic activity to diets based on high-forage grasses positively affected milk production by 3.1 kg/d (11.3%), and its fat and protein content by 0.11 and 0.129 kg/d (10.6 and 14.6%), respectively ($P < 0.0001$); however, similar treatments had negative effects on milk production (-1.83 kg/d, 3.5%), and milk fat (-0.11 kg/d, 7.9%) and milk protein content (-0.85 kg/d, 7.1%) in high legume forage-based diets.

The inclusion of EFE with Cel:Xyl on grass-based diets including $< 50\%$ forage improved the ADG (0.114 kg/d; 7.6%) and FC (0.9 units; 14.1%) of beef cattle in feed lots ($P < 0.016$); this diet also showed a tendency to improve the ADG in sheep (14.7 g/d) ($P =$

0.096). However, in grass forage-based diets with < 50% forage, the use of enzymatic products with primarily Xyl activities decreased the ADG in sheep (-14.3 g/d, 7.21%).

3.3.2. *Effect of using EFEs with different enzymatic compositions on in vitro and in situ digestibility.* Tables 4 and 5 show the improvements of DMD, NDFD, and ADFD following ERE supplementation.

IVDMD increased along with the proportion of Cel in EFE preparations (Tables 4 and 5) ($P < 0.0001$).

The use of EFE in high forage legume-based diets, evaluated in experiments performed *in vitro*, showed similar DMDs among different types of ruminant fluid (IVDMD) (Table 4) ($P = 0.3$), but adding EFE composed primarily of Cel improved the IVDMD (119 ± 54.9 g/kg DM). In addition, EFE composed primarily of Xyl improved the DMD evaluated *in situ* (25 g/kg DM) ($P = 0.0005$), and EFE supplement mixtures of Cel:Xyl increased the *in situ* NDFD (154 g/kg) ($P = 0.008$). However, there were no differences following use of EFE in the IVNDFD and IVADFD ($P > 0.17$).

Similarly, EFE in high forage grass-based diets improved the IVDMD from 15.2% to 37.1%, depending on the type of ruminal fluid used in the evaluations (Table 5) ($P = 0.0001$); enzyme products containing primarily Cel improved the IVDMD from 477 ± 20.6 g/kg DM (control) to 596.8 ± 60.57 g/kg DM (EFE treatment), and enzyme products containing primarily Xyl also improved the DIVMS (493.3 ± 47.07 g/kg DM (control)). However, some mixtures of Cel and Xyl could have negative effects on the IVDMD of high forage grass-based diets. In these diets, the effects of adding EFE were not consistent

with the *in vitro* digestibility of NDF (IVNDFD) across the type of ruminal liquid used for the analysis.

Enzymatic products containing primarily Cel or mixtures of Cel and Xyl had positive effects on IVNDFD determined in diets containing primarily grasses and evaluated in the presence of ruminal liquid from sheep (467.9 ± 17.20 g/kg DM (EFE treatment) vs. 414.39 g/kg DM (control)) (Table 4) ($P = 0.0001$). However, the effects of these types of enzymatic products in grass-based diets were null or negative when laboratory analysis was performed with ruminal liquid from dairy cows ($P > 0.05$). Similarly, IVNDFD and IVADFD improved when EFE containing primarily Cel or Cel:Xyl was evaluated in grass-based diets using ruminal liquid from sheep (Table 5). The NDFD was increased from 403.18 g/kg DM (control) to 455.83 ± 43.03 g/kg DM (EFE treatment), and the ADFD with EFE treatment was 393.5 ± 21.23 g/kg DM (EFE treatment) vs. 328.21 g/kg DM ($P = 0.0001$).

In diets containing more than 49.9% forage and composed primarily of grasses (Table 5), the *in situ* DMD was not affected because of the use of EFE primarily composed of Xyl; the *in situ* NDFD and A:P ratio were also not affected ($P > 0.25$). There were some negative effects related to EFE use associated with the VFA variables. However, EFE comprised primarily of Xyl and mixtures of Cel and Xyl, applied with high-forage grass-based diets, improved the IVNDFD in an analysis performed with ruminal liquid from beef cattle (263.20 ± 61.82 (EFE treatment) vs. 255.1 (control)) (Table 5) ($P = 0.0001$). Giraldo et al. (2008), Miller et al. (2008), and Chaji and Mohammadabadi (2010), using EFE with primarily Xyl activity, could improve the IVDMD, IVNDFD, and IVADFD an average of

9.28, 13.16, and 0.37 units, respectively (16, 79.1, and 5.2%). Incremental increases in NDFD could be related to the higher ADG shown previously.

3.4. Effect of time of application of the enzymatic product

The effects of the time of application of EFE products in diets before feeding ruminants are presented in Table 6.

In this study, the time of application was found to be related to changes in DMD, NDFD, and ADFD in diets that included more than 49% forage, for both legume- as well as grass-based diets (Table 6). In legume-based diets, the improvement of DMD was enhanced when the enzymatic product was added without pretreatment ($4.6 \pm 2.3\%$) compared to its addition 1 h prior to giving the diets to the ruminants ($1.1 \pm 4.2\%$) ($P < 0.0001$). On the other hand, in grass-based diets, DMD, NDFD, and ADFD had better responses to EFE supplementation when the products were applied onto the diets 1 h prior to feeding than when EFEs were utilized without pre-treatment ($9.6 \pm 1\%$ vs. $3.8 \pm 0.5\%$ for DMD; $10 \pm 5.4\%$ vs. $5.4 \pm 1.6\%$ for NDFD; and $15 \pm 13\%$ vs. $6.7 \pm 4.4\%$ for ADFD) ($P < 0.0001$, $P = 0.07$, and $P = 0.07$).

4. Discussion

4.1. General description of the enzyme effect

4.1.1. In vitro, in situ, and in vivo digestibility. According the results of this meta-analysis, the use of EFE increased the digestibility of the diet components. Previous studies have hypothesized about the variability of the effects obtained using EFE; these were attributed

to the type of enzyme preparation (Yang et al., 2011), the dose (Dean et al., 2008), and the type of forage treated with EFE (Jililvand et al., 2008). For example, the *in vitro* digestibility of forage legumes and grasses could be increased by using EFE with the primary of Xyl enzyme activities (Colombatto et al, 2007; Giraldo et al, 2008; Medina-Romo et al., 2006), ferulic acid esterases (Krueger et al, 2008), β -glucosidases (Dean et al., 2005), and Cel (Dean et al., 2008).

4.1.2. Animal behavior. Improving the *in vitro* NDF digestibility of feedstuffs should be reflected in the increment of passage rate, DMI, and yield of fat corrected milk (Jung et al., 2004; Oba and Allen, 1999; Oba and Allen, 2005). Our analysis identified that EFE positively affected the DMI, ADG, milk production and its fat and crude protein contents.

4.1.3. Fermentation patterns. Chung et al. (2012), Wang et al. (2012), and Mao et al. (2013) associated dietary enzyme supplementation with improvements in IVDMD, IVNDFD, and gross energy intake, suggesting that these enzymes could enhance the population of *Fibrobacter succinogenes* and work synergistically with ruminal microorganisms toward the promoting the fiber digestibility of diets. Consistent with this, in this analysis EFE treatment of diets increased both the *in vitro* GP and the proportion of VFA.

In some studies, no differences were seen in individual and total VFA proportions; however, these results are not necessarily attributable to the negative effects of enzyme use. The absence of differences in VFA and fermentation patterns is also not necessarily related to null effects on NDFD or productive animal behavior either. Enzyme supplementation might positively affect NDFD (Schwab et al., 2003) at a stable

degradation rate, which might not necessarily be reflected in individual and total VFA changes, but could still serve to improve the DMI and the production and quality of milk.

The latter might occur as DMI is in part regulated by the rate at which propionate passes to the liver, the subsequent velocity at which the oxidation products are released through the gluconeogenesis pathway (Bradford and Allen, 2004; Oba and Allen, 2003), and the quick adaptive capacity of animals to energy deficits without alteration of their eating behavior (Oba and Allen, 2003). Therefore, an increase in energy density could enhance the flow of propionate to the liver but decrease the overall DMI (Bradford and Allen, 2007), promote energy imbalance (Oba and Allen, 2003), and reduce the production of milk fat (Bradford and Allen, 2004).

The experiments analyzed in the present study, sowed increments in propionic acid and decrements in the A:P ratio, and changes in N-ammonia and pH values. Since certain types of enzyme preparations have been shown to change the structure of the cell walls of some kinds of forage (Vyver and Cruywagen, 2013); this can enhance the colonization of the substrate by bacteria (De Souza et al., 2008) and promote the activity of certain endogenous enzymes (Colombatto et al., 2003), which in turn could lead to positive changes in the patterns of fermentation (Yang et al., 2011).

4.2. Effect of supplementation with EFE on animal performance

4.2.1. Dairy cows. EFE supplementation increased milk production and milk solids with high forage-based diets. These results agree with studies published subsequent to those included in our meta-analysis (Kholif et al., 2014). Mohamed et al. (2013) found that the

use of a preparation with primarily Xyl activity increased milk production by 1.5 kg/d (3.8%). This result suggests that it might be possible to increase the amount of forage in the diets of dairy cows, if it is treated with fibrolytic enzymes. Maximization of the amount of forage included in the diet not only might reduce feed costs, (Mendoza et al., 2014; Oba and Allen, 2005), but it also might have beneficial effects on the health and welfare of dairy cows. For example, including more forage in diets increases the diversity of rumen microorganisms up to 3.45 times, reducing the bacteria acidosis caused by *Acetitomacullum*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, and *Streptococcus* (Petri et al., 2013), and reducing the abnormal metabolites content in the rumen (Saleem et al., 2012; Saleem et al., 2013).

4.2.2. Beef cattle. The ADG increased in animals fed diets treated with EFE containing less than 50% grasses. In similar diets, Gómez-Vázquez et al. (2011) reported improvements of 0.31 kg/d in ADG (70.4%), 0.12 units in DMD (16.6%) and 4.1 units in NDFD (6.2%) in beef cattle in feedlots with use of an enzyme preparation; similarly, Balci et al. (2007) also found 0.38 kg/d of increase in ADG.

In beef cattle experiments DMI improvements could be related to the rate at which enzymes act to increase the energy availability of fiber (Bradford and Allen, 2004), as EFEs act not only in the direct hydrolysis of cellulose and xylose links by enzymes, but also by changing the structure of cell walls and therefore impacting the successive populations of microorganisms (Giraldo et al., 2007; Wang et al., 2012; Yu et al., 2005).

4.2.3. Sheep. Although the results reported in sheep are not consistent, some studies included in this analysis (Gado et al., 2011; McAllister et al., 2000; Miller et al., 2008)

exhibited improvements in ADG and FC following EFE supplementation related to an increase in *in vivo* DMD and increases in the proportions of propionic acid and VFA. Tirado-Estrada et al. (2011) found similar results when using EFE in diets with more than 56% corn stover.

4.3. Effect of type of enzyme activity

In nature, cellulose degradation requires the coordinated action of the ligninases, Cel, and Xyl; these three groups of enzymes might therefore act synergistically. Eun and Beauchemin (2007) explain that the use of Xyl in the correct combination with Cel improves glucose release, at first because of increased xylose removal upon the breakage of some hemicellulose-cellulose bonds, which increases the accessibility to cellulose (Grabber, 2002). Consequently, exogenous enzymes products should contain the ideal proportion between Cel and Xyl to promote the best fibrolytic action in the ruminal environment. In contrast, certain EFE supplement protocols do not contain enough endoglucanase activity to increase the digestibility of corn silage, and the addition of Xyl might adversely affect the population of rumen microorganisms (Eun and Beauchemin, 2008a).

4.3.1. Effect of using EFE with different enzymatic compositions on animal productive performance. Improvements in production and milk composition could be related to DMD and NDFD increases. Oba and Allen (1999) and Jung et al. (2004) reported that an incremental unit of NDFD might increase DMI by 0.168 kg/d, and fat corrected milk from 0.14 to 0.249 kg/d (3.5 to 4%). Oba and Allen (2000) found similar milk production between dairy cows fed a diet that included a corn hybrid with an IVNDFD of 56%, and

those fed a diet with a hybrid with an IVNDFD of 46.55% but including 30% more grains, suggesting that the increase in IVNDFD is related to improved milk production and quality.

4.3.2. Effect of using EFEs with different enzymatic compositions on in vitro and in situ digestibility. IVDMD increased along with the proportion of Cel in EFE preparations. Studies carried out by Granzin (2005), Knowlton et al. (2006), and Arriola et al. (2011), included in this analysis, reported improvement associated with EFE preparations in DMD and NDFD; furthermore, Miller et al. (2008) and Arriola et al. (2011) found increases of propionic acid production in dairy cows associated with the use of enzymes consisting primarily of Cel and Xyl activities.

The results of the present meta-analysis are consistent with *in vitro* evaluations of the application of mixtures of Cel and Xyl enzyme extracts (Cel:Xyl ratios between 0.01:1 and 1.5:1), where the improvement on the alfalfa, rice straw, and corn silage IVDMD and IVNDFD had a linear relationship with the total dose of supplemented Cel ($r^2 = 0.58$ to 0.75 , depending the type of forage) (Eun and Beauchemin, 2007; Eun et al, 2007b; Eun and Beauchemin, 2008b; Eun et al., 2008; Yang et al., 2011).

An excess of Cel could also have negative effects such as limiting access of the enzyme to the hydrolysable portion of carbohydrates and reduce microbial adherence (Morgavi et al., 2001; Wang et al., 2004). To achieve more consistent results, it is necessary to utilize the application of the correct dose (Vyver and Cruywagen, 2013), which should depend on the Cel:Xyl content in the products. However, it would appear that as the proportion of Cel in the enzyme extract is increased, it is necessary to administer a lower dose for improvement of NDFD (Fortes et al., 2010). Yu et al. (2005) reported a multiple linear

regression model ($r^2 = 0.74$) that related the DMD of oat hulls with the activities of Xyl, two types of endoglucanases, ferulic acid esterases, β -glucosidases, and Cel, but 55% of the DMD was explained by the activity of Cel and β -glucosidases of an enzymatic product with 1024 units of Cel and 4096 units of Xyl (Cel:Xyl= 0.25:1). Vyver and Cruywagen (2013) observed that in different materials using an enzyme product can permit reduction of the thickness of the membranes, but this depends on the appropriate dose for each type of forage.

4.4. Effect of time of application of the enzymatic product

The initial and subsequent degradability of diet components could be affected by the application time of the enzyme products. At least 1 h of pretreatment has been shown to cause the release of reducing sugars, which can change the patterns of colonization of the rumen microorganisms (Mao et al., 2013). Sometimes, pretreatment improves the rate of initial colonization of microorganisms, but this effect does not necessarily remain after 12 to 48 h, and decreases the potential for DMD to be increased by the addition of EFE (Wang et al., 2012). In other cases, certain combinations might favor the accumulation of phenolic compound fragments, limiting access of the enzyme to the hydrolysable portion of carbohydrates and thus limiting microbial adherence (Wang et al., 2004).

In the present study, the time of application was found to be related to changes in DMD, NDFD, and ADFD in diets that included more than 49% forage. Some studies agree that pre-treatment might enhance the effects of the enzymes (Díaz et al., 2015; Yu et al., 2005), but the effect varied according to the type of forage used (Hong et al., 2003).

5. Conclusions

This meta-analysis determined that the use of EFE increased DMD, OMD, NDFD, and ADFD in an average of 11.4, 10.7, 15.2, and 22.6% diets, respectively, in an average of 58% of the studies included in this analysis. The *in vitro* GP and VFA production were increased by the use of enzymes in more than 76% of the observations (27.7 and 33.2%, respectively). N-ammonia increased 13.3%, and ruminal pH decreased 2% in 10% EFE treatments. In 36.7% of the experiments, the proportion of propionic acid increased (19.8%) and in 29.5%, the A:P ratio decreased (8.8%). The results suggest that the use of fibrolytic enzymes could allow an increase in the amount of forage in the diets of dairy cows without compromising their productive performance, since enzyme supplementation produced positive effects in dairy cows fed high-forage diets. EFE treatments applied with high forage-based diets increased milk production and protein content (1.96 kg/d and 99.44 g/d, respectively). EFE primarily composed of mixtures of Cel:Xyl in high forage legume-based diets improved DMI (6.9%) along with milk production and its fat and protein content (2.24 kg/d, 0.118 kg/d, and 0.082 kg/d, respectively). Furthermore, the addition of EFE consisting primarily of Xyl enzymatic activity to diets based on high forage grasses positively affected milk production by 3.1 kg/d, and its fat and protein content by 0.11 and 0.129 kg/d, respectively. The ADG of beef cattle increased (1.97%) when fed diets treated with EFE containing < 50% grasses; Cel:Xyl EFE in diets based on grasses and < 50% forage improved the ADG (7.6%) and FC (14.1%) of beef cattle. However, although this type of diet tended to improve the ADG of sheep (7.4%), it had negative effects on sheep FC. Xyl EFE in low grass forage-based diets decreased the ADG in sheep (7.21%). Results

of *in vitro* and *in situ* DMD, NDFD, and ADFD suggest that improvements of DMD could be related to the increase in Cel in the enzymatic products, but that improvements of ADFD and NDFD depend on a more careful balance of Cel:Xyl. Finally, pretreatment enhanced the effect of EFE in DMD, NDFD, and ADFD only in diets high in grass forage.

6. Acknowledgments

The present study was designed and directed by Agustín Ruiz Flores and Luis Alberto Miranda Romero, Ph.D., who were closely involved in the collection, analysis, and interpretation of data, and in writing and the decision to submit the present article for publication. There are no conflicts of interest to declare.

7. References

- Almaraz, I., Segundo-González, S., Pinos-Rodríguez, J.M., Miranda, L.A., 2010. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in sacco* ADN *in vitro* degradation of diets and on growth performance of lambs. Ital. J. Anim. Sci. 9(e2):6-10.
- Álvarez, G., Pinos-Rodríguez, J.M., Herrera, J.G., García, J.C., González, S.S., Bárcena, R., 2009. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal digestibility in steers fed high fiber rations. Livestock Sic. 121: 150-154.
- Arriola, K.G., Kim, S.C., Staples, C.R., Adesogan, A.T., 2011. Effect of fibrolytic enzyme application to low- and high- concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. J. Dairy Sci. 94: 832-841.

- Assoumaya, C., Boval, M., Weisbecker, J.L., Saminadin, G., Archimède, H., 2007. Limits of exogenous fibrolytic enzymes to improve digestion intake of a tropical grass. *Asian-Aust. J. Anim. Sci* 20(6): 914-919.
- Avellaneda-Cevallos, J.H., González-Muñoz, S.S., Pinos-Rodríguez, J.M., Hernández-Garay, A., Montañez-Valdez, O.D., Ayala, J., 2007. Enzimas fibrolíticas exógenas en la digestibilidad *in vitro* de cinco ecotipos de *Brachiaria*. *Agronomía Mesoamericana* 18(1): 11-17.
- Avellaneda-Cevallos, J.H., Pinos-Rodríguez, J.M., González-Muñoz, S.S., Bárcena R., Hernández-Garay, A., Montañez-Valdez, O., 2009. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and digestion of Guinea grass hay. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 149: 70-77.
- Awawdeh, M.S., Obeidat, B.S., 2011. Effect of supplemental exogenous enzymes on performance finishing Awassi lambs fed olive cake-containing diets. *Livestock Sci.* 138: 20-24.
- Bahh, J., Shelfrod, J.A., Hristov, A.N., McAllister, T.A., Cheng, K.J., 2005. Effects of tween and fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and digestibility of feeds in Holstein cows. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18(6): 816-824.
- Bala, P., Malik, R., Srinivas, B., 2009. Effect of fortifying concentrate supplement with fibrolytic enzymes on nutrient utilization, milk yield and composition in lactating goats. *Anim. Sci. J.* 80: 265-272.
- 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. *Bulgarian J. Vet. Medicine* 10(29): 113-118.
- Bassiouni, M.I., Gaafar, H.M., Saleh, M.S., Mohi, El Din, A.M., Elshora, M.A., 2011. Evaluation of ratios supplemented with fibrolytic enzyme on dairy cows performance 2- *in situ* ruminal degradability of rations containing different roughages at two concentrate to roughage ratios. *Researcher* 3(2): 21-33.

- Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P., 2004a. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 84:24-36.
- Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P., Yang, W.Z., Rode, L.M., 2004b. Mode of action of exogenous cell wall degrading enzymes for ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 84: 13-22.
- Bedford, M.R., Cowieson, A.J., 2012. Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 173(2012): 76-85.
- Bilik, K., Niwinska, B., Lopuszanska-Rusek, M., 2009. Effect of adding fibrolytic enzymes to periparturient and early lactation dairy cow diets on production parameters. *Ann. Anim. Sci.* 9(4): 401-413.
- Boonthep, K., Ngampongsai, W., Wattanachant, C., Visessanguan, W., Boonpayung, S., 2011. Effects of enzyme levels in total mixed ration containing oil palm frond silage on kinetics of gas production. *J. SAADC.* 3: 563-567.
- Bowman, G.R., Beauchemin, K.A., Shelford, J.A., 2002. *In vitro* degradation of fresh substrates treated with exogenous fibrolytic enzymes. *Can. J. Anim. Sci.* 82: 611-615.
- Bradford, B.J., Allen, M.S., 2004. Milk fat responses to a change in diet fermentability vary by production level in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 87(11): 3800-3807.
- Bradford, B., Allen, M., 2007a. Phlorizin administration does not attenuate hypophagia induced by intraruminal propionate infusion in lactating dairy cattle. *J. Nutr.* 137: 326-330.
- Bradford, B.J., Allen, M.S., 2007b. Phlorizin induces lipolysis and alters meal patterns in both early and late-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90: 1810-1815.
- Cano, A.L., Aranda, I.E., Mendoza, M.G., Pérez, P.J., Ramos, J.J., 2003. Comportamiento de toretes en pastos tropicales suplementados con caña de azúcar y enzimas fibrolíticas. *Téc. Pecu. Méx.* 41(2):151-164.

- Carreón, L., Pinos-Rodríguez, J.M., Bárcena, S.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. *Ital. J. Anim. Sci.* 2010(9:e17): 83-87.
- Chaji, M., Mohammadabadi, T., 2010. The effect of low temperature steam, sodium hydroxide and exogenous enzyme on *in vitro* degradation of rice straw by rumen bacteria of sheep. *Indian J. Small Ruminants* 16(2): 190-194.
- Chung, Y.H., Zhou, M., Holtshausen, L., Alexander, T.W., McAllister, T.A., Guan, L.L., Oba, M., Beauchemin, K.A., 2012. A fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets: ruminal fermentation, rumen microbial populations, and enteric methane emissions. *J. Dairy Sci.* 95: 1419-1427.
- Colombatto, D., Morgavi, D.P., Furtado, A.F., Beauchemin, K.A., 2003a. 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.L., Bhat, M.K., Morgavi, D.P., Beauchemin, K.A., Owen, E., 2003b. 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., Mould, F.L., Bhat, M.K., Owen, E., 2006. Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and incubation pH on the *in vitro* ruminal fermentation of alfalfa stems. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 137: 150-162.
- 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. and Tech.* 137: 150-162.
- Cruywagen, C.W., Zyl, W.H., 2007. Effects of a fungal enzyme cocktail treatment of high and low forage diets on lamb growth. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 145: 151-158.

- De Souza, M.A., Figueiredo, V.P., Berchielli, T.T., Nunes, P.I., Soares, G.J., 2006a. Eficiência de síntese microbiana e atividade enzimática em bovinos submetidos à suplementação com enzimas fibrolíticas. R. Bras. Zootec. 35(3): 1194-1200.
- De Souza, M.A., Figueiredo, V.P., Teresinha, B.T., Nunes, P.I., Moletta, J.L., 2006b. Consumo e digestibilidade aparente total em bovinos sob suplementação com enzimas fibrolíticas. R. Bras. Zootec. 35(5): 2118-2124.
- De Souza, M.A., Figueiredo, V.P., Teresinha, B.T., Nunes, P.I., 2008. Degradação ruminal da silagem de milho e da palha de arroz utilizando enzimas fibrolíticas exógenas. Maringá 30(4): 435-442.
- Dean, B.D., Adesogan, A.T., Krueger, N., Littell, R.C., 2005. Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, aerobic stability, and digestibility of bermudagrass Silage. J. Dairy Sci. 88(3):994-1003.
- 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. and Tech. 145: 68-83.
- Dehghani, M.R., Weisberg, M.R., Hvelplund, T., Kristensen, N.B., 2012. Effect of enzyme addition to forage at ensiling on silage chemical composition and NDF degradation characteristics. Livestock Sci. (2012). [Http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2012.07.031](http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2012.07.031)
- Díaz, A., Ranilla, M.J., Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Carro, M.D., 2014. Treatment of tropical forages with exogenous fibrolytic enzymes: effects on chemical composition and *in vitro* rumen fermentation. J. Anim. Physiol. and Anim. Nutr. (Early View).
- Elwakeel, E.A., Titgemeyer, E.C., Johnson, B.J., Armendariz, C.K., Shirley, J.E., 2007. Fibrolytic enzymes to increase the nutritive value of dairy feedstuffs. J. Dairy Sci. 90: 5226-5236.

- Eun, J.S., Beauchemin, K.A., Hong, S.H., Bauer, M.W., 2006. Exogenous enzymes added to untreated or ammoniated rice straw: effects on *in vitro* fermentation characteristics and degradability. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 131: 86-101.
- Eun, J.S., Beauchemin, K.A., 2007a. Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using *in vitro* fermentation characteristics. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 132: 298-315.
- Eun, J.S., Beauchemin, K.A., 2007b. Use *in vitro* degradation of alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. *J. Dairy Sci.* 90: 2839- 2851.
- Eun, J.S., Beauchemin, K.A., Schulze, H., 2007a. Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance *in vitro* fermentation of alfalfa hay and corn silage. *J. Dairy Sci.* 90: 1440-1451.
- Eun, J.S., Beauchemin, K.A., Schulze, H., 2007b. Use of an *in vitro* fermentation bioassay to evaluate improvements in degradation of alfalfa hay due to exogenous feed enzymes. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 135: 315-328.
- Eun, J.S., Beauchemin, K.A., 2008a. Assessment of the potential of feed enzyme additives to enhance utilization of corn silage fibre by ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 88: 97-106.
- Eun, J.S., Beauchemin, K.A., 2008b. Relationship between enzymic activities and *in vitro* degradation of alfalfa hay and corn silage. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 145: 53-67.
- Eun, J.S., ZoBell, D.R., Wiedmeier, R.D., 2009. Influence of replacing barley grain with corn-based dried distillers grains with soluble on production and carcass characteristics of growing and finishing beef steers. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 152: 72-80.
- Facchini, F.D.A., Reis, V.R.A., Roth, A.P., Magalhaes, K.A., Peixoto-Nogueira, S.C., Casagrande, D.R., Reis, R.A., Polizeli, M.L., 2012. Effects of *Aspergillus* spp. Exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* fermentation of tropical forages. *J. Food Agric.* 92: 2569-2573.

- Flores, C., Caja, G., Casals, R., Albanell, E., Such, X., 2008. Performance of dairy ewes fed diets with a fibrolytic enzyme product included in the concentrate during the suckling period. *Anim.* 2(6): 962-968.
- Fortes, G.L.M., Alves, O.R., Silva, B.E.P., 2010. Cellulases, xylanases, B-glucosidases and ferulic acid esterases produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochem. Eng. J.* 51: 72-78.
- Franco, G.L., Ferreira, R.F., Rocha, M.T., Cysneiros, C.S., Diogo, J.M., 2008. Parametros ruminaris e desaparecimento da matéria seca e fibra em detergente neutro da forragem em bovinos que recebe ndo levadura e enzims fibrolíticas na dieta. *R. Bras. Saúde Prod. Anim.* 9(3): 488-496.
- Gado, H.M., 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. and Tech.* 154: 36-46.
- Gado, H.M., 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. and Tech.* 165(2011): 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 Journal of Animal Science* 2010(9:e8): 34-38.
- Giraldo, L.A., Carro, M.D., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Mohamed, A.H., 2007a. *In vitro* rumianl fermentation of low-quality forages as influenced by the treatment with exogenous fibrolytic enzymes. *Options Mediterranées A*(74): 263-267.
- Giraldo, L.A., Carro, M.D., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., 2007b. Influence of fibrolytic enzymes on *in vitro* methane production and rumen fermentation of a substrate containing 60% grass hay. *Livestock Research for Rural Development* 19(12): article #185 <http://www.lrrd.org/lrrd19/12/gira19185.htm>

- Giraldo, L.A., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Carro, M.D., 2007c. Influence of exogenous fibrolytic enzymes and fumarate on methane production, microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters. *British J. Nutr.* 98(4): 753-761.
- Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Carro, M.D., 2007d. Effects of exogenous cellulase supplementantation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in Rusitec fermenters. *J. Anim. Sci.* 85: 1962-1970.
- Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Carro, M.D., 2008a. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage: concentrate ratios. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 141: 306-325.
- Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Ramos, S., Carro, M.D., 2008b. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed as grass hay-based diet. *J. Anim. Sci.* 86: 1617-1623.
- Gómez-Vázquez, A., Mendonza-Martínez, G., Aranda, E., Pérez, J., Hernández, A., Pinos-Rodríguez, J.M., 2011a. Influence of fibrolytic enzymes on growth performance and digestion in steers grazing stargrass and supplemented with fermented sugarcane. *J. Applied Anim. Research* 39(1): 77-79.
- Gómez-Vázquez, A., Mendonza-Martínez, G., Pinos-Rodríguez, J., 2011b. Comparison of *in vitro* degradation of elephant grass and sugarcane by exogenous fibrolytic enzymes. *African J. of Microbiology Research* 5(19): 3051-3053.
- Grabber, J.H., Ralph, J., Hatfield, R.D., 2002. Model studies of ferulate-coniferyl alcohol cross-product formation in primary maize walls: implications for lignification in grasses. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6008–6016.
- Granzin, B.C., 2005. Effects of a fibrolytic enzyme supplement on the performance of Holstein Freisian cows grazing kikuyu. *Trop. Grasslands* 39: 112-116.

- Guerra, L.J.E., Ibarra, L.E., Soto, A.L.E., Hernández, M.J.J.R., Corrales, A.J.L., Rodríguez, G.J., López, J.L.A., Córdova-Izquierdo, A., 2007. Alfalfa ruminal degradation using xylanases. *J. Anim. and Vet. Adv.* 6(12): 1443-1445.
- Holtshausen, L., Chung, Y.H., Gerardo-Cuervo, H., Oba, M., Beauchemin, K.A., 2011. Improved milk production efficiency in early lactation dairy cattle with dietary addition of a developmental fibrolytic enzyme additive. *J. Dairy Sci.* 94: 899-907.
- Hong, S.H., Lee, B.K., Choi, N.J., Lee, S.S., Yung, G., Ha, J.K., 2003. Effects of enzyme application method and levels and pre-treatment times on rumen fermentation, nutrient degradation and digestion in goats and steers. *Asian- Aust. J. Anim. Sci.* 16: 389-393.
- Hristov, A.N., McAllister, T.A., Cheng, K.J., 2000. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle barley grain diet. *J. Anim. Sci.* 78: 477-487.
- Hristov, A.N., Basel, C.E., Melgar, A., Foley, A.E., Ropp, J.K., Hunt, C.W., Tricarico, J.M., 2008. Effect of exogenous polysaccharide-degrading enzyme preparations on ruminal fermentation and digestibility of nutrients in dairy cows. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 145: 182-193.
- Hussain, A., Nisa, M., Sarwar, M., Sharif, M., Javaid, A., 2008. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal performance. *Pak. J. Agric. Sci.* 45(2): 297-306.
- Hwang, H.I., Hee, L.C., Woo, K.S., Guyn, S.H., Young, L.S., Sill, L.S., Hong, H., Kwak, Y., Ha, J.K., 2008. Effects of mixtures of Tween 80 and cellulolytic enzymes on nutrient digestion and cellulolytic bacterial adhesion. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 21(11): 1604-1609.
- Igawa, T., Ochiai-Fukuda, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., Shibata, T., Yamaguchi, I., Kimura, M., 2004. New TAXI-type xylanase inhibitor genes are inducible by pathogens and wounding in hexaploid wheat. *Plant cell physiol.* 45(10): 1347-1360.

- Igawa, T., Tokai, T., Kudo, T., Yamaguchi, I., Kimura, M., 2005. A wheat xylanase inhibitor gene, Xip-I, but not Taxi-I, is significantly induced by biotec and abiotic signals that trigger plant defense. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69(5): 1058-1063.
- Jung, H.G., Casler, M.D., 2006a. Maize stem tissues: Cell wall concentration and composition during development. *Crop. Sci.* 46:1793-1800.
- Jung, H.G., Casler, M.D., 2006b. Maize stem tissues: Impact and development on cell wall degradability. *Crop. Sci.* 46:1801-1809.
- Jung, H.G., Raeth-Knight, M., Linn, J.G., 2004. Forage fiber digestibility: measurement, variability, and impact. P. 105-125 in *Proc. 65th Minnesota Nutr. Conf.*, St. Paul, MN. Univ. Minnesota, Minneapolis, MN.
- Jililvand, G., Naserian, A., Kebreab, E., Odongo, N.E., Valizadeh, R., Eftekhari, F., López, S., France, J., 2008. Rumen degradation kinetics of alfalfa hay, maize silage and wheat straw treated with fibrolytic enzymes. *Arch. Zootec.* 57(218): 155: 164.
- Kalkan, M., Filya, I., 2011. Effects of cellulase enzyme on nutritive value, *in vitro* digestion characteristics and microbial biomass production on wheat straw. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg* 17(4): 585-594.
- Kholif, A.M., Aziz, H.A., 2014. Influence of Feeding Cellulolytic Enzymes on Performance, Digestibility and Ruminal Fermentation in Goats. *Anim. Nutr. and Feed Tech.* 14(1): 121-136.
- Knowlton, K.F., Taylor, M.S., Hill, S.R., Cobb, S.R., Wilston, K.F., 2007. Manure nutrient excretion by lactating cows fed exogenous phytase and cellulase. *J. Dairy Sci.* 90: 4356-4360.
- Kozelov, L.K., Iliev, F., Hirstov, A.N., Zaman, S., McAllister, T.A., 2008. Effect of fibrolytic enzymes and an inoculant on *in vitro* degradability and gas production of low-dry matter alfalfa silage. *J. Sci. Food Agric.* 88: 2568-2575.

- 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. *Microbiol. Reviews* 27(2003):663-693.
- Krueger, N.A., Adesogan, A.T., 2008. Effects of different mixtures of fibrolytic enzymes on digestion and fermentation of bahiagrass hay. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 145: 84-94.
- Lee, H.J., Jung, J.Y., Oh, Y.K., Lee, S.S., Madsen, E.L., Jeon, C.O., 2012. Comparative survey of rumen microbial communities and metabolites across one caprine and three bovine groups, using bar-coded pyrosequencing and H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Applied Environ. Microbiol.* 78(17): 5983-5993.
- Li, R.W., Connor, E.E., Li, C., Baldwin, Vi. R.L., Sparks, M.E., 2012. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomics tools. *Environ. Microbiol.* 14(1):129-139.
- Lopuszanska-Rusek, M., Bilik, K., 2011. Influence of pre and postpartum supplementation of fibrolytic enzymes and yeast culture, or both, on performance and metabolic status of dairy cows. *Ann. Anim. Sci.* 11(/4): 531-545.
- Malik, R., Bandla, S., 2010. Effect of source and dose of probiotics and exogenous fibrolytic enzymes (EFE) on intake, feed efficiency, and growth of male buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. *Trop. Anim. Health Prod.* 42: 1253-1269.
- Mao, H.L., Wu, C.H., Wang, J.K., Liu, J.X., 2013. Synergistic effect of cellulose and xylanase on *in vitro* rumen fermentation and microbial population with rice straw as substrate. *Anim. Nutr. and Feed Tech.* 13: 477-487.
- Márquez, A., Mendoza, G., Pinos-Rodríguez, J.M., Zavaleta, H., González, S., Buntinx, S., Loera, O., Meneses, M., 2009. Effect of fibrolytic enzymes and incubation pH on *in vitro* degradation of NDF extracts of alfalfa and orchardgrass. *Ital. J. Anim. Sci.* 8: 221-230.

- McAllister, T.A., Stanford, K., Bae, H.D., Treacher, R.J., Hristov, A.N., Baah, J., Shelford, J.A., Cheng, K.J., 2000. Effect of surfactant and exogenous enzymes on digestibility of feed and on growth performance and carcass traits of lambs. *Can. J. Anim. Sci.* 80: 35-44.
- Meale, S.J., Beauchemin, K.A., Hristov, A.N., Chaves, A.V., McAllister, T.A., 2014. BOARD-INVITED REVIEW: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve ruminant production. *J. Anim. Sci.* 92(2): 427-442.
- Medina, R.M., Tirado, E.G., Mejía, H.I., Solís, I.C., Cruz, V.C., 2006. Digestibilidad in situ de dietas con harina de nopal deshidratado conteniendo un preparado de enzimas fibrolíticas exógenas. *Pes. Agropec. Bras.* 41(6):1173-1177.
- Mendoza, G.D., Loera-Corral, O., Plata-Pérez, F.X., Hernández-García, P.A., Ramírez-Mella, M., 2014. Considerations on the Use of Exogenous Fibrolytic Enzymes to Improve Forage Utilization. *The Scientific World J. Review Article*.
- Miller, D.R., Elliott, R., Norton, B.W., 2008a. Effects of an exogenous enzyme, Roxazyme G2, on intake, digestion and utilization of sorghum and barley grain-based diets by beef steers. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 145: 159-181.
- Miller, D.R., Elliot, R., Norton, B.W., 2008b. Effects of an exogenous enzyme, Roxazyme G2 liquid, on digestion and utilization of barley and sorghum grain-based diets by ewe lambs. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 140: 90-109.
- Miller, D.R., Granzin, B.C., Elliot, R., Norton, B.W., 2008c. Effect of an exogenous enzyme Roxazyme G2 liquid, on milk production in pasture fed dairy cows. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 145: 194-208.
- Mohamed, D., Borhami, B., El-Shazly, K., Sallam, S., 2013. Effect of supplementation with fibrolytic enzymes on the productive performance of early lactating dairy cows. *J. Agric. Sci.* 6: 146-155.

- Moharrery, A., Hvelplund, T., Weisbjerg, M.R., 2009. Effect of forage type, harvesting time and exogenous enzyme application on degradation characteristics measured using in vitro technique. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 153: 178-192.
- Morgavi, D.P., Newbold, C.J., Beever, D.E., Wallace, R.J., 2000. Stability and stabilization of potential feed additive enzymes in rumen fluid. *Enzyme and Microbial Tech.* 26: 171-177.
- Morgavi, D.P., Beauchemin, K.A., Nsereko, V.L., Rode, L.M., McAllister, T.A., Iwaasa, A.D., Wang, Y., Yang, W.Z., 2001. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. *J. Anim Sci.* 79: 1621-1630.
- Muwalla, M.M., Haddad, S.G., Hijazeen, M.A. 2007. Effect of fibrolytic enzyme inclusion in high concentrate fattening diets on nutrient digestibility and growth performance of Awassi lambs. *Livestock Sci.* 11: 255-258.
- Oba, M., Allen, M., 1999. Evaluation of the importance of the digestibility of NDF from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82: 589-596.
- Oba, M., Allen, M., 2000a. Effects of Brown midrib 3 mutation in corn silage on productivity of dairy cows fed two concentrations of dietary neutral detergent fiber: 1. Feeding behavior and nutrient utilization. *J. Dairy Sci.* 83: 1333-1341.
- Oba, M., Allen, M., 2000b. Effects of Brown midrib 3 mutation in corn silage on productivity of dairy cows fed two concentrations of dietary neutral detergent fiber: 2. Digestibility and microbial efficiency. *J. Dairy Sci.* 83(6): 1350-1358.
- Oba, M., Allen, M., 2003. Intraruminal infusion of propionate alters feeding behavior and decreases energy intake of lactating dairy cows. *J. Nutr.* 133: 1094-1099.
- Oba, M., Allen, M., 2005. *In vitro* digestibility of forages. Tri-State Dairy Nutrition Conference Pp. 81-91. Dep. Dairy Sci., The Ohio State Univ., Columbus, Ohio, 43210.

- Petri, R.M., Schwaniger, T., Penner, G.B., Beauchemin, K.A., Forster, R.J., McKinnon, J.J., McAllister, T.A., 2013. Characterization of the core rumen microbiome in cattle during transition from forage to concentrate as well during and after an acidotic challenge. *PLoS One* 2013 31; 8(12): e83424.
- Pinos-Rodríguez, JM, González, M.S.S., Mendoza, M.G., Bárcena, G.R., Cobos, P.M., 2001. Efecto de enzimas fibrolíticas glucosiladas en la digestibilidad *in vitro* de la MS y MO de alfalfa (*Medicago sativa*) y ballico (*Lolium perenne*). *R. científica, FCV-LUZ* 11(6):505-509.
- Pinos-Rodríguez, J.M., González, M.S.S., Mendoza, M.G., Bárcena, G.R., Cobos, P.M., Hernández, A., Ortega, E., 2002. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility 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., 2007. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and digestibility of total mixed rations fed to lambs. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 142(2008): 210-219.
- Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Giraldo, L.A., Tricárico, J.M., Carro, M.D., 2008. Effects of an exogenous fibrolytic enzyme preparation on *in vitro* ruminal fermentation of three forages and their isolated cell walls. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 145: 109-121.
- Reboucas, S., Nussio, L.G., Paziani, S.F., Pedroso, A.F., Mari, L.J., Ribeiro, J.L., Zopollatto, M., Schmidt, P., Junqueira, M.C., Packer, I.U., Campos, F.P., 2005. Fibrolytic enzymes and dry matter content of Tanzaniagrass silages on the ruminal parameters, ingestive behavior and nutrient digestion of bovine. *R. Bras. Zootec.* 34(3): 736-745.
- Saleem, F., Ametaj, B.N., Bouatra, S., Mandal, R., Zebeli, Q., Dunn, S.M., Wishart, D.S., 2012. A metabolomics approach to uncover the effects of grain diets on rumen health in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95: 6606-6623.

- 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. *Animal Feed Sci. and Tech.* 171(2012): 128-135.
- Saleem, F., Bouatra, S., Gou, A., Psychogios, N., Mandal, R., Dunn, S., Ametaj, B., Wishart, D., 2013. The bovine ruminal fluid metabolome. *Metabolomics* 9(2): 360.
- Schwab, E.C., Shaver, R.D., Lauer, J.G., Coors, J.G., 2003. Estimating silage energy value and milk yield to rank corn hybrids. *J. Anim. Feed Sci. and Tech.* 109:1-18.
- Shekar, C., Thakur, S.S., Shelke, S.K. 2010. Effect of exogenous fibrolytic enzymes supplementation on milk production and nutrient utilization in Murrah buffaloes. *Trop. Anim. Health Prod.* 42: 1465-1470.
- Statistical Analysis System. 2013. SAS/STAT User's Guide. (Release 9.3). Cary, NC, USA. SAS Inst. Inc.
- Srinivas, B., Chaturvedi, O.H., Malik, R., Asgar, M., 2008. Effect of enzyme to substrate ratio of exogenous fibrolytic and protease enzymes on *in vitro* gas production kinetics. *Indian J. Small Ruminants* 14(2): 181-190.
- Sutton, J.D., Phipps, R.H., Deaville, E.R., Jones, A.K., Humphries, D.J., 2002. Whole-crop wheat for dairy cows: effects of crop maturity, a silage inoculant and an enzyme added before feeding on food intake and digestibility and milk production. *Anim. Sci.* 74: 307-318.
- Tang, S.X., Tayo, Z.L., Sun, 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: 1164-1172.
- Tirado-Estrada, G., Mendoza M.G.D., Pinos-Rodríguez, J.M., Quezada, T.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. Applied Anim. Research* 39:2, 158-160.
- Titi, H.H., 2003. Evaluation of feeding a fibrolytic enzyme to lactating dairy cows on their lactational performance during early lactation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 16(5): 677-684.
- Vyver, W.F.J., Cruywagen, C.W.C., 2013. Exogenous fibrolytic enzymes to unlock nutrients: histological investigation of its effects on fibre degradation in ruminants. *South African J. Animal Sci.* 43: S54-S59.
- 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 *in vitro* digestion of silage. *J. Sci. Food Agric.* 82: 760-768.
- Wang, Y., McAllister, T., Baah, J., Wilde, R., Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Shelford, J.A., Kamande, G.M., Cheng, K.J., 2003. Effect of tween 80 on *in vitro* fermentation of silages and interactive effects of tween 80, monoensin and exogenous fibrolytic enzymes on growth performance by feedlot cattle. *Asian-Asut. J. Anim. Sci.* 16(7): 968-978.
- 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.
- Wang, Y., Ramirez-Bribiesca, J.E., Yanke, L.J., Tsang, A., McAllister, T.A., 2012. Effect of exogenous fibrolytic enzyme application on the microbial attachment and digestion of barley straw *in vitro*. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 25: 66-74.
- Ware, R.A., Torrentera, N., Zinn, R.A., 2005a. Influence of maceration and fibrolytic enzymes on the feeding value of rice straw. *J. Anim. and Vet. Advances* 4(3): 387-392.

- Ware, R.A., Calderón, J.F., Corona, L., Zinn, R.A., 2005b. Case study: Comparative feeding value of rice straw in growing-finishing diets for Calf-Fed Holstein steers: Fibrolytic enzyme supplementation. *The Professional Anim. Scientist* 21: 416-419.
- Xu, C., Wang, H., Yang, F., Yu, Z., 2011. Effect of an inoculant and enzymes on fermentation quality and nutritive value of erect milkvetch (*Astragalus adsurgens* Pall.) silages. *J. Anim. and Feed Sci.* 20: 449-460.
- Yang, H.E., Son, Y.S., Beauchemin, K.A., 2011. Effects of exogenous enzymes on ruminal fermentation and degradability of alfalfa hay and rice straw. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24(1): 56-64.
- Yu, P., McKinnon, J., Christensen, D.A., 2005. Improving the nutritional value of oat hulls for ruminant animals with pretreatment of a multienzyme cocktail: *in vitro* studies. *J. Anim. Sci.* 83: 1133-1141.
- Zhao, S., Zhao, J., Bu, D., Sun, P., Wang, J., Dong, Z., 2014. Metabolomics analysis reveals effect roughage types on rumen microbial metabolic profile in dairy cows. *Letters in App Microbiol.* 59(1): 79-85.

Table 1. The effects of EFE on digestibility, fermentation patterns, and animal productive behavior.

Variable		Significantly different means		No significantly different means
		Positive	Negative	Σ Positive and Negative
Digestibility of cell wall contents				
DMD	N	130	20	87
	Improvement (%)	10.98	-2.86	2.24
OMD	N	24	2	29
	Improvement (%)	10.72	-0.31	-2
NDFD	N	80	20	88
	Improvement (%)	15.19	-3.69	2.8
ADFD	N	115	8	0
	Improvement (%)	19.86	-6.04	
Animal performance				
Crude milk protein	N	9	2	3
	Improvement (%)	5.4	0.9	-2
Fat milk	N	2	2	14
	Improvement (%)	25.02	-7.22	0.38
Milk production	N	7	0	13
	Improvement (%)	12.92		2.2
DMI	N	13	6	40
	Improvement (%)	11.8	-6	1.96
ADG	N	13		13
	Improvement (%)	21.7		0
Fermentation patterns				
GP	N	57	11	35
	Improvement (%)	27.37	-26.48	4
VFA	N	49	7	63
	Improvement (%)	33.18	-44.18	3.06
pH	N	5	5	40
	Improvement (%)	1.96	-1.5	-2
N-ammonia	N	16	13	56
	Improvement (%)	13.78	-2.03	2.49
A:P Ratio	N	17	23	38
	Improvement (%)	23.1	-8.8	0
Propionic acid	N	36	14	48
	Improvement (%)	19.84	-15.67	-5

N, number of experimental means; EFE, exogenous fibrolytic enzymes; OMD, organic matter digestibility; DMD, dry matter digestibility; NDFD, neutral detergent fiber digestibility; ADFD, acid detergent fiber digestibility; ADG, average daily gain; GP, gas production; VFA, volatile fatty acids; A:P, acetate:propionate ratio; DMI, dry matter intake.

Table 2. Effect of using exogenous fibrolytic enzymes (EFE) in diets with high and low forage on animal productive behavior.

Variable	Control	EFE Treatments				VC (%)	R ²	SE	P-value						Covariate		
	Forage: concentrate ratios				EFE				TP	F:C ratio	EFE*TP	EFE*F:C	TP*F:C	EFE*TP*F:C	BW	DM	
	< 50%	≥50%	< 50%	≥50%													
Dairy cows:																	
BW (kg)	543.85	621.7	548.8	612.94													
BW SD (kg)	±31.15	±41.85	±26.5	±47.45													
Days in milk production (d)	98.69	72.17	98.69	83.38													
Days in milk production SS (d)	±15.4	±40.35	±15.4	±41.95													
Crude milk protein (g/d)	924.57	1007.5	881.28	1106.94	6.72	0.97	56.9	0.0001	0.0005	0.0001	0.31	0.06	0.0001	0.19	0.0001	0.9	
Milk fat (g/d)	1136.6	1179.6	1101.16	1262.59	6.63	0.98	67.7	0.0004	0.015	0.023	0.33	0.18	0.0001	0.73	0.0001	0.53	
Milk production (kg/d)	28.37	32.97	28.08	34.93	4.23	0.99	1.16	0.0001	0.0001	0.0001	0.15	0.06	0.0001	0.24	0.013	0.12	
Dry matter intake (kg/d)	20.31	21.82	20.13	21.17	2.96	0.99	0.09	0.0034	0.0001	0.0001	0.98	0.8	0.0001	0.04	0.0001	0.2	
Average daily gain (g/d)	0.48	1.12	-0.47	1.52	38.4	0.8	1.45	0.3	0.16	0.0001	0.53	0.15	0.06	0.31	0.11	0	
ISDMD (g/kg)	712.39	512.32	729.39	573.21	11.8	0.92	15.57	0.0003		0.0001		0.7					
Beef cattle:																	
BW (kg)	324.08	219.75	305.17	233.32													
BW SD (kg)	±81.9	±124.8	±63.8	±112.9													
Dry matter intake (kg/d)	8.26	8.25	8.13	9.4	6.6	0.84	0.72	0.54		0.0009		0.03			0.0001		
Average daily gain (g/d)	1542.9	1124	1573.33	1128	5.32	0.95	135.8	0.05		0.0001		0.01			0.0001		
Feed conversion (DMI/ADG)	5.84	10.1	5.64	10.51	15.3	0.94	1.17	0.3		0.0001		0.02			0.0001		
Sheep:																	
BW (kg)	24.84	36.12	24.585	32.54													
BW SD (kg)	±7.1	±15.95	±7.6	±14.15													
Dry matter intake (g/d)	1450.3	920.92	1533.86	971.25	14.1	0.83	284	0.77	0.0001	0.05	0.94	0.84	0.06	0.143	0.061		
Average daily gain (g/d)	280.34	178.96	302.58	185.58	13.22	0.98	47.6	0.185	0.0001	0.01	0.28	0.67	0.8	0.34	0.0006		
Feed conversion (DMI/ADG)	6.2	7.49	6.375	6.85	39	0.87	4.61	0.73	0.02	0.01	0.73	0.63	0.22	0.83	0.0001		
DMD (g/kg)	694.8	644.74	692.5	558.2	1.98	0.99	40.8	0.002	0.0001	0.0001	0.69	0.146	0.813	0.33	0.005		

EFE, exogenous fibrolytic enzymes; TP, type of plant; F:C, forage to concentrate; BW, body weight; DMI, dry matter intake; ADG, average daily gain; VC, variation coefficient; ; SD, standard deviation; R², determination coefficient.

Table 3. Effects of fibrolytic enzyme type in animal productive behavior.

Variable	Primary enzymatic activity (EFE)						P-value	
	Cel	Cel:Xyl	Xyl	Control	R ²	CV (%)	SE	EFE
F: C ratio ≥50%. Legume-based diets								
<i>Dairy cows:</i>								
Milk production (kg/d)		41.57	37.95	39.33	0.82	5.3	0.92	0.005
Milk fat (g/d)		1500	1272.57	1381.81	0.79	6.1	36.08	0.003
Crude milk protein (g/d)		1278.72	1111.22	1196.55	0.86	6.91	38.07	0.018
DM intake (kg/d)		28.18	24.09	26.35	0.75	6.5	0.26	0.143
F: C ratio < 50%. Grass-based diets								
<i>Beef cattle:</i>								
Average daily gain (g/d)		1617.8	1554.6	1503.7	0.9	3.7	36.5	0.003
Feed conversion (DM intake/ADG)		5.5	5.9	6.4	0.7	11.8	0.34	0.018
DM intake (g/kg)		8.1	8.3	8.5	0.56	4.5	0.15	0.016
<i>Sheep:</i>								
Average daily gain (g/d)	212.8		183.8	198.1	0.61	11	23.5	0.096
Feed conversion (DM intake/ADG)	5.4		6	5.2	0.66	13.9	0.12	0.02
DM intake (g/d)	1082		926	933	0.19	15.9	148.3	0.744
F: C ratio ≥50%. Grass-based diets								
<i>Dairy cows:</i>								
Milk production (kg/d)			30.26	27.18	0.33	8.4	0.9	0.007
Milk fat (g/d)			1133.3	1024.3	0.51	10.3	38.48	0.09
Crude milk protein (g/d)			1013.05	883.72	0.43	10.9	36.03	0.02
DM intake (kg/d)			17.78	18.64	0.32	26.3	1.31	0.66

EFE, exogenous fibrolytic enzymes; Cel, cellulase; Xyl, xylanase; DM, dry matter; F:C, forage to concentrate; VC, variation coefficient; SE, standard error; R², determination coefficient.

Table 4. Effect of fibrolytic enzyme type on *in vitro* and *in situ* digestibility in diets containing more than 49.9% of forage and consisting primarily of legumes.

Variable	Primary enzymatic activity (EFE)					
	Cel	Cel:Xyl	Xyl	Control		
F: C ratio ≥50%. Legume-based diets						
Dairy cows:						
IVDMD (g/kg DM)	533.3	474.38	460.39	459.52		
IVNDFD (g/kg DM)	305.59	280.78	334.43	346.63		
IVADFD (g/kg DM)	188.96	271.48	290.09	287.33		
ISDMD (g/kg DM)						
ISNDFD (g/kg DM)						
Beef cattle:						
IVDMD (g/kg DM)	653.93	344.08	472.35	473.91		
IVNDFD (g/kg DM)	239.74	319.53	406.95	255.11		
Sheep:						
IVDMD (g/kg DM)	603.25	579.67	547.28	500.15		
IVNDFD (g/kg DM)	455.75	480.08	385.66	414.34		
IVADFD (g/kg DM)	378.5	408.52	278.49	312.98		
ISDMD (g/kg DM)	695.1	699.1	714.8	689.8		
NDF ISD (g/kg DM)	505	657	497.6	502.8		
P-value						
	VC (%)	R ²	SE	EFE	TR	EFE*TR
IVDMD (g/kg DM)	8.5	0.98	58.48	0.0001	0.3	0.72
IVNDFD (g/kg DM)	25.4	0.97	198.39	0.17	0.21	0.6
IVADFD (g/kg DM)	29.4	0.99	143.8	0.68	0.01	0.89
ISDMD (g/kg DM)	1.95	0.99	11.21	0.0005		
ISNDFD (g/kg DM)	4.23	0.99	32.04	0.008		

EFE, exogenous fibrolytic enzymes; Cel, cellulases; Xyl, xylanase; F:C, forage to concentrate; IVDMD, *in vitro* dry matter digestibility; IVNDFD, *in vitro* neutral detergent fiber digestibility; IVADFD, *in vitro* acid detergent fiber digestibility; ISDMD, *in situ* dry matter digestibility; ISNDFD, *in situ* neutral detergent fiber digestibility; TR, type of ruminant; VC, variation coefficient; SE, standard error; R², determination coefficient.

Table 5. Effect of fibrolytic enzyme type on *in vitro* and *in situ* digestibility in diets containing more than 49.9% forage, primarily grasses.

Variable	Primary enzymatic activity (EFE)			Control		
	Cel	Cel:Xyl	Xyl			
F: C ratio ≥50%. Grass-based diets						
Dairy cows:						
IVDMD (g/kg DM)	484.66	306.33	470.16	435.92		
IVNDFD (g/kg DM)	249.62	267.67	342.09	363.28		
IVADFD (g/kg DM)	151.86		306.92	290.13		
ISDMD (g/kg DM)			547.23	550.27		
VFA (mM/100 mM)	99.83		112.02	115.52		
A:P ratio (<i>in vitro</i>)	1.93		1.97	1.94		
Beef cattle:						
IVDMD (g/kg DM)	592.33	359.08	508.09	503.46		
IVNDFD (g/kg DM)	336.7	372.57	267.93	463.62		
IVADFD (g/kg DM)	107.5	53	120.43	135.88		
ISDMD (g/kg DM)			714	640.98		
ISNDFD (g/kg DM)			583.8	565.3		
VFA (mM/100 mM)	119		78.63	109.77		
Sheep:						
IVDMD (g/kg DM)	594.8	572	522.27	491.33		
IVNDFD (g/kg DM)	425.4	486.26	419.18	403.18		
IVADFD (g/kg DM)	346.4	415.05	280.57	328.21		
ISDMD (g/kg DM)			612.51	596.88		
ISNDFD (g/kg DM)			619.4	604.41		
VFA (mM/100 mM)	36.29		44.11	42.71		
A:P ratio (<i>in vitro</i>)	2.63		2.38	2.47		
P-value						
	VC (%)	R ²	SE	EFE	TR	EFE*TR
IVDMD (g/kg DM)	5.9	0.99	23.83	0.0001	0.0001	0.19
IVNDFD (g/kg DM)	8.8	0.99	39.98	0.0001	0.0001	0.07
IVADFD (g/kg DM)	8.3	0.99	21.35	0.0001	0.0001	0.05
ISDMD (g/kg DM)	6.9	0.95	19.29	0.51	0.0001	0.44
ISNDFD (g/kg DM)	16.4	0.88	39.9	0.25	0.008	0.5
VFA (mM/100 mM)	6.14	0.99	5.37	0.0001	0.0001	0.0001
A:P ratio (<i>in vitro</i>)	6.08	0.98	0.17	0.29	0.0001	0.1

EFE, exogenous fibrolytic enzymes; Cel, cellulases; Xyl, xylanase; F:C, forage to concentrate; IVDMD, *in vitro* dry matter digestibility; IVNDFD, *in vitro* neutral detergent fiber digestibility; IVADFD, *in vitro* acid detergent fiber digestibility; ISDMD, *in situ* dry matter digestibility; ISNDFD, *in situ* neutral detergent fiber digestibility; VFA, volatile fat acids, A:P ratio, acetate: propionate ratio, TR, type of ruminant; VC, variation coefficient; SE, standard error; R², determination coefficient.

Table 6. Effect of using fibrolytic enzymes and time of application (pre-treatment) on digestibility variables (*in vitro*, *in situ*, and *in vivo*).

Variable	Primary enzymatic activity (EFE)				VC (%)	R ²	SE	<i>P</i> -value		
	Cel		Xyl							
	Pre-treatment (Pret)									
	0 h	1 h	0 h	1 h						
F:C ratio ≥50%. Legumes-based diets										
	Improvement (%)									
DMD	6.2	4	3	-1.9	5.7	0.99	0.06	0.0001	0.0001	0.34
NDFD	36.17	36.05	36.14	36.16	0.28	0.99	0.194	0.0001	0.0001	0.172
F:C ratio ≥50%. Grass-based diets										
	Improvement (%)									
DMD	4.1	10.3	3.4	8.9	5.7	0.93	0.129	0.54	0.0001	0.43
NDFD	6.5	13.9	4.2	6.3	10.8	0.68	0.197	0.08	0.07	0.12
ADFD	9.8	23.9	3.6	6.1	22	0.6	0.39	0.08	0.07	0.77

EFE, exogenous fibrolytic enzymes; Cel, cellulases; Xyl, xylanases; DMD, dry matter digestibility; NDFD, neutral detergent fiber digestibility; ADFD, acid detergent fiber digestibility; F:C, forage to concentrate; Pret, pre-treatment; VC, variation coefficient; SE, standard error; R², determination coefficient.

8. Appendix

Table A. List of authors and experiments cited in the analysis of Tables 1 and 5.

Variables	N	Reference list of Tables 1 and 6
DMD	246	Hirstov et al., 2000; McAllister et al., 2000; Pinos-Rodriguez et al., 2001; Bowman et al., 2002; Pinos-Rodriguez et al., 2002; Sutton et al., 2002;
OMD	57	Wang et al., 2002; Cano et al., 2003; Colombatto et al., 2003; Hong et al., 2003; Titi, 2003; Wang et al., 2003; Wang et al., 2004; Bahh et al., 2005;
NDFD	192	Grazin, 2005; Reboucas et al., 2005; Ware et al., 2005a; Yu et al., 2005; Colombatto et al., 2006; De Souza et al., 2006; De Souza et al., 2006; Eun et al., 2006; Assoumaya et al., 2007; Avellaneda-Cevallos et al., 2007; Balci et al., 2007; Cruywagen and Zyl, 2007; Elwakeel et al., 2007; Eun et al., 2006b; Eun and Beauchemin, 2007a; Giraldo et al., 2007a; Giraldo et al., 2007b; Giraldo et al., 2007c; Giraldo et al., 2007d; Guerra et al., 2007; Knowlton et al., 2007; Muwalla et al., 2007; Pinos-Rodriguez et al., 2007;
ADFD	148	De Souza et al., 2008; Dean et al., 2008; Eun and Beauchemin, 2008a; Flores et al., 2008; Franco et al., 2008; Giraldo et al., 2008a; Giraldo et al., 2008b;
Gras production	106	Hirstov et al., 2008; Hwang et al., 2008; Jililvand et al., 2008; Kozelov et al., 2008; Krueger and Adesogan, 2008; Miller et al., 2008a; Miller et al., 2008b;
FVA	120	Miller et al., 2008c; Ranilla et al., 2008; Srinivas et al., 2008; Tang et al., 2008; Álvarez et al., 2009; Avellaneda-Cevallos et al., 2009; Bala et al., 2009;
pH	60	Bilik and Lopuszanska, 2009; Gado et al., 2009; Márquez et al., 2009; Moharrery et al., 2009; Almaraz et al., 2010; Carreón et al., 2010; Gallardo et al., 2010; Malik and Bandla, 2010; Shekar et al., 2010; Arriola et al., 2011;
N-ammonia	89	Awawadeh and Obeidat, 2011; Bassiouni et al., 2011; Boonthep et al., 2011; Gado et al., 2011; Gómez-Vázquez et al., 2011a; Gómez-Vázquez et al., 2011b; Holtshausen et al., 2011; Kalkan and Filya, 2011; Lopuszanska and Bilik, 2011; Tirado-Estrada et al., 2011; Xu et al., 2011; Yang et al., 2011;
A:P ratio	80	Chung et al., 2012; Dehghani et al., 2012; Facchini et al., 2012; Salem et al., 2012; Wang et al., 2012
Propionic acid proportion	101	
Milk production	24	
Crude milk protein	28	
Fat milk	20	
DMI	64	
ADG	30	

N, number of experimental means; OMD, organic matter digestibility; DMD, dry matter digestibility; NDFD, neutral detergent fiber digestibility; ADFD, acid detergent fiber digestibility;; ADG, average daily gain; GP, gas production; VFA, volatile fatty acids; A:P, acetate:propionate ratio; DMI, dry matter intake.

Table B. List of authors and experiments cited in the analysis of Table 2.

Variables	N	References list of Table 2
<i>Dairy Cows:</i>		
BW (kg)	52	
Days in milk production (d)	52	
Milk production (kg/d)	52	Sutton et al., 2002; Titi, 2003; Grazin, 2005; Elwakeel et al., 2007; Knowlton et al., 2007; Miller et al., 2008c; Bilik and Lopuszanska, 2009; Arriola et al., 2011; Lopuszanska and Bilik, 2011; Holtshausen et al., 2011; Chung et al., 2012
Fat milk (g/d)	49	
Crude milk protein (g/d)	49	
Dry matter intake (kg/d)	52	
Average daily gain (g/d)	52	
IS DMD (g/kg DM)	46	Hirstov et al., 2000; Bahh et al., 2005; Dean et al., 2008; Bassiouni et al., 2011; Holtshausen et al., 2011
<i>Beef Cattle:</i>		
BW (kg)	45	
Dry matter intake (kg/d)	45	Wang et al., 2004; Ware et al., 2005a; Ware et al., 2005b; Balci et al., 2007; Moharrery et al., 2009
Average daily gain (g/d)	45	
Feed conversion	45	
<i>Sheep:</i>		
BW (kg)	45	McAllister et al., 2000; Pinos-Rodriguez et al., 2002; Muwalla et al., 2007; Assoumaya et al., 2007; Cruywagen and Zyl, 2007; Miller et al., 2008b; Almaraz et al., 2010; Gado et al., 2011; Tirado-Estrada et al., 2011; Awawadeh and Obeidat, 2011; Salem et al., 2012
Dry matter intake (g/d)	45	
Average daily gain (g/d)	33	McAllister et al., 2000; Muwalla et al., 2007; Cruywagen and Zyl, 2007; Miller et al., 2008b; Almaraz et al., 2010; Gado et al., 2011; Tirado-Estrada et al., 2011; Awawadeh and Obeidat, 2011
Feed conversion	33	
DMD (g/kg DM)	35	McAllister et al., 2000; Pinos-Rodriguez et al., 2002; Muwalla et al., 2007; Assoumaya et al., 2007; Miller et al., 2008b; Tirado-Estrada et al., 2011; Awawadeh and Obeidat, 2011; Salem et al., 2012

N, number of experimental means; TP, type of plant; F:C, forage to concentrate; BW, body weight; DMI, dry matter intake; ADG, average daily gain.

Table C. List of authors and experiments cited in the analysis of Table 2.

Variables	N	References list of Tables 3, 4 and 5
F:C ratio > 49.9%. Legumes forage based diets		
Dairy Cows:		
Dry matter intake (kg/d)	19	Elwakeel et al., 2007; Arriola et al., 2011; Holtshausen et al., 2011; Chung et al., 2012
Milk production (kg/d)	19	
Fat milk (g/d)	18	
Crude milk protein (g/d)	18	
Average daily gain (g/d)	19	
Dairy cows, Beef cattle and Sheep:		
IVDMD (g/kg DM)	293	Pinos-Rodriguez et al., 2001; Colombatto et al., 2003; Yu et al., 2005; Colombatto et al., 2006; Eun et al., 2006b; Eun and Beauchemin, 2007a; Elwakeel et al., 2007; Kozelov et al., 2008; Srinivas et al., 2008; Márquez et al., 2009; Moharrery et al., 2009; Chaji and Mohammadabadi, 2010; Holtshausen et al., 2011; Yang et al., 2011; Wang et al., 2012
IVNDFD (g/kg DM)	231	Pinos-Rodriguez et al., 2001; Colombatto et al., 2003; Eun et al., 2006b; Eun and Beauchemin, 2007a; Elwakeel et al., 2007; Giraldo et al., 2008b; Kozelov et al., 2008; Márquez et al., 2009; Moharrery et al., 2009; Chaji and Mohammadabadi, 2010; Gómez-Vázquez et al., 2011; Holtshausen et al., 2011; Yang et al., 2011; Wang et al., 2012
IVADFA (g/kg DM)	157	Colombatto et al., 2003; Avellaneda-Cevallos, 2007; Eun and Beauchemin, 2007a; Eun et al., 2007b; Giraldo et al., 2007a, b, c, d; Dean et al., 2008; Eun and Beauchemin, 2008a; Giraldo et al., 2008b; Ranilla et al., 2008; Eun et al., 2009; Chaji and Mohammadabadi, 2010; Holtshausen et al., 2011
ISDMD (g/kg DM)	25	McAllister et al., 2000; Pinos-Rodriguez et al., 2002; Pinos-Rodriguez et al., 2007; Jililvand et al., 2008; Gallardo et al., 2010
F:C < 50%. Grasses forage based diets		
Beef cattle and Sheep:		
Dry matter intake (g/d)	38	Wang et al., 2003; Ware et al., 2005b; Muwalla et al., 2007; Miller et al., 2008b; Almaraz et al., 2010; Salem et al., 2012
Average daily gain (g/d)	37	
Feed conversion	37	
F:C > 49.9%. Grasses forage based diets		

Beef cattle and Sheep:

Dry matter intake (g/d)	28	Pinos-Rodriguez et al., 2002; Ware et al., 2005a; Assoumaya et al., 2007; Balci et al., 2007; Cruywagen and Zyl, 2007; Gado et al., 2011; Gómez-Vázquez et al., 2011a; Awawadeh and Obeidat, 2011; Tirado-Estrada et al., 2011
Average daily gain (g/d)	22	Ware et al., 2005a; Balci et al., 2007; Cruywagen and Zyl, 2007; Gado et al., 2011; Gómez-Vázquez et al., 2011a; Tirado-Estrada et al., 2011
Feed conversion	22	

Dairy Cows:

Dry matter intake (g/d)	22	
Average daily gain (g/d)	22	
Milk production (kg/d)	22	Titli, 2003; Miller et al., 2008c; Bilik and Lopuszanska, 2009; Lopuszanska and Bilik, 2011
Fat milk (g/d)	19	
Crude milk protein (g/d)	19	

Dairy cows, Beef cattle and Sheep:

ISDMD (g/kg DM)	71	Pinos-Rodriguez et al., 2002; Wang et al., 2004; Bahh et al., 2005; Assoumaya et al., 2007; Giraldo et al., 2008a; Jililvand et al., 2008; Dean et al., 2008; Franco et al., 2008; De Souza et al., 2008; Álvarez et al., 2009; Avellaneda-Cevallos et al., 2009; Gallardo et al., 2010; Bassiouni et al., 2011; Holtshausen et al., 2011
IVDMD (g/kg DM)	200	Bowman et al., 2002; Colombatto et al., 2003a; Yu et al., 2005; Colombatto et al., 2006; Avellaneda-Cevallos et al., 2007; Giraldo et al., 2007b; Giraldo et al., 2007c; Giraldo et al., 2007d; Dean et al., 2008; Giraldo et al., 2008b; Eun and Beauchemin, 2008a; Hwang et al., 2008; Srinivas et al., 2008; Ranilla et al., 2008; Gallardo et al., 2010; Malik and Bandla, 2010; Yang et al., 2011; Facchini et al., 2012; Wang et al., 2012
IVNDFD (g/kg DM)	157	Bowman et al., 2002; Colombatto et al., 2003a; Avellaneda-Cevallos et al., 2007; Giraldo et al., 2007b, c, d; Dean et al., 2008; Eun and Beauchemin, 2008a; Giraldo et al., 2008b; Ranilla et al., 2008; Gallardo et al., 2010; Wang et al., 2012
FVA <i>in vitro</i> (mM)	104	Wang et al., 2002; Wang et al., 2004; Avellaneda-Cevallos et al., 2007; Giraldo et al., 2007a, b, c, d; Eun and Beauchemin, 2008a; Giraldo et al., 2008b; Hwang et al., 2008; Ranilla et al., 2008; Malik and Bandla, 2010; Yang et al., 2011; Facchini et al., 2012
A: P ratio	68	Wang et al., 2002; Giraldo et al., 2007c, d; Eun and Beauchemin, 2008a; Giraldo et al., 2008b; Hwang et al., 2008; Ranilla et al., 2008; Yang et al., 2011; Facchini et al., 2012

N, number of experimental means; TP, type of plant; F:C, forage to concentrate; BW, body weight; DMI, dry matter intake; ADG, average daily gain; IVDMD, *in vitro* dry matter digestibility; IVNDFD, *in vitro* neutral detergent fiber digestibility; IVADFD, *in vitro* acid detergent fiber digestibility; ISDMD, *in situ* dry matter digestibility; ISNDFD, *in situ* neutral detergent fiber digestibility.

**Production of cellulases and xylanases by white-rot fungi cultured in corn stover media
for ruminant feed applications**

Deli Nazmín Tirado-González^a, Luis Alberto Miranda-Romero^a, Gustavo Tirado-Estrada G^b, Pedro Arturo Martínez-Hernández^a, Fidel Guevara-Lara^c, Juan Jáuregui-Rincón^{c*}

^a*Posgrado en Producción Animal, Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. km 38.5, Carretera México-Texcoco, Chapingo, México, CP 56230*

^b*Posgrado en Biotecnología Agropecuaria, Dirección general de Investigación y Posgrado, Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes. Km 18.5 Carretera Aguascalientes-S.L.P., El Llano, Aguascalientes. CP 20330*

^c*Departamento de Ciencias Básicas, Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad 940, Cd. Universitaria, Aguascalientes, Aguascalientes. CP 20131*

The present study was performed at Universidad Autónoma de Aguascalientes, Basic Sciences Department.

*Corresponding author: Juan Jáuregui Rincón (Ph.D.); e-mail: jjureg@correo.uaa.mx; tel: +52 4495540662, Fax: +52 4499108401.

Abbreviations: ADF, acid detergent fiber; ADL, acid detergent lignin; CSH, corn stover hybrid; NDF, neutral detergent fiber

Abstract

The aim of this study was to investigate the relationship between corn stover hybrid fiber proportions in white-rot fungus culture media and radial growth rate, adaptation, and cellulase and xylanase enzyme activities. Growth rate and fungal aggressiveness were measured in *Phanerochaete chrysosporium*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes zonatus*, and *Trametes trogii* in solid culture media with corn stover hybrid (subtropical and High Valleys germplasm). Endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase, and xylanase activities were assayed at 39°C, pH 6.0, reflecting the average temperature and pH in ruminants, in enzyme extracts of *S. pulverulentum*, *B. adusta*, and *T. trogii* in liquid culture media with H324 and AS951. The enzyme activities in enzyme extracts of *B. adusta* and *T. trogii* in culture medium with neutral detergent fiber, acid detergent fiber, and acid detergent lignin fractions were also analyzed. H324, AS822, and AS951 tended to have more neutral detergent fiber than other corn stover hybrids: AS951 had more cellulose, AS822 more hemicellulose, and H324 more acidic detergent lignins. Although *P. chrysosporium* and *S. pulverulentum* had the highest growth rate in AS822, H324, and G766 culture medium, *B. adusta* and *T. trogii* were more aggressive. Growth rate was not clearly related to fungal adaptation or enzyme activity. *B. adusta* enzyme extracts showed the highest endoglucanase activity, *T. trogii* the highest xylanase activity, and *S. pulverulentum* the highest β -glucosidase activity. Increasing the lignin proportion in the culture medium (H324 and ADL) improved endoglucanase and xylanase peaks and the endoglucanase:xylanase ratio. The fungus and culture medium composition could promote specific enzyme activity proportions in enzyme extract products for improving neutral detergent fiber degradability under certain ruminal environment conditions.

Key words: corn stover hybrid, fibrolytic enzyme, neutral detergent fiber degradability, ruminant, white-rot fungi

1. Introduction

Cell walls are primarily composed of cellulose and hemicellulose, whose potential energy sources are limited not only by the β -1, 4 bonds linking the monomers to form polymers, but also because of the lignin that restricts the degradation of the other cellular polysaccharides. During maturation of the leaves and stems in plants, lignin strengthens cell walls by cross-linking polysaccharides, thereby providing structural resistance to enzymatic attack (via the phenylpropanoid pathway) (Grabber, 2005; Hatfield and Fukushima, 2005). This process involves the formation of strong, barely hydrolyzable cross-links between ferulate and *p*-cumarate, with arabinoxylan, and lignin (Jung and Engels, 2002; Jung and Casler, 2006a; Jung and Casler, 2006b).

White-rot fungi produce cellulases (endo- β -glucanases, exo- β -glucanases, cellobiohydrolases, and β -glucosidases) and xylanases (arabinofurosidases, acetyl-xylan esterases, glucuronidases, β -xylosidases, and endo- β -xylanases) to access and utilize the energy from cellulose and hemicellulose in lignocellulosic substrates for their adaptation, growth, and fructification (Obodai et al., 2003). The media and culture period affect the growth environment, thereby affecting the proportion and diversity of fungal enzymes (Galhaup et al. 2002; Xiao et al., 2006; Kumar and Wyman, 2009). Gene expression in fungi is modulated by the presence of various sugars and oligosaccharides, the amount of nitrogen compounds (Silva et al. 2004), ions (Galhaup et al. 2002; Xiao et al., 2006), and the solid or liquid state of the culture media (Cohen et al., 2002).

Fungal extracellular enzyme isoforms also differ in their domains, the temperature and pH ranges in which they are stable, the affinity of their active sites, their isoelectric points,

molecular weights, spectral characteristics, and sugar content (Farrell et al., 1989; Glumoff et al., 1990; Galhaup et al., 2002; Xiao et al., 2006; Zhou et al., 2007). These factors affect their ability to remain active after being secreted outside the cell and to be used in different industrial processes (Moriya et al., 2003; Mikán and Castellanos, 2004; Cheng et al., 2005). Cellulases and xylanases have been studied in animal feedstuffs since 1980, with the objective of increasing the degradability of cell walls (neutral detergent fiber; NDF) and the digestible energy of diets (Bhat, 2000). In ruminants, enzymes of *Cellulomonas flavigena*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trametes versicolor*, and *Fomes fomentarius* can improve the NDF digestibility of feedstuff (Torres et al., 2013; Díaz et al., 2015), which is associated with increased fat-corrected milk production and dry matter intake (Oba and Allen, 2003; Jung et al., 2004; Oba and Allen 2005). Using enzymes in forage-based diets could also decrease the production costs, without compromising the productive performance of the ruminants (Oba and Allen, 2000a; Oba and Allen, 2000b; Torres et al. 2013).

Some effects related to the use of enzymes in ruminants are inconsistent, mainly because of the handling and dose of enzymatic products, the ingredients of the ruminant diet, the time point at which the exogenous enzymes are administered, and the methods used for administering the enzymes (Beauchemin et al., 2003). Increasing the consistency of results also requires products that contain defined forms of the enzymes for improving fiber degradation and that combine appropriate proportions of different enzymatic activities (Yu et al., 2005; Eun and Beauchemin, 2007b; Eun et al. 2007a). The optimal conditions for the activity of these enzymes may also be different from that expected; for ruminant feed applications, the temperature and pH used in assays should be 39°C and between 5.8 and 6.8, respectively, similar to the ruminal conditions

(Colombatto and Beauchemin, 2003). The aim of this study was to establish the relationship between the fiber proportions in different corn stover hybrids present in culture media for white-rot fungi and radial growth rate, adaptation, and cellulase and xylanase enzyme activities, which may potentially be useful with respect to supplements for ruminant diets.

2. Materials and Methods

2.1 Biological material

2.1.1 Corn stover hybrids. Culture media were prepared with extracts of the corn stover hybrids AS951, AS498, and AS822 (subtropical germplasm) and G766, H324, and Rio Grande (High Valleys germplasm), cultivated by the Forestry, Agricultural, and Livestock Research Mexican Institute (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP).

2.1.2 Bromatological analysis of corn stover hybrids. After harvesting (170 d), samples of corn stover hybrids were dried in a forced air oven at 60°C until they reached a constant weight (dry matter: DM). The corn stover hybrid samples were ground in a Thomas-Wiley Mill 4 (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ), with a 1-mm sieve. The NDF, acidic detergent fiber (ADF), and acidic detergent lignin (ADL) fractions were analyzed according to Van Soest (1982), and the analysis was performed using the reagents and filter bags of the Ankom filter bag system (Ankom, Technol. Corp., EUA). Hemicellulose (Hem) and cellulose (Cel) percentages were calculated by subtracting the ADF from the NDF, and LDA from ADF

percentages; total ashes (Ashes) were obtained in a muffle (FELISA, Fabricantes Feligneo S.A. de C.V., Jalisco, México) on calcining of the samples by treatment at 520°C for 4 h.

2.1.3 Fungal strains. *Bjerkandera adusta* (UAMH 8258), *Pleurotus ostreatus* (UAMH 8258), *Phanerochaete chrysosporium* (UAMH 3642), *Sporotrichum pulverulentum* (UAMH 340), *Trametes trogii* (UAMH 8156), and *Trametes zonatus* (UAMH 8158) were obtained from the Microfungus Collection and Herbarium of the University of Alberta, Edmonton, Canada. Strains were grown for 7 d in potato-dextrose agar (PDA, pH 4.5) and stored at 4°C until required for use.

2.2 Fungal radial growth rate and adaptability

Radial growth rate, fully invaded petri dishes, and contamination by bacterial growth were measured for *B. adusta*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *S. pulverulentum*, *Trametes trogii*, and *Trametes zonatus* cultures. Corn stover hybrids were used as the carbon source in solid culture media (2% wt/vol) dissolved in potassium phosphate buffer (pH 6.0, 60 mM). The media also contained bacteriological agar (15 g/L), 125 mL/L of mineral solution (16 g/L KH₂PO₄, 4 g/L Na₂SO₄, 8 g/L KCl, 2 g/L MgSO₄·7 H₂O, 1 g/L CaCl₂·2 H₂O), 8 mL/L of trace mineral solution (30 mg/L H₃BO₃, 70 mg MnCl₂, 200 mg/L ZnCl₂, 20 mg/L Na₂MoO₄·2 H₂O, 50 mg/L FeCl₃, 200 mg/L CuSO₄·5 H₂O), and Na₂NO₃ (0.15% wt/vol of N). After adjusting the pH to 6.0, media were sterilized by autoclaving at 1.5 atm (121°C) for 15 min. After the petri dishes were inoculated, they were incubated under constant conditions of temperature (28°C) and darkness. The diameter of growth was measured every 24 h until the fungi completely filled the petri dishes (area = 50.266 cm²), and the invaded area was calculated ($A = \pi \times r^2$). When fungal invasion formed an oval shape, the area was calculated measuring the

larger and the smaller growth radius, using the formula $A = \pi \times r_1 \times r_2$. Growth rate was adjusted to the linear trend, and R^2 and slope data were analyzed.

2.3 Enzyme production

Enzymatic extracts were obtained according to the method described by Rodriguez *et al.* (1999). *S. pulverulentum*, *B. adusta*, and *Trametes trogii* mycelium disks (1 cm²) were excised from PDA plates and used to inoculate 125-mL flasks containing 50 mL of sterilized glucose–malt–yeast media (GMYP, pH 4.5). The culture medium contained, per liter: 10 g of glucose, 2 g of yeast extract, 3.5 g of malt extract, 2 g of KH₂PO₄, 0.5 g/L of MnSO₄·7H₂O, and 1 mL of trace elements (0.14 mg/L ZnSO₄·7H₂O, 0.29 mg/L CoCl₂·6H₂O, 0.5 mg/L FeSO₄·7H₂O). After 6 d of incubation in shaking flasks at 28°C, cultures were used for generating culture media, as described below.

2.3.1 Fungal cultures in H324 or AS951 media. Drained biomass of *S. pulverulentum*, *B. adusta*, and *Trametes trogii* fungal growth obtained from GMYP liquid media was inoculated into sterile liquid culture media containing a corn stover hybrid (H324 or AS951; 2% wt/vol), as the only carbon source, dissolved in phosphate buffer (50 mM, pH 6.0).

2.3.2 Fungal cultures in NDF, ADF, and ADL media. Drained biomass of *B. adusta* and *Trametes trogii* from liquid GMYP cultures was used to inoculate sterile culture media containing a fraction of corn stover hybrids (NDF, ADF, or LDA) as only carbon source (2% wt/vol), dissolved in phosphate buffer (50 mM, pH 6.0). The H324, AS951, NDF, ADF, and ADL media also contained 125 mL/L of mineral solution (16 g/L KH₂PO₄, 4 g/L Na₂SO₄, 8 g/L KCl, 2 g/L MgSO₄·7 H₂O, 1 g/L CaCl₂·2 H₂O), 8 mL/L of trace mineral solution (30 mg/L H₃BO₃, 70 mg

MnCl₂, 200 mg/L ZnCl₂, 20 mg/L Na₂MoO₄·2 H₂O, 50 mg/L FeCl₃, 200 mg/L CuSO₄·5 H₂O), and Na₂NO₃ (0.15% wt/vol of N). In these experiments, cultures were incubated under constant shaking (4 rpm), temperature (28°C), and darkness conditions.

2.4 Enzyme activity assays

2.4.1 Enzyme extracts. Under sterile conditions, 2 mL of homogeneous samples was collected from cultures incubated for 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 19, and 23 d in H324 and AS951 media, and for 1, 3, 5, 8, 11, 15, and 17 d in NDF, ADF, and ADL media. Samples were transferred into Eppendorf tubes and were centrifuged at $1016 \times g$ at 4°C for 20 min, after which the supernatants were recovered.

2.4.2 Analysis of enzymatic activities. Colombatto and Beauchemin (2003) proposed a standard methodology for determining enzymatic activities in enzyme additives for ruminant feed applications, considering the ruminal temperature (39°C) and pH conditions (6.0). For assaying the activities of exoglucanases (exo-[1-4]- β -D-glucanase and cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91), endoglucanases (endo-[1-4]- β -D-glucanase, EC 3.2.1.4), and xylanases (endo-1,4- β -xylanohydrolase or D-xylanase, EC 3.2.1.8), 100 μ L of citrate–phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0) and 200 μ L of substrate (microcrystalline cellulose [Sigma–Aldrich, St Louis, MO], medium viscosity carboxymethyl cellulose [CMC], or birchwood xylan [Roth 750], respectively) dissolved in distilled water (1% wt/vol) were mixed in test tubes and pre-incubated for 15 min at 39°C in a water bath for equilibration. Then, 100 μ L of enzyme extract was added, and the solutions were mixed gently using a vortex mixer. Incubation was allowed to continue for 120 min for exoglucanases, 10 min for endoglucanases, and 5 min for xylanases at 39°C in a water bath. Enzymatic activities were determined by measuring the reducing sugars released

during incubation; to this end, 600 μL of dinitrosalicylic acid (DNS) reagent was added to the reaction volume. The test tubes were then placed in a boiling bath for exactly 5 min before being cooled in icy water. The absorbance of the samples was then read at 540 nm using a spectrophotometer (UV-Visible Spectrophotometer, EVOLUTION 201; Thermo Scientific; Waltham, MA).

2.4.3 β -glucosidase enzyme activities. β -glucosidases (cellobiases, EC 3.2.1.21) were analyzed using 400 μL of p-nitrophenyl- β D-glucopyranoside (Sigma–Aldrich) as substrate (1 mM dissolved in citrate–phosphate buffer, 0.1 M, pH 6.0); these samples were incubated at 39°C in a water bath for equilibration. Then, 100 μL of enzyme extract was added to the substrate and the samples were vortexed. The mixtures were incubated at 39°C for 25 min. The reaction was terminated by adding 500 μL of glycine buffer (0.4 M, pH 10.8), after which the absorbance was read at 412 nm using a spectrophotometer.

Tubes containing substrate only (no enzyme) and enzyme only (no substrate) were also included to correct for substrate autolysis or the background of reducing sugars in the enzyme samples. The units of enzymatic activities were defined as micromoles of glucose, xylose, or p-nitrophenol released in volume reaction per milliliter of enzyme extract per minute ($\mu\text{mol/mL EE/min}$).

2.5 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SAS (SAS, 2013). Variables were analyzed using ANOVA (GLM procedure). Experiments were carried out in completely randomized statistical designs and factorial arrangements, according to models 1 and 2 (see below), considering six

replicates for analyzing the variables in fully invaded petri dishes and experiments on contamination by bacterial growth, and four replicates for analyses of radial growth rate, enzymatic activities, and reducing sugars in cultures. Correct standard errors were obtained from adjusted means (LsMeans/pdiff) using the MIXED procedure (SAS, 2013). For comparison of media, minimum significant differences were calculated through the number of error degrees of freedom, *p*-value data, and corrected standard errors.

2.5.1 Fungal radial growth rate and aggressiveness

$$Y = \mu + F_i + CSH_j + (F*CSH)_{ij} + E_{ijk} \quad (\text{Model 1})$$

where *Y* is the response variable (linear trend in the fungal radial growth rate, in fully invaded and contaminated petri dishes); μ is the general mean; F_i is the effect of the i^{th} fungus; CSH_j is the effect of the j^{th} corn stover hybrid in culture media; $(F*CSH)_{ij}$ is the interaction between the i^{th} fungus and the j^{th} corn stover hybrid in culture media; and E_{ijk} is the experimental error.

2.5.2 Enzymatic activities and reducing sugars in cultures

$$Y = \mu + F_i + CSH_j + T_k + (F*CSH)_{ij} + (F*T)_{ik} + (CSH*T)_{jk} + (F*CSH*T)_{ijk} + E_{ijkl} \quad (\text{Model 2})$$

where *Y* is the response variable (enzymatic activities and reducing sugars released in cultures); μ is the general mean; F_i is the effect of the i^{th} fungus; CSH_j is the effect of the j^{th} corn stover hybrid in culture media; T_k is the effect of the k^{th} sampling time; $(F*CSH)_{ij}$ is the interaction between the i^{th} fungus and the j^{th} corn stover hybrid in culture media; $(F*T)_{ik}$ is the interaction between the i^{th} fungus and the k^{th} sampling time; $(CSH*T)_{jk}$ is the interaction between the j^{th}

corn stover hybrid in culture media and the k^{th} sampling time; $(F*CSH*T)_{ijk}$ is the interaction between the i^{th} fungus and the j^{th} corn stover hybrid in culture medium by the k^{th} sampling time; and E_{ijkl} is the experimental error.

Reducing sugars in culture media were related to enzymatic activities using multiple linear regression (REG procedure); final regression models were obtained by forward selection ($P < 0.15$). Mallow's C_p and adjusted R^2 statistic were used as the criteria for selecting models.

3. Results

3.1 Bromatological composition of corn stover hybrids

Table 1 shows the bromatological composition of corn stover hybrids used for the preparation of culture media. The proportion of cell walls (NDF) tended to be different among corn stover hybrids ($P = 0.09$). The varieties H324, AS822, and AS951 formed a subgroup with an average that was 3.6 NDF units more than the average of AS948, G766, and Rio Grande corn stover. AS951 not only had an average of 5.1 more FDA (cellulose, lignin, silicates, and tannins) units ($P < 0.0001$), but also, on average, had more cellulose (4 units; $P < 0.0001$), and tended to have less hemicellulose (3 units; $P = 0.085$) than the average means of H324 and AS822. Within this subgroup, AS822 and H324 tended to have more hemicellulose, while H324 had more lignin (1 unit; $P < 0.0001$) than other corn stover hybrids.

Moreover, the corn stover hybrids AS948, G766, and Rio Grande tended to have a lower average NDF proportion. Although the average AS948 and G766 hemicellulose proportions were higher than that of Rio Grande mean values (by 3.6 units), G766 had a lower lignin proportion than Rio Grande (by 1.3 units). There were no differences in NDF, ADF, and cellulose among the corn stover hybrids of this subgroup.

3.2 Fungal radial growth rate and adaptability to culture media

In Table 2, we show the slopes of the radial growth rate curves after adjustment in linear regressions. The radial growth rates showed that there were three difference fungal subgroups: 1) *Phanerochaete chrysosporium* and *S. pulverulentum*, with an average radial growth rate of 10.5 cm²/d; 2) *Pleurotus ostreatus* and *B. adusta*, with an average growth rate of 6.6 cm²/d; and 3) *Trametes trogii* and *Trametes zonatus*, with an average growth rate of 5.3 cm²/d. The average radial growth rate among the fungi cultured in AS822 media differed from those of fungi cultured in AS948 (13.8 cm²/d vs. 12.7 cm²/d; $P < 0.0001$). Even though *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, and *Trametes zonatus* grew radially at a faster rate, these cultures showed more contamination by other microorganisms than did *S. pulverulentum*, *B. adusta*, and *Trametes trogii* (8.3%, 13.9%, and 16.7% vs. 5.6%, 5.6%, and 2.8%, respectively, $P < 0.0001$). *Trametes zonatus* had the lowest number of completely invaded petri dishes (100% vs. 88.9%; $P < 0.05$).

There was a statistical interaction between the type of fungus and the composition of the culture media for the growth rate ($P = 0.046$): culture media containing AS822, H324, and G766

promoted the fastest growth of *Phanerochaete chrysosporium* and *S. pulverulentum*, but these media negatively affected the growth rates of other fungi. Even though *Phanerochaete chrysosporium* showed the fastest growth in H324 culture media and *S. pulverulentum* did so in AS822, H324, and G766 culture media, *B. adusta* and *Pleurotus ostreatus* presented the lowest growth rate in media containing H324 and AS822. Furthermore, *Trametes zonatus* had the lowest growth rate in media with H324 and G766, but the growth rate of *Trametes trogii* was not affected by the type of culture media.

3.3 Enzymatic activity assays

As shown in Figures 1 and 2, *Sporotrichum pulverulentum*, *B. adusta*, and *Trametes trogii* showed higher endoglucanase, exoglucanase, and xylanase enzymatic activities in media containing H324 than in media containing AS951 (4.1 vs. 3.5 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$; 172.2 vs. 81.2 $\text{nmol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$; and 13.9 vs. 14.6 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectively). Cultures grown in AS951 media part also demonstrated higher β -glucosidase enzyme activities than those grown in H324 media (269.9 vs. 240.1 $\text{nmol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$; $P < 0.0001$).

3.3.1 Endoglucanases. There were two similar peaks of enzymatic activities. On days 5 and 7, the average endoglucanase activity was 5.2 $\mu\text{mol glucose mL}^{-1} \text{min}^{-1}$; at 19 d, the enzyme activity was 5.45 $\mu\text{mol glucose/mL EE/min}$ (Figure 1a). *B. adusta* grown in H324 media demonstrated the maximum endoglucanase activity at 15 and 19 d (8.3 and 8.8 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectively), which corresponded to 16.6% more activity than that observed at 7 d. In addition, *Trametes trogii* grown in H324 media showed the highest enzymatic activity at 19 d (6.5 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$), which was 121% more than that seen at 9 d. Enzyme extracts from *S. pulverulentum* cultures showed two similar peaks of enzyme activity at 7 and at 23 d (6.6 and

6.9 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectively; $P < 0.0001$). Enzyme extracts of media containing AS951 (Figure 2a) yielded the highest enzyme activities for cultures of *Trametes trogii* and *B. adusta* at 5 and at 7 d (6.3 and 8.2 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectively), while the lowest activity was observed for *S. pulverulentum* cultures (2.2 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$; $P < 0.0001$).

3.3.2 Xylanases. Figure 1b presents the average xylanase activity in media containing H324. *S. pulverulentum* showed the highest average peak of this activity between 15 and 19 d (21.9 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$); enzyme extracts from cultures of *Trametes trogii* had the maximum xylanase activity at 15 d (45.4 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$). Moreover, *B. adusta* also expressed two similar peaks of activity at 15 and at 23 d (25.5 and 24.4 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectively; $P < 0.0001$). As shown in Figure 2b, in media containing AS951, the highest xylanase activity was observed in *S. pulverulentum* cultures at 5 d (10.05 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$), in *Trametes trogii* cultures at 9 and 23 d (25.3 and 25.1 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectively), and in *B. adusta* cultures at 15 and 23 d (17.7 and 19.3 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectively; $P < 0.0001$).

3.3.3 Exoglucanases. Exoglucanases showed the lowest activities of all the enzymes (Figures 1c and 2c). *Trametes trogii* showed an exoglucanase activity peak in H324 medium at 7 d (1001.6 $\text{nmol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$), as well as in AS951 medium at 12 d (848.4 $\text{nmol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$). This was followed by *B. adusta* cultures at 19 d in H324 medium (271.5 $\text{nmol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$), and at 12 d in AS951 medium (360.1 $\text{nmol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$). *S. pulverulentum* cultures had the lowest average exoglucanase activity in both H324 and AS951 media (71.9 and 31.6 $\text{nmol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectively; $P < 0.0001$).

3.3.4 β -glucosidases. Although the average β -glucosidase activity was higher in enzymatic extracts from media containing H324 than from media containing AS951 (Figures

1d and 2d), *S. pulverulentum* cultures had the highest β -glucosidase activity peak at 7 d in H324 media ($338.5 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$), while that in AS951 media at this time point was $575 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ($P < 0.0001$). In media containing H324, *B. adusta* cultures had enzyme activity peaks at 7 d ($172.3 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$), while this enzyme activity for *Trametes trogii* cultures peaked at 5 d and 19 d (186.1 and $164.0 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively). The minimum β -glucosidase activity was seen for cultures of both *Bjerkandera adusta* and *Trametes trogii* in media containing AS951 (75.0 and $75.2 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively; $P < 0.0001$).

3.4 Effect of culture medium composition on enzymatic activities

Including NDF, ADF, or ADL fractions of corn stover hybrids in media affected the enzymatic activities (Figure 3). *Trametes trogii* showed more endoglucanase, xylanase, and β -glucosidase activity than did *B. adusta* in these culture media (1.4 vs. $0.8 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$; 4.2 vs. $3.4 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$; and 4.2 vs. $3.4 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively; $P < 0.0001$).

Exoglucanase activity was not observed in enzyme extracts from fungal cultures grown in media supplemented with NDF, ADF, and ADL. Enzymatic activities in extracts from NDF and ADF cultures were similar. The average endoglucanase, xylanase, and β -glucosidase activities were higher in enzyme extracts from cultures grown in media supplemented with ADF ($1.7 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $4.0 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, and $25.7 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively) than in media supplemented with ADL ($0.9 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $4.0 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, and $14.7 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively) and in media supplemented with NDF ($0.7 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $3.3 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, and $5.3 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively; $P < 0.05$). However, the highest peaks of enzyme activity were observed in media containing ADL at 10 and 16 d, with an average of $3.9 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $6.5 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, and $46.5 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively ($P < 0.0001$). In media

with NDF and ADF, the highest peaks of endoglucanase and xylanase activity occurred at 3 d ($1.0 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ and $4.8 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectively).

3.5 Effect of culture medium composition on the endoglucanase:xylanase ratio

In order to understand the effect of culture medium composition on the proportion of enzymes, endoglucanase activities were divided by the xylanase activities to yield the endoglucanase:xylanase ratios (Figure 4). These ratios ranged from 0.1:1 to 0.6:1, but the highest ratios were obtained by increasing the amount of lignin in the culture media, as in H324 media, at 5 d (0.55:1; Figure 4a) and in ADL media, at 10 d (0.6:1; Figure 4b; $P < 0.0001$).

In enzyme extracts from cultures grown in media containing NDF and ADF, which included a greater proportion of cellulose than other culture media, the endoglucanase:xylanase ratios were not only similar among the various culture media (Figure 4b), but there were no such activity peaks visible after the third day ($P > 0.05$). Furthermore, enzyme extracts from cultures grown in AS951 media, a primarily cellulosic substrate, did not show statistically significantly different peaks for the endoglucanase:xylanase ratios between 3 and 19 d ($P > 0.05$).

3.6 Multiple linear regression models for reducing sugars released in media and individual enzymatic activities

In Table 3, models from multiple linear regression analysis are presented; the total reducing sugars released in the culture media were correlated with the enzymatic activities in cultures containing H324, AS951, NDF, ADF, and ADL. Regression coefficients were higher in media supplemented with NDF, ADF, and ADL than in culture media containing H324 and AS951,

perhaps because of the complexity of the whole corn stover hybrids compared to the corn stover fiber fractions.

The enzyme extracts from *Trametes trogii* and *B. adusta* cultures grown in both H324 and AS951 media, and in NDF, ADF, and ADL media, showed that the amount of reducing sugars was primarily related to the activities of endoglucanases, β -glucosidases, and exoglucanases (adjusted $r^2 = 0.22$ – 0.39). In culture media supplemented with H324 and AS951, endoglucanase activities were associated with 23% of the reducing sugars in media; adding β -glucosidase activities into the model increased the adjusted r^2 value from 0.23 to 0.29, and adding exoglucanase activities increased the adjusted r^2 further from 0.29 to 0.39. Additionally, media containing NDF, ADF, and ADL fractions also showed that 26% of the reducing sugars in cultures were released by β -glucosidases, but the combined action of β -glucosidases and endoglucanases released 37% of reducing sugars in the culture media. Thus, the linear models reported here showed that xylanases contributed very little, if anything, to the release of reducing sugars.

4. Discussion

4.1 Corn stover hybrids bromatological composition

NDF and ADF reagents allow differentiation of some basic cell structures, as most of the cell wall content consists of NDF, and cellulose, lignin, tannins, and silicates (ADF), according to Van Soest *et al.* (1991). In addition, lignin is an amorphous hydrophobic polymer that is recalcitrant to hydrolysis, which limits the energy that can be obtained from cellulose and

hemicellulose (He et al., 2003). As genetic selection of corn hybrids has been based on nutritional quality characteristics that can increase the digestibility of dry matter and NDF (Shaver, 2006; Stendal et al., 2006; Staton et al., 2007), the degradability of their cell walls varies among maize hybrids. In the present study, the corn stover hybrids AS822, AS948, and AS951 were obtained from subtropical germplasm, but H324, G766, and Rio Grande were obtained from High Valleys germplasm. Previous tests have demonstrated the differences in NDF and ADL for these corn stover hybrids and have also shown how these differences affect production in dairy cows (Peña et al., 2006; Antolin et al. 2009; Dashtban et al., 2010).

4.2 Relationship between radial growth rate and the fungal adaptability and enzyme activities

Although *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, and *Trametes zonatus* had the fastest radial growth rate, these cultures were also more contaminated by other microorganisms or showed fewer completely invaded dishes. Even though *S. pulverulentum* had a greater radial growth rate, it also had lower enzyme activities than *Trametes trogii* and *B. adusta*. Enzyme extracts from *B. adusta* cultures showed more endoglucanase activity, but extracts from *Trametes trogii* cultures showed higher xylanase and β -glucosidase activities. On the other hand, in *Trametes trogii* and *B. adusta*, AS951 media promoted a faster growth rate, while H324 culture media promoted more endoglucanase and xylanase activities.

4.3 Effect of culture media composition on enzyme activities

In this study, we report enzymatic activities assayed at 39°C and pH 6.0; these conditions were chosen so that the potential enzyme activities under temperature and pH characteristic of

ruminal conditions could be assessed, with a view to the development of ruminant feed supplements (Colombatto and Beauchemin, 2003). However, we also supplemented culture media with high fiber substrates to induce the production of the types and proportion of enzymes useful for forage fiber treatment (Eun and Beauchemin, 2007).

The proportion of cellulose and lignin in corn stover hybrids used in the culture media affected the individual enzymatic activities in extracts of *S. pulverulentum*, *Trametes trogii*, and *B. adusta*. Moreover, extracts from fungi in culture media supplemented with a substrate higher in the proportion of lignin (H324 and ADL) promoted endoglucanase and xylanase activities more than when supplements containing a greater proportion of cellulose and hemicellulose (AS951, NDF, and ADF) were used. The adaptive response of fungi to the culture medium conditions could involve modification of gene expression to produce specific enzyme forms and isoforms (Ohen et al., 2002), which depended on the fungal species (Mata and Waliszewski, 2005) and the sampling time (Cavallazzi et al., 2004). Fungal species behave differently because, in addition to the presence of extracellular enzyme-encoding genes, there are strong inducible promoters in each system (March and Zelinger, 2003).

After H_2SO_4 treatment of corn stover hybrids, ADL substrates retained some cellulose and hemicellulose fragments, allowing the fungi to grow, although the expression of endoglucanase and xylanase genes in ADL media could be related to low sugar content (Galhaup et al., 2002; Xiao et al., 2006), and the lignin content in media could induce the expression of genes encoding enzymes responsible for degradation of the lignocellulosic complex (Dashtban et al., 2010).

Moreover, NDF, ADF, and H_2SO_4 reagents produce some ions that could have stimulated laccases and Mn peroxidases, enzymes that increase the access of cellulases and xylanases to

their substrates. Some specific ions and compounds can promote the expression of different isoenzymes during the incubation time for fungal adaptation to culture media (Xiao et al., 2006). Isoenzymes also differ in their isoelectric point, molecular weight, sugar content, spectral characteristics, specificity, and stability, and their N-terminals, and in some cases, they are encoded by different genetic sequences (Farrel et al., 1989; Glumoff et al., 1990; Cohen et al., 2002). These isoenzymes may therefore vary in their affinities for substrates (Wang et al., 2002).

4.4 Enzyme activities and their proportions affect ruminal fiber digestibility

In ruminant feed applications, the use of cellulases and xylanases as supplements can improve the DM and NDF degradability (Wang et al., 2003; Granzin, 2005; Tirado et al., 2011; Kholif and Aziz, 2014). Previous studies have shown a relationship between improvement of NDF digestibility and improved animal performance (Jung et al., 2004; Oba and Allen 2005; Shaver 2006). Oba and Allen (1999; 2000a; 2000b) published regression models, which associated each unit of improvement of NDF degradability with increase in DM intake (0.17 g/d) and fat-corrected milk production (0.25 kg/d). Therefore, use of fibrolytic enzymes as a supplement for ruminants could increase the digestible energy of high fiber and forage-based diets and reduce the amount of feed required per unit of milk or live weight (Meale et al., 2014).

In the present study, the endoglucanase:xylanase ratios varied from 0.15:1 to 0.60:1, but the ratio showed greater peaks in media containing more lignin (H324 or ADL) than in media containing a higher proportion of cellulose or hemicellulose (AS951, NDF, or ADF). According to previous studies, enzymatic products with cellulase:xylanase ratios ranging from 0.01:1 to 0.61:1 increased NDF degradability in assays including ruminal fluid (Eun et al. 2007a). Eun *et*

al. (2007b) observed that the optimum cellulase:xylanase ratio for improving DM digestibility of alfalfa hay and corn silage ranged from 0.25:1 to 0.5:1.

Multienzyme cocktails may work better than extracts of almost pure enzymes (Yu et al., 2005); Eun and Beauchemin (2007) reported that the correct mixture of xylanases and cellulases improves glucose release, first by removing the xylose. During hemicellulose removal, some hemicellulose–cellulose bonds break, increasing the accessibility to cellulose (Grabber et al., 2002). Some studies have tested mixtures of cellulases:xylanases ranging from 0.01:1 to 1.5:1 *in vitro*, in ruminal fluid; thus, it seems that there is a relationship between the activity of certain types of cellulases (endoglucanases, exoglucanases, and β -glucosidases) or the combination of cellulases and xylanases, and the improvement of alfalfa or corn silage NDF degradability (Eun and Beauchemin, 2007; Eun et al., 2007b; Eun and Beauchemin, 2008b). In many cases, the products evaluated for ruminant feed applications do not contain the appropriate mixture of enzymes, decreasing their effect on fiber digestibility. For example, Yang et al. (2011) evaluated 26 enzyme products in alfalfa forage; after the first selection, they chose three products with 0.029:1, 0.135:1, and 0.443:1 endoglucanase:xylanase ratios. They found that a ratio of 0.135:1 increased the *in vitro* (with ruminal fluid) digestibility of NDF and ADF of alfalfa hay, while a ratio of 0.443:1 did not affect the digestibility.

In order to reduce production costs of enzyme extracts, it would be desirable to obtain extracts containing adequate proportions of enzymes to increase NDF degradability, without having to combine extracts from different cultures or incubation times (Morgavi et al., 2000; Fortes et al., 2010). Supplementing culture media that are the same as the substrate requiring treatment by enzyme extracts would furthermore be desirable, in order to obtain products that combine

appropriate proportions of enzyme activities (Eun and Beauchemin, 2007; Eun et al., 2007a; Yang et al., 2011).

Another advantage of considering the ratio of cellulases to xylanases and the stability and structure of the enzymes (Morgavi et al., 2000; Eun and Beauchemin, 2007; Fortes et al., 2010; Yang et al., 2011), instead of the individual activities in a product, is that considering those variables could make it easier to extrapolate laboratory results to the field and facilitate establishment of the correct dose for NDF improvement (Colombatto et al., 2003a; 2003b).

4.5 Regression models of reducing sugars released in culture media

Previous studies suggested that, in both assays with and without ruminal fluid, it is possible that the main limitation for the release of reducing sugars could be the deficiency of cellulase activities; thus, an excess of xylanase activity could adversely affect the ruminal microorganism population (Eun et al. 2007a; 2007b; Eun and Beauchemin, 2008a).

In the present study, linear models showed that, in both types of media, the increment in reducing sugars in the medium mainly correlated with β -glucosidase and endoglucanase activities, but xylanase activities contributed little to the regression coefficient. These results are in agreement with those of Eun and Beauchemin (2008b), who studied more than 80 types of enzymes in ruminal fluid, with the objective of increasing the digestibility of DM and NDF of alfalfa hay and corn silage; they observed that enhancing exoglucanase activities was related to improving corn silage digestibility.

Eun *et al.* (2007b) observed a linear trend between increasing endoglucanase activities and improvement of alfalfa hay and corn silage DM degradability ($r^2 = 0.59$ and 0.60 and $r^2 = 0.62$

and 0.56, respectively). Furthermore, Yu *et al.* (Yu *et al.*, 2005) reported multiple linear models of the effect of 23 enzyme products *in vitro*, with ruminal fluid, on the digestibility of oat hull DM; this model indicated that 55% of the DM digestibility was attributable to the activities of cellulases and β -glucosidases and also showed an $r^2 = 0.74$ for the enzyme activity of xylanases, endoglucanases I, endoglucanases II, ferulic acid esterases, β -glucosidases, and cellulases.

However, Colombatto *et al.* (2003b) used multiple linear regression to show the effect of 22 enzyme products tested in ruminal fluid, at 18 h, on NDF degradability. Xylanase activity was positively correlated with improvement in alfalfa hay NDF degradability, but was negatively correlated with improvement in corn silage NDF degradability. In addition, Eun and Beauchemin (2007) assayed extracts of enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*, *in vitro* (in ruminal fluid), and reported that the proportion of cellulases showed a regression coefficient of 0.26 with the improvement of digestibility of alfalfa NDF, but of 0.72 with the improvement of corn silage NDF digestibility.

5. Conclusions

Corn stover hybrids H324, AS822, and AS951 showed a tendency for greater proportions of cell walls (NDF): AS951 had a higher proportion of cellulose; AS951 had a higher proportion of hemicellulose; and H324 a higher proportion of lignin. Radial growth was not clearly related to fungal adaptation or enzyme production. *Phanerochaete chrysosporium* and *S. pulverulentum* had the highest radial growth in AS822, H324, and G766 culture media. Because of fungal aggressiveness, *B. adusta* and *Trametes troglia* demonstrated a better adaptation capacity. Enzyme extracts from cultures of *B. adusta* showed more endoglucanase activity, *Trametes*

trogii enzyme extracts showed more xylanase and exoglucanase activities, but *S. pulverulentum* had the highest β -glucosidase activity. Increasing the proportion of lignin in the culture media (H324 and ADL) improved endoglucanase and xylanase peaks. However, increasing the proportion of cellulose in the culture media (AS951 and ADF) sometimes improved the average enzymatic activities. In addition, increase in lignin content in the culture media increased the endoglucanase:xylanase ratio, which is associated with enhancing the amount of total reducing sugars released in media. Since all the enzymatic assays were performed at 39°C and pH 6.0, simulating rumen conditions, the results of the present study indicated that *B. adusta* can be used for the extraction of enzymatic extracts that primarily enhance endoglucanase activities, while *Trametes trogii* can be used to enhance xylanase activities, in ruminant feed applications. Moreover, choosing culture media in order to promote high cellulase:xylanase ratios may be useful for increasing the digestibility of NDF in feedstuff under some temperature and pH conditions of the ruminal environment.

6. Acknowledgments

The present study was designed and directed by Luis Alberto Miranda Romero, Ph.D., and Juan Jáuregui Rincón, Ph.D., and supervised by Gustavo Tirado Estrada, Ph.D., who were closely involved in the collection, analysis, interpretation of data, writing and in the decision to submit the present article for publication. We are grateful for the reagents, supplies and the biological materials provided by the Universidad Autónoma Chapingo, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes, and INIFAP. The funding sources had no role in the design of the study, the collection, analysis, or interpretation of data,

or in the writing of the manuscript and its submission for publication. There are no conflicts of interest to declare.

7. References

- Antolín, D. M., González, M., Goñi, C. S., Domínguez, I. A., Ariciaga, C. 2009. Rendimiento y producción de gas *in vitro* de maíces híbridos conservados por ensilaje o henificado. Tec. Pecu. Méx. 47(4): 413-423.
- 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(2): E37-E47.
- Bhat, M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotech. Adv. 18: 355-383.
- Cavallazzi, P., Almeida M., Megumi, M. 2004. Laccase production by *Lepista sordida*. Brazilian J. Microbiol. 35: 261-253.
- Cheng, Y., Yang, C., Liu, W. 2005. Cloning and expression of *Thermobifida* xylanase gene in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Enzyme and Microbial Tech. 37(5): 541-546.
- Cohen, R., Yarden, O. Yitzhak, H. 2002. Lignocellulose affects Mn^{2+} regulation of peroxidase transcript levels in solid-state cultures of *Pleurotus ostreatus*. App. Env. Microbiol. 68(6): 3156-3158.
- Colombatto, D., Beauchemin, K. A. 2003. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. Can. J. Animal Sci. 83: 559-568.
- Colombatto, D., Mould, F. L., Bhatt, M. K., Morgavi, D. P., Beauchemin, K. A., 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(4): 1040-1050.

- Colombatto, D., Morgavi, D. P., Furtado, A. F., Beauchemin, K. A. 2003b. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: Relationship between biochemical characteristics and *in vitro* ruminal degradation. J. Anim. Sci. 81(10): 2628-2638.
- Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T. A., Qin, W. 2010. Review article: fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. Int. J. Biochem. Mol. Biol. 1(1): 36-50.
- Díaz, A., Ranilla, M. J., Giraldo, L. A., Tejido, M. L., Carro, M. D. 2014. Treatment of tropical forages with exogenous fibrolytic enzymes: effects on chemical composition and *in vitro* rumen fermentation. J. of Animal Physiology and Animal Nut. 99(2): 345-355.
- Eun, J. S., Beauchemin, K. A. 2007. Use *in vitro* degradation of alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. J. Dairy Sci. 90: 2839- 2851.
- Eun, J. S., Beauchemin, K. A., Schluzer, H. 2007a. Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance *in vitro* fermentation of alfalfa hay and corn silage. J. Dairy Sci. 90: 1440-1451.
- Eun, J. S., Beauchemin, K. A., Schluzer, H. 2007b. Use of an *in vitro* fermentation bioassay to evaluate improvements in degradation of alfalfa hay due to exogenous feed enzymes. Anim. Feed Sci. Tech. 135: 315-328.
- Eun, J. S., Beauchemin, K. A. 2008a. Assessment of the potential of feed enzyme additives to enhance utilization of corn silage fibre by ruminants. Can. J. Anim. Sci. 88: 97-106.
- Eun, J. S., Beauchemin, K. A. 2008b. Relationship between enzymic activities and *in vitro* degradation of alfalfa hay and corn silage. Anim. Feed Sci. Tech. 145: 53-67.
- Farrell, R. L., Murtagh, K., Tien, M., Mozuch, M., Kirk, T. 1989. Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. Enzyme and Microbial Tech. 11(6): 322-328.
- Fortes, G. L. M., Alves, O. R., Silva, B. E. P. 2010. Cellulases, xylanases, β -glucosidases and ferulic acid esterases produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. Biochemical Eng. J. 51: 72-78.

- Grabber, J. H., Ralph, J., Hatfield, R.D. 2002. Model studies of ferulate-coniferyl alcohol cross-product formation in primary maize walls: implications for lignification in grasses. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6008–6016.
- Grabber, H. 2005. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Sci.* 45: 820-831.
- Granzin, B. C. 2005. Effects of a fibrolytic enzyme supplement on the performance of Holstein Friesian cows grazing kikuyu. *Tropical Grasslands* 39: 112-116.
- Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C. K., Strauss, J., Haltrich, D. 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* 147(7): 2159-2169.
- Glumoff, T., Harvey, P. J., Molinari, S., Globe, M., Frank, G., Palmer, J. M., Smit, J. D. G., Leisola, M. S. A. 1990. Lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Molecular and kinetic characterization of isoenzymes. *Eur. J. Biochem.* 187: 515-520.
- Hatfield, R., Fukushima, R. S. 2005. Can lignin be accurately measured? *Crop Sci.* 45: 832-839.
- He, X., Hall, M. B., Gallo-Meagher, M., Smith, R. L. 2003. Improvement of forage quality by downregulation of maize *O*-methyltransferase. *Crop Sci.* 43: 2240-2251.
- Jung, H. G., Engels, F. M. 2002. Alfalfa stem tissues: cell wall deposition, composition, and degradability. *Crop Sci.* 42: 524-534.
- Jung, H. G., Raeth-Knight, M., Linn, J. G. 2004. Forage fiber digestibility: measurement, variability, and impact. P. 105-125 in *Proc. 65th Minnesota Nutr. Conf.*, St. Paul, MN. Univ. Minnesota, Minneapolis, MN.
- Jung, H., G., Casler, M. D. 2006a. Maize stem tissues: Cell wall concentration and composition during development. *Crop Sci.* 46:1793-1800.
- Jung, H., G., Casler, M. D. 2006b. Maize stem tissues: Impact of development on cell wall degradability. *Crop Sci.* 46:1801-1809.

- Kholif A. M., Aziz, H. A. 2014. Influence of feeding cellulolytic enzymes on performance, digestibility and ruminal fermentation in goats. *Anim. Nutr. Feed Tech.* 14(1): 121-136.
- Kumar, R., Wyman, C. E. 2009. Effects of cellulose and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnol. Prog.* 25(2): 302-314.
- March, R. L., Zelinger, S. 2003. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Microbiology and Biotechnol* 60(5): 515-22.
- Mata, G., Waliszewski, K. N. 2005. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. On coffee pulp and wheat straw: Biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource Technology* 96: 537-544.
- Meale, S. J., Beauchemin, K. A., Hirstov, A. N., Chaves, A. V., McAllister, T. A. 2014. Board-invited-review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve ruminant production. *J. Anim. Sci.* 92(2): 427-442.
- Mikán, J. F., Castellanos, D. E. 2004. Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas. *Revista Colombiana de Biotecnología* 6(1): 58-71.
- Morgavi, D. P., Newbold, C. J., Beever, D. E., Wallace, R. J. 2000. Stability and stabilization of potential feed additive enzymes in rumen fluid. *Enzyme and Microbial Tech.* 26: 171-177.
- 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. Bacteriology* 185(5):1749-1756.
- Oba, M., Allen, M. 1999. Evaluation of the importance of the digestibility of NDF from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82: 589-596

- Oba, M., Allen, M. 2000a. Effects of Brown midrib 3 mutation in corn silage on productivity of dairy cows fed two concentrations of dietary neutral detergent fiber: 1. Feeding behavior and nutrient utilization. *J. Dairy Sci.* 83: 1333-1341.
- Oba, M., Allen, M. 2000b. Effects of Brown midrib 3 mutation in corn silage on productivity of dairy cows fed two concentrations of dietary neutral detergent fiber: 2. Digestibility and microbial efficiency. *J. Dairy Sci.* 83(6): 1350-1358.
- Oba, M., Allen, M. 2003. Intraruminal infusion of propionate alters feeding behavior and decreases energy intake of lactating dairy cows. *J. Nutr.* 133: 1094-1099.
- Oba, M., Allen, M. 2005. *In vitro* digestibility of forages. Tri-State Dairy Nutrition Conference Pp. 81-91. Dep. Dairy Sci. The Ohio State University, Columbus, Ohio, 43210.
- Obodai, M., Cleland-Okine, J., Vowotor, K. A. 2003. Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-products. *J. Microbiology Biotechnol.* 30: 146-149.
- Peña, R., González, C., Núñez, H., Tovar, G., Preciado, O., Terrón, I., Gómez, M., Ortega, C. 2006. Stability of yield and forage quality of corn hybrids. *Rev. Fitotec. Méx.* 29(Num. esp. 2): 109-114.
- Rodríguez, E., Pickard, M. A., Vázquez-Duhalt, R. 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology* 38: 27-32.
- Statistical Analysis System. 2013. SAS/STAT User's Guide. (Release 9.3). Cary, NC, USA. SAS Inst. Inc.
- Shaver, R. D. 2006. Forage intake, digestion and milk production by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89(Suppl.1): 298(Abstr.).
- Silva, M., Melo I. S., Oliveira, P. R. 2004. Producao de enzimas lignolíticas por fungos isolados de solos sob cultivo de arroz irrigado. *Boletim de Pesquisa Desenvolvimento/EMBRAPA, Jaguariúna.*

- Staton, D. A., Grombacher, W., Pinnisch, R., Mason, H., Spaner, D. 2007. Hybrid and population density affect yield and quality of silage maize in central Alberta. *Can. J. Plant Sci.* 87: 867-871.
- Stendal, C., Casler, M. D., Jung, H. G. 2006. Marker-assisted selection for neutral detergent fiber in smooth bromegrass. *Crop Sci.* 46: 303-311.
- Tirado, E. G., Mendoza, G. D., Pinos, J. M., Quezada, T., Guevara, F. 2011. Effects of two fibrolytic enzyme mixture on growth performance, digestion and ruminal fermentation in lambs fed corn stover based diets. *J. App. Animal Research* 39(2): 158-160.
- Torres, N., Mendoza, G. D., Bárcena, R., Loera, O., González, S., Aranda, E., Hernández, P. A., Crosby, M. 2013. Effects of various fibrolytic enzyme extracts on digestibility and productive performance of lambs fed a forage-based diet. *Animal Nutrition and Feed Tech.* 13: 381-389.
- Van Soest, P. J. 1982. Nutritional ecology of the ruminant. O. and Books Ed. Corvallis OR. 374 p.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583–3597.
- Wang, Y., Vazquez-Duhalt, R., Pickard, M. A. 2002. Purification, Characterization, and Chemical modification of manganese Peroxidase from *Bjerkandera adusta* UAMH 8258. *Current Microbiology* 45: 77-87.
- Wang, Y., McAllister, T., Baah, J., Wilde, R., Beauchemin, K. A., Rode, L. M., Shelford, J. A., Kamande, G. M., Cheng, K. J. 2003. Effect of tween 80 on *in vitro* fermentation of silages and interactive effects of tween 80, monensin and exogenous fibrolytic enzymes on growth performance by feedlot cattle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 16(7): 968-978.
- Xiao, Y. Z., Hong, Y. Z., Li, J. F., Hang, J., Tong, P. G., Fant, W., Zhou, C. Z. 2006. Cloning of novel laccase isoenzyme genes from *Trametes* sp AH28-2 and analyses of their differential expression. *App. Microbiol. Biotechnol.* 71(4): 493-501.

- Yang, H. E., Son, Y. S., Beauchemin, K. A. 2011. Effects of exogenous enzymes on ruminal fermentation and degradability of alfalfa hay and rice straw. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24(1): 56-64.
- Yu, P., McKinnon, J. J., Christensen, D. A. 2005. Improving the nutritional value of oat hulls for ruminant animals with pretreatment of multienzyme cocktail: *In vitro* studies. *J. Anim. Sci.* 83:1133-1141.
- Zhou, X., Smith, J. A., Oi, F. M., Koehler, P. G., Bennett, G. W., Scharf, M. E. 2007. Correlation of cellulase gene expression and cellulolytic activity throughout the gut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Gene* 395(1-2): 29-39.

Table 1. Fiber content of six corn stover hybrids used for fungal growth and enzyme production.

Corn Stover Hybrids	DM	NDF	ADF	Cel	Ash	Hem	ADL
	%	%	%	%	%	%	%
AS822	92.35	70.23	45.06	39.02	1.43	25.17	4.60
AS951	90.81	71.86	50.09	43.03	1.39	21.77	5.67
AS948	90.12	68.26	45.42	38.98	1.57	22.84	4.87
H324	92.05	70.34	45.96	38.59	1.19	24.38	6.18
G766	89.85	66.77	44.27	37.55	1.02	22.50	5.71
Rio Grande	89.38	66.38	47.27	39.03	1.22	19.11	7.01
<i>P-value</i>	0.0001	0.09	0.0001	0.0001	0.346	0.085	0.0001
SE	0.45	2.27	0.92	0.88	0.20	1.953	0.344
MSD	1.29	3.01	2.63	2.52	-	2.59	0.98

*DM: dry matter; NDF: neutral detergent fiber; ADF: acid detergent fiber; Cel: cellulose; Ash: ashes; Hem: hemicellulose; ADL: acid detergent fiber; **% of contents in the dry matter of corn stover hybrids; SE, standard error; MSD, mean significantly difference.

Table 2. Fungal radial growth rate linear trend (cm^2/d) in culture media elaborated with six corn stover hybrids.

Fungi	Corn Stover Hybrids					
	AS822	AS948	AS951	H324	G766	Rio Grande
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	19.14	18.31	17.2	20.81	19.14	19.25
<i>Sporotrichum pulverulentum</i>	21.32	17.83	19.8	20.54	21.32	19.72
<i>Bjerkandera adusta</i>	11.5	10.3	10.87	10.32	11.43	10.93
<i>Pleurotus ostreatus</i>	12.13	11.03	11.92	10.75	11.18	11.29
<i>Trametes zonatus</i>	10.6	9.65	9.91	9.6	9.23	7.44
<i>Trametes trogii</i>	8.4	9.04	9.19	8.51	8.63	8.92
	<i>Source of Variation</i>					
	Fungi (F)		Substrate (CSH)		F*CSH	
<i>P-value</i>	0.016		0.0001		0.046	
SE	0.607					
MSD (P = 0.05)	0.99					

F, fungi; CSH, corn stover hybrid; SE, standard deviation; MSD, mean significantly difference.

Table 3. Multiple linear regression models associating enzymatic activities with the total of reducing sugars released in culture media ($\mu\text{Mol RS/mL EE}$) including the CSH AS951 and H324 and NDF, ADF and ADL fractions of corn stover hybrids.

Reducing sugars released in media with H324 and AS951							
R ² Adjusted	R ²	Independent Variables					
0.3867	0.3970	End	Xyl	Exo	β-Glu		
0.3888	0.3965	End	Exo				
0.2932	0.2991	End	β-Glu				
0.2277	0.2310	End					

Reducing sugars released in culture media = $4.7 - 4.61 \text{ End} + 0.065 \text{ Exo} - 0.03 \beta\text{-Glu}$

$R^2 = 0.397$ Mallow's $C_p = 3.18$

Reducing sugars released in media with NDF, ADF and ADL					
R ² Adjusted	R ²	Independent Variables			
0.3688	0.3806	End	β-Glu		
0.3630	0.3809	End	Xyl	β-Glu	
0.2606	0.2675	β-Glu			

Reducing sugars released in culture media = $0.192 - 0.766 \text{ End} + 0.0804 \beta\text{-Glu}$

$R^2 = 0.38$ Mallow's $C_p = 2.05$

End, endoglucanase; Xyl, xylanase; β -Glu, β -glucosidase; Exo, exoglucanase.

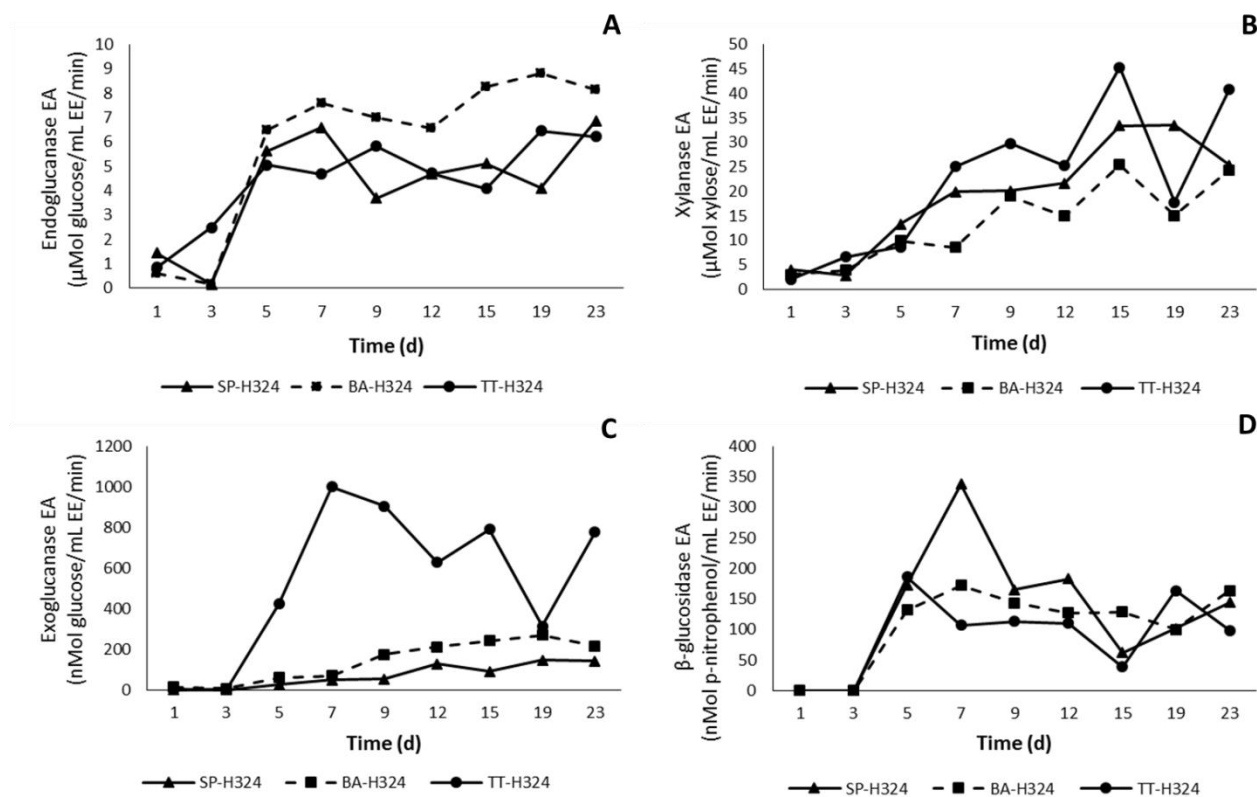


Figure 1. Enzymatic activities of *Sporotrichum pulverulentum* (SP), *Bjerkandera adusta* (BA), and *Trametes trogii* (TT) cultured in media supplemented with corn stover hybrid H324: A) Endoglucanases (SE = 0.325); B) Xylanases (SE = 1.74); C) Exoglucanases (SE = 7.989); and D) β-glucosidases (SE = 20.492).

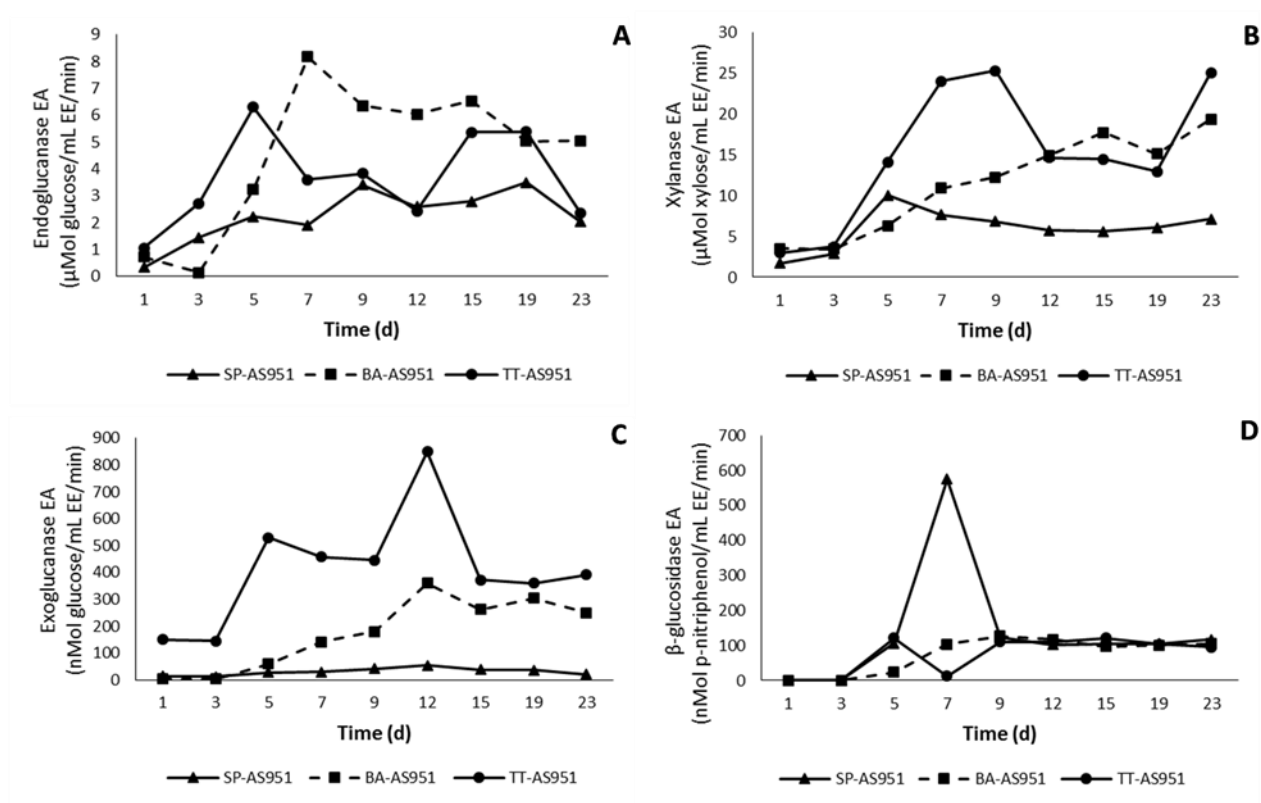


Figure 2. Enzymatic activities of *Sporotrichum pulverulentum* (SP), *Bjerkandera adusta* (BA), and *Trametes trogii* (TT) cultured in media supplemented with CSH AS951: A) Endoglucanases (SE = 0.325); B) Xylanases (SE = 1.74); C) Exoglucanases (SE = 7.989); and D) β -glucosidases (SE = 20.492).

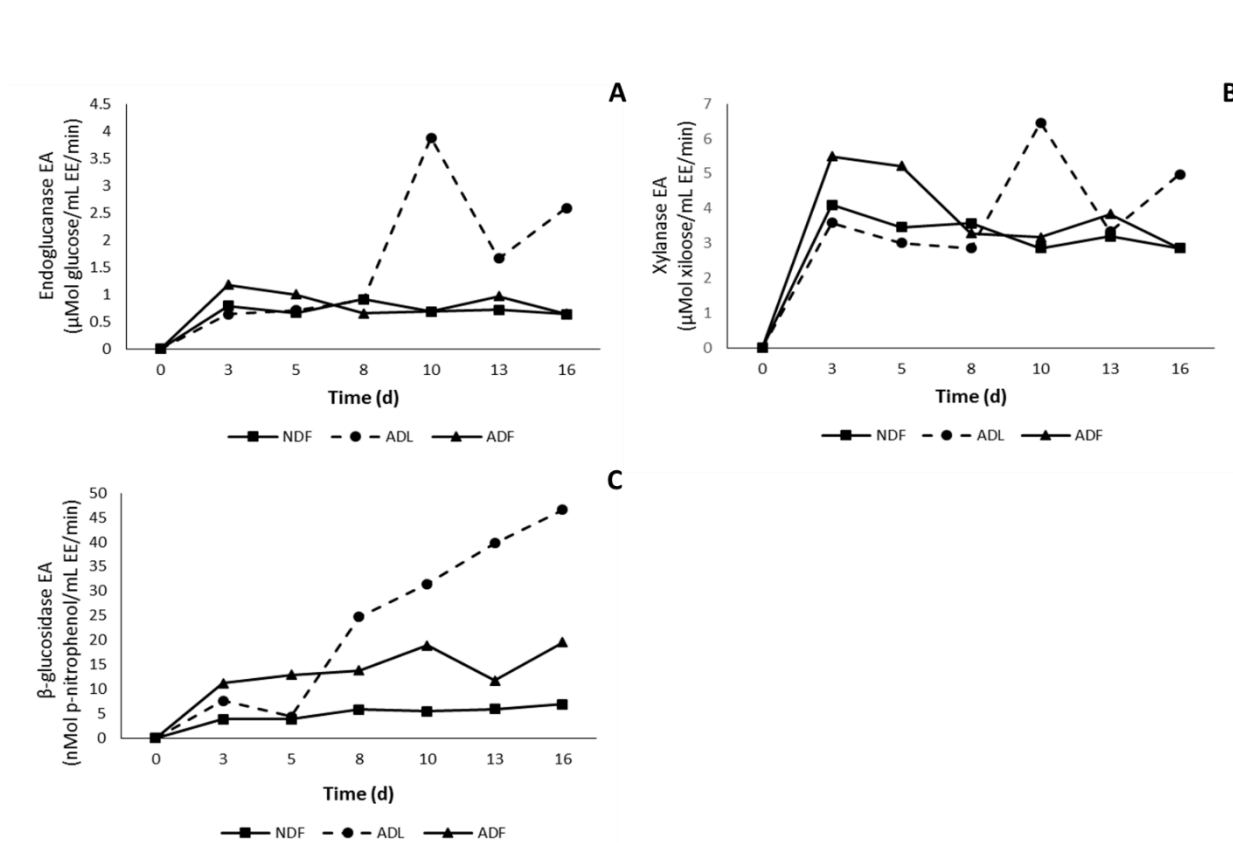


Figure 3. Average of *Bjerkandera adusta* and *Trametes trogii* enzyme activities in extracts from culture media supplemented with fractions of corn stover hybrid neutral detergent fiber, acidic detergent fiber, and acidic detergent lignin: A) Endoglucanases (SE = 0.158); B) Xylanases (SE = 0.288); and C) β -glucosidases (SE = 1.955).

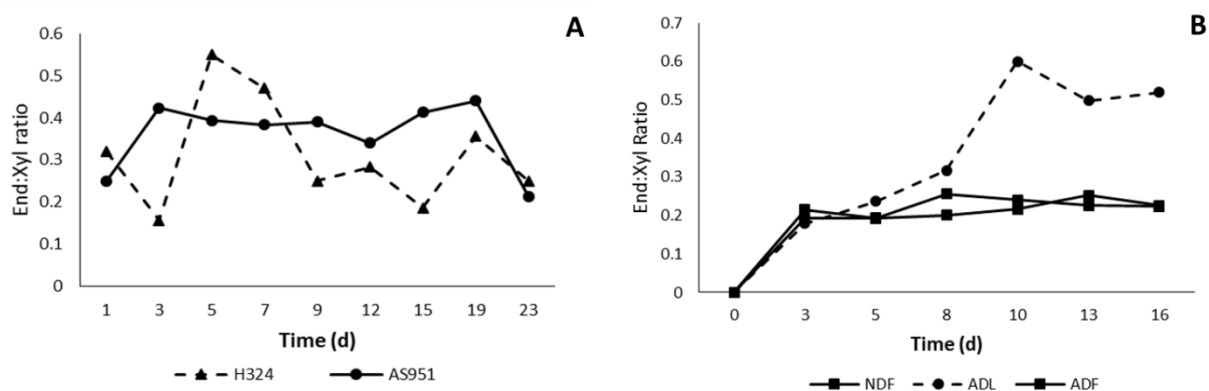


Figure 4. Endoglucanase:xylanase ratios in cultures of A) *Sporotrichum pulverulentum*, *Bjerkandera adusta*, and *Trametes trogii* in media supplemented with corn stover hybrid H324 and AS951 (SE = 0.058); and B) *Bjerkandera adusta* and *Trametes trogii* grown in media supplemented with neutral detergent fiber, acidic detergent lignin, and acidic detergent fiber fractions of corn stover hybrid (SE = 0.031).

Producción de enzimas fibrolíticas y ligninolíticas en cultivos de *Pleurotus ostreatus* en medios líquidos con rastrojo de maíz y fracciones FDN, FDA y LDA

Deli Nazmín Tirado-González^a, Luis Alberto Miranda-Romero^{a*}, Juan Jáuregui-Rincón^c, Pedro Arturo Martínez-Hernández^a, Gustavo Tirado-Estrada^b, Héctor Silos-Espino^b

^a*Posgrado en Producción Animal, Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. km 38.5, Carretera México-Texcoco, Chapingo, México, CP 56230*

^b*Posgrado en Biotecnología Agropecuaria, Dirección General de Investigación y Posgrado, Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes. Km 18.5 Carretera Aguascalientes-S.L.P., El Llano, Aguascalientes. CP 20330*

^c*Departamento de Ciencias Básicas, Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad 940, Cd. Universitaria, Aguascalientes, Aguascalientes. CP 20131*

**Autor de correspondencia: Luis Alberto Miranda Romero, microbiología.pecuaria08@gmail.com.*

Resumen

El objetivo fue relacionar la actividad endoglucanasa, exoglucanasa, xilanasas, β -glucosidasa y lacasa de extractos enzimáticos de *Pleurotus ostreatus* cultivado en medios líquido con rastrojo de maíz (RM) H324 ó AS951, y con fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) o lignina detergente ácido (LDA) de rastrojo de maíz. La actividad endoglucanasas y exoglucanasas fue mayor en medio de cultivo con RM-H324, éste RM tuvo mayor proporción de hemicelulosa y LDA. La mayor actividad xilanasas y β -glucosidasas ocurrieron en el medio de cultivo RM-AS951, el cual contenía mayor proporción de FDA y celulosa. El medio con FDA promovió mayor actividad endoglucanasas, xilanasas y β -glucosidasas. El extracto enzimático con la mayor proporción de actividad endoglucanasas:xilanasas se obtuvo en los medios con RM-H324 y FDA (Rel. End:Xil = 0.6:1). La cantidad de azúcares reductores libres en medio de cultivo de RM-H324 y RM-AS951 se relacionaron 55% (R^2 ajustada) a la actividad endoglucanasas, xilanasas y lacasas, y 53% a la actividad de endoglucanasas, β -glucosidasas, xilanasas y lacasas en el medio con FDN, FDA y LDA. La mejor actividad de lacasa ocurrió en el medio con LDA. La composición del medio de cultivo puede promover proporciones de actividades enzimáticas en los extractos de enzimas que permitan mejorar la digestibilidad de la FDN en ciertas condiciones ambientales similares a las del rumen.

Palabras clave: FDN, FDA y LDA, celulasas, xilanasas y lacasas, híbridos de rastrojo de maíz.

1. Introducción

Las especies del género *Pleurotus* pertenecen al grupo de hongos de tallo blanco responsables de la degradación de lignina, las cuales producen y presentan enzimas lignolíticas tales como lacasas, lignina peroxidasas, manganeso peroxidasas y peroxidasas diversas, muchas de ellas secuenciadas anteriormente (Cohen *et al.*, 2002; Murrieta *et al.*, 2002; Goudopoulou *et al.*, 2010; Téllez-Téllez *et al.*, 2012).

Pleurotus ostreatus es el segundo tipo de setas más cultivado en el mundo, después del champiñón (*Agaricus bisporus*), por su alto valor nutritivo y comercial (Labarere y Bois, 2001; Bermúdez *et al.*, 2003; Soto-Velazco *et al.*, 2005). *P. ostreatus* también es de interés por sus aplicaciones industriales, cosméticas y farmacéuticas (Iriarte, 2003), debido a que produce una amplia gama de enzimas fibrolíticas (celulasas, xilanasas y fenoloxidasas) que digieren los polímeros estructurales de la pared celular vegetal y libera compuestos simples que asimilan para su crecimiento y fructificación (Sánchez *et al.*, 2002; Marquéz *et al.*, 2007; Murrieta *et al.*, 2002). Las especies de *Pleurotus* spp prefieren crecer en sustratos ricos en fibra, lignocelulosa y hemicelulosa (Obodai *et al.*, 2003). Su capacidad de adaptación y degradación de materiales lignocelulósicos ha sido probada con anterioridad (Tribal *et al.*, 2002; Camassola y Dillon, 2009) y se ha investigado su aplicación para mejorar el valor nutritivo de alimentos fibrosos para rumiantes (Tricarico y Dawson, 2005).

El tratamiento directo de las pajas con cultivos de *Pleurotus* sp puede mejorar las proporciones de FDN y FDA (Okano *et al.*, 2006), disminuir la cantidad de nematodos (Labarere y Bois, 2001) y de bacterias lácticas (Ángulo, 2002), y degradar algunos agrotóxicos (Maganotto *et al.*, 2004). Tanto el tratamiento de las pajas con hongos como con extractos enzimáticos de su cultivo, puede

incrementar el valor de los residuos de cosecha (Camassola y Dillon, 2009). En algunas investigaciones se ha intentado establecer la relación entre los componentes químicos de los sustratos del medio de cultivo y la adaptación del hongo *Pleurotus ostreatus* (Sánchez *et al.*, 2002; Tribal *et al.*, 2002; Obodai *et al.*, 2003), así como correlacionar la composición de los sustratos con la actividad enzimática específica mostrada (Camassola y Dillon, 2009; Omoahghe y Mikiashvili, 2009). El objetivo de la presente investigación fue determinar la actividad endoglucanasa, exoglucanasa, xilanasas, β -glucosidasa y lacasa de extractos del cultivo de *Pleurotus ostreatus* en medios de cultivo líquidos con rastrojo de maíz (H324 ó AS951), y medios de cultivo con FDN, FDA y LDA del rastrojo de maíz.

2. Materiales y Métodos

2.1 Material biológico

2.1.1. Rastrojo de maíz. Para la elaboración de los medios de cultivo se obtuvieron muestras de rastrojo de maíz de la variedad AS951 y del híbrido H324 del germoplasma de Valles Altos, los cuales fueron proporcionados por el Campo Experimental INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias), Pabellón, Aguascalientes, México.

2.1.2. Cepas de hongos. Se utilizó la cepa *Pleurotus ostreatus* (UAMH 8258) de la colección de microhongos y herbario de la Universidad de Alberta, Canadá. La cepa fue crecida por 7 días en medios de papa-dextrosa-agar (PDA, pH 4.5) y almacenadas a 4°C para su posterior uso.

2.1.3. Análisis bromatológicos. Se obtuvieron muestras de rastrojo de maíz de las variedades AS951 y H324, de 170 días a la cosecha, las cuales fueron molidas (1 mm) y secadas en estufa a 65 °C por 48 h. Posteriormente se les determinó el contenido de fibra detergente neutro (FDN),

fibra detergente ácido (FDA) y lignina ácido detergente (LDA) (Van Soest *et al.*, 1982). El porcentaje de celulosa y hemicelulosa (HCE) se calculó por diferencia del porcentaje de la fibra detergente neutro, la fibra detergente ácido y lignina.

2.2. Producción de enzimas

Se siguió el procedimiento descrito por Rodríguez *et al.* (1999). Frascos de vidrio con capacidad de 125 mL, los cuales contenían 50 mL de medio glucosa-malta-extracto de levadura (pH 4.5), fueron inoculados con discos de 1cm² de PDA con crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus*, y homogeneizado. Cada litro de medio de cultivo estuvo constituido de: 10 g de glucosa, 2 g de extracto de levadura, 3.5 g de extracto de malta, 2 g de KH₂PO₄, 0.5 g de MnSO₄·7H₂O y 1 mL de solución mineral (0.14 mg/L ZnSO₄·7H₂O, 0.29 mg/L CoCl₂·6H₂O, 0.5 mg/L FeSO₄·7H₂O). Los frascos inoculados se mantuvieron en agitación (4 rpm) a 28°C por 6 días. Los pellets de crecimiento fungal formados y drenados se utilizaron para inocular en una proporción del 2% (p/v) los medios de cultivo de rastrojos de maíz H324 y AS951, y de las fracciones FDN, FDA y LDA de AS951.

Los medios de cultivo con rastrojo de maíz o FDN, FDA o LDA se obtuvieron mezclando en un litro de buffer de fosfatos (50 mM; pH 6.0), 125 mL de solución de macrominerales, 8 mL de solución de minerales traza, Na₂NO₃ (equivalente a 0.15% p/v de N) y 2 % (p/v) de rastrojo de maíz (H324 o AS951) o de FDN, FDA y LDA, molidas (≤ 1 mm). La solución de macrominerales contenía 16 g de KH₂PO₄, 4 g de Na₂SO₄, 8 g de KCl, 2 g de MgSO₄·7 H₂O y 1 g de CaCl₂·2 H₂O, por litro de solución, y la solución de elementos traza tuvo 30 mg de H₃BO₃, 70 mg de MnCl₂, 200 mg de ZnCl₂, 20 mg de Na₂MoO₄·2 H₂O, 50 mg de FeCl₃, y 200 mg de CuSO₄·5 H₂O, por litro de solución. Los medios se esterizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos. Para la elaboración de los

medios de cultivo con FDN, FDA y LDA, primeramente se obtuvieron las fracciones de fibra correspondientes de cada rastrojo de maíz (H324 y AS951) de acuerdo con Van Soest *et al.* (1991), y 2% (p/v).

2.3 Ensayos de actividad enzimática

2.3.1. *Obtención del extracto enzimático (EE)*. En condiciones de esterilidad, se tomaron muestras homogéneas de 2 mL en los días 1, 3, 5, 9, 15, 19 y 23 del cultivo en variedades de rastrojo de maíz y en los días 1, 3, 5, 8, 11, 15 y 17 del cultivo en fracciones FDN, FDA y LDA. Los tubos se centrifugaron a 8500 rpm (1016 xg) por 20 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante.

2.3.2. *Ensayos de actividades enzimáticas (AE)*. Colombatto y Beauchemin (2003) propusieron la metodología para la medición de actividades enzimáticas: Se tomaron 2 mL de EE. La mezcla de reacción para actividad exoglucanasas, endoglucanasas y xilanasas se compuso de 100 µL de amortiguador de citrato-fosfato (0.1 M, pH 6.0), 200 µL de solución (1% p/v) de celulosa microcristalina (Sigma Chemicals Co.), o de carboximetil celulosa de viscosidad media o, de xilano de madera de abedul (Roth 750), y 100 µL de sobrenadante de cada cultivo. Las mezclas de reacción se incubaron en baño maría a 39°C por 120, 15 y 5 min, respectivamente para cada tipo de enzima. Se usaron como blancos de reactivos tubos con extracto enzimático (sin sustrato) y solo sustrato (sin extracto enzimático). Las reacciones se detuvieron al añadir reactivo ácido dinitrosalicílico (DNS) para la estimación de azúcares reductores liberados durante la incubación.

Se determinó la actividad de β -glucosidasa usando como sustrato el reactivo p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (Sigma Chemical Co.) a una concentración 1 mM, disuelto en amortiguador citrato-fosfato (0.1 M, pH 6.0). La mezcla de reacción consistió de 100 µL de sobrenadante del cultivo de *P. ostreatus* y 400 µL de la solución de sustrato, la cual se incubó a 39°C por 25 min. La reacción

se detuvo con la adición de 500 μL de buffer glicina (0.4 M, pH 10.8); las muestras se leyeron a 412 nm en un espectrofotómetro. La unidad de actividad enzimática fue definida como los μmoles de glucosa, xilosa o p-nitrofenol libre por mililitro de sobrenadante por minuto ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

La actividad de lacasa se determinó a temperatura ambiente ($33 \pm 1^\circ\text{C}$), por la oxidación de 2-2'-Azinobis-3-etilbenztiazolina-6-sulfonato (ABTS) a pH 5.0 y $\xi_{420} = 36,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Cavallazzi *et al.*, 2004). El volumen de reacción estuvo constituido por 400 μL de sobrenadante de cultivo de *P. ostreatus*, 500 μL de un buffer de acetato de sodio (pH 5.0, 0.1 M) y 100 μL de ABTS (1mM). La unidad enzimática se definió como UE = la cantidad 1 μmol de ABTS oxidado minuto por mL de EE de cultivo de *P. ostreatus*; la actividad enzimática (AE) se refiere a la cantidad de UE contenidas en un litro de sobrenadante de cultivo de *P. ostreatus*.

2.3.3. Determinación de azúcares reductores. Los azúcares reductores obtenidos de la actividad enzimática y liberados en los medios de cultivo, se determinaron añadiendo 600 μL del reactivo DNS (ácido dinitrosalisílico), los tubos se colocan en baño de agua en ebullición por exactamente 5 min y la reacción se terminó enfriando los tubos en agua 5°C ; la lectura de las absorbancias se realizó en un espectrofotómetro a 540 nm.

2.4 Presencia de inhibidores de endoglucanasas, xilanasas y lacasas en los medios de cultivo

Se determinó el efecto de extractos de RM H324 y AS951 y FDN, FDA y LDA en la actividad Fibrozyme ® (endoglucanasas), Promote ® (xilanasas) y una lacasa comercial. Se obtuvieron extractos de RM (AS951 y H324) y de las fracciones FDN, FDA y LDA (MC) con y sin inocular con el hongo, de manera semejante a la obtención del sobrenadante para actividad enzimática. En los extractos donde se inoculó el hongo, las enzimas fueron inactivadas a 90°C por 15 minutos y se

usó agua destilada como testigo para esta prueba. La actividad enzimática se midió de la forma ya referida y las mezclas de reacción estuvieron constituidos por 100 µL de una solución (0.02%) de Fibrozyme® o Promote®, 100 µL de CMC o xilano, 200 µL del extracto inactivado o del testigo, en uno de ellos, y de 300 µL de una solución (4%) de la lacasa comercial, 300 µL de buffer de acetato de sodio (pH 5.0, 0.1 M), 300 µL de extracto inactivado o del testigo y 100 µL de ABTS (1mM). La actividad enzimática relativa (ARel) se calculó como el porcentaje de actividad observada con respecto al Testigo (ARel= Actividad enzimática del tratamiento/ Actividad enzimática del EE inactivo *100).

2.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue por análisis de varianza (ANOVA) utilizando un diseño completamente al azar y arreglo factorial, de acuerdo al Modelo 1. Se utilizó Proc GLM del paquete estadístico SAS (SAS, 2013). Se consideraron 4 repeticiones. Las medias se compararon determinando la diferencia mínima significativa (DMS) de acuerdo al valor de probabilidad de cada fuente de variación.

2.5.1. Actividades enzimáticas

(Modelo 1)

$$Y = \mu + MC_i + T_j + (MC \cdot T)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde: Y=actividad enzimática de endoglucanasas, exoglucanasas, β-glucosidasas, xilanasas y lacasas; μ= media general; MC_i= efecto del i-ésimo medio de cultivo; T_j= efecto del j-ésimo tiempo de muestreo; (MC*T)_{ij} = interacción entre el i-ésimo medio de cultivo por el j-ésimo tiempo de muestreo; y E_{ijk}= error aleatorio.

Se generaron modelos de regresión lineal múltiple para relacionar la liberación de azúcares reductores (Y) con las diferentes actividades enzimáticas (X_i). Los modelos se generaron con el Procedimiento Reg, utilizando la instrucción Forward del programa estadístico SAS (SAS, 2013). Se consideraron válidos todos aquellos modelos con $P < 0.15$ y valores aceptables en el criterio Cp de Mallows y R^2 ajustada.

3. Resultados

3.1 Composición bromatológica de los rastrojos de maíz H324 y AS951

Las variedades de RM H324 y AS951 tienen un contenido de FDN similar ($P > 0.05$; 70.34% vs. 71.86%), pero RM-AS951 y RM-H324 difieren ($P = 0.0001$) en cuanto al porcentaje de FDA (50.1% vs. 46.0%) y celulosa (43.03% vs. 38.59%). La hemicelulosa y LDA tendió a ser mayor ($P = 0.08$) en el RM-H324 que en el RM-AS951 (24.38% vs. 21.77%, 6.18% vs. 5.67%).

3.2 Actividades de enzimas fibrolíticas

La Figura 1 muestra la actividad endoglucanasa (Fig. 1A), xilanasa (Fig. 1B), exoglucanasa (Fig. 1C) y β -glucosidasas (Fig. 1D) de *Pleurotus ostreatus* en medios de cultivo elaborados con RM-H324 y RM-AS951. La actividad endoglucanasa, xilanasa y β -glucosidasa mostró un pico de mayor actividad a los 15 días de incubación (Figuras 1A, 1B y 1D), mientras que la mayor actividad exoglucanasa ocurrió en RM-H324 a 19 días de incubación (Figura 1C; $P = 0.0001$). La actividad endoglucanasa y exoglucanasa mostró picos más altos en el medio de cultivo con RM-H324 en

comparación con el medio RM-AS951 (Figuras 1A y 1C) ($P = 0.0001$); sin embargo, los máximos de actividad xilanasa y β -glucosidasa fueron más altos en el medio con RM-AS951 (Figuras 1B y 1D) ($P = 0.0001$).

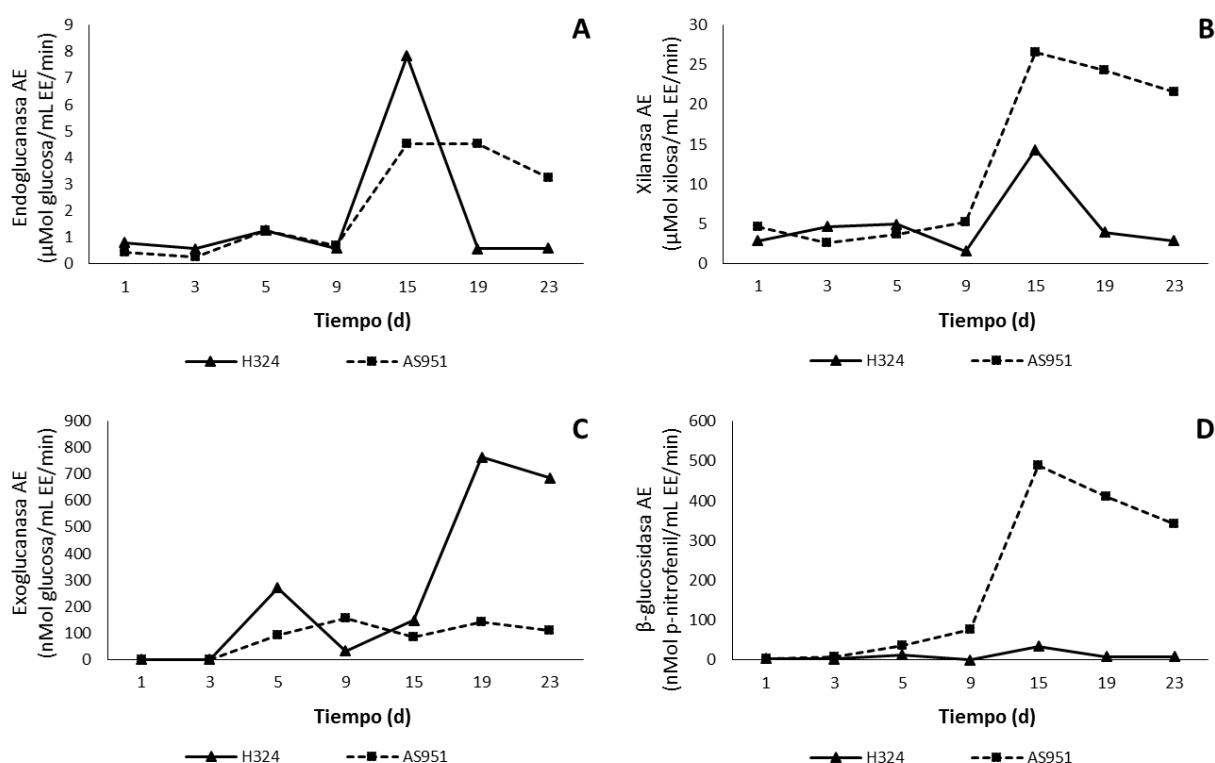


Figura 1. Actividades enzimáticas del hongo *Pleurotus ostreatus* (PO) en medios elaborados con la variedad de rastrojo de maíz H324 y AS951: A) endoglucanasa (Error estándar = 0.123); B) xilanasa (Error estándar = 0.936); C) exoglucanasa (Error estándar = 5.488); D) β -glucosidasa (Error estándar = 17.726).

Respecto a las fracciones de fibra, los picos máximos de actividad endoglucanasa se observaron en el medio de cultivo con FDA, a los 5 y 10 días de incubación (Figura 2A) ($P = 0.0001$). La actividad endoglucanasa no fue diferente ($P > 0.05$) entre medios de cultivo con FDN y con LDA.

Las actividades xilanasa y β -glucosidasa mostraron dos picos de máxima actividad en el medio con FDA a 3 y 13 días, y a 5 y 10 días de incubación, respectivamente (Figuras 1B y 1C) ($P = 0.0001$). Los medios de cultivo con LDA promovieron un pico de máxima actividad β -glucosidasas a los 8 días de incubación (Figura 1C) ($P = 0.0001$). Las tendencias de las actividades endoglucanasas y xilanasas en los medios con FDA contrastan con las actividades en medios con LDA, de manera que la actividad más baja en medio con LDA coinciden con los picos de máxima actividad en medio con FDA, y viceversa. En general, los picos de actividad ocurrieron más pronto en el medio con FDA. Un comportamiento similar se observó con la actividad β -glucosidasa, los picos de máxima actividad en el medio con FDN ocurrieron en el momento en que se observó la menor actividad de ésta misma enzima en los medios con FDA. Esto último pudiera estar relacionado con la remoción de la hemicelulosa en la FDA y esto promovió los picos de actividad β -glucosidasas, endoglucanasas y xilanasas.

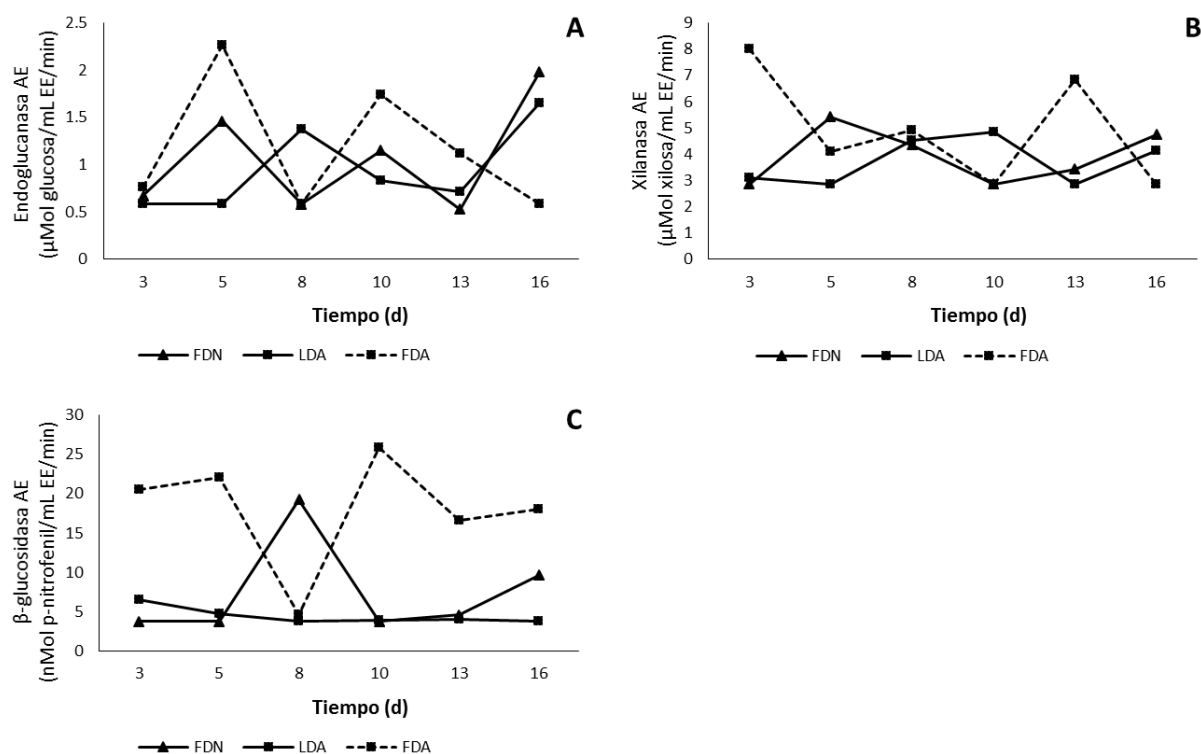


Figura 2. Actividades enzimáticas promedio del hongo *Pleurotus ostreatus* (PO), en medios elaborados con fracciones de rastrojo de maíz FDN, FDA y LDA: A) endoglucanasas (Error estándar = 0.066); B) xilanasas (Error estándar = 0.181); C) β-glucosidasas (Error estándar = 0.741).

3.3 Efecto de la composición del medio de cultivo en la proporción de endoglucanasas: xilanasas

La relación endoglucanasas:xilanasas mayor ocurrió a los 15 días de incubación en el medio con RM-H324, y a 5 y 10 días en el medio con FDA (Figuras 3A y 3B) ($P = 0.0001$). Ésta relación varió de 0.1:1 a 0.6:1, y la máxima relación endoglucanasas:xilanasas se observó a tiempos similares

a los de máxima actividad endoglucanasas, xilanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. La mayor relación endoglucanasas:xilanasas puede estar relacionada principalmente con la proporción de hemicelulosa y lignina en los medios con RM completo, pero la mayor proporción entre estas dos enzimas ocurrió en los medios elaborados con FDA.

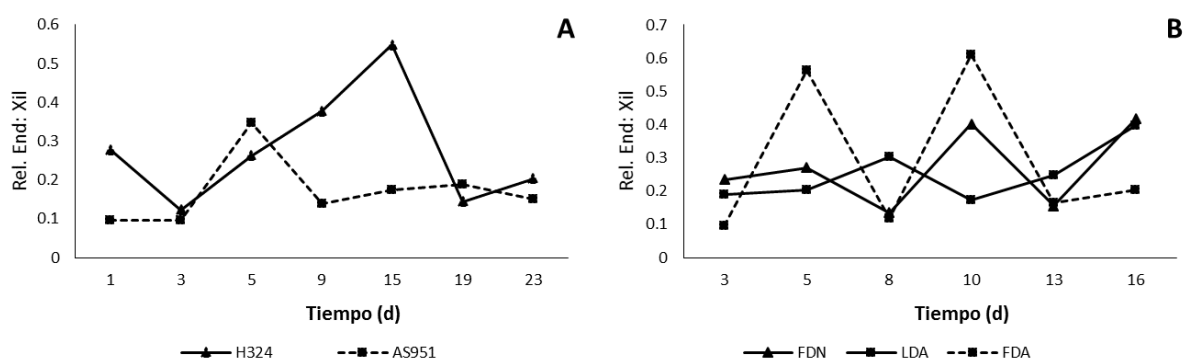


Figura 3. Medias de relación de actividades enzimáticas endoglucanasas: xilanasas en de cultivos de *Pleurotus ostreatus*: A) en medios elaborados con H324 y AS951; B) en medios elaborados con FDN, FDA y LDA (Error estándar = 0.019).

3.4 Actividades de enzimas lacasas

Respecto a la actividad de lacasas, se observaron dos picos de máxima actividad a los 9 y 15 días de incubación en el medio con RM-AS951 y con LDA (Figuras 4A y 4B) ($P = 0.0001$). Éste híbrido de rastrojo de maíz tiene mayor proporción de FDA y celulosa.

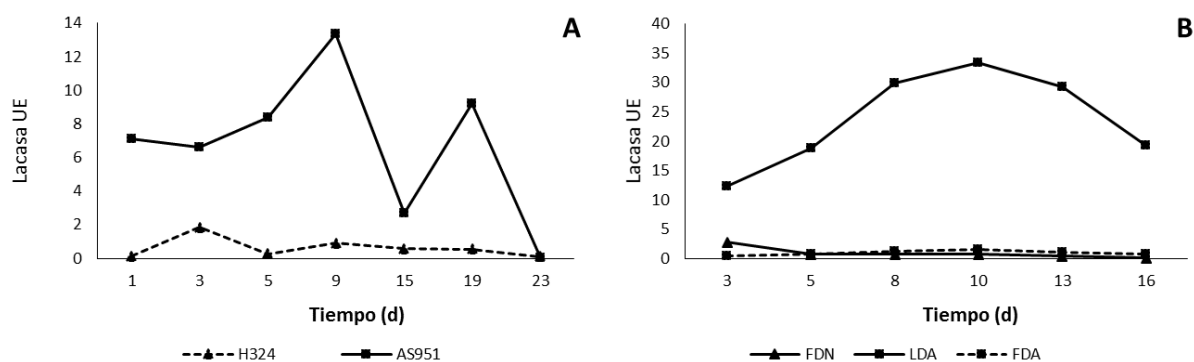


Figura 4. Medias de relación de actividades enzimáticas de lacasas de cultivos de *Pleurotus ostreatus* cultivos: A) en medios elaborados con H324 y AS951 (Error estándar = 2.437); B) en medios elaborados con FDN, FDA y LDA (Error estándar = 1.294).

3.5 Relación entre la liberación de azúcares reductores libres y las actividades enzimáticas

En el Cuadro 1, se muestran los valores de R^2 ajustados de los modelos que relacionan la cantidad de azúcares reductores totales libres con el perfil de actividad endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa y xilanasas, en medios con RM-H324, RM-AS951, FDN, FDA o LDA. El coeficiente de regresión fue mayor cuando se usó medio con RM-H324 y RM-AS951, en comparación a los medios con FDN, FDA o LDA. La cantidad de azúcares reductores libres en el medio se explicó principalmente por las actividades combinadas de endoglucanasas, β -glucosidasas, xilanasas y lacasas. En el medio con RM-AS951 o RM-H324, las actividades de xilanasas y lacasa explicaron el 49% (R^2 ajustado) del azúcar libre pero al añadir la actividad endoglucanasa, el modelo obtiene mayor validez (Valor de Cp de Mallows ± 1 número de variables regresoras en el modelo) con un coeficiente de regresión ajustado de 55%. En los medios con FDN, FDA y LDA, el modelo con mayor validez para azúcares libres totales fue con la actividad coordinada de endoglucanasa, β -glucosidasa, xilanasas y lacasa, quienes explican el 53% de la concentración de azúcares reductores en el medio.

3.6 Efectos inhibidores de los medios de cultivo en las actividades enzimáticas

Con relación a la determinación de la presencia de posibles inhibidores de la actividad de la lacasa presentes en los sustratos (Cuadro 2), La actividad enzimática del tratamiento testigo fue 28.4 UE L⁻¹ y ésta fue menor ($P = 0.0001$) cuando se utilizaron los extractos con o sin inoculación con *P. ostreatus*, lo que indicó la presencia de inhibidores de la actividad de lacasas en los extractos. La inhibición fue mayor en los extractos de rastrojo de maíz H324 y AS951 que en los extractos de las fracciones fibrosas (FDN, FDA LDA). Los extractos de RM-H324 y RM-AS951 previamente inoculado con *P. ostreatus*, mostraron una actividad relativa mayor (32.9 y 23.5 UE L⁻¹) en comparación a los no inoculados, lo que puede deberse a que *P. ostreatus* metabolizó parte de los inhibidores durante su crecimiento. Un fenómeno similar se observó con el extracto de LDA sin y con inoculación. La actividad lacasa en los extractos de FDN y FDA del RM con o sin inoculación fueron iguales ($P > 0.01$; Cuadro 2). Por otra parte, las actividades de enzimas endoglucanasa y xilanasa no fueron inhibidas ($P > 0.05$) por los extractos de RM (H324 y AS951) o de las fracciones de fibra (FDN, FDA y LDA).

Cuadro 2. Actividad de un concentrado de lacasa comercial (4% p/v) en extractos de rastrojo de maíz (RM) de las variedades H324 y AS951 y de fracciones de fibra con y sin pretratamiento con *P. ostreatus*.

Extracto del Sustrato	Inóculo		Actividad enzimática (UE L ⁻¹)	Actividad enzimática Relativa (%)
	<i>P. ostreatus</i>	Tratamiento		
RM-H324	No	Ninguno	2.8 ^c	9.4 ^e
RM-AS951	No	Ninguno	3.1 ^c	10.6 ^e
FDN	No	Ninguno	16.6 ^b	60.9 ^b
FDA	No	Ninguno	12.5 ^{bc}	42.1 ^{bcd}
LDA	No	Ninguno	10.9 ^{bc}	33.6 ^{cde}
RM-H324	Si	Inactivado	9.2 ^{bc}	32.9 ^{cde}
RM-AS951	Si	Inactivado	7.7 ^{bc}	23.5 ^{de}
FDN	Si	Inactivado	16.6 ^b	60.7 ^b
FDA	Si	Inactivado	13.4 ^{bc}	46.4 ^{bcd}
LDA	Si	Inactivado	15.6 ^b	56.4 ^{cd}
Testigo	No	Agua destilada	28.4 ^a	100 ^a

*Medias sin letras en común son diferentes estadísticamente (P<0.05); H324 y AS951, variedades de rastrojo de maíz; SH y MH, sin y con cultivo de hongos; EE, extracto enzimático; UE, es la unidad de enzima = la cantidad de extracto enzimático que oxida 1 µmol de ABTS⁺/min; Actividad enzimática, es la cantidad de unidades de enzima contenidas en 1 L de extracto enzimático; Act. Enz. Relativa, es la actividad enzimática en relación a la del testigo.

4. Discusión

4.1 Actividades enzimáticas

Goikoetxea (2005) mediante la búsqueda en una genoteca genómica del basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, lograron aislar cinco genes *cbhl*, que se han denominado *cbhl1*, *cbhl2*, *cbhl3*, *cbhl4* y *cbhl5*, cuya expresión daría lugar a diferentes celobiohidrolasas I, lo que demuestra la existencia de una familia multigénica responsable de dicha actividad enzimática. Por otra parte, Idareta (2004), Pastor (2004) y Redondo (2004) han demostrado la presencia de β -glucosidasas en *P. ostreatus*. Asimismo, previamente se han caracterizados genes presentes en *Pleurotus ostreatus* que codifican formas e isoformas de lacasas que pueden variar dependiendo de las condiciones y tiempo de los cultivos (POXA3) (Goudopoulou *et al.*, 2010). Téllez-Téllez *et al.* (2012), observaron la expresión del gen lacP83 del hongo *P. ostreatus* que codifica para una isoenzima de lacasa y cuya secuencia conserva entre el 70 y 92% de similitud con secuencias previamente reportadas. La actividad endoglucanasa y exoglucanasa tuvieron máximos mayores en el medio con RM-H324 (Figura 1A y 1C). Éste RM también tuvo una mayor proporción de hemicelulosa y LDA que el RM-AS951, cuyos componentes pueden haber estimulado tal actividad enzimática. Por otra parte los mayores máximos de actividad xilanasa y β -glucosidasa se observaron en el cultivo con RM-AS951, en el cual la proporción de FDA y celulosa es mayor que en RM-H324. Respecto a las fracciones de fibra (FDN, FDA y LDA) los mayores máximos de actividad endoglucanasa, xilanasa y β -glucosidasa se observaron en el medio con FDA. Resultados similares fueron mostrados por Tribal *et al.* (2002), al observar que la actividad xilanasa incrementó al cultivar *Pleurotus ostreatus* en celulosa microcristalina. Los picos de máxima actividad lacasa se encontraron en los medios con RM-H324 y LDA, los cuales tienen una mayor proporción de lignina. Estos resultados

demuestran que la producción enzimática depende de la expresión de genes, los cuales son influidos tanto espacial como temporalmente, por el tipo de sustrato (composición) y las condiciones del cultivo (Esmendi *et al.*, 2004). La inducción de los genes de estas enzimas es llevada a cabo por la presencia en el medio de los sustratos específicos para estas enzimas (celulosa y xilanos). Primeramente la célula microbiana sintetiza y exporta a su superficie cantidades pequeñas de enzimas digestivas, las cuales inician la hidrólisis parcial del polisacárido, liberando cadenas pequeñas de oligosacáridos y, éstas son transportadas al interior celular donde actúan como inductores de la transcripción de genes. Por otro lado, la represión es realizada por moléculas de bajo peso molecular como glucosa y celobiosa (Ponce y Pérez, 2002).

Los picos de máxima actividad endoglucanasa, xilanasa y β -glucosidasa ocurrieron a 15 días de incubación en medio con RM-AS951 y, el de máxima actividad exoglucanasa se presentó a 19 días de incubación en medio con RM-H324. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Téllez-Téllez *et al.* (2012). En los medios con FDN, FDA y LDA, los picos de máxima actividad ocurrieron a dos tiempos de incubación para xilanasa (3 y 13 días) y β -glucosidasas (5 y 10 días). La actividad enzimática menor en el medio con LDA coincide con la máxima actividad en FDA y viceversa (Figura 2). Los picos de máxima actividad enzimática ocurrieron más pronto en el medio con FDA. Dado que tuvo el pico de máxima actividad β -glucosidasa en el medio con FDN, ocurrió cuando la actividad de ésta misma enzima fue menor en el medio con FDA. Esto último puede estar relacionado con la constitución de las paredes celulares ya que la remoción de la hemicelulosa en la FDA causó una mayor actividad β -glucosidasas, endoglucanasas y xilanasas. Omoahghe y Mikiashvilli (2009) encontraron que la actividad endoglucanasas (CMCasa) más alta de *Pleurotus ostreatus* ocurre antes de la primera fructificación (18 a 21 días), en medios de cultivos con 70-80% de rastrojo de maíz.

La mayor actividad lacasa se presentó a los 9 y 15 días de incubación, en los medios con RM-AS951 y LDA. Murrieta *et al.* (2002) encontraron que la mayor actividad lacasas de *Pleurotus* sp, cultivado en pulpa de café, fue a los días 12 y 16, y decreció cuando el micelio cubrió totalmente el sustrato cuando se inicia la fructificación e inicia la producción de celulasas relacionadas con la formación de primordios.

4.2. Relación endoglucanasas: xilanasas

El tratamiento con cepas de *Pleurotus ostreatus* o enzimas fibrolíticas puede mejorar la digestibilidad de los residuos lignocelulósicos. Velasco (2005) y Okano *et al.* (2006) encontraron que la digestibilidad de la paja de trigo y maíz y el bagazo de la caña de azúcar, se incrementó cuando fueron tratado con *Pleurotus ostreatus* (IBUG-8 y IBUG-4). Lo anterior se debe tanto a los tipos de enzimas presentes en los cultivos del hongo, como a la proporción de las mismas. Eun y Beauchemin, 2007, Eun *et al.*, 2007 y Eun y Beauchemin, 2008b demostraron en evaluaciones *in vitro* con líquido ruminal, que una relación celulasa:xilanasas entre 0.01 y 1.5:1 puede mejorar degradabilidad de la FDN de la alfalfa y ensilado de maíz. Esto demostró la necesidad de que los extractos enzimáticos deben contener una actividad suficiente de endoglucanasas sin excederse en la actividad xilanasas para esperar una mejoría de la digestibilidad (Eun y Beauchemin, 2008a). En esta investigación la relación endoglucanasas:xilanasas mayor se obtuvo en medio con RM-H324 y, a 5 y 10 días de incubación, en el medio con FDA. Los relación endoglucanasas:xilanasas varió entre 0.1:1 a 0.6: 1. La mayor relación endoglucanasas:xilanasas se relacionó con la mayor proporción de hemicelulosa y lignina en el medio con RM-H324, y a la proporción de celulosa y

lignina en el medio con FDA. Esto sugiere que una mayor proporción de hemicelulosa, celulosa o lignina puede aumentar la proporción endoglucanasa:xilanasa.

4.3. Azúcares reductores liberados en los cultivos

La producción de azúcares reductores libres a partir de la digestión del complejo polisacárido de la fibra requiere de la acción coordinada del complejo enzimático fúngico. Una vez que se hidroliza parte de la lignina, las xilanasas participan desdoblado los enlaces glicosídicos β -1,4 formados entre la celulosa y la hemicelulosa. La degradación de la celulosa involucra la acción de endoglucanasas las cuales actúan en las regiones amorfas de la celulosa con lo que se crean sitios de acción para las exoglucanasas. Estas enzimas actúan en las regiones cristalinas de la celulosa. El grupo de β -glucosidasas hidrolizan la celobiosa e impiden su acumulación (Vilches, 2002). En la presente investigación se estimó que el 45% de los azúcares libres en medio con RM-H324 o RM-AS951 provinieron principalmente, de la actividad xilanasa; mientras que en los medios con FDN, FDA o LDA, el 36% de los azúcares libres fue el resultado de la actividad β -glucosidasas. La actividad lacasa incrementó el porcentaje de correlación de los modelos de regresión múltiple para azúcares libres. Los azúcares libres se relacionaron 55% (R^2 ajustado) con las actividades endoglucanasa, xilanasa y lacasa, en los medios con RM-AS951 y RM-H324, y 53% con las actividades endoglucanasa, β -glucosidasa, xilanasa y lacasa en medios con FDN, FDA o LDA.

4.4. Efecto de la composición del medio de cultivo en las actividades enzimáticas

En la presente investigación, la actividad lacasa fue inhibida por algún agente químico desconocido contenido en los extractos de RM-H324 o RM-AS951. El tratamiento del RM por 24d con *Pleurotus ostreatus* disminuyó el efecto inhibidor del extracto de RM, en la actividad lacasa probablemente porque el hongo metabolizó y redujo la concentración de agente inhibidor. En promedio, la actividad lacasa en extractos de RM fue $44.56 \pm 14.02\%$ de la actividad lacasa potencial medida sin extracto de RM o sus fracciones FDN, FDA o LDA. El efecto inhibitorio de los extractos pudo deberse también a la ausencia de mediadores como O_2 , H_2O y Mn^{+2} . Se ha demostrado que éstos compuestos estimulan la actividad lacasa al funcionar como parejas redox o mediadores (Höfer y Schlosser, 1999; Rochefort *et al.* 2002) para la actividad de la lacasa. La oxidación del glioxilato, malonato y oxalato son fuentes de O_2 , H_2O y Mn^{+2} (Höfer y Schlosser, 1999). Aparentemente, el CO_2^- es producido por la oxidación de la lignina cuando ésta dona un electrón al oxígeno reduciéndolo a O_2^- , esto es indispensable en la producción de H_2O_2 . Dobson y Field (1998) investigaron el poder reductor de metabolitos Mn^{2+} y H_2O_2 producidos durante la oxidación del oxalato y malonato sobre $ABTS^+$. El Mn^{2+} estimuló fuertemente la reducción del $ABTS^+$, debido a que el O_2^- oxida el Mn^{2+} a Mn^{3+} . Otra causa de la inhibición puede ser la presencia de compuestos secuestrantes de O_2 , H_2O_2 y OH , como el catecol, tiourea o azide de sodio o benzoato de sodio. Estos compuestos pueden disminuir sustancialmente la actividad lacasa (González *et al.*, 2003). El efecto inhibitorio del extracto de RM o sus fracciones de fibra, es específico para lacasa ya que no se observó inhibición de las actividades endoglucanasa y xilanasa.

5. Conclusiones

Los medios de cultivo elaborados con el RM H324, que contenían mayor proporción de hemicelulosa y LDA, promovieron los picos más altos de AE de endoglucanasas y exoglucanasas, sin embargo, las mayores AE de xilanasas y β -glucosidasas se observaron en los MC elaborados con AS951, con mayor contenido de FDA y celulosa. Consistentemente, en medios elaborados con las fracciones FDN, FDA y LDA, los picos más altos de actividad enzimática de endoglucanasas, xilanasas y β -glucosidasas se observaron en los medios de cultivo elaborados con FDA. El extracto de la variedad de rastrojo AS951, con mayores contenidos de FDA y celulosa, promovió mayor actividad de lacasas. De igual manera se observaron mejores actividades enzimáticas en los medios con el sustrato de fracción LDA. Los picos más altos de actividad de enzimas endoglucanasas, xilanasas y β -glucosidasas ocurrieron a los 15 d en medios elaborados con RM AS951, mientras que la máxima AE de exoglucanasas ocurrió a los 19d en los medios elaborados con H324; en medios elaborados con FDN, FDA y LDA los picos ocurrieron entre los 3 a los 13d (xilanasas) y 5 y 10d (β -glucosidasas). Asimismo, las mayores AE de lacasas se observaron entre los 9 y 15 d en los medios elaborados con AS951 y LDA. Las mayores relaciones celulasas: xilanasas ocurrieron en los medios elaborados con H324 y FDA, y variaron de 0.1: 1 a 0.6: 1. La liberación de AR en los medios de H324 y AS951 relacionó un 55% (R^2 ajustado) a las actividades de endoglucanasas, xilanasas y lacasas, y un 53% a la acción coordinada de endoglucanasas, β -glucosidasas, xilanasas y lacasas en los medios con fracciones de FDN, FDA y LDA. La actividad enzimática de lacasas fue afectada negativamente por los RM en los medios, al añadir un tratamiento a los medios de cultivo, tal como los lavados con los jabones detergente neutro, detergente ácido o H_2SO_4 o la inoculación con *Pleurotus ostreatus* mejoró la AE de lacasas,

en promedio se observó el $44.56 \pm 14.02\%$ de la AE real (tomando en cuenta mediciones realizadas en volúmenes de reacción que no contuvieron RM). Por otra parte, no hubo efectos de los RM completos o sus fracciones en las actividades de enzimas endoglucanasas y xilanasas. Lo anterior sugiere que hay mayor potencial de producción de lacasas del hongo *Pleurotus ostreatus* en medios con altos contenidos de FDA y LDA, aunque las características químicas de algunos sustratos pueden esconder parte de la actividad enzimática de lacasas. El tipo de hongo y la composición del MC pueden promover proporciones de AE en los productos de EE que permitan mejorar la digestibilidad de la FDN en ciertas condiciones ambientales similares a las del rumen.

6. Agradecimientos

El presente trabajo fue diseñado y dirigido por el Dr. Luis Alberto Miranda Romero, y supervisado por el Dr. Juan Jáuregui Rincón y el Dr. Gustavo Tirado Estrada quienes estuvieron involucrados en las etapas de colección, análisis, redacción, escritura y decisión final de someter el presente artículo para su arbitraje. Agradecemos por los reactivos y materiales proporcionados por la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Universidad Autónoma Chapingo, Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes y Centro de Investigación INIFAP. No hay conflictos de interés que declarar.

7. Referencias

- Ander P., y K. Messner. 1998. Oxidation of 1-hydroxybenzotriazole by laccase and lignin peroxidase. *Biotechnology Techniques* 12(3): 191-195.
- Angulo O. 2002. Estudio de la microflora asociada al sustrato de *Pleurotus ostreatus*. Tesis. Universidad Pública de Navarra.
- Bermúdez C., Morris J., Donoso C., Martínez E., y E. Ramos. 2003. Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus* var. Florida. *Rev. Cubana Invest. Biomédica* 22: 4.
- Camassola M., and A. J. P. Dillon. 2009. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. *Industrial crops and products* 29(2-3): 642-647.
- Cavallazzi P., Almeida M., and M. Megumi. 2004. Laccase production by *Lepista sordida*. *Brazilian Journal Microbiology* 35: 261-253.
- Colombatto D., and K. A. Beauchemin. 2003. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. *Can. J. Anim. Sci.* 83: 559-568.
- Cohen R., O. Yarden y H. Yitzhak. 2002. Lignicellulose affects Mn^{2+} regulation of peroxidase transcript levels in solid-state cultures of *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (6): 3156-3158.

- Dobson D. W., y J. A. Field. 1998. Reduction of the 2-2-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) cation radical by physiological organic acids in the absence and presence of manganese. *Org. Biomol. Chem.* 64(6): 2026-2031.
- Esmendi A., Sannia G., Ramírez L., y A. G. Pisabarro. 2004. Estudio de la actividad celulolítica en el basidiomicete comestible *Pleurotus ostreatus*. Tesis. Universidad Pública de Navarra.
- Eun J. S., Beauchemin K. A., and H. Schulze. 2007. Use of an *in vitro* fermentation bioassay to evaluate improvements in degradation of alfalfa hay due to exogenous feed enzymes. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 135: 315-328.
- Eun J. S., and K. A. Beauchemin. 2007. Use *in vitro* degradation of alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. *J. Dairy Sci.* 90: 2839- 2851.
- Eun J. S., and K. A. Beauchemin. 2008a. Assessment of the potential of feed enzyme additives to enhance utilization of corn silage fibre by ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 88: 97-106.
- Eun, J. S., and K. A. Beauchemin. 2008b. Relationship between enzymic activities and *in vitro* degradation of alfalfa hay and corn silage. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 145: 53-67.
- Goikoetxea E. 2005. Caracterización molecular de una familia de genes de celobiohidrolasas en el hongo *Pleurotus ostreatus*. Tesis para optar al grado de doctor. Dpto. Producción Agraria, Universidad Navarra.
- Gorka R., Monque J., Der Heiden V., Swathoff T., y T. Verrips. 2001. Cloning of a phenol oxidase gene from *Acremonium murorum* and its expression in *Aspergillus awamori*. *Applied and Environmental Microbiology* 67(6): 2610-2616.

- Goudopoulou A., Krimitzas A., and M. A. Typas. 2010. Differential gene expression of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* grown on olive oil mill wastewater. *App. Microbiology and Biotech.* 88(2): 541-551.
- Höfer C., y D. Schlosser. 1999. Novel enzymatic oxidation of Mn^{2+} a Mn^{3+} catalyzed by a fungal laccase. *FEBS Letters.* 451: 186-190.
- Idareta O. 2004. Estudio de caracteres productivos de híbridos de *Pleurotus ostreatus* en condiciones semiindustriales para su selección dentro de un programa de mejora genética. Tesis. Universidad Pública de Navarra.
- Iriarte H. 2003. Estudio de la producción y secreción de enzimas celulolíticas en micelios “rápidos” y “lentos” de *P. ostreatus*. Tesis. Universidad Pública de Navarra.
- Labarere J., y F. Bois. 2001. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Capítulo V. Ed. ECOSUR-LIMUSA. México. pp. 86-87.
- Márquez-Araque A., Mendoza Martínez G., Segundo González S., Buntix Dios E., y O. Loera Corral. 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes* sp EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. *Interciencia* 32(11): 780-785.
- Murrieta D., Mata G., and L. G. Iglesias. 2002. Cambios en la producción de lacasa por el hongo *Pleurotus pulmonarius* (FR.) QUÉL. cultivado en pulpa de café en confrontación con *Trichoderma viride* Pers., un moho contaminante. *Foresta Veracruzana.* 4(1): 47-52.

- Obodai M., Cleland-Okine J., and K. A. Vowotor. 2003. Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-products. J. Microbiology Biotechnol. 2003(30): 146-149.
- Okano K., Lida Y., Samsuri M., Prasetya B., Usagawa T., y T. Watanabe. 2006. Comparison of *in vitro* digestibility and chemical composition among sugarcane bagasses treated by four white-rot fungi. Animal Sci. 77 (3): 308-313.
- Omoahghe S. I., and N. A. Mikiashvili. 2009. Lignocellulolytic enzyme activity, substrate utilization, and mushroom yield by *Pleurotus ostreatus* cultivated on substrate containing anaerobic digester solids. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36: 1353-1362.
- Pastor J. 2004. Mapeo del gen Mn4-161 mediante el uso de marcadores RFLP, en *Pleurotus ostreatus* var. Florida. Tesis. Universidad Pública de Navarra.
- Ponce T., y A. O. Pérez. 2002. Celulasas y xilanasas en la industria. Avance y Perspectiva 21. pp. 273-277.
- Rocheft D., Bourbonais R., Leech D., y M.G. Paice. 2002. Oxidation of lignin model compounds by organic and transition metal-base electron transfer mediators. Chem. Comun. 2002:1182-1183.
- Redondo P. 2004. Mapeo de los genes dyp y Mn-162 y del fragmento que contiene los genes ligados porfobilinógeno deaminasa y fosfatidilserina decarboxilasa del basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* var. Florida. Tesis. Universidad Pública de Navarra.

- Rodríguez E., Pickard M. A., and R. Vázquez-Duhalt. 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology* 38: 27-32.
- Statistical Analysis System. 2013. SAS/STAT User's Guide. (Release 9.3). Cary, NC, USA. SAS Inst. Inc.
- Sánchez A., Ysunza F., Beltrán M., y M. Esqueda. 2002. Cultivo del hongo comestible *Pleurotus* sobre residuos vitivinícolas y su manejo postcosecha. Trabajo de tesis de maestría del primer autor, Área de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal. Centro de Inv. en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora, México.
- Soto-Velazco C., Serratos J., Ruiz M., y P. García. 2005. Análisis proximal y de aminoácidos de residuos de cosecha del hongo *Pleurotus* spp. *Revista Mexicana de Micología* 21:49-53.
- Schlosser D., y C. Höfer. 2002. Laccase-catalyzed oxidation of Mn^{2+} in presence of natural Mn^{3+} chelators as a novel source of extracellular H_2O_2 production and its impact on manganese peroxidase. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68 (7): 3514- 3521.
- Téllez-Téllez M., Díaz-Godínez G., Aguilar M., Sánchez C., and F. J. Fernández. 2012. Description of a laccase gene from *Pleurotus ostreatus* expressed under submerged fermentation conditions. *BioResources* 7(2): 2038-2050.
- Tribal M., Ocampo J.A., y García-Romera. 2002. Production of xyloglucanolytic enzymes by *Trichoderma viride*, *Paecilomyces farinosus*, *Wardomyces inflatus*, and *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia* 94(3): 404-410.

- Tricarico J. M., and K.A. Dawson. 2005. Influence of supplemental endoglucanase or xylanase on volatile fatty acid production from ruminant feed by ruminal *in vitro* cultures. *Archives of Animal Nutrition*, 59(5): 325-334.
- Van Soest P.J., Robertson J. B., and B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Sci.* 74: 3583–3597.
- Vilches P.L. 2002. Determinación de la actividad de endoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Haraz. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. Depto. Acad. de Microbiología y Parasitología. Tesis. 77 p.
- Yaver D., Feng Xu, Golignthly E., Brown K., Brown S., Rey M., Schneider P., Halkier T., Mondorf K., y H. Dalboge. 1996. Purification, characterization, molecular cloning and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 62(3): 834-841.