

**UNIVERSIDAD DE MATANZAS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo**

**Efecto del extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44 sobre una dieta para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras.**



**Autor:**

Félix Darian Llanes Martínez

**Tutores:**

MSc. Madyu Matos Trujillo

Dr C. Aymara Valdiva Avila

**Julio, 2018**

## **Declaración de Autoridad**

Declaro que yo, Félix Darían Llanes Martínez, soy el único autor de este Trabajo de Diploma, en calidad de lo cual autorizo a la Universidad de Matanzas a hacer uso del mismo con la finalidad que estime pertinente.

---

Firma

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedico a mi madre querida: Loida Barbarita Martínez Gutiérrez, quien aun cuando no pudo ganarle al tiempo y estar físicamente presente para verlo terminado, sé que de alguna manera superior, estará a mi lado el día indicado o quizás frente a mí, observándome y como bien ella dijera: “qué regocijo el mío, poder ver finalmente, la segunda obra más importante de mi vida realizada”.

A ti, madre mía, que siempre me enseñaste con herramientas el camino a seguir, para que, teniéndolas en cuenta, lo recorriera yo lo mejor que pudiera; y aprendiera a valorar cada esfuerzo tuyo, cada noche de desvelo, cada consejo que me dabas, cada palabra que me decías, o frases que en el momento no comprendía como: “...beber el conocimiento de la sabia de la vida...”, y así terminar siendo un hombre de bien, útil a la sociedad, tal cual siempre quisiste que fuera.

Muchas Gracias, Mami, a ti, POR TODO.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecerles desde lo más profundo de mi corazón a las dos profesoras más hermosas e inteligentes de la Universidad de Matanzas, Madyu Matos Trujillo y Aymara Valdivia Avila por su completa dedicación, por su entrega incondicional, por aceptar tutoriar la presente tesis, por ayudarme a ser realidad este sueño. Muchas gracias.

Agradecerle a mi mamá por todos los consejos que me dio, por su cariño, por su amor, por ser mí paradigma, por siempre enseñarme que hay que batallar para lograr lo que se quiere, por estar siempre presente a mi lado y ayudarme en los momentos más difíciles, a ti mí mami donde estés, gracias.

Agradecerle a mi hermana Loida Esther (loidita), por ser hermana y por ser madre, por su amor, su dedicación, su entrega, por los consejos que me dio, por ser un modelo a seguir, por darme fuerza y animo en los momentos en que me faltaba, a ti gracias por ser la mejor hermana del mundo.

A mis tíos, Naite y Lourdes que más que tíos son padre y madre por su completa preocupación en ocasiones demasiada, pero sé que es por mi bien, agradecerles por la dedicación, por los consejos que me brindaron. Agradecerles por todo lo que hicieron, por lo que hacen y por lo que quisieran hacer. A ustedes gracias.

A mi papá Eustaquio Neninge por ser mi guía, por estar presente en todo momento y guiarme por el buen camino, por su preocupación y dedicación. Pienso que con palabras no sabría expresar todo mi agradecimiento, pero si con el pensamiento, y con palabras te diría: gracias por todo.

A mi abuela Camila, a mamita Francisca, a mi tío, a mi abuelo que sé que de alguna forma siempre han estado al lado de nosotros dándonos fuerzas.

A mi tía Yadira, Lazarita, Mirian y Dulce por la atención y la preocupación que siempre me han brindado. A ustedes Gracias.

A mi papá, a mi tía Antolina y mi prima Luisa, y a Marielena por la preocupación con respecto hacia mí.

A mis primos y hermanos: Yoana, Mailin, Anay, Arianna, Nana, Maura, Dariel, Noelito, Indi, Andy, Barbarita, Ifi, Danlay, Pepe por siempre estar a mi lado apoyándome.

Agradecerle a Raquel por su dedicación, por apoyarme, guiarme, aconsejarme, en los momentos que necesite. Por estar dispuesta a ayudarme a cualquier hora, a ti gracias.

A Silvia, a Danni y Armandito por ser como una familia, por la preocupación y la dedicación, a ustedes gracias.

A Marielena, a Santana por la atención que siempre me han brindado.

A Iliana y a Silvio por siempre contar con su ayuda y dedicación.

A los profesores del CETEN: el profesor Héctor, Yunel, Leysi y Camacho porque siempre conté con el apoyo de todos, sobre todo me enseñaron el arte de fregar.

A los profesores, Mabelkis, Agustin, Liriano, Marlen, Yildrey, Yordanis, Yasmaly, Enildo, Lilibet, Yohanca, Ana ajulia, Odelin, al profesor Pepe, Dania, a todos los profesores de la facultad por el apoyo que siempre mostraron.

A todos mis compañeros de la escuela, a Daine, Lázara, Alejandro Mesa, Alejandro Aquino, a todos gracias por compartir conmigo estos años.

A todas las personas, familiares y amigos que estuvieron presentes y me brindaron, regalaron un consejo, su preocupación, su atención, su sabiduría, su amistad, su cariño, un momento agradable o hasta una sonrisa, les digo muchas gracias a todos.

Por último que no significa que sea menos importante:

Gracias a Dios.

## **OPINIÓN DEL TUTOR**

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de diploma presentado en opción al título de Ingeniero Agrónomo titulado: “Efecto del extracto de enzimas de *Bacillus subtilis* E44 sobre una dieta para pollitas de reemplazo de ponedoras” es el resultado de un trabajo dedicado del aspirante Félix Darían Llanes Martínez.

Como resultado del trabajo realizado por varios investigadores del Centro de Estudios Biotecnológico de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, se evaluó el efecto de un extracto enzimático producido por *Bacillus subtilis* E44, sobre una dieta para pollitas de reemplazo de ponedoras para producir azúcares reductores libres. El uso de enzimas que degradan los componentes de la pared celular presentes en la dieta, favorece la asimilación de nutrientes y disminuye los efectos negativos de factores antinutricionales.

En este marco la investigación desarrollada por el estudiante, contribuyó a entender los procesos microbiológicos y bioquímicos durante la fermentación de *Bacillus subtilis* E44. Durante el período de trabajo el estudiante mantuvo buena disciplina cumpliendo con cada etapa de la investigación, lo que permitió que concluyera con calidad y alto rigor científico.

### **Tutores:**

---

MSc. Madyu Matos Trujillo

---

Dr C. Aymara Valdivia Ávila

## RESUMEN

En los últimos años, el incremento de la población urbana y suburbana ocasiona que la demanda de productos de origen animal se eleve considerablemente. El precio de muchas de las materias primas que se utilizan en la elaboración de los piensos, se incrementan cada vez más, debido a lo cual se emplean alimentos poco nutritivos. El uso de enzimas que degradan las paredes celulares vegetales, favorece revalorizar el empleo de estos materiales. El objetivo de la presente investigación consistió en determinar el efecto de un extracto enzimático, obtenido de *Bacillus subtilis* E44 durante la fermentación en estado sólido (FES), empleando el bagazo de caña de azúcar como fuente de carbono, en la dieta para pollitas de reemplazo de ponedoras. Se determinaron las enzimas presentes en el extracto enzimático. Se evaluó la acción del extracto (500 UIg<sup>-1</sup> de actividad endoxilanasas fundamentalmente) a las 2, 4 y 6 h, sobre la dieta. El extracto enzimático mostró actividad endoxilanasas, mananasa, endoglucanasa, amilasa y muy baja actividad proteolítica con valores de 259.70 UIg<sup>-1</sup>, 62.02 UIg<sup>-1</sup>, 30.06 UIg<sup>-1</sup>, 84.46 UIg<sup>-1</sup> y 0.70 UIg<sup>-1</sup> respectivamente. Al aplicar el extracto sobre la dieta se incrementó significativamente (P<0.05) la producción de azúcares reductores en función de equivalentes de glucosa, xilosa y manosa en los tiempos muestreados y se alcanzó el valor máximo a las 6 horas. A partir de los resultados obtenidos, se concluye que el extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44 obtenido durante la FES, favorece la liberación de azúcares reductores de la dieta empleada en la alimentación avícola.



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
1.1. Hipótesis.....	3
1.2. Objetivo General.....	3
1.3. Objetivos Específicos.....	3
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
2.1. Pared celular .....	4
2.2. Polisacáridos no amiláceos.....	8
2.3. Enzimas que participan en la degradación de la pared celular vegetal.....	9
2.3.1. Definición de enzimas.....	9
2.3.2. Fuentes para la obtención de enzimas .....	10
2.3.3. Enzimas que degradan la celulosa.....	11
2.3.3.1 Enzimas que hidrolizan la celulosa.....	11
2.3.3.2. Enzimas que hidrolizan la hemicelulosa.....	12
2.4. Utilización de enzimas que degradan la celulosa y la hemicelulosa.....	13
2.5. Efectos de la utilización de enzimas en los parámetros de los animales....	15
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	19
3.1. Preparación del extracto enzimático.....	19
3.1.1. Cultivo microbiano.....	19
3.1.2. Medio de cultivo .....	19
3.1.3. Preparación del bagazo de caña.....	19
3.1.4. Composición química del bagazo de caña de azúcar.....	19
3.1.5. Fermentación en estado sólido (FES).....	20
3.1.6. Extracción del extracto enzimático.....	20
3.2. Determinaciones analíticas.....	21
3.2.1. Actividad xilanasa.....	21
3.2.2. Actividad mananasa.....	21
3.2.3. Actividad endoglucanasas.....	22
3.2.4. Actividad amilasa.....	22
3.2.5. Actividad proteasa.....	22
3.2.6. Determinación del contenido de azúcares reductores.....	22

3.3. Efecto del extracto enzimático en una dietas para pollitas de remplazo....	23
3.3.1. Composición de la dieta.....	23
3.3.2. Efecto del extracto enzimático sobre una dieta de pollitas de remplazo...	24
3.4. Análisis estadístico.....	24
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>25</b>
4.1. Preparación del extracto enzimático.....	25
4.1. Determinación de las enzimas obtenidas en extracto obtenido.....	26
4.1.1. Evaluación de endoxilanasas, endoglucanasa y mananasas .....	26
4.2. Evaluación de otras enzimas presentes en el extracto enzimático.....	31
4.3. Acción del extracto enzimático sobre el mejoramiento de una dieta.....	33
4.4. Valoración cualitativa del impaccto económico-medioambiental.....	38
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>6.RECOMENDACIONES.....</b>	<b>41</b>
<b>7.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>42</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

Los cambios económicos, la situación del medio ambiente y el aumento de la población originan grandes dificultades en respuesta a las demandas de la comercialización de alimentos. Las necesidades de estos productos no son lo suficientemente cubiertas con las vías de producción tradicionales y como consecuencia las direcciones de los países responsables de esta área y de manera particular los productores, buscan otras formas de solución.

En los últimos años, el incremento de la población urbana y suburbana ha ocasionado que la demanda de productos de origen animal se eleve considerablemente, provocando con ello un desequilibrio de la producción del mercado nacional. Con este proceso de cambios los productores de explotaciones pecuarias se ven en la necesidad de buscar alternativas de solución para cubrir la demanda de productos de origen animal, sin elevar demasiado los costos de producción (Becerra, 2002).

En la crianza animal la alimentación constituye una de las actividades que resultan más costosas, sobre todo en especies monogástricas. Esta problemática se ha agudizado en los últimos años, debido al incremento del precio de muchas de las materias primas que se utilizan en la elaboración de las dietas. Una de las estrategias que actualmente se proponen para solucionar esta problemática consiste en la adición de enzimas a las raciones de las aves, con el objetivo de incrementar la asimilación de nutrientes y mejorar los indicadores productivos de esta especie.

Generalmente el uso de estas proteínas como aditivo nutricional se ha encaminado principalmente a disminuir el efecto de los componentes antinutricionales, específicamente de los polisacáridos no amiláceos (PNA) y a mejorar el aprovechamiento de los nutrientes.

Teniendo en cuenta lo antes expuesto nos planteamos el siguiente **problema científico** a resolver: *El elevado contenido de polisacáridos no amiláceos en las dietas empleadas en la nutrición avícola, impide acción enzimas endógenas y disminuye la asimilación de nutrientes*

Para dar solución a este problema se plantea como **hipótesis científica**:

*La aplicación de un extracto enzimático, obtenido de **Bacillus subtilis** E44, en dietas para pollitas de reemplazo de ponedoras, elevará contenido de azúcares reductores libres, para una mejor asimilación por parte de los animales.*

Para validad esta hipótesis se planea el **objetivo general**:

Determinar el efecto de un extracto enzimático, *obtenido de **Bacillus subtilis** E44* durante la fermentación en estado sólido empleando el bagazo de caña de azúcar como fuente de carbono, en la dieta para pollitas de reemplazo de ponedoras.

Para dar cumplimiento a este objetivo se proponen los siguientes **objetivos específicos**:

1. Evaluar las enzimas presentes en el extracto de *Bacillus subtilis* E44.
2. Determinar el efecto del extracto enzimático, en dietas para pollitas de reemplazo de ponedoras.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

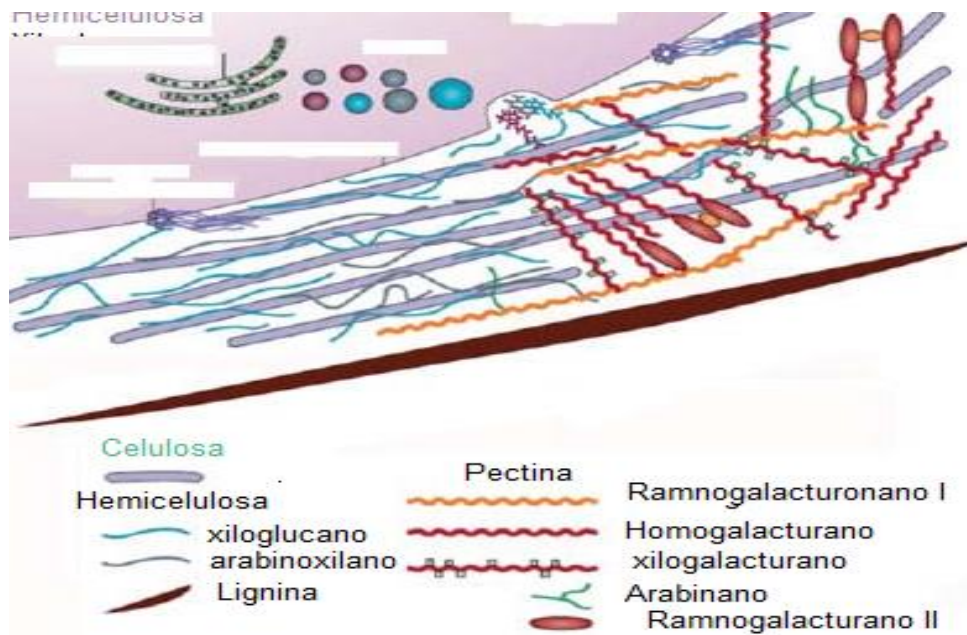
### 2.1 Pared celular.

Una de las características distintivas de las células vegetales es la presencia en ellas de la pared celular (Valenciaga y Chongo, 2004). Esta estructura se localiza en la zona exterior de la célula, en contacto íntimo con la membrana plasmática. Proporciona rigidez, soporte estructural y mecánico a la célula, determinando la morfología y el crecimiento celular, y, por tanto, en última instancia, la arquitectura de la planta. Además, previene la excesiva expansión de la célula debido a la entrada y circulación de agua, actúa de barrera frente a patógenos y es el compartimiento celular que media todas las relaciones de la célula vegetal con el entorno (Gallardo, 2007).

La pared celular está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosas, sustancias pécticas, glicoproteínas, y en ocasiones se encuentra reforzada por polímeros aromáticos como la lignina. Estos polímeros están entremezclados y unidos químicamente entre sí mediante enlaces covalentes y no covalentes, formando una estructura denominada lignocelulosa (Jordan *et al.*, 2012). Según Valenciaga y Chongo (2004) la composición y organización de los componentes individuales en la pared controlan su estructura y función, por lo que resulta necesario conocer detalles de los más importantes: celulosa, hemicelulosas, lignina y ácidos fenólicos.

La celulosa es el polímero más abundante en la naturaleza, altamente estable e insoluble en agua. Es el principal componente de la pared celular de las plantas: constituye el 50% del peso seco de la madera y en dependencia de su origen, puede tener un grado de polimerización de alrededor de 2000 a 25 000 unidades de glucosa. Está compuesta por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4, que forman moléculas de celobiosa (dímero de glucosa unido

por un enlace  $\beta$ -1,4). Estas, a su vez, se estructuran en filamentos de celulosa no ramificados. En la naturaleza, la celulosa no se encuentra como cadena sencilla; desde su síntesis se ordena en filamentos que forman las microfibrillas, con un diámetro de 5 a 15 nm (Quiroz y Folch-Mallol, 2011).



**Figura 1** Composición de la pared celular vegetal. (Tomado de Quiroz y Folch-Mallol, 2011).

La hemicelulosa es el segundo polisacárido estructural más abundante de las plantas, está presente en asociación con la celulosa en las paredes de la mayoría de las especies vegetales, y puede ser extraída por álcalis. Basado en los principales residuos de azúcares presentes en el esqueleto del polímero, las hemicelulosas pueden ser denominadas xilanos, glucomananos, galactanos o arabinanos (Bhatt y Hazlewood, 2001). Se considera generalmente que los dos tipos principales de hemicelulosas son los xilanos y los glucomananos (García 2000).

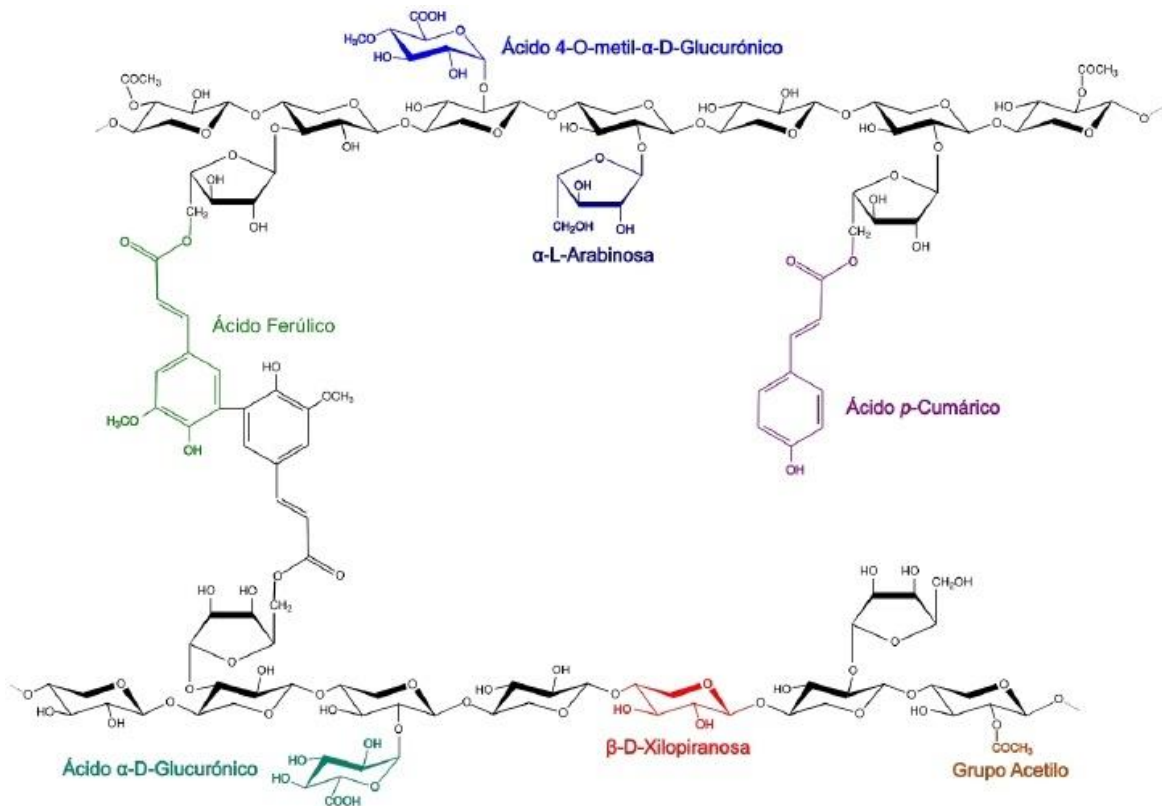
La hemicelulosa más abundante en los cereales y las maderas duras (angiospermas) es el xilano, mientras que en las maderas blandas (gimnospermas) es el galactoglucomanano. Otras hemicelulosas frecuentes en vegetales son el xiloglucano, el galactomanano, el glucomanano, el manano puro y la calosa. (Gallardo, 2007).

El xilano es el principal polisacárido estructural de la pared celular de las plantas y el segundo en prevalencia en la naturaleza después de la celulosa. Es un polímero heterogéneo constituido primariamente por cadenas lineares de  $\beta$  (1-4)- xilosa, las cuales están parcialmente acetiladas y sustituidas en diferente grado por una variedad de cadenas principalmente por unidades de  $\alpha$ -D-glucuronosil y  $\alpha$ -L-arabinosil (Knob, *et al.*, 2013).

Según Zhang y Sang (2015), el xilano y el manano son dos importantes hemicelulosas y los polímeros más abundantes en la naturaleza después de la celulosa. Los mananos se encuentran en la pared celular asociados a gucosa y xilosa mediante enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (Yamabhai *et al.*, 2016). Según su composición, pueden clasificarse en mananos lineales, galactomananos, glucomananos y galactoglucomananos. En plantas presentan un rol estructural y también son utilizados como fuente de reserva de carbohidratos sin almidón.

La lignina forma una red hidrofóbica que rodea los demás componentes de la pared celular (Loque *et al.*, 2015). Es uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza, después de la celulosa y la hemicelulosa. Es altamente resistente a la degradación química y biológica. Le confiere soporte estructural, impermeabilidad y resistencia al ataque de microorganismos a la pared celular (Valenciaga y Chongo, 2004).

Las celulosas, hemicelulosas y pectinas forman parte de los componentes de los piensos que se utilizan en la alimentación animal. Son macromoléculas de difícil digestión para las aves y se consideran polisacáridos no amiláceos, aunque también se conocen como factores antinutricionales (Bosch, 1996).



**Figura 2.** Esquema de la estructura de la molécula de xilano y sus ramificaciones. (Tomado de Gallardo, 2007).



## 2.2. Polisacáridos no amiláceos (PNA) efectos antinutricionales.

Según Gray (2006), los PNA se consideran los principales componentes de las paredes de las células vegetales. Entre ellos se incluyen la celulosa, las hemicelulosas, las pectinas,  $\beta$ -glucanos y otros polisacáridos.

La estructura de las paredes celulares, tanto de cereales como de otros ingredientes de uso común en piensos, es muy compleja y dependiendo del tipo de materia prima a evaluar, encontraremos que su perfil en PNA es diferente (Fernández y González, 2011). La mayoría de los ingredientes alternativos que se usan en las dietas para aves poseen altos niveles de estos polisacáridos (Dudley-Cash, 2014). Los arabinoxilanos son los PNA mayoritarios en el trigo, el centeno y el triticale, mientras que los  $\beta$ -glucanos son los más abundantes en la cebada y la avena. En otros ingredientes del pienso, como la soja, el girasol o la colza, aparecen, en menor cantidad, pero con un marcado efecto antinutricional, otros tipos de PNA como las pectinas, los  $\beta$ -galactosidos y los  $\beta$ -galactomananos (Fernández y González 2011).

Los PNA se clasifican en solubles e insolubles de acuerdo a su solubilidad en agua. Los insolubles son muy difíciles de digerir y están representados por la hemicelulosa. Los solubles más importantes son los  $\beta$ -glucanos, las pectinas y los arabinoxilanos que presentan propiedades antinutricionales (Lata, 2011). La presencia de estos compuestos se relaciona con incrementos de la viscosidad de la digesta, menor digestibilidad de las grasas, las proteínas y los carbohidratos y disminución de la actividad de las enzimas endógenas al provocar una reducción del contacto entre estas proteínas y los nutrientes (Nikam 2017).

La inclusión de alimentos ricos en PNA en dietas para pollos de engorde puede provocar una disminución del rendimiento de los parámetros productivos de los animales (Alba, 2013). Se demostró que el exceso de estos compuestos ocasiona cambios en la microflora del tracto gastro intestinal de las aves, incrementándose la

proliferación de bacterias anaerobias (Dudley-Cash 2014). En porcinos, el empleo de dietas con altos niveles de PNA, reduce la digestibilidad de los nutrientes (Nortey *et al.* 2007).

## **2.3. Enzimas que participan en la degradación de la pared celular de las plantas.**

### **2.3.1. Definición de enzimas.**

Las enzimas son proteínas con actividad catalítica que poseen una extraordinaria eficiencia y especificidad, cuya función es catalizar las reacciones químicas que ocurren en las células vivas (Garg, 2016). Están presentes prácticamente en cualquier lugar, se encuentran en los procesos naturales y son producidas por todos los organismos vivos, desde unicelulares, pasando por las plantas, los insectos, los animales y el hombre (González, 2004).

En la actualidad el desarrollo de investigaciones en temáticas relacionadas con la tecnología enzimática ha propiciado que el uso de estas proteínas se haya extendido a diversos campos como la biomedicina, las industrias que producen papel, etanol y detergentes entre otros productos, la producción de alimentos y la alimentación animal (Purich, 2010).

La utilización de las enzimas en la nutrición animal se inició en los años 80. Los países pioneros en su aplicación fueron los Escandinavos, Gran Bretaña, Canadá y de forma muy particular, España (Brufau, 2014). En las últimas décadas el uso de estas proteínas como aditivos se amplió, de manera que 200 millones de toneladas de alimentos para cerdos y aves se suplementan con estos productos (Graham y Bedford, 2007).

Actualmente se recomienda el uso productos que combinan varias enzimas, los cuales han mostrado efectos superiores en el desempeño de los animales al compararlos con los que contienen solo una enzima (Amerah *et al.*, 2016).

### **2.3.2. Fuentes para la obtención de enzimas.**

La mayoría de las enzimas utilizadas en la alimentación y el procesamiento de alimentos tienen un origen microbiano. (Khattak *et al.*, 2006). Muchas de las enzimas exógenas son producidas por hongos y levaduras en condiciones controladas en plantas de fermentación (Fuller, 2004; Ahirwar *et al.*, 2016).

Las bacterias también se han utilizado como fuentes de enzimas lignocelulósicas (Hamann *et al.*, 2015). Varios autores recomiendan el empleo de estos cultivos microbianos teniendo en cuenta factores como la baja demanda de nutrientes de estos microorganismos para su crecimiento y sus posibilidades de desarrollo en una amplia variedad de ambientes. Además, consideran su capacidad para producir enzimas estables bajo condiciones extremas de temperatura y pH, que podrían mantenerse en procesos de bioconversión e incrementar las tasas de actividad enzimática, fermentación y recuperación de productos (Maki *et al.* 2009 y Chakdar *et al.* 2016).

Entre los géneros bacterianos más utilizados con este objetivo se encuentra *Bacillus*, debido a su amplia distribución en diversos hábitats y sus posibilidades de sobrevivir en condiciones adversas (Kim *et al.*, 2017). Específicamente *Bacillus subtilis* es una bacteria abundante y que muestra características potenciales para su utilización en la elaboración de aditivos zootécnicos (Cheng *et al.*, 2016, y Milián *et al.*, 2017). Este microorganismo posee la capacidad de secretar gran cantidad de enzimas al medio de cultivo (Meima *et al.*, 2004), como amilasas (Maity *et al.* 2015), mananasas (Liu *et al.*, 2015; Pangri *et al.*, 2017) y xilanasas (Sugumaran *et al.*, 2013 y Ho, 2015).

La mayoría de los enzimas que se utilizan en la alimentación animal son producidos mediante hongos como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* o bien, mediante bacterias como *Streptomyces*, *Bacillus Subtilis* o *Bacillus licheniformis* (Brufau, 2014).

Por otra parte, debe tenerse en cuenta que existen dos procesos fermentativos que se utilizan para la producción de enzimas: la Fermentación Sumergida (FSm) y la Fermentación en Estado Sólido (FES) (Brandao, 2003)

La Fermentación en Estado Sólido (FES) puede ser una alternativa interesante para la producción de enzimas a partir de microorganismos, debido a que la misma ofrece la posibilidad de utilizar residuos agroindustriales o subproductos como fuentes de nutrientes y soporte para el desarrollo de microorganismos (Rigo *et al.*, 2010).

### **2.3.3. Enzimas que degradan la pared celular.**

#### **2.3.3.1. Enzimas que hidrolizan la celulosa.**

La pared celular vegetal consiste principalmente en biopolímeros celulosa, y hemicelulosa. Estos biopolímeros son degradados con la ayuda de enzimas extracelulares que actúan sobre los enlaces glicosídicos terminales y/o internos. Estas son conocidas como enzimas de degradación de la pared celular (Castañeda *et al.*, 2017).

Las celulasas son O-glucósido hidrolasas que catalizan la ruptura del enlace  $\beta$ -1,4 de la celulosa (Hildén y Johansson, G., 2004). Estas enzimas forman un complejo de tres enzimas que se clasifican de acuerdo con su actividad enzimática: exoglucanasas, endoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas (Quiroz y Folch-Mallol, 2011; Iqbal *et al.*, 2012).

Las exoglucanasas son enzimas hidrolizan los enlaces glucosídicos terminales, rompiendo la estructura cristalina de la celulosa y transformándola en celulosa amorfa. Al actuar en la celulosa libera glucosa o celobiosa. (García, 2000 y Guerrero, 2011)

Las endoglucanasas, conocidas también como 1,4  $\beta$ -D-glucan-4-glucanohidrolasas, actúan en las porciones amorfas de las fibras de celulosa y rompen los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos. Generan oligosacáridos de distintas longitudes, lo que implica la formación de nuevos extremos reductores y no reductores (Guerrero, 2011). Las  $\beta$ -glucosidasas hidrolizan las unidades de celobiosa en monómeros de glucosa, es muy importante para que se produzca la degradación completa de la celulosa (Guerrero 2011).

### **2.3.3.2. Enzimas que hidrolizan la hemicelulosa.**

Debido a la compleja estructura del xilano se requieren varias enzimas para completar su degradación. La endoxilanasas (EC 3.2.1.8) es la principal enzima que participan en la degradación de la hemicelulosa, la cual rompe las cadenas de xilano y produce oligosacáridos (Knob, *et al.*, 2013). La capacidad de degradar xilano está ampliamente distribuida entre los microorganismos, los cuales poseen diferentes enzimas, cada una con una acción específica (Chakdar *et al.* 2016).

Se considera que las xilanasas son una de las enzimas hacia la que se han enfocado las investigaciones, debido a sus potencialidades para aplicarse en diversos sectores, (Ho, 2015). Se han producido a escala industrial a partir de *Aspergillus* y *Trichoderma* spp. (Fadel *et al.*, 2014). Actualmente se utilizan ampliamente como aditivos en varias especies animales monogástricos (Sun *et al.*, 2015) y poligástricas (Arce-Cervantes *et al.*, 2013).

La enzima esencial para la degradación de los mananos es una endo  $\beta$  (1,4) mananasa, la cual hidroliza el enlace interno  $\beta$  (1-4)-D-manopiranosil en el esqueleto del manano originando una mezcla de oligomananos, principalmente manobiosa y manotriosa y manotretosa, que son solubles en agua. Esta proteína es producida por varios organismos incluyendo bacterias, levaduras, hongos, plantas y algas marinas (Zuluaga *et al.*, 2017). Entre las aplicaciones de estas enzimas se destaca el blanqueamiento de la pulpa de papel, la fabricación de detergentes, en la hidrólisis del extracto de café, en la preparación de prebióticos para la industria alimenticia (Pangsri y Pangsri, 2017).

#### **2.4. Utilización de enzimas que degradan la celulosa y la hemicelulosa en la alimentación de monogástricos.**

El uso de la suplementación de enzimas en la alimentación animal se ha incrementado progresivamente, a partir de que los productores e investigadores se han percatado de los beneficios que ofrece esta tecnología. La aplicación de estas proteínas mejora el desarrollo de los animales, incrementa la digestibilidad de las dietas, disminuye la carga de contaminación generada por los desechos animales y reduce los costos de producción durante la crianza (Souza *et al.*, 2014).

La utilización de los aditivos enzimáticos en la alimentación animal es una opción prometedora desde el punto de vista económico, ambiental y sostenible (Asmare 2014). Esta estrategia ofrece nuevas oportunidades en el mercado para cultivos como la canola, el girasol y el algodón, al favorecer el aprovechamiento de las propiedades nutricionales de estas fuentes alternativas de alimento animal (Souza *et al.*, 2014).

Según McDonald *et al.* (2010) el empleo de estos productos se dirige a solucionar dos problemas fundamentales. En primer lugar mejorar la disponibilidad de polisacáridos, lípidos y proteínas, los cuales se encuentran protegidos de las

enzimas digestivas por estructuras impermeables de la pared celular de las plantas y en segundo degradar materiales que interfieren en la digestión, absorción y utilización de nutrientes.

García (2000), recomendó la adición de enzimas de origen microbiano con actividad  $\beta$ -glucanásica y xilanásica con la finalidad de incrementar el valor nutritivo de los cereales ricos en PNA. Esta estrategia permite la ruptura de  $\beta$ -glucanos y xilanos, lo cual evita los inconvenientes que se derivan de la presencia de los mismos.

Lagunas *et al.*, (2006) comprobaron experimentalmente, que la aplicación de un extracto enzimático con actividad xilanasa y mananasa en la alimentación de pollos de engorde, favoreció la digestión de la fracción hemicelulósica, lo que permitió una mayor digestión de algunos nutrientes, incluidos lípidos y proteínas. Al degradarse, parte de la hemicelulosa que pudiera encapsular parcialmente algunos de los nutrimentos, se favorece la acción de otras enzimas digestivas, como lipasas, proteasas y amilasas.

Los aditivos enzimáticos ejercen sus efectos a través de acciones directas sobre los alimentos, antes de que estos sean consumidos o a partir de modificaciones de los procesos digestivos de los animales en los cuales se aplican (Carro *et al.* 2006). Estos productos se utilizan para mejorar el valor nutricional del alimento animal, incrementar la utilización de los nutrientes de dietas basadas en cereales para pollos y cerdos y en el pre tratamiento de la biomasa lignocelulósica y de los forrajes, (Sharma y Chand, 2012; Soroor *et al.*, 2013).

Se conoce, además, que la utilización de enzimas puede mejorar el balance microbiano y la salud intestinal. La adición de enzimas capaces de degradar los componentes de la pared celular puede incrementar la utilización de los carbohidratos y producir sustancias prebióticas que resultan beneficiosas para las bacterias, mientras que las proteasas pueden disminuir las proteínas indigestibles y

reducir los sustratos para las bacterias patógenas (Walsh *et al.*, 2013; Murugesan *et al.*, 2013).

## **2.5. Efectos de la utilización de enzimas en los parámetros productivos y de salud de los animales.**

Entre los modos de acción de las enzimas propuestos se destaca i) la hidrólisis de enlaces químicos específicos en los alimentos que no son degradados lo suficiente por las enzimas endógenas de los animales; ii) la eliminación del efecto de encapsulación de nutrientes de los polisacáridos de la pared celular y por tanto aumenta la asimilación de almidón, aminoácidos y minerales; iii) hidroliza factores antinutricionales presente en muchos alimentos; iv) solubiliza los polisacáridos no amiláceos insolubles para una mejor fermentación intestinal y así mejorar la utilización de energía y v) complementación de enzimas (por ejemplo amilasas, proteasas, lipasas) en animales jóvenes debido a la inadecuada producción de enzimas endógenas de su sistema digestivo (Kiarie *et al.*, 2017).

La adición de enzimas como fitasas, carbohidrasas y proteasas a la dieta de monogástricos, generó un gran interés en los últimos años. Esta práctica repercutió positivamente en los indicadores productivos de estas especies animales (Asmare, 2014). Aunque debe considerarse que los efectos observados dependen en gran medida de factores como de los ingredientes utilizados en la alimentación, la especie, la edad, el sexo de los animales en los cuales se apliquen y el tipo de enzima empleado (Bedford y Cowieson, 2010).

Numerosos estudios han demostrado que el suministro de dietas suplementadas con xilanasas exógenas, frecuentemente produce mejoras en el crecimiento y el índice de conversión de las aves tratadas. Estos estudios se han realizado en dietas basadas en cereales como el trigo, la cebada, el maíz y la harina de soja (Dudley-Cash, 2014).



La aplicación de una combinación de enzimas que hidrolizan los PNA como xilanasas,  $\beta$ -D-glucanasas, mananasas y peptinasas, provocó un aumento del rendimiento en pollos. Este efecto está relacionado con una mayor ingestión de alimentos y una mejora en la conversión alimenticia que conllevó a elevar la ganancia en peso de los animales (Nikam 2017). Cortés *et al.*, (2002) demostraron experimentalmente que la adición de un complejo de enzimas con actividad alfa-amilasas, xilanasas y proteasas en dietas prácticas estándares y con bajo contenido de proteína cruda (3%) y energía metabolizable a base de maíz y sorgo más pasta de soya, mejoraron la ganancia de peso y la conversión alimentaria en pollos de engorde.

La adición de mananasas a dietas basadas en maíz y harina de soya para la alimentación de cerdos en crecimiento, mostró efectos positivos como la reducción del número de bacterias coliformes fecales y una tendencia a disminuir la emisión de  $\text{NH}_3$  de las heces después de 24 h de fermentación (Upadhaya *et al.* 2016).

En esta especie se comprobó que la adición de xilanasas tuvo efectos positivos en el crecimiento y la calidad de la canal. Se demostró además que la suplementación moderada con esta proteína redujo la emisión de gases en los animales tratados, por lo que podría recomendarse para reducir el efecto odorífero del estiércol porcino (O'Shea, *et al.*, 2014).

El uso de una combinación de productos multienzimáticos con preparados microbianos que contienen *Bacillus* mejoró el bienestar animal y redujo las lesiones en las patas en pollos. También incrementó la eficiencia de la producción, la ingestión de alimentos y la ganancia de peso en la fase final de la crianza (Dersjant, *et al.*, 2015).

Los oligosacáridos de mananos tienen interés prebiótico (Yamabhai *et al.*, 2016 y Zuluaga *et al.*, 2017). Sus efectos como promotores de la salud y el crecimiento

animal se han comprobado en diferentes especies animales como pavos, pollos y bovino (Yamabhai *et al.*, 2016 y Seo *et al.* 2016).

Otros ejemplos que demuestran los efectos beneficiosos de la suplementación de enzimas sobre los indicadores productivos de diferentes especies animales se resumen en la tabla 1.

**Tabla 1.** Efecto de la suplementación enzimática en diferentes especies animales.

Enzimas	Especie animal	Efecto	Fuente
Mezcla de enzimas fitasa, xilanasas, celulasas, proteasas y amilasas	Gallinas ponedoras	Mejora el coeficiente de retención del tracto del extracto etéreo y la actividad de proteasas y lipasas en la digesta jejunal y duodenal.	Weng <i>et al.</i> , (2012)
Celulasa y xilanasas	Ovinos	Incremento de la digestibilidad de la materia seca y ganancia de peso	Arce-Cervantes <i>et al.</i> , 2013
$\beta$ -mananasa	Cerdos en crecimiento	Mejoras en el crecimiento y en la digestibilidad.	Kim <i>et al.</i> , (2013)

<p>Aditivo enzimático con actividad xilanasa, glucanasa y manasa</p>	<p>Pollos</p>	<p>Mejora de la salud, atenuación del retardo del crecimiento en pollos desafiados con <i>Cloustridium perfringens</i>.</p>	<p>Sun <i>et al.</i>, (2015)</p>
<p><math>\beta</math>-mananasa</p>	<p>Novillas</p>	<p>Incremento del crecimiento y de la eficiencia de la alimentación.</p>	<p>Seo <i>et al.</i>, (2016)</p>

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Preparación del extracto enzimático.**

##### **3.1.1. Cultivo microbiano.**

Se empleó la cepa *Bacillus subtilis* E44 aislada en el Laboratorio de Microbiología, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas (conservada a -30 °C en glicerol).

##### **3.1.2. Medio de cultivo.**

Solución mineral: Se empleó un medio de cultivo optimizado para la producción del extracto enzimático a partir de *Bacillus subtilis* E44. Se empleó como fuente de carbono el bagazo de caña de azúcar. La solución nutritiva utilizada está compuesta por (%): NaCl, 0,1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,3; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,6; MgSO<sub>4</sub>, 0,12; NH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,34 y KNO<sub>3</sub>, 0,12 y urea, 0,54. El pH se fijó a 7,5 con KOH 0,1M. Para ajustar el volumen a usar se utilizaron volumétricos de 500ml.

##### **3.1.3. Preparación del bagazo de caña**

Se pesaron 10 g de bagazo de caña de azúcar, procedente del CAI "René Fraga Moreno". Se molieron a un tamaño máximo de partícula de 2 mm, en un molino de martillos tipo Fritsch modelo GmbH. Se esterilizaron a 121 °C durante 15 min. Posteriormente se colocaron en la estufa a 60 °C durante 48 h para eliminar completamente la humedad.

##### **3.1.4. Composición química del bagazo de caña de azúcar.**

El porcentaje de celulosa y hemocelulosa se determinó siguiendo la técnica secuencial descrita por (Van Soest *et al.*, 1991), según las modificaciones propuestas por (ANKOM, 1998). Para la cuantificación del nitrógeno se utilizó el método Kjeldahl (AOAC, 1999). El contenido de proteína bruta se obtuvo multiplicando el contenido en nitrógeno obtenido por el factor de conversión 6,25.

### 3.1.5. Fermentación en estado sólido (FES).

El inóculo se preparó en 50 ml de caldo nutritivo, a partir de células de *Bacillus subtilis* E44 conservadas en cuñas de agar nutritivo a 4°C. Se incubó en zaranda a 28°C a 110 rpm, durante 16 h hasta obtener una densidad óptica del cultivo ( $D.O_{600nm} = 0.8-1.0$ ) equivalente a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml.

La fermentación se realizó en Erlenmeyer de 2 L de capacidad que contenían 10 g del bagazo previamente esterilizado y seco. Se añadió 1,5 ml del inóculo y 6.5 ml de la solución mineral. La humedad final de la FES fue de 80%. Se colocó una cubierta de gasa a los Erlenmeyer y se colocaron en incubadora a 33 °C durante 24 horas (figura 4).



**Figura 3.** Desarrollo de la fermentación en estado sólido de *Bacillus subtilis* E44 sobre bagazo de caña de azúcar.

### 3.1.6. Extracción del extracto enzimático.

Para extraer el extracto enzimático se añadió agua destilada estéril (relación 1:20 con el sustrato) a los Erlenmeyers donde se efectuó la FES (figura 4). Se colocaron en zaranda a 110 rpm durante 50 min. Posteriormente se filtró por gasa y se centrifugó a 10 000 rpm, durante 10 min a 4 °C. Para disminuir la contaminación microbiana la solución se filtró por una membrana de 0,2  $\mu m$  y se conservó a 4°C.



**Figura 4.** Extracción del extracto enzimático después de 24 h de fermentación.

### **3.2. Determinaciones analíticas.**

#### **3.2.1. Actividad xilanasa.**

La actividad xilanasa se determinó según método descrito por Bailey *et al.*, 1992. La producción de azúcares reductores por acción de la enzima se cuantificó a través de una curva de calibración de xilosa. Una unidad internacional (UI) de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima capaz de producir 1  $\mu\text{mol}$  de xilosa por minuto.

#### **3.2.2. Actividad mananasa.**

La actividad mananasa se determinó según método descrito por Bailey *et al.*, 1992. Una UI de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima capaz de producir 1  $\mu\text{mol}$  de manosa por minuto.

### **3.2.3. Actividad endoglucanasas.**

Se determinó según método descrito por Bailey *et al.*, 1992. Una unidad UI de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima capaz de producir 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa por minuto.

### **3.2.4. Actividad amilasa.**

Se determinó al incubar 100  $\mu\text{l}$  del extracto enzimático con 400  $\mu\text{l}$  de una disolución de almidón al 1%, disuelta en tampón acetato 0.1 mol/L<sup>-1</sup>, pH 5.5 durante 10 min a 50 °C. Una UI de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima capaz de producir 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa por minuto.

### **3.2.5. Actividad proteasa.**

Se determinó utilizando el método de la azocaseína al 0.5% (p/v) disuelta en tampón Tris/HCL, 0.1 mol/L<sup>-1</sup>, pH 9.0. Se añadieron 150  $\mu\text{l}$  del extracto enzimático y se incubaron en baño termostado durante 30 min a 37 °C. Después de la incubación, se añadió 1,2 ml de ácido tricloacético 10% (v/v) para detener la reacción, la disolución se neutralizó con 0,8 ml de NaOH 1,8 mol/L<sup>-1</sup> y se leyó la absorbancia a 420 nm contra un blanco sin extracto enzimático. Una UI de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce una diferencia unitaria entre el blanco y la muestra por minuto bajo las mismas condiciones de ensayo.

### **3.2.6. Determinación del contenido de azúcares reductores.**

La determinación de los azúcares reductores se realizó mediante el método descrito por Miller, 1959. Después de realizar la actividad enzimática de xilanasas, mananasas, endoglucanasas y amilasas, la reacción se detuvo al añadir 0.5 ml del reactivo DNSA e incubar los tubos de ensayos a 100 °C durante 10 min, se añadió 1.2 ml de agua destilada y se leyó la DO=546 nm en el colorímetro. La cantidad de

azúcares reductores producidos se calculó a partir de la construcción de una curva patrón a concentraciones conocidas de xilosa, manosa y glucosa.

### 3.3. Efecto del extracto enzimático en una dieta para pollitas de reemplazo de ponedoras.

#### 3.3.1. Composición de la Dieta

Se elaboró una dieta para pollitas de reemplazo de ponedoras. Su composición se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.** Composición de la dieta para pollitas de reemplazo de ponedora.

Componentes de la dieta	(%)
Maíz	56.00
Soya	14.15
Salvado de Trigo	26.00
Fosfato monocálcico	1.25
Carbonato de calcio	1.60
Sal común	0.30
DL Metionina	0.17
Lisina	0.10
Colina	0.13
Premezcla vitaminas <sup>(1)</sup> –minerales <sup>(2)</sup>	0.30
<b>Aporte de nutrientes calculado</b>	
Proteína Bruta	14.55
Energía Metabolizable (MJ/kg)	2 760
Fibra bruta	4.07
Fósforo disponible	0.41
Calcio	0.91

(1) Suplemento vitamínico: vitamina A, 10000 UI; vitamina D3, 2000 UI; vitamina E, 10 mg; vitamina K3, 2 mg; tiamina, 1 mg; riboflavina, 5 mg; piridoxina, 2 mg; vitamina B12, 15.4 µg; ácido nicotínico, 125 mg; pantotenato de Ca, 10 mg; ácido fólico, 0.25 mg; biotina, 0.02 mg.

(2) Suplemento mineral: selenio, 0.1 mg; hierro, 40 mg; cobre, 12 mg; zinc, 120 mg; magnesio, 100 mg; iodo, 2.5 mg; cobalto, 0.75mg.



### **3.3.2. Efecto del extracto enzimático sobre una dieta de pollitas de reemplazo.**

El experimento se realizó con un diseño completamente aleatorizado. Se evaluaron dos tratamientos: dieta tratada con enzimas (E) y el control, la dieta sin enzimas (SE).

Se utilizaron tubos ependorff que contenían 0,1 g de dieta. La dosis de enzima aplicada en E fue de 500 UI.g<sup>-1</sup> disueltas en 0.150 ml de agua destilada estéril. En el control (SE) se adicionó igual cantidad de agua destilada.

Los tubos se incubaron a 45 °C y las muestras se retiraron a los tiempos: 2, 4 y 6 horas. La extracción de los productos de la hidrólisis se realizó al adicionar 0,5 ml de agua destilada a cada tubo ependorff. Se colocaron en zaranda durante 30 min. y posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se utilizó para determinar los azúcares reductores producidos.

Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

### **3.4. Análisis estadístico.**

Para el análisis estadístico se realizó análisis de varianza según diseño completamente aleatorizado en arreglo factorial (3\*4), se aplicó dócima de Duncan (1955), para  $P < 0,05$ . Los procedimientos estadísticos se realizaron en el Software estadístico InfoStat, 2012 (Di Rienzo, 2012).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. Preparación del extracto enzimático

La producción de enzimas es un campo que está en continuo crecimiento en el área de la biotecnología con ventas anuales en el mundo de hasta dos billones de dólares aproximadamente (Greiner y Konietzny, 2006). La tendencia actual consiste en reemplazar algunos procesos químicos tradicionales por procesos biotecnológicos que impliquen microorganismos y/o enzimas.

Una alternativa interesante para la producción de enzimas es su obtención a partir de la fermentación en estado sólido. Esta técnica constituye una opción menos agresiva para el medio ambiente y más rentable al utilizar residuos agroindustriales como sustratos para el crecimiento microbiano (Couto y Sanroman, 2006). De esta forma, subproductos como los residuos de frutas y verduras, cortezas de árboles, cáscaras de frutos secos, salvado de trigo, cáscara de café y bagazo de caña de azúcar se han empleado con estos fines (Díaz, 2009).

En la presente investigación se utilizó el bagazo de caña de azúcar como sustrato para obtener enzimas hidrolíticas. Este es un subproducto de la industria azucarera. Anualmente se colectan grandes volúmenes del mismo en el mundo, llegando a alcanzar producciones de aproximadamente 1 287 millones de toneladas de este desecho (Melati *et al.*, 2017).

En muchos países el bagazo se utiliza en la generación de electricidad y calor (Knob *et al.*, 2014). Varios autores también refieren su empleo como sustrato para la obtención de enzimas xilanolíticas a partir de bacterias del género *Bacillus* (Gupta y Kar, 2008; Kumar *et al.*, 2010 e Irfan *et al.*, 2012). Esta estrategia puede

considerarse una alternativa económica y ecológica para la obtención de estas proteínas y su posterior aplicación en la nutrición animal en Cuba.

#### **4.1. Determinación de las enzimas presentes en el extracto obtenido de *Bacillus subtilis* E44.**

##### **4.1.1. Evaluación de endoxilanasas, endoglucanasa y mananasas en el extracto enzimático.**

La capacidad de un microorganismo para crecer en sustratos lignocelulósicos está directamente relacionada con la producción de diferentes enzimas que actúan sinérgicamente para degradar la pared celular hasta la despolimerización de la compleja estructura del mismo (Siqueira *et al.*, 2010 y Moreira *et al.*, 2012). En la obtención de estas macromoléculas se emplean varias especies microbianas, dentro de las que se destaca el género *Bacillus* (Kim *et al.*, 2017).

La cepa *Bacillus subtilis* E44 mostró características potenciales para su empleo en la elaboración de probióticos (Milián, 2009) y se usó en la producción de un hidrolizado de destilería obtenido de la pared celular de las levaduras (Pérez, 2000). Teniendo en cuenta estas razones y sus potencialidades para producir enzimas que podrían utilizarse como aditivos en la alimentación animal, se cuantificaron algunas de las hidrolasas producidas por esta bacteria durante la FES a partir del bagazo de caña de azúcar (tabla 3).

Entre las enzimas producidas por el microorganismo al crecer en un medio lignocelulósico como el bagazo, se destaca, por los elevados valores de actividad, las xilanasas; seguidas por mananasas y endoglucanasa. Este resultado está en correspondencia con lo planteado por Yamabhai *et al.*, (2014), quienes consideran que los productos finales del proceso de fermentación dependen en gran medida de

la composición lignocelulósica del sustrato y difieren entre las especies microbianas utilizadas.

**Tabla 3.** Enzimas presentes en el extracto de *Bacillus subtilis* E44.

Enzima	Sustrato	Actividad enzimática (UIg <sup>-1</sup> )
Endoxilanasas (EC 3.2.1.8)	Xilano de abedul	259.70
Mananasas (EC 3.2.1.7.8)	Galactomanano	62.02
Endoglucanasas (EC 3.2.1.4)	Carboximetil celulosa	30.06

En la literatura consultada se informa la utilización de varios residuos agroindustriales para producir enzimas hidrolíticas a partir de bacterias del género *Bacillus* y su aplicación en la FES. Se obtuvieron endoxilanasas a partir del uso de salvado de trigo (Phadke y Monmin, 2015) y mananasas con el empleo de torta de harina de palma (Siti-Noritaac *et al.* 2015). También se destaca la utilización del bagazo de caña de azúcar para la producción de estas proteínas (Zhao, *et al.*, 2013; Cunha *et al.*, 2014; Batalha *et al.*, 2015), debido a la composición química de este sustrato (tabla 4).

La caracterización del bagazo utilizado como sustrato en este ensayo es similar a la informada en la literatura. Batalha *et al.*, (2015), notificaron 40.6% de hemicelulosa (referidos a la molécula de xilano) y 20.9% de celulosa (referidos a la molécula de glucano). Estos valores son ligeramente más bajos que los mostrados en la presente investigación. La composición de este subproducto puede variar debido a la influencia de factores como la variedad de caña de azúcar, la época de plantación del cultivo, el procedimiento para la cosecha, los métodos post cosechas empleados, así como los métodos analíticos aplicados (Amores *et al.*, 2013).

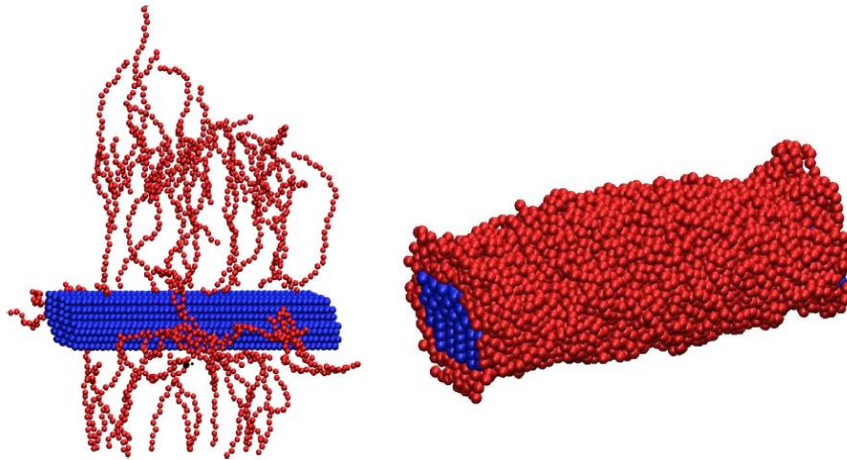
**Tabla 4.** Composición química del bagazo de caña de azúcar.

	<b>Celulosa</b>	<b>Hemicelulosa</b>	<b>Lignina</b>	<b>Proteína Bruta (%)</b>
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	
<b>Bagazo de caña de azúcar</b>	42,22	33,95	13,44	2,00

El bagazo de caña se utilizó en la FES sin tratamiento previo, lo que concuerda con los criterios de Rahnama *et al.*, (2013) quienes evaluaron la producción de endoxilanasas y endoglucanasa a partir de paja de arroz pretratada con alcali y sin tratar. Los mejores valores de actividad enzimática se obtuvieron al emplear el sustrato sin procesar. La integridad de la estructura de la pared celular favorece la mayor producción de enzimas capaces de degradar todos sus componentes.

En el bagazo de caña de azúcar, la celulosa ocupa mayor porcentaje que las hemicelulosas (tabla 4). No obstante, en el extracto enzimático las endoxilanasas mostraron valores superiores de actividad al compararlas con las endoglucanastas. Estos resultados podrían estar relacionados con la distribución de las cadenas de celulosa y hemicelulosa que forman la pared celular de las plantas. Li *et al.*, (2015) construyeron un modelo que describe la adsorción del xilano a la cadena de celulosa cristalina (figura 5).

En la imagen obtenida a través del mismo, se muestran los residuos de xilanos que envuelven a las miofibrillas de celulosa; de esta manera la molécula de xilano queda expuesta hacia el exterior lo cual favorece el reconocimiento por parte del microorganismo y repercute en el incremento de la producción de la enzima (Li *et al.*, 2015). Es importante destacar que el xilano es un polisacárido muy abundante en la naturaleza y constituye uno de los componentes principales de la pared celular de las plantas que se destinan a la alimentación animal (Kamble y Jadhav, 2012).



**Figura 5.** Imagen del modelo que representa la formación del complejo entre celulosa y xilano. En azul, la celulosa y en rojo el xilano. La imagen izquierda representa estructura cristalina de la celulosa rodeada por 50 cadenas de xilano. A la derecha, aproximadamente 200 cadenas de xilano envolviendo la celulosa (Tomado de Li *et al.*, 2015).

Las  $\beta$ -mananasas, detectadas en el extracto enzimático, alcanzan valores de actividad superiores a las endoglucanasa y menores que las endoxilanasas. Las  $\beta$ -mananasas se consideran enzimas inducibles y necesitan sustratos ricos en galactomananos para su expresión, los cuales actúan como inductores de las enzimas (Kim *et al.*, 2011).

Estas proteínas hidrolizan los restos de mananos presentes en la pared celular de las plantas. Los mananos se encuentran entrecruzadas entre las miofibrillas de celulosa (Scheller, 2010). Este polisacárido se considera después del xilano, la hemicelulosa más importante y representativa.

Otra de las actividades enzimáticas presentes en el extracto son las endoglucanasas, las cuales alcanzaron valores de  $30,06 \text{ UIg}^{-1}$  (tabla 3). Esta enzima actúa sobre los enlaces  $\beta$  (1,4) glucosídicos de las regiones amorfas de la molécula de celulosa, disminuye la longitud de la cadena de celulosa y proporciona la formación de extremos reactivos que sirven de sustrato para la acción posterior de la  $\beta$  (1,4) exoglucanasa que corta la cadena a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa hasta obtener unidades de celobiosa y glucosa (Ryu y Mandels, 1980).

De forma general, las enzimas producidas por la cepa utilizada, se sintetizan para degradar el bagazo de caña y obtener las fuentes de carbono para su crecimiento. Tal como se informó por otros autores, *B.subtilis* E44 es capaz de crecer en un hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (Palladino, 2008). En ese caso el mejor crecimiento de este microorganismo se evidenció al emplear la glucosa, seguido de la xilosa y posteriormente el hidrolizado como sustrato.

#### **4.2. Evaluación de otras enzimas presentes en el extracto enzimático.**

En el acápite anterior se demostró la capacidad de la cepa E44 para sintetizar enzimas endoxilanasas, endoglucanasas y mananasas. Sin embargo, estas no son las únicas enzimas extracelulares producidas durante la fermentación. En el extracto enzimático se determinó además la presencia de amilasas y proteasa (tabla 5).



**Tabla 5.** Actividad de otras enzimas en el extracto enzimático obtenido durante la FES de *Bacillus subtilis* E44 sobre bagazo de caña de azúcar.

Enzima	Sustrato	Actividad enzimática (UIg <sup>-1</sup> )
Amilasas	Almidón	84.46
Proteasas	Azocaseína	0.70

La actividad amilasa determinada en el extracto fue de 84,46 UIg<sup>-1</sup>. Estas proteínas participan en la degradación del almidón (Maity *et al.*, 2015). Entre sus múltiples aplicaciones industriales, se destaca la alimentación animal. La adición de las mismas a dietas de maíz y soya en la alimentación de aves, conjuntamente con enzimas que degradan los polisacáridos no amiláceos, mejoró la asimilación de nutrientes al disminuir la viscosidad de la digesta (Munir y Maqsood, 2013; Stefanello *et al.*, 2016).

En cuanto a la actividad proteolítica de la cepa no se registran actividades significativas (0,70 UIg<sup>-1</sup>). Este hecho debe estar relacionado con la composición química del medio de crecimiento empleado el cual no favorece la producción de las proteasas. Resultados similares se informaron por Palladino (2008), al emplear la cepa E44 en un medio formulado a partir de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar y no detectó la presencia de estas proteínas. Mientras que Pérez (2007), empleó la misma cepa, para producir proteasas en un medio formulado a base de peptona bacteriológica, extracto de carne, extracto de levadura y NaCl para hidrolizar las paredes celulares de las levaduras.

En este caso debe tenerse en cuenta que las proteasas son enzimas asociadas al crecimiento microbiano, razón por la cual se detectan en el extracto. La baja actividad proteolítica en este producto puede considerarse como una posible ventaja, ya que disminuye el riesgo que representa la posible degradación de las enzimas del extracto por la acción de estas enzimas.

Los resultados obtenidos en este experimento muestran la capacidad de *Bacillus subtilis* E44 para producir un extracto enzimático con actividades endoxilanasas, endoglucanasas, mananasas y amilasas durante la fermentación del bagazo de caña de caña de azúcar. Las enzimas presentes en el extracto se aplican para incrementar la eficiencia de la alimentación y mejorar los indicadores productivos de especies monogástricas (Weng *et al.*, 2012 y Sun *et al.*, 2015).

#### **4.3. Acción del extracto enzimático sobre el mejoramiento de una dieta de pollitas de reemplazo de ponedoras.**

La producción de azúcares reductores en función de glucosa, xilosa y manosa, se evaluó en el tiempo en dietas tratadas con enzimas (E) y sin tratar (SE). La adición del extracto enzimático de *B.subtilis* E44, incrementó significativamente ( $P<0.05$ ) la producción de azúcares reductores respecto al tratamiento control (figura 6).

La liberación de glucosa, xilosa y manosa se incrementó gradualmente con el tiempo en el tratamiento E (31.97 mg.g<sup>-1</sup>, 24, 88 mg.g<sup>-1</sup> y 27,37 mg.g<sup>-1</sup> respectivamente) con respecto al control. El mejor tiempo de incubación coincide con las 6 h, con diferencias significativas para la glucosa con respecto a xilosa y manosa. A las 2 h se produce más glucosa y manosa que xilosa, mientras que a las 4 h no se aprecian diferencias significativas en la liberación los tres monosacáridos.

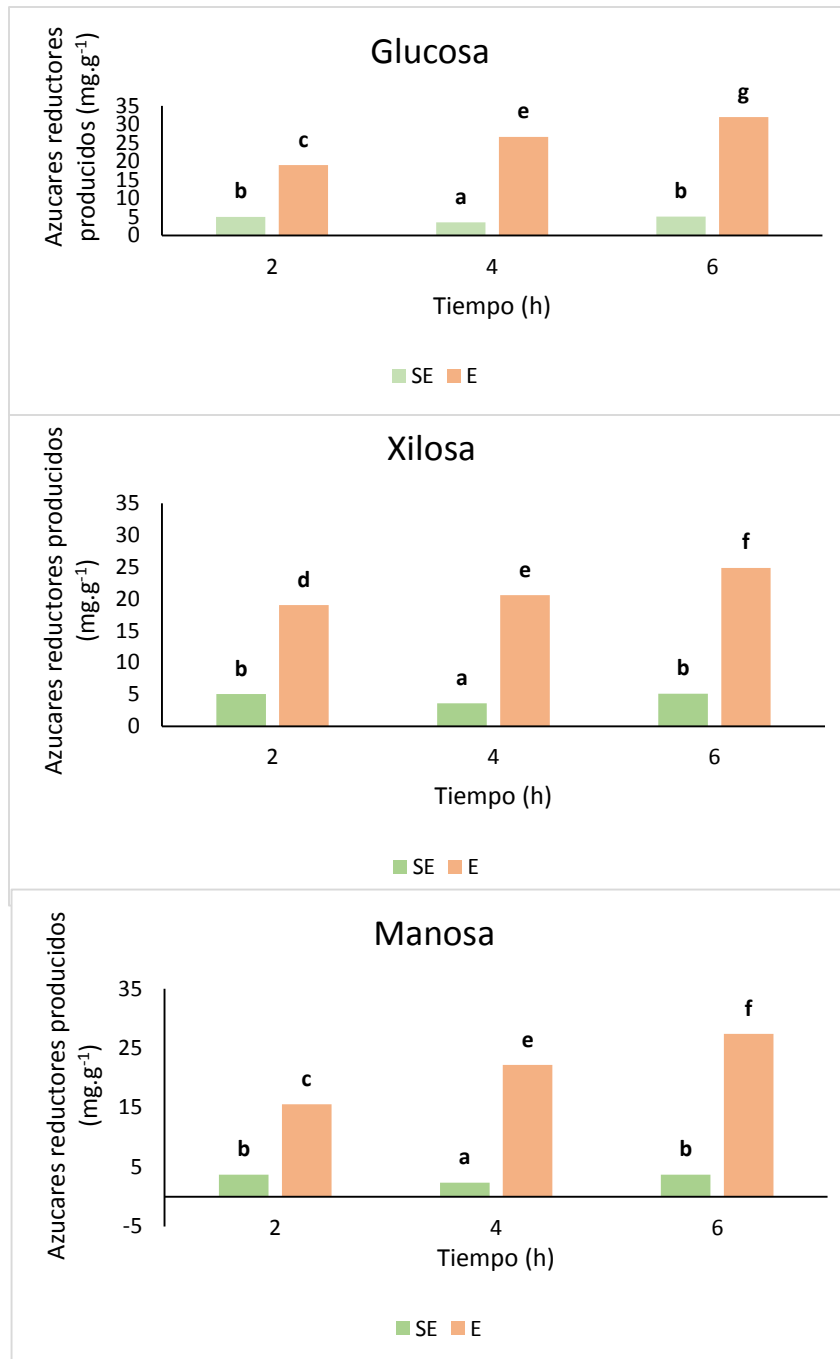
Las diferencias obtenidas en la producción de los monosacáridos por acción de las enzimas del extracto, podrían estar asociados a la naturaleza de los sustratos

presentes en la dieta (Díaz *et al.*, 2015). La composición química de las paredes celulares y la distribución de los polímeros celulosa y hemicelulosa del maíz, la soya y el salvado de la dieta difieren entre sí (Li *et al.*, 2015).

Los valores elevados de glucosa se deben a la acción de las enzimas amilasa y celulasas. El almidón es el polisacárido de reserva más abundante en las plantas. En el maíz alcanza aproximadamente un 70% del peso seco (Tang *et al.*, 2014). La amilasa, presente en el crudo, produce dextrina, maltosa y glucosa, mientras que las endoglucanasas, generan oligosacáridos de distintas longitudes; lo que implica la formación de nuevos extremos reductores.

La acción combinada con las  $\beta$ -glucosidasas y exoglucanasas conllevan a la degradación completa hasta la glucosa (Guerrero, 2011). Por otra parte, la xilosa y manosa se producen por acción de las endoxilanasas y mananasas respectivamente. Estos monosacáridos se obtienen solo por hidrólisis de la hemicelulosa la cual se encuentra en menor cuantía en las plantas respecto a la celulosa.

Resultados similares se obtuvieron durante experimentos realizados en tallos de maíz, con enzimas endoxilanasas y endoglucanasas. Se demostró que a las tres horas, se convierte la celulosa en glucosa en un 90%, mientras que la liberación de xilosa fue de 60% (Sipponen *et al.*, 2014).



**Figura 6.** Azúcares reductores medidos en función del contenido de glucosa, xilosa y manosa en las dietas tratadas con enzimas (E) y sin enzimas (SE)

En la actualidad se reconocen las ventajas de la aplicación de los cocteles enzimáticos en comparación con las enzimas purificadas. Los resultados obtenidos en este experimento se corresponden con los informados por varios autores al aplicar enzimas solas o combinadas con otras, sobre sustratos similares (Panwar *et al.*, 2014; Kallela *et al.*, 2015; Pedersen *et al.*, 2015). En este análisis debe tenerse en cuenta que los complejos estructurales presentes en las dietas no están aislados sino enlazados a proteínas, fibras y otros carbohidratos complejos (Kiarie *et al.*, 2013).

Se ha comprobado experimentalmente que la aplicación de complejos enzimáticos con actividad endoxilanasas en dietas que contienen trigo incrementa la energía utilizable. La liberación de xilosa y arabinosa en el intestino delgado podría tener un efecto promotor del crecimiento en las aves (Zhang *et al.*, 2014).

La adición de enzimas  $\beta$ -mananasa a la dieta favorece la formación oligosacáridos de manano, compuestos que tienen interés prebiótico (Yamabhai *et al.*, 2016 y Zuluaga *et al.*, 2017). Sus efectos como promotores de la salud y el crecimiento animal se comprobaron en la crianza aviar (Yamabhai *et al.*, 2016).

Las enzimas obtenidas en el extracto al aplicarse a la dieta formulada, propiciaron la degradación de los polisacáridos de la pared celular de los componentes vegetales contenidos en la misma y produjeron una gran variedad de oligosacáridos de cadena corta y en muchos casos monómeros simples. De forma general, se incrementó hasta 6.4 veces las cantidades de azúcares reductores después del tratamiento de la dieta con el extracto enzimático a las 6 h.

Los resultados indican el alto potencial de las enzimas producidas por *Bacillus subtilis* E44 para degradar, *in vitro*, el contenido de fibra presente en la dieta y liberar los componentes de las paredes celulares del maíz, la soya y el salvado de trigo. Los cereales que se caracterizan por su elevado contenido factores antinutricionales

para las especies monogástricas. El pretratamiento de las dietas suministradas a los animales con enzimas incrementa el valor energético y nutricional de los alimentos, lo cual favorece el mejoramiento de los indicadores productivos en estas especies (Ravindran, 2013).

Otro de los efectos beneficiosos que puede esperarse de la aplicación de este extracto enzimático en la alimentación de especies monogástricas consiste en la producción de fragmentos de arabinosilanos (AXOS). Estos compuestos no pueden asimilarse por el animal y atraviesan el intestino delgado para acumularse en el intestino distal y el ciego, principal sitio de actividad de la microflora. Según los resultados obtenidos en diferentes investigaciones los AXOS poseen potencialidades para actuar como prebióticos (Aachary y Prapulla, 2011; Kiarie *et al.*, 2013).

Por otra parte, varios estudios demostraron que la adición de endoxilanasas tiene un efecto beneficioso sobre la microflora que se encuentra a nivel del intestino delgado de las aves (Adeola y Cowieson, 2011). Otra de las consecuencias descritas en estas investigaciones está relacionada con la reducción de la viscosidad del contenido intestinal provocada por la acción de esta proteína que acelera la velocidad del tránsito intestinal y disminuyen las posibilidades de las bacterias para implantarse en este órgano. Este mecanismo resulta de gran interés si se tiene en cuenta que en el extracto enzimático obtenido se cuantificaron  $259.70 \text{ UIg}^{-1}$  de endoxilanasas.

Nian *et al.*, (2011) mostraron que la adición de endoxilanasas a una dieta con 75 % de trigo aumentaba las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos en el ciego de pollitas con 30 días de edad. Este efecto se asocia a la presencia de los oligosacáridos de cadena corta producidos por la acción de la enzima. Favorecer el crecimiento de estas bacterias en el tracto gastrointestinal distal, se considera

beneficioso debido a que estos géneros bacterianos poseen actividad antagonista frente a *Salmonella* y *Campylobacter* (Vandeplas *et al.*, 2010) agentes etiológicos que frecuentemente causan enfermedades en la avicultura.

Los estudios realizados por Vandeplas *et al.* (2009) demostraron que al añadir endoxilanasas de obtenida de *Bacillus subtilis* E1606 a una dieta con trigo, se reduce la infección causada por *Salmonella typhimurium*, en el tracto digestivo de pollitas infectadas.

#### **4.4. Valoración cualitativa del impacto económico-medioambiental**

La producción de enzimas es un campo que está en continuo crecimiento en el área de la biotecnología con ventas anuales mundiales de millones de dólares. Una de las ventajas de la aplicación de las estas proteínas es que constituye una alternativa menos agresiva para el medio ambiente y son más rentables desde el punto de vista económico.

La aplicación de las enzimas en la producción animal se ha convertido en una práctica común debido a la posibilidad de emplear alimentos de bajo valor nutricional. En Cuba, la aplicación de estos en la producción animal, se ve limitada debido a los elevados precios en el mercado internacional. La obtención de un extracto enzimático a partir de microorganismos beneficiosos y fuentes renovables, garantiza una reducción del costo de producción de estas proteínas.

La aplicación de enzimas en alimentos empleados en la nutrición de monogástricos mejora la disponibilidad de los monosacáridos. Estos compuestos libres son asimilados fácilmente por el animal para utilizarlos como fuente de energía, lo cual implica una mejora de los indicadores productivos en la crianza animal.

Por otra parte, los oligosacáridos libres, tales como glucomananos y arabinosilanos mejoran los indicadores de salud, ya que abastecen de compuestos con efecto

prebiótico y las enzimas exógenas permiten favorecer una flora beneficiosa con una actividad antimicrobiana en el tracto intestinal distal y el ciego, siendo éstos los sitios privilegiados de presencia de patógenos comunes en la avicultura.



## 5. CONCLUSIONES

- ✓ La cepa *Bacillus subtilis* E44 produce las enzimas endoxilanasas, endocelulasas, mananasas, amilasas y muy baja actividad proteolítica durante la fermentación en estado sólido al emplear el bagazo de caña de azúcar como fuente de carbono.
- ✓ Las enzimas del extracto evaluado demostraron su capacidad de hidrolizar la celulosa y hemicelulosa en la dieta empleada para pollitas de reemplazo de ponedoras.
- ✓ Se obtuvo 6.4 veces más azúcares reductores libres en las dietas tratadas con el extracto enzimático con respecto a las no tratadas.

## 6. RECOMENDACIONES

- ✓ Evaluar el efecto de otras dosis del extracto enzimático sobre la dieta de pollitas de reemplazo.
- ✓ Evaluar la estabilidad de las enzimas en el extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44.
- ✓ Evaluar el efecto del extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44 en otras dietas destinadas a la alimentación de monogástricos.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adeola O & Cowieson AJ. 2011. Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve non-ruminant animal production. *J Anim Sci* 89, 3189–3218
- Ahirwar, S.; Soni, H.; Rawat, H.K.; Ganaie, M.H.; Pranaw, K.; Kango, N. 2016. Production optimization and functional characterization of thermostable  $\beta$ -mannanase from *Malbranchea cinnamomea* NFCCI 3724 and its applicability in mannotetraose (M 4) generation. *J Taiwan Inst Chem Engineers*. 63:344–353.
- Alba, Diana P. 2013. Efectos nutricionales de los polisacáridos no amiláceos en pollos de engorde de la línea Ross. *Ciencia y Agricultura*.10 (1):39-45.
- Amerah, A. M.; Romero, L.F.; Awati, A.; Ravindran, V. 2016. Effect of exogenous xylanase, amylase, and protease as single or combined activities on nutrient digestibility and growth performance. *Poultry Science* 0:1–10.
- Amores, I.; Ballesteros, I.; Manzanares, P.; Sáez, F.; Michelena, G.; Ballesteros, M. 2013. Ethanol production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion. *Electron. J. Energy Environ*. 1, 25–36.
- AOAC. 1999. Official methods of analysis. Vol. 16th ed., 5th rev. Assoc. Off. Anal. Chem., Gaithersburg, MD, USA.
- Arce-Cervantes, O.; Mendoza, G.D.; Hernández, P.A.; Meneses, M.; Torres - Salado, M. & Loera, O. 2013. The effects of a lignocellulolytic extract of *fomes* sp. EUM1 on the intake, digestibility, feed efficiency and growth of lamb's animal nutrition and feed technology. 13: 363-372.
- Asmare, B. 2014. Effect of common feed enzymes on nutrient utilization of monogastric animal's. *Int. J. Biotechnol. Mol. Biol. Res*. 5 (4): 27-34.
- Batalha, L. A. R.; Han, Q.; Jameel, H.; Chang, H. min, Colodette, J. L.; & Borges Gomes, F. J. 2015. Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical

- refining. *Bioresource Technology*, 180, 97–105.  
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.060>
- Bedford, M.R. & Partridge, G. 2010. Enzymes in farm animal nutrition. 2 ND. Edition, ED. CAB International, London, UK, p .12-129.
- Bhatt, M.S.; Rajkumar, N.; 2001. Mapping of combined heat and power systems in cane sugar industry. *Applied Thermal Engineering* 21, 1707–1719
- Bosch, Assela. 1996. Enzimas en la avicultura. Selecciones avícolas. Universidad autónoma de Barcelona: 212-214.
- Brandao, M. 2003. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. Florianópolis. Tesis en opción al grado de doctor en Ingeniería Química. Universidad Federal de Santa Catarina.
- Brufau, J. 2014. Introducción al uso de las enzimas en la alimentación animal un proceso de innovación. *Nutrinews*. Noviembre: 17-21.
- Carro, M.D.; Ranilla, M.J. & Tejido, M.L. 2006. Utilización de aditivos en la alimentación del ganado ovino y caprino. *PR.3:26-31*.
- Castañeda, Cocchet.; Mercado, Yuridia.; Tellez, A.; Mendoza, A.; Anducho, M. 2017. Efectos benéficos de *Trichoderma* y su regulación de la expresión génica de celulasas y hemicelulasas. Ed. Ciencias Biológicas y de la Salud. Proceedings-©ECORFAN-México, Pachuca: 38-55.
- Chakdar, H.; Kumar<sup>1</sup>, M.; Pandiyan, K.; Singh, A.; Nanjappan, K.; Kashyap, P.L. & Srivastava, A. K. 2016. Bacterial xylanases: biology to biotechnology. *Biotech*. 6:8-15.
- Cheng, L.; Duan, S.; Feng, X.; Zheng, K.; Yang, Q. & Liu, Z. 2016. Purification and Characterization of a Thermostable  $\beta$ -Mannanase from *Bacillus subtilis* BE-91: Potential Application in Inflammatory Diseases. *BioMed. Research International*: 1-7.

- Cortés, C. A.; Águila, S. R. & Ávila, G. E. 2002. La Utilización de enzimas como aditivos en dietas para pollos de engorda. Vet. Méx. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F: 33.
- Couto, S.; Sanroman, M. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering*, 76, 291-302.
- Cunha, F. M.; Kreke, T.; Badino, A. C.; Farinas, C. S.; Ximenes, E.; & Ladisch, M. R. 2014. Liquefaction of sugarcane bagasse for enzyme production. *Bioresource Technology*, 172, 249–252. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.025>
- Dersjant -Li, Y.; Van de Belt, K.; Van der Klis, J.D.; Kettunen, H.; Rinttil, T.; Awati, A. 2015. Effect of multi-enzymes in combination with a direct-fed microbial on performance and welfare parameters in broilers under commercial production settings. *J. Appl. Poult. Res.* 24:80–90
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. 2012. INFOSTAT. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible: <http://www.infostat.com.ar>. [Consultado: 08/10/2015].
- Díaz, A. 2009. Reciclado del orujo de uva como medio sólido de fermentación para la producción de enzimas hidrolíticas de interés industrial. Tesis (en opción al grado de Doctor en Ciencias). Universidad de Cádiz. España.
- Díaz, A.; Ranilla, M. J.; Giraldo, L. A.; Tejido, M. L.; & Carro, M. D. 2015. Treatment of tropical forages with exogenous fibrolytic enzymes: Effects on chemical composition and in vitro rumen fermentation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(2), 345–355. <http://doi.org/10.1111/jpn.12175>
- Dudley-Cash, B. 2014. La respuesta de las aves a las enzimas NSP varían. *Selecciones avícolas*. Enero: 16-18.
- Fadel, M.; Keera, Abeer, Abdel-Aziz, Shadia M.; Kahil, T. 2014. Clean production of xilanase from white corn flour by *Aspergillus fumigates* F-993 under Solid State Fermentation. *World Applied Sciences Journal* 29 (3): 326-336.

- Fernández, J.I. & González, G. 2011. Polisacáridos no amiláceos y complejos multienzimáticos; como mejorar el valor nutricional de los piensos. *Selecciones Avícolas*:20-21.
- Fuller, M.F. 2004. *The encyclopedia of farm animal nutrition*. CABI Publishing.
- Gallardo Román, O. 2007. Caracterización de Nuevas Xilanasas Bacterianas. Ingeniería de Enzimas con la Xilanasas B de *Paenibacillus barcinonensis*. España. 250 h. Tesis (en opción al grado de Doctor en Ciencias Biológicas) – Universidad de Barcelona
- García, M. 2000. Evaluación de complejos enzimáticos en alimentación de pollos de engorde. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias, Universidad Politécnica de Madrid, España.
- Garg, S. 2016. Xylanase: Applications in Biofuel Production. *Current Metabolomics*.4: 23-37.
- González, E. 2004. Utilización de enzimas fibrolíticas en cabras lecheras. Evaluación de su actividad y características fermentativas in vitro. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Graham, H. y Bedford, M. 2007. Using enzymes to improve energy utilization in a animal feeds. 15<sup>th</sup> Annual ASAAM Southeast Asian Feed Technology and Nutrition Workshop. May 27-30, 2007, Conrad Bali Resort. Indonesia.
- Gray, Juliet. 2006. Definiciones. En: *Fibra dietética definición, análisis, fisiología y salud*. International Lifes Science Institute. Edición Original, ILSI Europe, Bruselas. Bélgica, p 5-8.
- Greiner, R.; Konietzny, U. 2006. Phytase for food application. *Food Technology and Biotechnology*, 44,125–140.
- Hamann, P.R.; Serpa, Dayane. Souza, Amanda.; Camargo, Brenda.; Karen Ofuji.; Valle de Sousa, Marcelo, Felix.; C.R.; Miller.; R , Noronha, Eliane F. 2015. Evaluation of plant cell wall degrading enzyme production by *Clostridium*

- thermocellum* B8 in the presence of raw agricultural wastes. International Biodeterioration & Biodegradation 105. 97-105.
- Hildén, L.; Johansson, G. 2004. Recent developments on cellulases and carbohydrate binding modules with cellulose affinity. Biotechnol Lett. 26(22):1683-93.
- Ho, H.L. 2015. Xylanase production by *Bacillus subtilis* using carbon source of inexpensive agricultural wastes in two different approaches of Submerged Fermentation (SmF) and Solid State Fermentation (SsF). J. Food Process Technol. 6: 437-446.
- Iqba, H.M.N.; Kamal, S.; Ahmed, I.; Naveed, M. 2012. Enhanced bio-catalytic and tolerance properties of an indigenous cellulase through xerogel immobilization. Advances in Bioscience and Biotechnology. 3, 308-313.
- Irfan, M.; Nadeem, M.; Syed, Q.; Baig, S. 2012. Effect of Medium Composition on Xylanase Production by *Bacillus subtilis* using Various Agricultural Wastes. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 12 (5): 561-565
- Jordan, D.; Bowman, M.; Braker, J.; Dien, B.; Hector, R.; Lee, C.; Mertens, J.; Wagschal, K. 2012. Plant cell walls to ethanol. Biochem. J. 442, 241-252. Biochemical Society.
- Kallela, F.; Drissa, D.; Bouaziza, F.; Neiferb, M.; Ghorbela, R.; & Chaabouni, S. E. 2015. Production of xylooligosaccharides from garlic straw xylan by purified xylanase from *Bacillus mojavensis* UEB-FK and their in vitro evaluation as prebiotics. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 536–546. <http://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.07.012>.
- Kamble, R.; Jadhav, A.R. 2012. Production, purification and characterisation of alkali stable xylanase from *Cellulosimicrobium* sp. MTCC 10645. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine: S1790-S1797.
- Khattak, F. M.; Pasha, T. N.; Hayat, Z. & Mahmud, Z. 2006. Enzymes in poultry nutrition. J. Anim. Pl. Sci. 16: 1-7.

- Kiarie, E.; Romero, L. F.; & Nyachoti, C. M. 2017. The role of added feed enzymes in promoting gut health in swine and poultry Nutrition Research Reviews. *Nutrition Research Reviews*, 26(2013), 71–88. <http://doi.org/10.1017/S0954422413000048>
- Kim, D.Y.; Ham, S.J.; Lee, H.J.; Cho, H.Y.; Kim, J.H.; Kim, Y.J.; Shin, D.H.; Rhee, Y.H.; Son, K.H.; Park, H.Y. 2011. Cloning and characterization of a modular GH5  $\beta$ -1,4-mannanase with high specific activity from the fibrolytic bacterium *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13. *Biores Technol* 102:9185–9192. doi:10.1016/j.biortech.2011.06.073
- Kim, M., Khan, M., Cheol, J. 2017. Antimicrobial and antioxidant peptide from *Bacillus* strain CBS73 isolated from Korean food. *J. Chosun Natural Sci.* 10 (3): 154 – 161.
- Knob, A.; Fortkamp, D.; Prolo, T.; Izidoro, S. C.; & Almeida, J. M. 2014. Agro-residues as Alternative for Xylanase Production by Filamentous Fungi. *BioResources*, 9(3), 5738–5773.
- Knob, A., S.; Beitel, D.; Fortkamp, C.; Terrasan F. Alex. 2013. Production, purification and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using Brewer's spent grain as substrate. *Bio. Med. Res. Int.*, pp: 1-8.
- Kumar, D.; Verma, R.; Sharma, P.; Rana, A.; Sharma, R.; Prakash, Ch.; Chand, T. 2010. Production and partial purification of xylanase from a new thermophilic isolate. *Biological Forum — An International Journal*, 2(2): 83-87.
- Lagunas, I.; García, Blanca E.; Castaño, E.; Regalado, C.; Ávila, E. 2006. Producción de enzimas hemicelulolíticas por fermentación sólida y su aplicación en alimento balanceado para pollo de engorde. *Vet. Méx.* 37 (1): 1-13.
- Lata, O.R. 2011. Evaluación de enzimas exógenas en la alimentación de cerdos en la etapa de crecimiento. Tesis en opción de obtener el título de Ingeniero



- Zootecnista, Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Li L.; Pérré P.; Frank X.; Mazeau K. 2015. A coarse-grain force-field for xylan and its interaction with cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 127:438-450.
- Liu, H-X.; Gong, J-S.; Li, H.; Lu, Z-M.; Li, H.; Qian, J.Y.; Xu, H.; Shi, J.S. 2015. Biochemical characterization and cloning of anendo-1, 4- mannanase from *Bacillus subtilis* YH12 with unusually broad substrate profile. *Process Biochemistry* 50:712–721.
- Loque, D.; Scheller V.H.; Pauly, M. 2015. Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel production. *Current Opinion in Plant Biology*. 25,151–161.
- Maity, S.; Mallik, S.; Basuthakur & Gupta, S. 2015. Optimization of solid state fermentation condition and characterization thermostable alpha amilase from *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). *J. Bioprocess Biotech.* 5 (4): 218- 224.
- Maki, M.; Tin, K. & Qin, W. 2009. The prospects of cellulose-producing bacteria for bioconversion of lignocellulosic biomass”. *Int J. Biol. Sci.* 5(5): 5000-513.
- Mcdonald, P.; Edwards, R.A.; Greenhalgh, J. F.D.; Morgan, C.A.; Sinclair, L.A. & Wilkinson, R. G. 2010. Food additives En *Animal Nutrition*. Seventh Edition. Pearson, p 600-602.
- Meima, R.; Van Dijn, J.M.; Holsappel, S., Bron, S. 2004. Expression systems in *Bacillus*. In *expression technologies: current status and future trends* Edited by: Baneux F. Wyndham, UK. Horizon Scientific Press.
- Melati, R.B. & Schmatz, A.A. & Pagnocca, Fernando & Contiero, Jonas & Brienzo, Michel. 2017. Sugarcane bagasse: Production, composition, properties, and feedstock potential. *Sugarcane: Production Systems, Uses and Economic Importance*. 1-38.
- Milián, G. 2009. Obtención de cultivos de *Bacillus* spp. y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos (*Gallus gallus domesticus*).

- Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba.
- Milián, Grethel.; Rondón, Ana Julia.; Pérez, M.; Bocourt, R.; Rodríguez, Marlen.; Arteaga, Fátima.; Portilla, Yadileiny, Pérez, Y.; Beruvides, A. & Laurencio, Martha. 2017. Caracterización de cepas *Bacillus subtilis* como candidatas para la elaboración de aditivos zootécnicos. Cuban Journal of Agricultural Science. 51(2): 1-8.
- Munir, K.; & Maqsood, S. 2013. A review on role of exogenous enzyme supplementation in poultry production, 25(1), 66–80. <http://doi.org/10.9755/ejfa.v25i1.9138>
- Murugesan, G. R.; I. V.; Wesley, J.; Remus, J.; Plumstead, P.W.; Persia. M.E. 2013. Effects of exogenous enzymes and direct-fed microbials supplementation on first cycle laying hen performance, energy digestibility, gut integrity and pathogen colonization. Poultry Science. 92(E-Suppl.1):11.
- Nikam, M.G.; Ravinder, V.; Raju1, M.V.L.N.; Kondal & K.; Narasimha, J. 2017. Effect of dietary supplementation of Non Starch Polysaccharide hydrolyzing enzymes on performance of broilers fed diets based on guar meal, rape seed meal and cotton seed meal. International Journal of Livestock Research. 7 (2): 2277-1964.
- Nortey, T.N.; Patience, J.F.; Sands, J.S. & Zijlstra, RT. 2007. Xylanase supplementation improves energy digestibility of wheat by-products in grower pig's. Livestock Science. 109: 96-99.
- Palladino, Fernanda. 2008. Estudio de la síntesis de enzimas por *Bacillus licheniformes* E-44 en medio formulado a base de hidrolizado hemicelulolítico de bagazo de caña de azúcar. Tesis presentada en opción al Título de Master en Biotecnología Industrial. Universidad de Sao Pablo, Brasil.
- Pangsri, P.; Pangsri, P. 2017. Mannase enzyme from *Bacillus subtilis* P2-5 with waste management. Energy Procedia .138: 343-347.

- Panwar, D., Kumar Srivastava, P., & Kapoor, M. 2014. Production, extraction and characterization of alkaline xylanase from *Bacillus* sp. PKD-9 with potential for poultry feed. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 118–125. <http://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.006>.
- Pedersen, M. B.; Dalsgaard, S.; Arent, S.; Lorentsen, R.; Knudsen, K. E. B.; Yu, S.; & Lrke, H. N. 2015. Xylanase and protease increase solubilization of non-starch polysaccharides and nutrient release of corn- and wheat distillers dried grains with solubles. *Biochemical Engineering Journal*, 98, 99–106. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2015.02.036>.
- Pérez, M. 2000. Obtención de un hidrolizado de crema de levadura de destilería y evaluación de su actividad probiótica. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Agraria de La Habana. Cuba.
- Pérez, M.; Piad, R.; Milian, G.; Felipe, M.G.; Ferreira, A.; Mancilha, I. M.; Laurêncio, M.; Silva, j. B. A. 2007. Preparation of a crude enzymatic from *Bacillus licheniformis* E-44 and its evaluation in the hydrolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 40, p. 452-455.
- Phadke, M. & Momin, Z. 2015. Application of Xylanase produced by *Bacillus megaterium* in saccharification, juice clarification and oil extraction from *Jatropha* seed kernel. *Journal of Biotechnology and Biochemistry*. V 1 (2): 38-45.
- Purich, D.L. 2010. *Enzymes Kinetics: Catalysis and control. A references of theory and best practice methods*. Ed. Elsevier: 1-49.
- Quiroz, Estela, Folch-Mallol, J.L. 2011. Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: perspectivas actuales. *Biotecnología Aplicada* 2011; Vol. 28(4):1-11.
- Rahnama, N.; Mamat, S.; Shah, U. K. M.; Ling, F. H.; Rahman, N. A. A.; & Ariff, A. B. 2013. Effect of alkali pretreatment of rice straw on cellulase and xylanase

- production by local trichoderma harzianum SNRS3 under solid state fermentation. *BioResources*, 8(2), 2881–2896.
- Ravindran, V. 2013. Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities. *Journal of Applied Poultry Research*, 22(3). <http://doi.org/10.3382/japr.2013-00739>
- Rigo, Elisandra, Ninow, J. L.; Di Luccio, M.; Oliveira, V.; Polloni, A. E.; Remonatto, Daniela, Arbter, F.; Vardanega, Renata.; Oliveira, Débora.; Treichel, Helen. 2010. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *Food Science and Technology* .43:1132-1137.
- Scheller, U. 2010. Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol* 61:263–289. 1829.
- Seo, J., Park, J.; Lee, J.; Lee, J. H.; Lee, J.J.; Kam, D. K. & Seo, S. 2016. Enhancement of daily gain and feed efficiency of growing heifers by dietary supplementation of  $\beta$ -mannanase in Hanwoo (*Bostaurus coreanae*). *Livestock Science*.188: 21–24.
- Sharma, P.K.; Chand, D.2012. Purification and Characterization of Thermostable Cellulase Free Xylanase from *Pseudomona* ssp. XPB-6. *Advances in Microbiology*. 2: 17-25.
- Sipponen, M. H.; Laakso, S.; & Baumberger, S. 2014. Impact of ball milling on maize (*Zea mays* L.) stem structural components and on enzymatic hydrolysis of carbohydrates. *Industrial Crops and Products*, 61, 130–136. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.052>.
- Siqueira, F. G.; Siqueira, A. G.; Siqueira, E. G.; Carvalho, M. A.; Peretti, B. M. P.; Jaramilho, P. M. D.; Teixeira, R. S. S.; Dias, E. S.; Félix, C. R.; and Filho, E. X. F. 2010. “Evaluation of holocellulase production by plant-degrading fungi grown on agro-industrial residues,” *Biodegradation* 21(5), 815-824.
- Siti-Noritaac, M.; Arbakariyab, A.; Noor-Azlinac, I. & Ibrahimc, CH. 2015. Effect of  $\beta$ -Mannanase supplementation on the growth and apparent digestibility of red

- tilapia fed formulated diets containing palm kernel cake. *Glo. Adv. Res. J. of Ag. Sci.* 4(2): 075-088.
- Soroor, Magda; Ghazy, A.RH., Mahdy, E.S.; El-Badry, M.O.; Shousha, G.; El-Khonezy, M. 2013. Purification and characterization of cellulase-poor xylanases from *Trichoderma reesei* F418 grown on rice straw by solid-state fermentation. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(3): 1702-1713.
- Souza, G., Arruda, E. y Mattos, M. 2014. Enzymes in animal diets: benefits and advances of the last 25 years. *Zootecnia* .1(1): 25-35
- Stefanello, C.; Vieira, S. L.; Rios, H. V, Simões, C. T.;& Sorbara, J. O. B. 2016. Energy and nutrient utilisation of broilers fed soybean meal from two different Brazilian production areas with an exogenous protease. *Animal Feed Science and Technology*, 221, 267–273. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.06.005>.
- Sugumaran, K. R.; Kumar, B.K.; Mahalakshmi, M. & Ponnusami, V. 2013. Cassava bagasse – Low cost substrate for thermotolerant xylanase production using *Bacillus subtilis*. *International Journal of Chem.Tech. Research*. 5(1): 394-400.
- Sun, Q.; Liu, D.; Guo, S.; Chen, Y. & Guo, Y. 2015. Effects of dietary essential oil and enzyme supplementation on growth performance and gut health of broilers challenged by *Clostridium perfringens*. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 207: 234–244.
- Tang, D., Hao, S.; Liu, G.; Nian, F.; & Ru, Y. 2014. Effects of maize source and complex enzymes on performance and nutrient utilization of broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(12). <http://doi.org/10.5713/ajas.2014.14255>
- Upadhaya, S.D.; Park, J. W.; Lee, J. H. & Kim, I.H. 2016. Efficacy of  $\beta$ -mannanase supplementation to corn–soya bean meal-based diets on growth performance, nutrient digestibility, blood urea nitrogen, faecal coliform and

- lactic acid bacteria and faecal noxious gas emission in growing pigs. Archives of Animal Nutrition. 70 (1): 33–43.
- Valenciaga, Daiky y Chongo, Bertha. 2004. La pared celular. Influencia de su naturaleza en la degradación microbiana ruminal de los forrajes. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 38 (4): 343-350.
- Van Soest, P. J.; J. B. Robertson and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74:3583-3597.
- Vandeplas S, Dauphin RD, Thiry C. 2009. Efficiency of a Lactobacillus plantarum-xylanase combination on growth performances, microflora populations, and nutrient digestibilities of broilers infected with Salmonella Typhimurium. Poult Sci 88, 1643–1654.
- Vandeplas S. 2010. Attempt to develop treatments based on bacteria-enzyme combination to reduce broiler contamination by two main human's bacterial food-born enteric pathogens. Tesis doctoral. Universidad de Liege, Bélgica.
- Walsh, M. C.; Romero, L.F.; Indrakumar, S.E.; Ravindran, V. 2013. Influence of combinations of a directed microbial and exogenous enzyme on the growth performance and feed efficiency of broilers. Poult. Sci. 92(E-Suppl. 1):87.
- Weng, C.; Wang, L.C.; Zhou, Y.M.; Jiang, Z.Y. & Wang, T. 2012. Effect of enzyme preparation on egg production, nutrient retention, digestive enzyme activities and pancreatic enzyme messenger RNA expression of late-phase laying hens. Anim. Feed Sci. and Tech.172: 180– 186.
- Yamabhai, M.; Sak-Ubol. S.; Srila, W. & Haltrich, D. 2016. Mannan biotechnology: from biofuels to health. Crit Rev Biotechnol. 36(1): 32–42.
- Zhang, H. & Sang, Q. 2015. Production and extraction optimization of xylanase and  $\beta$  mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn cob. Biochemical Engineering Journal. 97:101-110.
- Zhang, L.; Xu, J.; Lei, L.; Jiang, Y.; Gao, F.; & Zhou, G. H. 2014. Effects of Xylanase

- Supplementation on Growth Performance , Nutrient Digestibility and Non-starch Polysaccharide Degradation in Different Sections of the Gastrointestinal Tract of Broilers Fed Wheat-based Diets, 27(6), 855–861.
- Zhao, L., Wang, Y.; Liu, X.; & Lin, J. 2014). Optimization of enzymatic hydrolysis of recombinant multi-functional xylanase. Nongye Gongcheng Xuebao/Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering. <http://doi.org/10.3969/j.issn.1002-6819.2014.01.034>.
- Zuluaga, Laura Vanes; Padilla, Beatriz; Elena, Aguilera; Carolina, Ocampo, J. L.; Acuña, J. C. 2017. Remoción de sedimentos en extractos de café mediante hidrólisis enzimática con una mananasa de *Hypothenemus hampei*. Cenecafé, 68 (2):90-98