



UNIVERSIDAD DE MATANZAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
TRABAJO DE DIPLOMA



Evaluación del tratamiento enzimático en alimentos de mala calidad nutricional para los rumiantes.



Autora: Liliam Alonso Antelo

Tutores: Dra. C. Madyu Matos Trujillo

Dra. C. Sonia Jardinez González

Matanzas, 2022



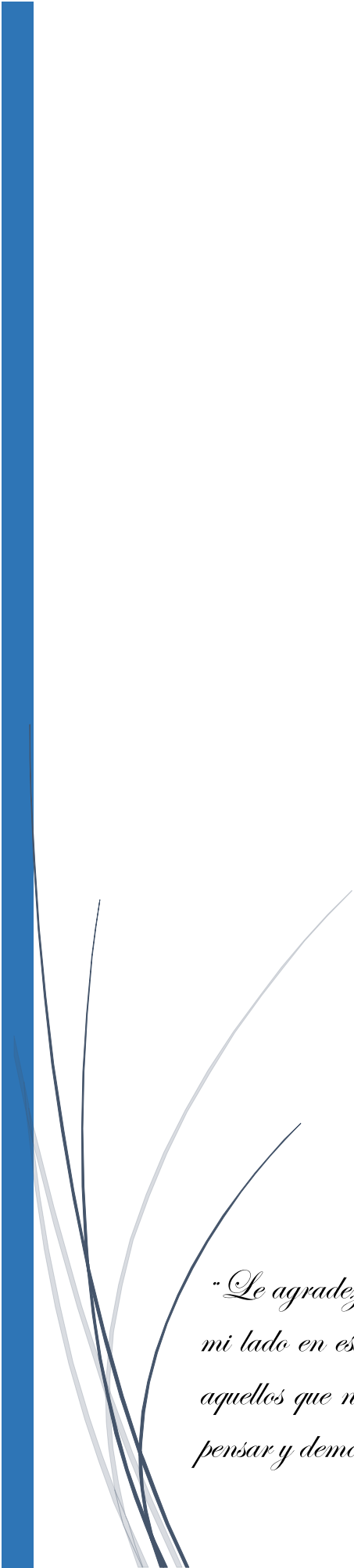
*"...urge activarnos y pensar diferente, proponer soluciones con valentía, inteligencia y
creatividad..."*

Miguel Díaz- Canel Bermúdez

DECLARACIÓN DE AUTORIDAD

Declaro que yo, Liliam Alonso Antelo soy el único autor de este Trabajo de Diploma por lo que autorizo a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas a hacer uso del mismo, con la finalidad que estime conveniente.

Firma: _____



“Le agradezco infinitamente a todas las personas que de una forma u otra estuvieron a mi lado en este momento tan trascendental en mi vida; hago una mención especial a aquellos que no me apoyaron, puesto que, con su actitud me hicieron tomar una pausa, pensar y demostrarme a mí misma que soy más fuerte de lo que muchos quisieran”.

AGRDECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han apoyado en este largo camino.

Sin dejar de mencionar a nadie quisiera agradecer:

A Dios por estar siempre a mi lado guiando mis pasos y dándome fuerzas para seguir adelante.

A mis tutoras Madyu y Sonia, por regalarme su tiempo, paciencia y sabiduría, sin sus consejos cuando ya, no surgían de mis pensamientos ideas para plasmar lo que hoy hemos logrado.

A mi pareja, por aguantar mis cambios de humor y ser mi pilar en todo momento.

A mis padres y a mi familia, que ha transitado conmigo este largo pero fructífero camino.

A mis amigos y compañeros de trabajo que siempre han estado al pendiente y brindándome su apoyo en esta etapa tan importante en mi vida.

Y una mención especial a mis "gatitas" por brindarme su amor sincero y distraerme cuando en mi mente no ya existían palabras para seguir escribiendo.

OPINIÓN DEL TUTOR

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de diploma presentado en opción al título de Ingeniero Agrónomo titulado: “Evaluación de tratamiento enzimático en alimentos de mala calidad nutricional para los rumiantes” es el resultado de un trabajo dedicado de la aspirante Liliam Alonso Antelo. Los experimentos se realizaron a la par con otros profesores de la Facultad e investigadores del Centro de Estudios Biotecnológico de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. Se evaluó la capacidad de las enzimas del extracto de *Bacillus subtilis* E44 para disminuir el contenido fibroso de pastos y forrajes de mala calidad nutricional. El uso de enzimas en la alimentación animal favorece la asimilación de nutrientes y mejora la calidad nutricional de los pastos y forrajes tropicales.

En este marco la investigación, la estudiante contribuyó al análisis y comprensión los procesos bioquímicos y microbiológicos de *Bacillus subtilis* E44 durante la fermentación y su efecto en la disminución del contenido fibroso de alimentos destinados a los rumiantes. Durante el período de trabajo la estudiante mantuvo buena disciplina cumpliendo con cada etapa de la investigación, lo que permitió que el mismo se realizara con calidad y alto rigor científico. Es de destacar la independencia adquirida durante la última etapa de su trayectoria académica, con un dominio de diferentes técnicas bioquímicas y microbiológicas que le permitieron elaborar un enfoque multidisciplinario a los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Tutores:

Dra. C. Madyu Matos Trujillo

Dra. C. Sonia Jardines González

RESUMEN

La alimentación de los rumiantes se basa en la utilización de pastos y forrajes para satisfacer sus necesidades energéticas. Sin embargo, las especies cultivadas en países tropicales, presentan estructuras en la pared celular difíciles de degradar. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar *in vitro* el efecto del extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44 en la degradación de la fibra en seis especies pratenses y forrajeras de mala calidad nutricional destinadas a la alimentación de los rumiantes. Se ensayaron dos dosis del extracto enzimático (10,97 y 5,48 UI mL⁻¹ g⁻¹) y se evaluó su efecto en la modificación del contenido de la fibra detergente neutra (FDN) y la fibra detergente ácida (FDA). El tratamiento enzimático favoreció la degradación de la FDN en las especies *Cynodon nlemfuensis*, *Dichanthium spp.*, *Centrocema pubescens* y *Alysicarpus vaginalis*. La dosis menor del extracto (5,48 UI mL⁻¹ g⁻¹) mostró los mejores resultados en la modificación de la FDN, mientras que la fracción FDA no se modificó en ninguna de las especies.

Palabras clave: Pastos, forrajes, fibra detergente neutra, enzimas.

ABSTRACT

The feeding of ruminants is based on the use of pastures and forages to satisfy their energy needs. However, species cultivated in tropical countries present cell wall structures that are difficult to degrade. The present investigation had as objective to evaluate *in vitro* the effect of *Bacillus subtilis* E44 on degradation of the fiber in six pastures and forage species of poor nutritional quality destined to feed ruminants. Two doses of the enzymatic extract (10,97 and 5,48 UI mL⁻¹ g⁻¹) were tested and its effect on the modification neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) was evaluated. The enzymatic treatment favored the NDF in the species *Cynodon nlemfuensis*, *Dichanthium spp.*, *Centrocema pubescens* and *Alysicarpus vaginalis*. The lowest dose of the extract (5,48 UI mL⁻¹ g⁻¹) showed the best results in the modification of the NDF, while the FDA fraction was not modified in any of the species.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Características anatómicas y fisiológicas del aparato digestivo de los rumiantes.	3
2.2. Composición química de la pared celular	4
2.3. Enzimas que participan en la degradación de la pared celular vegetal.....	6
2.3.1. Celulasas.....	6
2.3.2. Hemicelulasas	7
2.3.3. Xilanasas	7
2.3.4. β -Mananasas.....	8
2.3.5. Enzimas ligninolíticas	9
2.4. Utilización de enzimas en las dietas de animales rumiantes	10
2.5. Principales enzimas utilizadas en la industria de ganadera.	11
2.6. Modo de acción de las enzimas exógenas en los rumiantes	11
2.7. Resultados de la aplicación de enzimas exógenas en los rumiantes.....	13
2.8. <i>Bacillus subtilis</i> E44 y su empleo en la producción animal	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Especies pratense y forrajeras utilizadas.	17
3.3. Determinación del contenido de fibra.....	18
3.3. Producción del extracto enzimático de <i>Bacillus subtilis</i> E44	18
3.4. Efecto del extracto enzimático en la degradación de la fibra en las especies seleccionadas	20
3.5. Análisis estadístico.....	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1. Composición química de los pastos y forrajes seleccionados	21
4.2. Efecto del extracto enzimático en la degradación de la fibra de los forrajes y pratenses	22
5. CONCLUSIONES	26
6. RECOMENDACIONES	27
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

Índice de Figuras

Figura 1. Sistema digestivo de los rumiantes.	3
Figura 2. Estructura de la pared celular de las plantas (Arredondo y Vázquez, 2018).	5
Figura 3. Esquema del mecanismo sinérgico de los componentes celulolíticos (Iráizoz, 2011). CBH I y CBH II.....	6
Figura 4. Enzimas que participan en la degradación del xilano (Gallardo, 2007)...	8
Figura 5. Enzimas que participan en la degradación del galactomanano. Mecanismo de acción de A: β -mananasas y β -manosidasas y B: β -galactosidasas y β -glucosidasas. rombo blanco, negro y gris manosa, glucosa y galactosa, respectivamente (Soni y Kango, 2013).	9
Figura 6. Especies de pastos y forrajes utilizados en la investigación	17

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la población mundial asciende a 8000 millones de habitantes; y a pesar, de que el ritmo de crecimiento está en descenso, se estima que para el 2080 exista una población mundial de 10 400 millones de personas (ONU, 2022). Por esta razón, se hace necesario lograr una eficiencia y rentabilidad de los recursos destinado a la producción de alimentos para la población.

Los rumiantes constituyen una importante fuente de alimentos el hombre por la elevada calidad nutricional de la leche y la carne. El sustento de esta especie se basa en la utilización de pastos y forrajes para satisfacer sus necesidades energéticas, los cuales son relativamente abundantes en la superficie terrestre, aspecto que los coloca entre los animales de gran interés zootécnico (Molina, 2018).

Las investigaciones en nutrición animal en los últimos años se han encaminado a optimizar la eficiencia productiva del ganado por modificación de la comunidad microbiana que habita en el tracto gastrointestinal de estos (Galindo *et al.*, 2017). En este sentido, una de las vías más explotadas es el uso de aditivos, dentro de los se estudian un gran número de sustancias (García, 2020).

Entre los aditivos utilizados y que muestran resultados satisfactorios en el mejoramiento de los alimentos destinados al consumo de los rumiantes están las enzimas (Parodi y Landi, 2012). Estos productos se adquieren en el mercado internacional a elevados costos, por lo que esta práctica no se aplica en la ganadería cubana.

Debido a esta problemática varias investigaciones se desarrollan en la actualidad para obtener aditivos enzimáticos de especies microbianas como los hongos (Alberto, 2020; García, 2020) y las bacterias (Matos, 2021). Entre los productos obtenidos por las bacterias se encuentra el extracto enzimático de *Bacillus subtilis* con resultados satisfactorios en el mejoramiento de la digestibilidad de alimentos para las aves.

A partir de lo anteriormente planteado, en la presente investigación se declaró el siguiente problema científico:

Se desconoce el efecto del extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44 en el contenido fibroso de especies pratenses y forrajeras tropicales utilizadas en la alimentación de los rumiantes en Cuba.

Para dar respuesta a la problemática se propuso la siguiente hipótesis científica:

El extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44, favorece la disminución del contenido fibroso en especies pratenses y forrajeras tropicales de mala calidad nutricional.

Para aceptar o refutar la hipótesis se trazaron los siguientes objetivos:

Objetivo general: Evaluar *in vitro* el efecto del extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44 en la degradación de la fibra en seis especies pratenses y forrajeras de mala calidad nutricional destinadas a la alimentación de los rumiantes en Cuba.

Los **objetivos específicos** fueron:

1. Evaluar el efecto del extracto enzimático en la degradación de la fibra detergente neutra y la fibra detergente ácida en las especies pratenses y forrajeras: *Saccharum officinarum*, *Cynodon nlemfuensis*, *Dichantius* spp., *Centrocema pubescens*, *Paspalum notatum* y *Alysicarpus vaginalis*.
2. Determinar la dosis efectiva para la degradación del componente fibroso en las especies seleccionadas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características anatómicas y fisiológicas del aparato digestivo de los rumiantes.

Los rumiantes poseen la capacidad de transformar los alimentos vegetales indigestibles para los humanos en alimentos de elevado valor nutritivo para la especie. Esta característica está asociada fundamentalmente a las diferencias anatómicas y funcionales del aparato digestivo de los rumiantes con respecto a otros grupos animales (Figura 1).

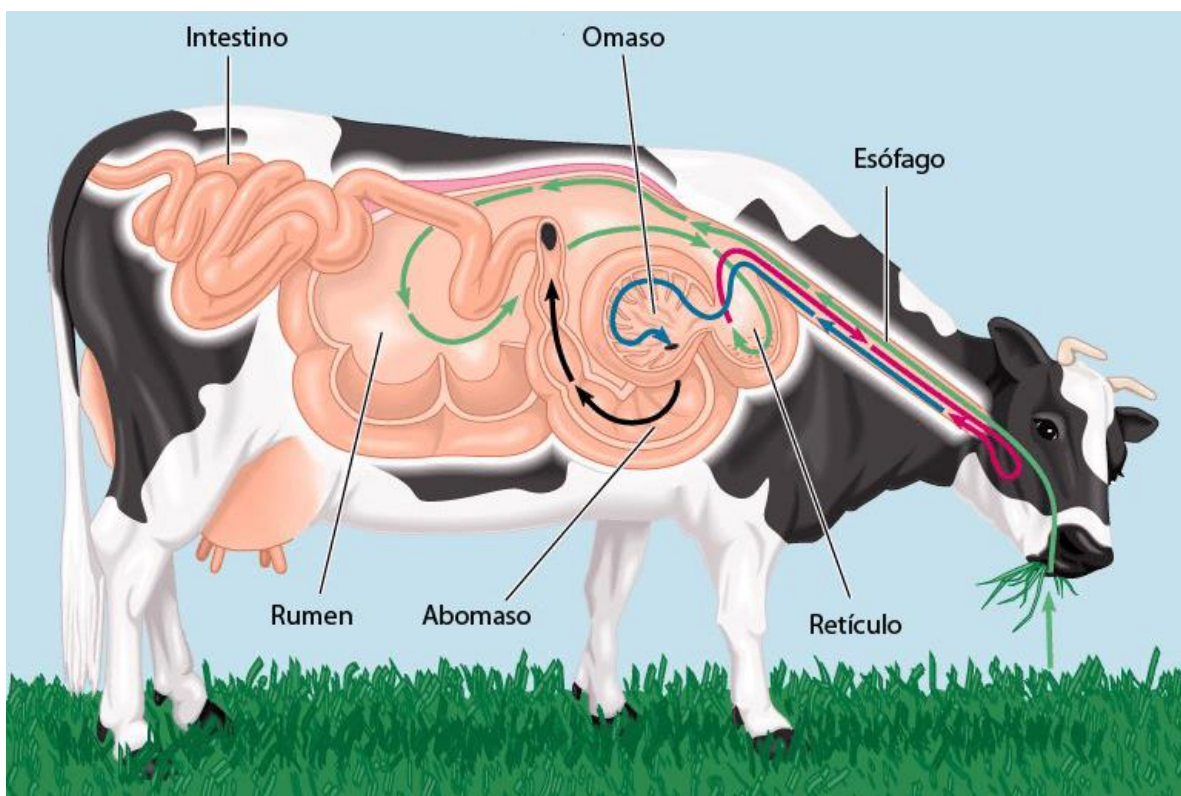


Figura 1. Sistema digestivo de los rumiantes.

En los rumiantes el estómago se encuentra dividido en cuatro compartimentos diferenciados anatómicamente y funcionalmente. El rumen es el mayor de los preestómagos y su interior se encuentra dividido en compartimentos denominados sacos, separados entre sí mediante pilares musculares, formando junto al retículo una cámara de fermentación (Van Soest, 1994).

El omaso es la siguiente cavidad y su mucosa presenta papilas en forma de hoja que absorben agua y minerales y cuya principal función es evitar el paso de partículas de gran tamaño del retículo al abomaso. Por último, el abomaso presenta una mucosa de tipo glandular y secreta mucus, pepsinógeno y ácido clorhídrico, de forma similar al estómago de los animales monogástricos (Asplund, 1994).

En el tracto gastrointestinal de los rumiantes se establece un complejo ecosistema microbiano capaz de degradar los hidratos de carbono estructurales presentes en los vegetales que ingiere el animal (Cheng *et al.*, 1991). La estructura celular de las plantas es difícil de digerir debido a los enlaces complejos que posee y esta característica influye en su digestibilidad.

2.2. Composición química de la pared celular

La pared celular vegetal está compuesta por: celulosa, hemicelulosa y lignina (LIG). En las plantas superiores, la celulosa aparece en forma de microfibrillas en las paredes primarias y secundarias, como resultado de la formación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas (Figura 2). Es un polímero insoluble formado por residuos de glucosa unidos por enlaces glucosídicos $\beta(1,4)$ que se orientan en dominios cristalinos, paralelos altamente ordenados con regiones amorfas más desordenadas (Lee *et al.*, 1997).

La hemicelulosa constituye el segundo polisacárido estructural más abundante en las plantas, se encuentra asociado con la celulosa en la mayoría de las especies vegetales (Bhat y Hazlewood, 2001). Está compuesta principalmente por unidades de D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-xilosa y L-arabinosa, unidas en diferentes combinaciones (Mendoza *et al.*, 2014).

La lignina presenta un fuerte entrecruzamiento químico con la fracción de carbohidratos de la pared celular mediante enlaces tipo éter que forman una extensa red y se considera recalcitrante para su degradación (Moore y Jung, 2001). Es un polímero insoluble, complejo y ramificado de unidades fenilpropano que refuerza las uniones de la celulosa y hemicelulosa (Tarasov *et al.*, 2018). Su estructura es

variable y depende del tipo de planta, el estado fenológico y la tasa fotosintética (Ortiz, 2010).

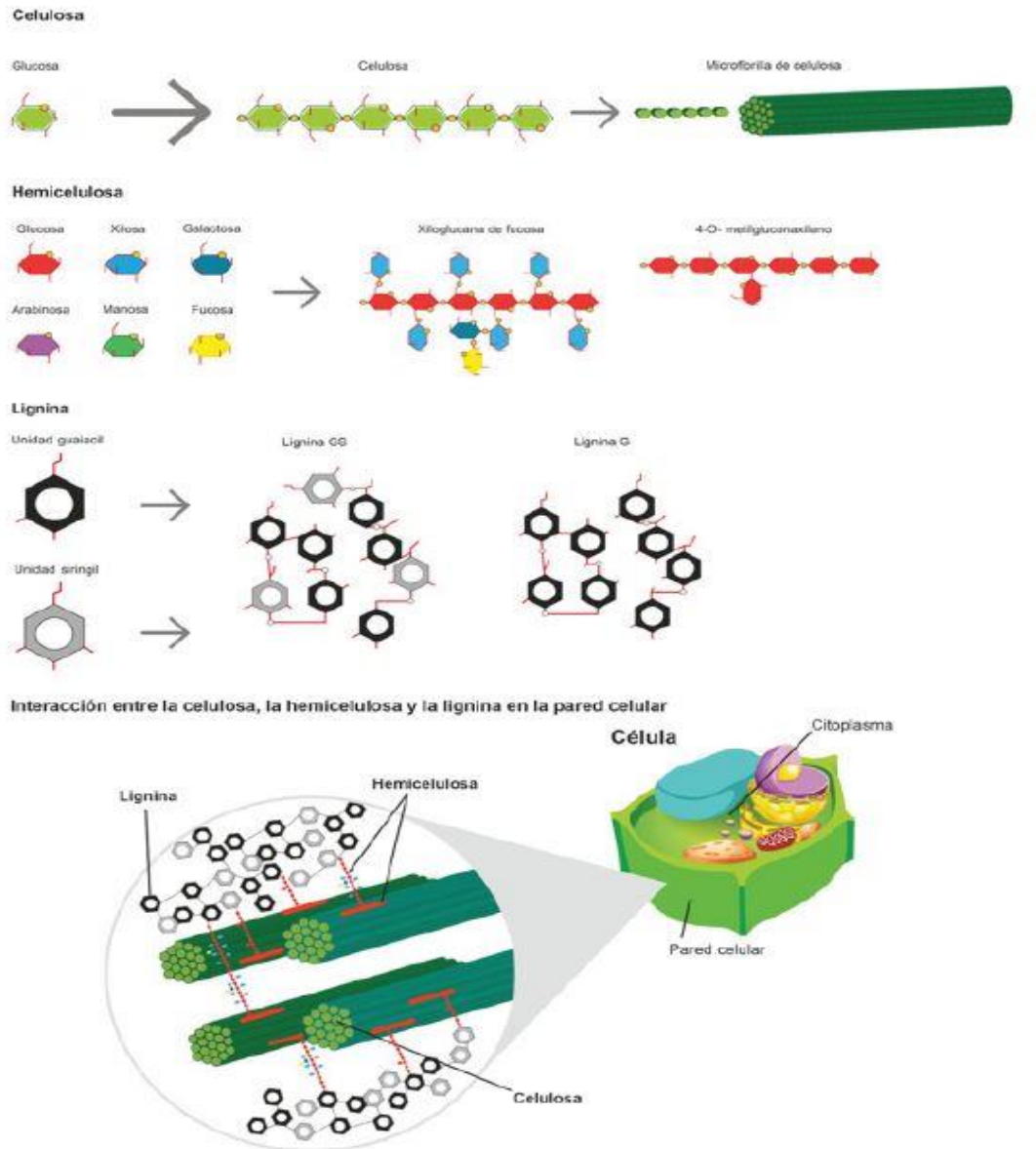


Figura 2. Estructura de la pared celular de las plantas (Arredondo y Vázquez, 2018). La descomposición de la pared celular vegetal implica la participación sinérgica de varios biocatalizadores. Entre las más utilizadas se destacan las celulasas, hemicelulasas y las enzimas lignocelulolíticas (Bajaj y Mahajan, 2019).

2.3. Enzimas que participan en la degradación de la pared celular vegetal

2.3.1. Celulasas

Las celulasas están formadas por un complejo de enzimas que cataliza la degradación de la celulosa y está formado por: β -(1,4) endocelulasas (E.C. 3.2.1.4), celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) y β -(1,4) glicosidasa (E.C. 3.2.1.21). Todas funcionan de manera sinérgica y secuencial, y como producto final se liberan monómeros de glucosa (Bhardwaj *et al.*, 2021).

Según el mecanismo propuesto para la degradación de la celulosa, las enzimas β -(1,4) endocelulasas catalizan la hidrólisis aleatoriamente los enlaces β -(1,4) glicosídicos internos de la región amorfa de la celulosa, se generan nuevos extremos que facilitan la acción de las celobiohidrolasas (CBH) y se liberan unidades de celobiosa desde los extremos terminales. Dentro de las CBH se distinguen las formas CBH I que actúan desde el extremo reductor de la cadena de celulosa y las CBH II que liberan celobiosa desde el extremo no reductor (Kumar y Verma, 2020). Una vez degradadas las zonas amorfas de la celulosa, ocurre la hidrólisis de la región cristalina por la acción sinérgica de las endo y exocelulasas. Las β -glucosidasas hidrolizan la celobiosa hasta la glucosa (Jørgensen *et al.*, 2007) (Figura 3).

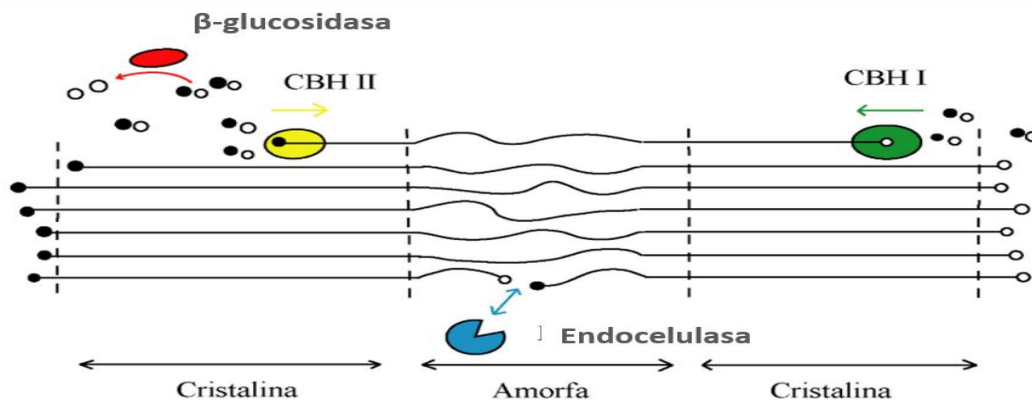


Figura 3. Esquema del mecanismo sinérgico de los componentes celulolíticos (Iráizoz, 2011). CBH I y CBH II.

2.3.2. Hemicelulasas

Las hemicelulasas constituyen un grupo de enzimas que catalizan las reacciones de degradación de la hemicelulosa. Debido a la variabilidad de los sustratos que hidrolizan, se clasifican según el tipo de hemicelulosa o del enlace que rompen. Se distinguen xilanasas, β -mananasas, xilosidasas, arabinasas y galactosidasas (Iráizoz, 2011). Entre las más utilizadas en la alimentación animal se destacan las xilanasas, celulasas y las β -mananasas (Craig *et al.*, 2019; Saeed *et al.*, 2019).

2.3.3. Xilanasas

Las xilanasas (EC 3.2.1.8) catalizan la hidrólisis al azar de los enlaces β -(1,4) glicosídicos del xilano para producir xilooligómeros (Malhotra y Chapadgaonkar, 2018). El xilano es el polímero más abundante de la hemicelulosa en las paredes celulares de las plantas. Constituye entre el 20 y 40% de la biomasa total, por lo que su degradación es fundamental para aprovechar los productos de los materiales lignocelulósicos como fuente de energía útil (Polizeli *et al.*, 2005). Esta enzima se utiliza para el tratamiento de dietas con elevado contenido de fibras insolubles destinadas a la alimentación de animales monogástricos (Matos *et al.*, 2018).

Las enzimas que catalizan la hidrólisis del xilano se clasifican en dos grupos principales (figura 4):

- Enzimas implicadas en la despolimerización de la cadena principal de xilosas: xilanasas (β -1,4-D-xilano-xilano-hidrolasas) y β -xilosidasas (β -1,4-D-xilano-xilohidrolasas).
- Enzimas encargadas de la eliminación de las cadenas laterales del xilano, llamadas también accesorias o desramificantes: α -L-arabinofuranosidasas, α -D-glucuronidasas, acetilxilano esterasas, y ferúlico y p-cumárico esterasas (hidroxicinámico esterasas).

La extensión de la actividad enzimática depende en gran medida de la conformación física y la interacción de la molécula de xilano con otros componentes de la pared celular. Las cadenas laterales del polímero determinan su solubilidad en agua (Chakdar *et al.*, 2016).

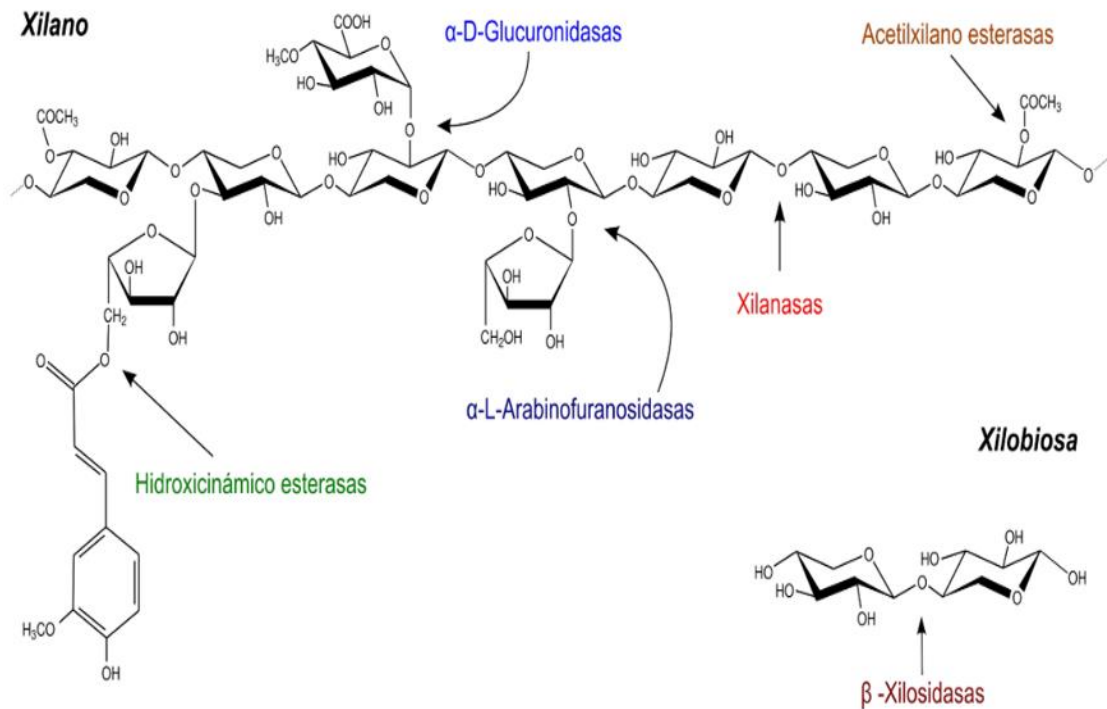


Figura 4. Enzimas que participan en la degradación del xilano (Gallardo, 2007).

2.3.4. β-Mananasas

Las enzimas involucradas en la hidrólisis de los polímeros lineales de manano son las β-mananasas (EC 3.2.1.78), β-manosidasas (EC 3.2.1.25) y β-glucosidasas (EC 3.2.1.21). Se requieren además, otras enzimas como las α-galactosidasas y las acetil-manano esterasas para eliminar los sustituyentes de la cadena lateral (Moreira y Filho, 2008).

La enzima más importante de este complejo es la β -mananasa, la que produce oligómeros cortos de β -(1,4) manano y luego se convierten en moléculas de manosa por acción de las β -manosidasas (Chauhan *et al.*, 2012). Estas proteínas catalizan la hidrólisis al azar de los enlaces β -(1,4)-D-mananosídicos de los mananos, galactomananos y glucomananos (Yamabhai *et al.*, 2016).

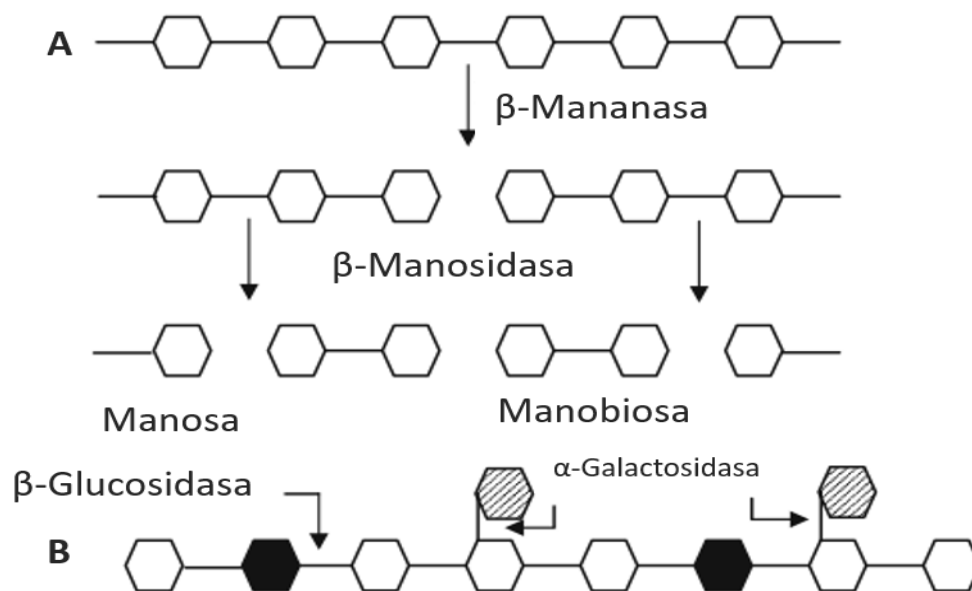


Figura 5. Enzimas que participan en la degradación del galactomanano. Mecanismo de acción de A: β -mananasas y β -manosidasas y B: β -galactosidasas y β -glucosidasas. rombo blanco, negro y gris manosa, glucosa y galactosa, respectivamente (Soni y Kango, 2013).

2.3.5. Enzimas ligninolíticas

Las enzimas ligninolíticas modifican la estructura de la lignina a través de mecanismos de oxidación-reducción. Forman parte del complejo las ligno peroxidadas, manganeso peroxidadas, peroxigenasa versátil y lacasas (Margida *et al.*, 2020). El uso de estos catalizadores en el pre tratamiento de la biomasa es fundamental para lograr el acceso a la matriz polisacáridica, paso fundamental en la degradación eficiente de la fibra.

Los enlaces covalentes de la molécula de lignina son fundamentalmente del tipo aril-éter, aril-aril y carbono-carbono, y no se hidrolizan por mecanismos típicos (Brink *et al.*, 2019). El mecanismo catalítico se basa en la generación de radicales libres intermedios con alta reactividad, capaces de aceptar o ceder un electrón y por ende generar la oxidación o la reducción de estos compuestos. Las enzimas lignocelulolíticas actúan sinérgicamente con el resto complejos enzimáticos (Tarasov *et al.*, 2018).

2.4. Utilización de enzimas en las dietas de animales rumiantes

Las enzimas poseen algunas particularidades significativas. Su acción catalítica, eleva varias veces la rapidez de las reacciones en las que se encuentran involucradas. Después de cada proceso catalítico vuelven a su fase inicial y son catalizadores específicos. Su acción catalítica puede ser controlada por moléculas que se ajustan a los requerimientos celulares (Lozano *et al.*, 2005; Macías *et al.*, 2018).

En su medio natural los microorganismos del rumen generan enzimas que hidrolizan la fibra. La complicada estructura de la pared celular y el escaso período de estancia de los forrajes en el rumen, no admiten una correcta explotación de la fibra; puesto, que es necesario una suplementación de la ración suministrada con enzimas exógenas, que permitan una mejor degradación y aprovechamiento de este compuesto (Arís y Garcías-Fruitós, 2022).

Es de gran importancia a la hora de suministrar aditivos enzimáticos en la dieta de los rumiantes, tener en cuenta, que esta, puede modificar su eficiencia. Los factores que afectan la acción enzimática en estas circunstancias son: la dosis o el tipo de enzima, la dieta utilizada, el mecanismo de aplicación de la enzima y el desarrollo fisiológico del animal (Phakachoed *et al.*, 2013).

Las enzimas son más eficaces cuando se aplican en forma líquida en los alimentos antes de la ingestión. Los efectos de enzimas exógenas ayudan a eliminar las barreras estructurales que limitan la digestión microbiana de los alimentos en el

rumen y causan la liberación de carbohidratos solubles (Beauchemin *et al.*, 2004). La suplementación enzimática estimula la actividad hidrolítica del rumen, a causa, del incremento de la adhesión bacteriana y el desarrollo de las poblaciones microbianas, mejorando la digestibilidad total de la dieta (Beauchemin *et al.*, 1999).

Actualmente pueden encontrarse un sin número de enzimas para diferentes especies de animales, de los cuales, gran parte se obtienen a partir de cuatro géneros de bacterias (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus faecium*) y tres tipos de hongos (*Aspergillus oryzae*, *Trichoderma* spp. y *Saccharomyces cerevisiae*) (Muirhead, 2001). Por otro lado, ninguno de estos suplementos comerciales está compuesto por un preparado único de una enzima aislada, sino que se tratan de un concentrado de proteínas con actividades enzimáticas disimiles (Colombatto *et al.*, 2003).

2.5. Principales enzimas utilizadas en la industria de ganadera.

El aumento de la digestibilidad de los alimentos en la producción ganadera por la utilización de enzimas fibrolíticas es cada vez más evidente. Se publican en la literatura los resultados de la efectividad de las enzimas con su capacidad degradativa para lograr una total digestibilidad de la materia seca, en experimentos *in situ* e *in vitro* (Gado *et al.*, 2013).

Aunque actualmente se realizan diversos estudios sobre los beneficios de las enzimas fibrolíticas como aditivos nutricionales para el ganado, la manera de actuar de las mismas se desconoce completamente. El empleo de estas, para la alimentación del rumiante pudiera variar el rango de acción del proceso digestivo del animal o trabajar directamente encima del alimento antes de ser ingerido (McAllister *et al.*, 2001).

2.6. Modo de acción de las enzimas exógenas en los rumiantes

El modo de acción de los bioenzimáticos que se utilizan en la nutrición de estas especies, es un tema muy complejo y de gran importancia en las investigaciones

que actualmente se desarrollan. Según Velázquez-De Lucio *et al.* (2021), la acción de cada enzima es diferente e interdependiente, su aplicación en los concentrados debe realizarse de manera racional y cuidadosa para lograr el máximo efecto. Además, actúan directa e indirectamente en los sustratos, por ejemplo, en el complejo lignocelulolítico, degradan la lignina como efecto principal, sin embargo permiten acceder también a los nutrientes que estaban unidos a esta estructura, fundamentalmente carbohidratos y proteínas como efecto secundario (Beauchemin *et al.*, 2004).

Los biocatalizadores pueden modificar la calidad del alimento antes del consumo a través de determinados estímulos durante la digestión ruminal y/o en el tracto digestivo post-ruminal. Aunque las condiciones de pH, temperatura y tipo de sustrato fuera del rumen no siempre favorecen la acción de las enzimas (Mcgrath *et al.*, 2018). En el rumen, actúan directamente en la digestión del alimento, o estimulan indirectamente la actividad digestiva a través de efectos sinérgicos con los microorganismos ruminales (López-Ordaz *et al.*, 2020). Del mismo modo, las enzimas pudieran permanecer activas en el tracto digestivo posterior, y contribuyen indirectamente a la absorción de nutrientes debido a la disminución de la viscosidad de la digesta intestinal (Ojha *et al.*, 2019).

Por otra parte, las condiciones del sustrato afectan la acción de las enzimas, éstas son más efectivas en alimentos húmedos que en los secos por lo que la presencia del agua facilita su solubilidad y es esencial para reducir los polímeros a monómeros. Según informó Nsereko *et al.* (2000) la aplicación de preparaciones sólidas de enzimas no favorece la interacción preingestiva entre las enzimas y los alimentos.

La respuesta a la suplementación con enzimas fibrolíticas es variable (Bedford, 2018). Entre los factores que intervienen en la efectividad de estos aditivos se destaca el tipo de enzima, su estabilidad y especificidad de acción, los animales que se les aplica (especie, edad y morfofisiología del tracto gastrointestinal) y las características de las dietas (Valdivia *et al.*, 2019). Del mismo modo, el efecto puede

afectarse por la dosis, la preparación del producto, el método de suministro y el mecanismo de acción enzimático (Tirado-González *et al.*, 2018).

2.7. Resultados de la aplicación de enzimas exógenas en los rumiantes

Las enzimas fibrolíticas no se utilizaban en la alimentación de los rumiantes debido a la hipótesis de su posible hidrólisis inmediata por las proteasas del rumen. Además, se conocía que los microorganismos ruminales degradaban los sustratos fibrosos (Beauchemin *et al.*, 2004). Sin embargo, los estudios desarrollados posteriormente permitieron demostrar las ventajas de esta práctica en los animales poligástricos.

Las investigaciones desarrolladas en las últimas décadas destacaron que el tratamiento enzimático de los forrajes provocaba incrementos en la digestibilidad de la fibra en experimentos *in vitro* e *in vivo* (Iannaccone *et al.*, 2022). La mayoría de los autores coinciden que las enzimas exógenas mejoran la digestión de la fibra (Pech-Cervantes *et al.*, 2021), aun cuando representa solo el 15 % del total de la actividad en el rumen (Rosser *et al.*, 2022). Los efectos de enzimas fibrolíticas en la degradación de forraje son significativos, aunque, los cambios en la porción molar de estos compuestos pueden ser inconsistentes, debido a que dependen de la fuente fibrosa, las dosis suministradas y su impacto en la fermentación ruminal (Kumar y Sridhar, 2021).

En la literatura internacional se informa la utilización de diversos sistemas enzimáticos en la producción de rumiantes. Selzer *et al.* (2021) demostraron que la digestibilidad de la FDN y la FDA mejoró después del tratamiento con celulasas y xilanasas. De acuerdo con Da Costa *et al.* (2019) las xilanasas poseen particular importancia en la alimentación de los rumiantes porque elevan la resistencia contra infecciones y disminuyen el impacto ambiental al reducir la producción de metano por los animales. Asimismo las investigaciones realizadas por Santana *et al.* (2018) y Miranda-Romero *et al.* (2022) comprobaron que la digestibilidad de la porción

fibrosa depende de la combinación de enzimas, la dosis y el tipo de sustrato que se utilice.

Otra de las ventajas del tratamiento enzimático es la mejora de la calidad de alimentos no convencionales (Jimoh, 2018). Autores como Abid *et al.* (2019) utilizaron xilanasas, exo y endocelulasas para incrementar el valor nutritivo del orujo de uva mientras que Cornejo-Cornejo *et al.* (2020) emplearon las xilanasas para mejorar la digestibilidad *in vitro* de la cáscara de *Musa paradisiaca* L. De igual manera Alberto (2020) informó mejoras en la calidad nutritiva de paja de trigo y la digestibilidad del bagazo de caña de azúcar después del tratamiento con lacasas aisladas de hongos.

Las enzimas exógenas también tienen impacto positivo en la producción de leche. Por ejemplo, Refat *et al.* (2018) informó aumentos en la producción de leche y la digestibilidad de la materia seca en vacas alimentadas con ensilaje (34% de cebada) tratadas con enzimas fibrolíticas. De igual forma, Golder *et al.* (2019) notificó incrementos de la producción de leche en experimentos de campo como respuesta a la aplicación de enzimas en las vacas y lo relacionó con la elevada digestibilidad de los alimentos después del tratamiento.

Asimismo la producción lechera, la ganancia de peso diario y el consumo de alimentos en cabras mejoró con la inclusión del extracto enzimático de *Pleorutus ostreatus* en las dietas (Trejo *et al.*, 2017). Mendoza *et al.*, (2014) destacaron que el aumento de la producción de leche y carne después del tratamiento con enzimas exógenas se debe a una mejor digestibilidad de la FDN y la FDA.

Por su parte, Bortoluzzi *et al.* (2019) y Qiao *et al.* (2018), demostraron que el tratamiento con β -mananasas promovió la producción de neutrófilos, leucocitos y macrófagos que intervienen en la reducción del conteo de células somáticas en la leche y es un indicador potencial de la presencia de mastitis (López-Ordaz *et al.*, 2020). Esta enfermedad, que provoca la inflamación de la glándula mamaria,

frecuentemente tiene causas infecciosas y ocasiona cuantiosas pérdidas económicas a la industria láctea (Benić *et al.*, 2018).

La adición de β -mananasa en vacas Holstein-Friesen de lactancia avanzada, redujo el consumo de materia seca en 1,8 kg por vaca en comparación con el control (Tewoldebrhan *et al.*, 2017). La reducción en el consumo se atribuyó a una mayor digestibilidad aparente de la materia seca, la materia orgánica y la proteína. También Kebreab, (2016) informaron que la adición de β -mananasas a la dieta (0,10%) incrementó la eficiencia de conversión del nitrógeno, la proteína de la leche, la ganancia de peso y la higiene de las ubres en vacas en lactación, sin afectar las excreciones de metano y el nitrógeno fecal.

Según López-Ordaz *et al.* (2020), la mejora de la salud por la suplementación enzimática se debe a que los requerimientos de nitrógeno en los animales se cubren con el consumo de la materia seca y la proteína de la dieta. De esta forma se evitan gastos energéticos por la excreción del exceso de nitrógeno y repercute en beneficios ambientales y económicos.

De forma general, el efecto de las enzimas exógenas en la degradabilidad de la materia seca, la hidrólisis de la fibra, la producción de gases y el rendimiento de la leche dependen en gran medida de la especie, la proporción del forraje, su calidad y el número de ingredientes incluidos en la dieta (Tirado-González *et al.*, 2021). Esta práctica favorece una mayor disponibilidad de los nutrientes para su digestión, absorción y contribuye a mejorar los procesos fisiológicos, y en muchas ocasiones, se evidencia a través de incrementos de la productividad ganadera.

2.8. *Bacillus subtilis* E44 y su empleo en la producción animal

Las investigaciones desarrolladas en la década de 1990 entre el Instituto de Ciencia Animal y la Universidad de Matanzas, resaltaron los beneficios de *Bacillus subtilis* E44 en la alimentación ganadera. El extracto enzimático de *B. subtilis* E44 obtenido en un medio de cultivo con componentes nacionales se utilizó para elaborar el biopreparado PROBIOLEV® (patente 2014-0617) a partir de la hidrólisis de la pared

celular de la crema de *Saccharomyces cerevisiae* (Pérez *et al.*, 2006). El producto se evaluó en la producción ganadera con resultados satisfactorios y se demostró su efecto prebiótico *in vitro* por Pérez *et al.* (2016) y la acción antibacteriana *in vitro* e *in vivo* (Rodríguez *et al.*, 2015; 2019).

Recientemente Matos (2021) obtuvo el extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44 a partir de la fermentación en estado sólido (FES) del bagazo de caña de azúcar. La autora notificó la presencia de enzimas β -mananasas, xilanasas, endocelulasas, amilasas y proteasas estables en el extracto y se evaluó su efecto en el componente fibroso y la digestibilidad de la dieta de reemplazo para pollitas ponedoras.

El extracto enzimático disminuyó la FDN del salvado de trigo, como componente fibroso del alimento e incrementó la digestibilidad *in vitro* de la dieta. Sin embargo, no se ha evaluado su efecto en alimentos fibrosos destinados a los rumiantes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Especies pratense y forrajeras utilizadas.

Para la aplicación del tratamiento enzimático, se seleccionaron al azar, especies de plantas predominantes en los pastizales de las áreas ganaderas de la provincia Matanzas (Tabla 1) y el forraje que se le estaba suministrando a los animales en los comederos, que en este caso fue el *Saccharum officinarum*. Las plantas se colectaron en áreas de las vaquerías 65 y Monticelo, de la Empresa Pecuaria Genética Matanzas (EPGM).



Saccharum officinarum



Cynodon nlemfuensis



Dichanthium spp



Centrochema pubescens



Paspalum notatum



Alysicarpus vaginalis

Figura 6. Especies de pastos y forrajes utilizados en la investigación

Las muestras se trasladaron al laboratorio. Se lavaron con abundante agua y se

secaron en la estufa a 60 °C durante 48 h. Posteriormente se molieron a un tamaño máximo de partícula de 1 mm, utilizando un molino de martillos tipo Fritsch modelo GmbH.

3.3. Determinación del contenido de fibra

El contenido de FDN y FDA se analizó siguiendo la técnica secuencial descrita por (Van Soest *et al.*, 1991), adoptando las modificaciones propuestas por (ANKOM, 1998). Para el análisis se utilizaron bolsas de poliéster (ANKOM Corp #57) con un tamaño de poro de 30 µm y dimensiones de 4,5 x 5,5 cm.

3.3. Producción del extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44

Cultivo de *Bacillus subtilis* E44

Se utilizó la cepa de *Bacillus subtilis* E44 procedente del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas. A partir de un frasco de la cepa conservada a -30 °C en caldo nutriente y 20% de glicerol, se sembraron en placas Petri que contenían agar nutriente por el método de agotamiento y se incubaron a 37°C durante 24 h.

La suspensión microbiana se preparó a la concentración de 10^8 UFC mL⁻¹ (densidad óptica a 600 nm de 0,8) y se adicionó a Erlenmeyers que contenían 50 mL de caldo nutriente (relación 1:10). Luego se incubaron a 37 °C en zaranda orbital a 110 rpm hasta obtener una densidad óptica a 600 nm entre 0,8-1.

Fermentación en estado sólido

La fermentación se realizó en Erlenmeyer de 2 L que contenían 100 g de bagazo de caña de azúcar seco previamente esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 min. La bacteria se inoculó al 15 % y se completó la humedad final de la FES hasta 80 % con medio mínimo (MM) compuesto por: NaCl (0.1 %), KH₂PO₄ (0.3%), K₂HPO₄ (0.6%) MgSO₄ (0.12%), NH₄HPO₄ (0.34%); KNO₃ (0.12%) y urea (0.54%). El pH de la disolución se ajustó a 7,5 con KOH (1 mol L⁻¹).

La FES se realizó en la incubadora a 33°C durante 24 h. Posteriormente se realizó la extracción de las enzimas al adicionar tampón fosfato de sodio 0,01 mol L⁻¹ (pH 7) a la relación 1:10 (p/v). El erlenmeyer se colocó en la zaranda orbital (HDL® APPARATUS) a 110 rpm durante 30 min y se filtró a través de tela de gasa. El extracto se centrifugó (Heal Force®) a 10 000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se colectó por decantación y se determinó la actividad xilanólítica.

Determinación de la actividad enzimática xilanólítica en el extracto

La reacción se realizó en tubos de ensayo de cristal al cual se añadieron 0,4 mL de xilano de avena al 1% (sustrato de la enzima) disueltos en tampón fosfato de sodio 0,01 mol L⁻¹, pH 6,5) y 0,1 mL del extracto enzimático. La incubación se realizó a 39 °C durante 10 min simulando las condiciones del óptimas del rumen según se describió por Díaz *et al.* (2013). A continuación, se agregó 0,5 mL de ácido 3,5 dinitrosalicílico para detener la reacción enzimática y los tubos se colocaron en baño termostático (KOTTERMANN) a 100°C durante 10 min para cuantificar los azúcares reductores producidos por la acción de la enzima. Finalmente se adicionaron 1,2 mL de agua destilada, se enfriaron a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech Ultrascope 2000) a una longitud de onda de 546 nm. Los blancos del ensayo contenían solución tampón y otro que contenía únicamente la solución del sustrato correspondiente (blanco sustrato). Con estos controles se corrigieron los valores para calcular los azúcares producidos por la hidrólisis del sustrato.

Para la realización de la recta de calibración se añadieron tubos que contenían 0,5 mL de solución tampón y 0,5 mL de disoluciones de xilosa con concentraciones de 0,55; 1,38; 2,22; 3,31 y 4,16 µg mL⁻¹. Los tubos se sometieron al procesado descrito para los tubos que contenían las muestras a analizar. Al valor de absorbancia obtenido en cada caso se le restó el correspondiente al blanco sustrato y blanco muestra. Una unidad de actividad enzimática se expresa como los µmol de xilosa liberados por minuto por mL de muestra a 39°C y pH 6,5.

3.4. Efecto del extracto enzimático en la degradación de la fibra en las especies seleccionadas

Se pesaron 0,4 g de las muestras en bolsas de poliéster (Ankom Corp #57) con un tamaño de poro de 30 μm y dimensiones de 4,5 x 5,5 cm, previamente pesadas. Se añadió 1 mL del extracto enzimático a cada bolsa y se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente. Se evaluaron tres tratamientos: 1 control: se adicionó tampón fosfato de sodio, 0.01 mol L⁻¹ (pH 7); D1: extracto enzimático sin diluir (10,97 UI mL⁻¹); D2: extracto enzimático diluido ½ (5,48 UI mL⁻¹). Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento.

Pasadas las 24 h se determinó el contenido en FDN, FDA según la técnica secuencial descrita por (Van Soest *et al.*, 1991), adoptando las modificaciones propuestas por (ANKOM, 1998).

3.5. Análisis estadístico

Para la composición química de los forrajes se utilizó la estadística descriptiva se determinó la media, desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV) Para la comparación de medias de la degradación de la fibra en los forrajes por efecto de las enzimas se utilizó el análisis de varianza simple para $P < 0,05$. Los procedimientos estadísticos se realizaron con el programa STATGRAPHICS Plus.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Composición química de los pastos y forrajes seleccionados

Los pastos tropicales se caracterizan por tener menor calidad lo cual afecta la productividad animal en la calidad de la leche y la carne (Taye y Etefa, 2020). La composición química de los pratenses y forrajeras tropicales en este estudio se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Composición química de los pastos y forrajes

Forrajes	cenizas	FDN (%)	FDA (%)	LIG (%)
<i>Saccharum officinarum</i>	6,11	62,99	37,48	6,48
<i>Cynodon nlemfuensis</i>	12,14	62,42	32,8	3,67
<i>Dichanthiun spp</i>	10,18	71,62	38,52	5,69
<i>Centrocema pubescens</i>	7.91	54,81	34,28	9,65
<i>Paspalum notatum</i>	9,14	70,84	35,11	3,76
<i>Alysicarpus vaginalis</i>	8,75	53,55	36,86	13,64

La especie *Saccharum officinarum* L. posee gran potencial para producción de forraje y el consumo satisfactorio por los bovinos, lo que la convierten en un recurso forrajero apropiado para el período de escasez de pasto (Rodríguez *et al.*, 2012). No obstante, los valores del contenido de la fibra obtenidos son más bajos que los informados por García, (2017). Esta diferencia puede estar relacionada con la edad del cultivo. Las plantas de *Saccharum officinarum* del presente experimento tienen seis meses de edad.

El resto de las gramíneas del estudio muestran elevados valores de carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa). Las leguminosas (*Centrocema pubescens* y *Alysicarpus vaginalis*) presentan mayor contenido de lignina en su pared celular

que las gramíneas, mientras que estas últimas tienen mayor contenido de hemicelulosa.

La diferencia entre las características estructurales de estas especies podría explicarse por el proceso de lignificación. En las leguminosas se presenta esencialmente en los anillos vasculares, en las gramíneas cubre la epidermis y desarrolla una alta proporción del tejido parenquimatoso a medida que la planta envejece (Lakshmi *et al.*, 2020).

Los pastos y forrajes tropicales, raramente exceden el 65% de digestibilidad debido al contenido de fibra en el caso de las especies en estudio oscila entre el 50 y el 70% (Vela, 2018). Una de las alternativas para incrementar la digestibilidad de estos alimentos es el tratamiento con enzimas fibrolíticas que favorezcan la degradación de la fibra de la pared celular e incrementar su digestibilidad (Kumar y Sridhar, 2021).

4.2. Efecto del extracto enzimático en la degradación de la fibra de los forrajes y pratenses

El tratamiento enzimático en los pastos y forrajes se muestra en la tabla 2. La magnitud del efecto en la degradación de la fibra varió con el tipo de forraje, lo que sugiere que, la acción de las enzimas fibrolíticas en el componente fibroso de la pared celular de los alimentos evaluados, depende de su naturaleza y, por lo tanto, sus características influyen en la respuesta.

Las enzimas del extracto favorecieron la degradación de la FDN en los pastos *Cynodon nlemfuensis*, *Dichanthium spp*, *Centrocema pubescens* y *Alysicarpus vaginalis*. No se modificó este componente en *Saccharum officinarum* y *Paspalum notatum*.

Los pratenses y forrajeras de mala calidad, como los que se evalúan en la presente investigación, se caracterizan por la elevada fracción de la FDN no digestible. Por tanto, la aplicación de enzimas exógenas podría mejorar

significativamente el rendimiento de los animales rumiantes en muchas partes del mundo, principalmente en los trópicos y subtrópicos (Díaz, 2017).

Tabla 2. Degradación de la fibra de los pastos y forrajes tratados con el extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44.

Forrajes	Tratamiento enzimático			± EE	Valor de p
	C	D1	D2		
<i>Saccharum officinarum</i>					
FDN	60.65	60.80	60.12	0.42	0.634
FDA	35.82	34.63	35.08	0.33	0.109
<i>Cynodon nlemfuensis</i>					
FDN	63.89^b	61.19^a	59.84^a	0.49	0.0031
FDA	32.80	31.81	31.94	0.37	0.211
<i>Dichanthium spp</i>					
FDN	71.18^c	68.78^b	66.50^a	0.53	0.0025
FDA	37.13	36.25	36.20	0.60	0.5060
<i>Centrocema pubescens</i>					
FDN	57.14^b	53.69^{ab}	51.09^a	0.45	0.0039
FDA	36.11	32.83	32.97	0.49	0.4645
<i>Paspalum notatum</i>					
FDN	66.76	68.46	67.30	0.65	0.2680
FDA	34.33	34.80	34.49	0.26	0.4880
<i>Alysicarpus vaginalis</i>					
FDN	56.06^b	56.17^b	52.26^a	0.66	0.0092
FDA	37.03	36.49	6.14	0.44	0.4101

Según Kumar y Sridhar (2021) el contenido de lignina de la pared celular, limita la acción de las enzimas y la digestión de la fibra. Sin embargo, en la presente investigación no se aprecia relación entre el contenido de lignina de los alimentos y la respuesta al tratamiento enzimático. Es importante destacar que la cuantificación de este componente se realiza por métodos convencionales, los que

en ocasiones no tienen en cuenta la complejidad de los enlaces que se establecen entre la lignina y los carbohidratos en los forrajes tropicales (Díaz *et al.*, 2015).

La FDA en los prateses y forrajeras utilizadas en la investigación no se modificaron por el tratamiento enzimático. Esta porción de la fibra está compuesta por la celulosa y la lignina, y este último compuesto está asociado físicamente a los polisacáridos de la pared celular a través de enlaces glicosídicos, éter y éster que forman una matriz alrededor de las microfibrillas de celulosa (Li *et al.*, 2015).

Las lacasas son las enzimas ligninolíticas más abundantes y se producen fundamentalmente a partir de hongos. De acuerdo a los resultados de la FDA, al parecer, en el extracto de *Bacillus subtilis* E44 no hay biocatalizadores que degradan la lignina y esta podría ser una de las causas por las cuales no se modificó la fracción.

Kryukov *et al.* (2019) destacaron también, que la efectividad del tratamiento enzimático en la alimentación animal depende de las dosis aplicadas y la extensión de la hidrólisis. El tratamiento enzimático en el pasto *Cynodon nlemfuensis* mostró diferencias significativas entre las dosis D1 y D2 en la disminución de la FDN respecto al control, pero no entre ellas. Sin embargo, D2 mostró mejores resultados que D1 en la degradación de la FDN en *Dichanthium spp.*, comparadas con el control. Mientras que, en *Centrocema pubescens* y *Alysicarpus vaginalis*, D2 fue el mejor tratamiento, y la dosis D1 no fue efectiva pues no presentó diferencias respecto al control.

La dosis de enzimas se establece a partir de su actividad en sustratos específicos, pero en la literatura no siempre los autores declaran la actividad de los catalizadores que se utilizan. En ocasiones se evalúa el efecto de enzimas comerciales o de extractos enzimáticos producidos por diferentes géneros microbianos.

Los resultados de la presente investigación evidencian que la menor dosis del extracto fue la más efectiva en la disminución de la FDN en los pastos y forrajes. Según Masey-O'Neill *et al.* (2014) la respuesta al incremento de la dosis de enzimas

no es proporcional a la degradación de la fibra. Resultados similares se mostraron en los estudios presentados por Díaz (2017) al evaluar cuatro dosis en tres enzimas comerciales en la degradación fibrosa de alimentos de baja calidad para rumiantes.

En el extracto enzimático se determinó solamente la actividad xilanolítica debido a que posee particular importancia en la alimentación de rumiantes (Da Costa *et al.*, 2019). No obstante, Matos (2021) notificó que en el extracto de *Bacillus subtilis* E44, coexisten otras enzimas como β -mananasas, endocelulasas, amilasas y proteasas, por lo que la degradación de la FDN en los pastos y forrajes no se debe solamente por la acción de las xilanasas.

Aftab *et al.* (2018) y Handique *et al.* (2018) notificaron que la acción sinérgica de varias enzimas favorece la degradación de los componentes estructurales de la pared celular y como consecuencia se incrementa su valor nutritivo. Además, aumenta la disponibilidad de almidones, proteínas y minerales atrapados en las paredes celulares y beneficia el sistema digestivo en animales jóvenes en los que la producción de enzimas endógenas aún es escasa (Taye y Etefa, 2020).

5. CONCLUSIONES

- ✓ El extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44 favorece la degradación de la FDN en las especies *Cynodon nlemfuensis*, *Dichanthiun spp.*, *Centrocema pubescens* y *Alysicarpus vaginalis*,
- ✓ La menor dosis de enzima ($D2=5,48 \text{ UI mL}^{-1} \text{ g}^{-1}$) fue la que mostró mejores resultados en la disminución de la FDN.

6. Recomendaciones

- ✓ Evaluar otras dosis del extracto enzimático en el tratamiento de los sustratos fibrosos utilizados en la alimentación para rumiantes.
- ✓ Determinar el efecto del extracto enzimático en otras dietas utilizadas en la nutrición de los rumiantes.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abid, K., Jabri, J., Beckers, Y., Yaich, H., Malek, A., Rekhis, J., Kamoun, M., 2019. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on the ruminal fermentation of agro-industrial by-products. *South African J. Anim. Sci.* 49, 612-618. <https://doi.org/10.4314/sajas.v49i4.2>
- Aftab, U., Bedford, M.R., 2018. The use of NSP enzymes in poultry nutrition: Myths and realities. *Worlds. Poult. Sci. J.* 74, 277-286. <https://doi.org/10.1017/S0043933918000272>
- Alberto, M., 2020. Obtención, caracterización y evaluación de lacasas fúngicas en la degradación de sustratos fibrosos para la alimentación animal. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias. Universidad Agraria de la Habana.
- ANKOM, 1998. Procedures for fibre and in vitro analysis. <https://doi.org/http://www.ankom.com>. Annamalai
- Arredondo, M. y Vázquez G., 2018. Pared celular de las plantas: Función estructura y aplicaciones. *Reavista saber más*. Artículo 38
- Arís, A. y Garcías-Fruitós., 2022. Uso de enzimas en la nutrición bovina. *Nutrición teórica frene a la nutrición real*. Abeitar. Artículo 257 , IRTA Caldes de Maontbui. España
- Asplund, J. M. 1994. The influence of energy on amino acid supply and utilization in the ruminant, en: *Principles of protein nutrition of ruminants*. Asplund, J. M., ed. CRC Press, Boca Ratón, Florida, EEUU.
- Bajaj, P., Mahajan, R., 2019. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 8711-8724. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10146-0>
- Beauchemin, Rode, K. A., Karren, L. M., & D., 1999. Use of feed enzymes in feedlot finishing diets. *Can. J. Anim.*
- Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P., Yang, W.Z., Rode, L.M., 2004. Mode of action of exogenous cell wall degrading enzymes for ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 84, 13–22. <https://doi.org/abs/10.4141/A02-102>
- Bedford, M., 2018. The evolution and application of enzymes in the animal feed

- industry : the role of data interpretation data interpretation. *Br. Poult. Sci.* 59, 486-493. <https://doi.org/10.1080/00071668.2018.1484074>
- Benić, M., Maćešić, N., Cvetnić, L., Habrun, B., Cvetnić, Ž., Turk, R., Samardžija, M., 2018. Bovine mastitis: a persistent and evolving problema requiring novel approach esforitscontrol - a review. *Vet. Arch.* 88, 535-557. <https://doi.org/doi.org/10.24099/vet.arhiv.0116>
- Bhardwaj, N., Kumar, B., Agrawal, K., Verma, P., 2021. Current perspective on production and applications of microbial cellulases : a review. *Bioresour. Bioprocess.* 8, 2-34. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00447-6>
- Bhat, M.K., Hazlewood, G.P., 2001. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases, en: Bedford, M.R., Partridge, G.G. (Eds.), *Enzymes in farm animal nutrition*. CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 11-49.
- Bortoluzzi, C., Scapini, L.B., Ribeiro, M.V., Pivetta, M.R., Buzim, R., Fernandes, J.I., 2019. Effects of β -mannanase supplementation on the intestinal microbiota composition of broiler chickens challenged with a coccidiosis vaccine. *Livest. Sci.* 228, 187-197. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.09.001>
- Brink, D.P., Ravi, K., Lidén, G., 2019. Mapping the diversity of microbial lignin catabolism: experiences from the eLignin database. *Appl Microbiol Biotechnol* 103, 3979pp. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s00253-019-09692-4>.
- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P.L., Srivastava, A.K., 2016. Bacterial xylanases : biology to biotechnology. *3 Biotech* 6, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0457-z>
- Chauhan, P.S., Puri, N., Sharma, P., Gupta, N., 2012. Mannanases: Microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 1817-1830. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3887-5>
- Cheng, K. J., C. W. Forsberg, H. Minato, J. W. Costerton. 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen, en: *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. Tsuda, T., Y. Sasaki, R. Kawashima, ed. Academic Press, San Diego, California, EEUU.
- Colombatto, D. y Beauchemin, K.A., 2003. A proposed methodology to standardize

the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. *Can. J. Anim.*

Cornejo-Cornejo, R., Azúm-González, J.L., Gorozabel-Muñoz, W., Vargas, P., Mendoza_Rivadeira, F., Macias-Barberan, R., 2020. Valor nutritivo in vitro de la cáscara *Musa paradisiaca* L., pre-tratada con enzima exógena xilanasa. *Pastos y Forrajes* 43, 11-17.

Craig, A.D., Bedford, M.R., Hastie, P., Khattak, F., Olukosi, O.A., 2019. The effect of carbohydrases or prebiotic oligosaccharides on growth performance, nutrient utilisation and development of small intestine and immune organs in broilers fed nutrient-adequate diets based on either wheat or barley. *J. Sci. Food Agric.* 99, 3246-3254. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9537>

Da Costa, A.C., Cavalheiro, G.F., De Queiroz Vieira, E.R., Gandra, J.R., de Tonissi e Buschinelli de Goes, R.H., da Paz, M.F., Fonseca, G.G., Leite, R.S.R., 2019. Catalytic properties of xylanases produced by *Trichoderma piluliferum* and *Trichoderma viride* and their application as additives in bovine feeding. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 19, 101-161. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101161>

Díaz, A., Carro, M.D.D., Saro, C., Mateos, I., Odongo, E., Ranilla, M.J., 2013. In Vitro Evaluation of Commercial Fibrolytic Enzymes for Improving the Nutritive Value of Low-Quality. *Anim. Nutr. Feed Technol.* 13, 461-476. <https://doi.org/https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20143137970>

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. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 99, 345-355. <https://doi.org/10.1111/jpn.12175>

Díaz, A., 2017. Estrategias para mejorar el valor nutritivo de los forrajes en producción convencional y ecológica. TESIS PRESENTADA PARA OPTAR POR EL GRADO CIENTÍFICO DE DOCTOR EN CIENCIAS. Universidad de León.

Gado, H.M., Salem, A.Z.M., Camacho, L.M., Elghandour, M.M.Y. y Salazar, M.C., 2013. Influence of exogenous enzyme on in vitro ruminal degradation of ensiled rice straw with DDGS. *Animal Nutrition and Feed Technology.*

- Galindo, J., Elías, A., Muñoz, E., Marrero, Y., González, N., Sosa, A., 2017. Ruminant activators , general features and their advantages for feeding ruminants. Cuba. J. Agric. Sci. 51, 11-23.
- Gallardo, O., 2007. Caracterización de nuevas xilanasas bacterianas. Ingeniería de enzimas con la xilanasas B de *Paenibacillus barcinonensis*. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias. Universidad de Barcelona. Universidad de Barcelona, España.
- García, D., 2017. Respuesta productiva y composición química de la leche de cabras alpino frances, suplementadas con enzimas fibrolíticas exógenas. Tesis presentada en opción al título de Ingeniero Agrónomo Zootecnista.
- García, V., 2020. Evaluación de la actividad enzimática de cepas de *Trichoderma* para el desarrollo de enzimas exógenas para rumiantes. Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Golder, H.M., Rossow, H.A., Lean, I.J., 2019. Effects of in-feed enzymes on milk production and components, reproduction, and health in dairy cows. J. Dairy Sci. 102, 8011–8026. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16601>
- Handique, B., Maurya, L.K., Devi, Y.R., 2018. Supplementation of exogenous fibrolytic enzyme in livestock nutrition. J. Entomol. Zool. Stud. 6, 302-305.
- Iannaccone, F., Alborino, V., Dini, I., Balestrieri, A., Marra, R., Davino, R., Di Francia, A., Masucci, F., Serrapica, F., Vinale, F., 2022. In Vitro Application of Exogenous Fibrolytic Enzymes from *Trichoderma* spp. to Improve Feed Utilization by Ruminants. Agric. 12, 573. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE12050573>
- Iráizoz, P.A., 2011. Estudio y formulación de nuevos cócteles enzimáticos para la mejora de la producción de etanol a partir de paja de trigo. Tesis presentada para optar por el título de Doctor en ciencias. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Jimoh, A., 2018. Effects of enzyme cocktails on in vitro digestibility of palm kernel cake. J. Cent. Eur. Agric. 19, 114-125.
- Jørgensen, H., Kristensen, J.B., Felby, C., 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. Biofuels.

- Bioprod. Biorefin. 119-134. <https://doi.org/10.1002/bbb.4>
- Kebreab, E., 2016. Supplementation of β -mannanase (ctczyme) to lactating dairy cattle diets improves feed conversion efficiency and somatic cell count. *Anim. Sci.* 94, 658–659. <https://doi.org/10.2527/jam2016-1362>.
- Kryukov, V.S., Glebova, I.V., Zinoviev, S.V., 2019. Monitoring the Activity of Feed Enzymes in Vitro and Their Activity in the System that Modulates the GIT. *Ecol. Evol. Biol.* 4, 33-38. <https://doi.org/10.11648/j.eeb.20190403.12>
- Kumar, B., Verma, P., 2020. Enzyme mediated multi-product process: a concept of bio-based refinery. *Ind Crop. Prod* 154, 112607. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112607>
- Kumar, V.P., Sridhar, M., 2021. Study on Production of Microbial Lignolytic Enzymes for Deconstruction of Lignocellulosic Biomass for Feeding Ruminants : Current Trends and Future Study on Production of Microbial Lignolytic Enzymes for Deconstruction of Lignocellulosic Biomass for Feeding Ruminants, en: *Research Aspects in Agriculture and Veterinary Science*. <https://doi.org/10.9734/bpi/raavs/v3/4417F>
- Lakshmi, R., Kumari, K., Adegbeye, M., y Ravikanth, P., 2020. Anti-nutritional factors in Indian leguminous top feeds: A review on their feeding management. *International Journal of Livestock Research*.
- Lee, J., Hong, J., Lim, H., 1997. Experimental optimization of fed – batch culture for poly- γ -hydroxybutyrate acid production. *Biotechnol. Bioeng.* 56, 697–705. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19971220\)56:6<697::AID-BIT13>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19971220)56:6<697::AID-BIT13>3.0.CO;2-5)
- López-Ordaz, Rufino, Sánchez-López, F., Sanchez del Real, C., Alejandro Lara-Bueno, López-Ordaz, Reyes, Ruiz-Flores, A., 2020. Efecto de la adición de mannanasa sobre el consumo de alimentos, producción, composición y contenido de células somáticas en leche de vacas Holstein- Friesian. *Ciencias Nat. e Ing.* <https://doi.org/10.21640/ns.v12i25.2334>
- Lozano, J.A., Galindo, J.D., García-Borrón, J.C., Martínez, J.H., Peñafiel, R. y Solano, F., 2005. *Bioquímica y Biología Molecular para Ciencias de la Salud*. Edición 3. Madrid España.
- Macías, A., Hurtado, J.R., Cedeño, D.M., Vite, F.A., Scott, M.M., Vallejo, P.A.,

- Macías, M.J., Santana, J.W., Espinoza, M.J., Ubillús, S.P., Arteaga, S.X., Torres, O.E., Pigüave, J.M., Mera, L.A., Chavarría, D.I. y Intriago, K.J., 2018. Introducción al estudio de la bioquímica. Edición 1. Editorial Área de innovación y desarrollo. Els Alzamora, 17 - 03802 - ALCOY (ALICANTE). España
- Malhotra, G., Chapadgaonkar, S., 2018. Production and applications of xylanases : an overview. *J. Biotechnol. Comput. Biol. Bionanotechnol.* 99, 59-72. <https://doi.org/10.5114/bta.2018.73562>
- Margida, M.G., Lashermes, G., Moorhead, D.L., 2020. Estimating relative cellulolytic and ligninolytic enzyme activities as functions of lignin and cellulose content in decomposing plant litter. *Soil Biol. Biochem.* 141, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107689>
- Masey-O'Neill, H. V., Smith, J.A., Bedford, M.R., 2014b. Multicarbohydase enzymes for non-ruminants. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 27, 290-301. <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13261>
- Matos, M., 2021. Obtención y evaluación de un extracto enzimático para el tratamiento de dietas fibrosas en la alimentación avícola. Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias. Universidad de Matanzas.
- Matos, M.M., Valdivia, A., Rodríguez, Z., , R. Boucourt, M.A.B., Portilla, Y., Ramírez, Yasmery Rubio, .Hector L., 2018. Production of xylanases by *Bacillus subtilis* E44 under submerged fermentation conditions Producción de xilanasas por *Bacillus subtilis* E44 en condiciones de fermentación sumergida. *Cuba. J. Agric. Sci.* 52, 1-8. <https://doi.org/193060480010>
- McAllister, T. A., Hristov, A. N., Beauchemin, K. A., Rode, L. M. y Cheng, K., 2001. Enzymes in ruminant diets. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. M. R. Bedford and G. G. Partridge (Eds). CABI Publishing, Wallingford, Oxon, U. K.
- Mcgrath, J., Duval, S.M., Tamassia, L.F.M., Kindermann, M., Stemmler, R.T., Gouvea, V.N. De, Acedo, T.S., Immig, I., Williams, S.N., Celi, P., 2018. Research in Veterinary Science Nutritional strategies in ruminants : A lifetime approach. *Res. Vet. Sci.* 116, 28-39. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.09.011>
- 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. *Sci. World J.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/247437>
- Miranda-Romero, L.A., Ch, G., Zepeda-batista, J.L., Arturo, C., 2022. Improvement of Ruminant Neutral Detergent Fiber Degradability by Obtaining and Using Exogenous Fibrolytic Enzymes from White-Rot Fungi. *Animals* 12, 843. <https://doi.org/10.3390/ani12070843>
- Molina, E., 2018. los rumiantes como productores de alimentos nutritivos y saludables. *El diario*.
- Moore, K.J., Jung, H.J., 2001. Lignin and fiber digestion. *J. of Range Manag.* 54, 420-430. https://doi.org/10.2458/azu_jrm_v54i4_moore
- Moreira, L.R.S., Filho, E.X.F., 2008. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 1, 165-178. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1423-4>
- Muirhead, S., 2001. *Direct Fed Microbial, Enzyme and Forage Additive Compendium*. The Miller Publishing Co., Minnetonka, MN.
- Nsereko, V.L., Morgavi, D.P., Rode, L.M., Beauchemin, K.A., McAllister, T.A., 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. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(00\)00225-X](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(00)00225-X)
- Ojha, B.K., Singh, P.K., Shrivastava, N., 2019. *Enzymes in the Animal Feed Industry*, en: Mohammed, K. (Ed.), *Enzymes in Food Biotechnology*. Academic Press, Cambridge, MA, pp. 93-109. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00007-4>
- ONU, 2022. La población mundial llega a los 8000 millones de habitantes. departamento de asuntos economicos y sociales. <https://www.un.org/es/desa-es>
- Ortiz, M.L., 2010. Evaluación preliminar de la abundancia de hongos lignolíticos cultivables y su actividad peroxidasa, obtenidos a partir de suelos con diferentes usos agrícolas en zona rural de Villavicencio. *Orinoquia* 14, 171-177. <https://doi.org/articulo.oa?id=89622691014>

- Parodi, P., Landi, H., 2012. ENZIMAS FIBROLÍTICAS : UNA ALTERNATIVA PARA INCREMENTAR LA UTILIZACIÓN DE PARED CELULAR POR RUMIANTES. Rev. FAVE-Ciencias Vet. 11, 71-81.
- Pech-Cervantes, A.A., Pech-Cervantes, A.A., Ogunade, I.M., Jiang, Y., Estrada-Reyes, Z.M., Arriola, K.G., Amaro, F.X., Staples, C.R., Vyas, D., Adesogan, A.T., Jiang, Y., Estrada-Reyes, Z.M., Arriola, K.G., Amaro, F.X., Staples, C.R., Vyas, D., Adesogan, A.T., 2021. Effects of a xylanase-rich enzyme on intake, milk production, and digestibility of dairy cows fed a diet containing a high proportion of bermudagrass silage. J. Dairy Sci. 104, 7671–7681. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19340>
- Pérez, M. Q., Milián, G., Piad. R. B., González, R.C., Bocourt, R. S. & Savón, V., 2006. Hidrolizado de fondaje de cubetas de destilerías de alcohol con un crudo enzimático de la cepa de Bacillus licheniformis E-44 y su procedimiento de obtención.
- Pérez, M., Milián, G., Boucourt, R., Alemán, R., 2016. Evaluación in vitro de prebióticos en hidrolizados de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) preparados por diferentes métodos. Rev. La Técnica ISSN 1390-6895.
- Phakachoed, N., Suksombat, W., Colombatto, D., & Beauchemin, K. A., 2013. Use of fibrolytic enzymes additives to enhance in vitro ruminal fermentation of corn silage. Livestock Science.
- Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Amorim, D.S., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67, 577-591. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>
- Qiao, Y., 2018. Dietary B-mannanase supplementation improved growth and health of nursery pigs fed high soybean meal diet. J. Anim. Sci. 96, 304-305. <https://doi.org/10.1093/jas/sky404.670>
- Refat, B., Christensen, D.A., McKinnon, J.J., Yang, W., Beattie, A.D., McAllister, T.A., Eun, J.S., Abdel-Rahman, G.A., Yu, P., 2018. Effect of fibrolytic enzymes on lactational performance, feeding behavior, and digestibility in high-producing dairy cows fed a barley silage-based diet. J. Dairy Sci. 101, 7971-7979. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14203>

- Rodríguez, A.; Torres, R.; Campos, O.; Aroeira, L. 2012. Uréia e sulfato de cálcio para bovinos alimentados com cana de açúcar. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Vicoso*, 23(4), pp. 585-594
- Rodríguez, M., Milián, G., Rondón, A.J., Bocourt, R., Beruvidez, A., Crespo, E., 2015. Evaluation of a probiotic mixture in the started birds feeding of heavy pure breeds B4 in a production unit. *Rev. Cuba. Cienc. Agrícola* 49, 497-502
- Rodríguez, M., Milián, G., Castillo, A.J.R., Beruvides, A., Arteaga, F., 2019. Actividad antibacteriana del aditivo simbiótico PROBIOLEV® en pollos de ceba infectados con *Salmonella enterica*. *Rev. Venez. Microbiol.* 39, 34-40.
- Rosser, C., Terry, S.A., Badhan, A., McAllister, T.A., Beauchemin, K.A., 2022. Current Knowledge and Future Opportunities for Ruminant Enzymes. CABI Books. <https://doi.org/10.1079/9781789241563.0009>
- Saeed, M., Ayaşan, T., Alagawany M, El-Hack, M., Abdel-Latif, M., Patra, S.M., Patra, A., 2019. The Role of β -Mannanase (Hemicell) in Improving Poultry Productivity, Health and Environment. *Brazilian J. Poult. Sci.* 21, 2019. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2019-1001>
- Santana, Y.A.G., Vasconcelos, V.R., Alves, A.A., Silva, S.C.D.M.L., Garcez, B.S., 2018. Fermentation characteristics in hay from *Cynodon* and crop stubble treated with exogenous enzymes. *Rev. Ciênc. Agron.* 49, 167-173. <https://doi.org/0.5935/1806-6690.20180019>
- Selzer, K., Hassen, A., Akanmu, A.M., Salem, A.Z., 2021. Digestibility and rumen fermentation of a high forage diet pre-treated with a mixture of cellulase and xylanase enzymes. *South* 51. <https://doi.org/10.4314/sajas.v513.14>
- Soni, H., Kango, N., 2013. Microbial Mannanases : Properties, en: Pletschke, P.S. and B.I. (Ed.), *Advances in Enzyme Biotechnology*. Springer India, India, pp. 41-56. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1094-8>
- Tarasov, D., Leitch, M., Fatehi, P., 2018. Lignin-carbohydrate complexes: Properties, applications, analyses, and methods of extraction: A review. *Biofuels Biotechnol.* 11, 269. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1262-1>
- Taye, D., y Etefa, M., 2020. Review on improving nutritive value of forage by applying exogenous enzymes. *Int. J. Vet. Sci. Anim. Husband.* 5, 72-79.

- Tewoldebrhan, T.A., Appuhamy, J., Lee, J.J., Niu, M., Seo, S., Jeong, S., Kebreab, E., 2017. Exogenous beta-mannanase improves feed conversion efficiency and reduces somatic cell count in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 100, 244-252. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11017>
- Tirado-González, D.N., Miranda-Romero, L.A., Ruíz-Flores, A., Medina-Cuéllar, E.S., Ramírez-Valverde, R. y Tirado-Estrada, G., 2018. Metanálisis: efectos de enzimas fibrolíticas exógenas en dietas de rumiantes. *JourAnal of Applied Animal Research*.
- Tirado-González, D.N., Tirado-Estrada, G., Miranda-Romero, L.A., Ramírez-Valverde, R., Medina-Cuéllar, S.E., Salem, A.Z., 2021. Effects of Addition of Exogenous Fibrolytic Enzymes on Digestibility and Milk and Meat Production – A Systematic Review. *Ann. Anim. Sci.* 2, 1159-1192. <https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1399135>
- Trejo, L.T., Zepeda, B.A., Franco, F.J., Soto, S.S., Ojeda, R.D., Ayala, M.M., 2017. Uso de extracto enzimático de *Pleurotus ostreatus* sobre los parámetros productivos de cabras. *Abanico Vet.* 7, <https://doi.org/10.21929/abavet2017.72.1>
- Valdivia, L., Matos, M., Rodríguez, Z., Pérez, Y., Rubio, Y. y Vega, J., 2019. Los aditivos enzimáticos, su aplicación en la crianza animal. *Cuban Journal of Agricultural Science. Scielo.* Vol 53. No 4.
- Van Soest P.J., Robertson J. B. y Lewis B. A. 1991. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J dairy sci.*
- Van Soest, P. J., 1994. *Nutritional ecology of the ruminant.* Cornell University Press, Ithaca, Nueva York, EEUU.
- Vela, C., 2018. Evaluación de la calidad de especies pratenses y forrajeras en la vaquería 65 de la empresa pecuaria genética de matanzas. Tesis presentada en opción del título de Ingeniero Agrónoma. Universidad de Matanzas.
- Velázquez-De Lucio, B.S., Hernández-Domínguez, E.M., Villa-García, M., Díaz-Godínez, G., Mandujano-Gonzalez, V., Mendoza-Mendoza, B., Álvarez-

Cervantes, J., 2021. Exogenous enzymes as zootechnical additives in animal feed: A review. *Catalysts* 11, <https://doi.org/10.3390/catal11070851>

Yamabhai, M., Sak-ubol, S., Srila, W., Haltrich, D., Yamabhai, M., Sak-ubol, S., Srila, W., Haltrich, D., 2016. Mannan biotechnology : from biofuels to health. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923372>