



UNIVERSIDAD DE MATANZAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INSTITUTO DE CIENCIA ANIMAL



OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE UN EXTRACTO ENZIMÁTICO PARA EL TRATAMIENTO DE DIETAS FIBROSAS EN LA ALIMENTACIÓN AVÍCOLA



Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias

Lic. Madyu de las Mercedes Matos Trujillo, MSc.

Matanzas

2021



UNIVERSIDAD DE MATANZAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INSTITUTO DE CIENCIA ANIMAL



OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE UN EXTRACTO ENZIMÁTICO PARA EL TRATAMIENTO DE DIETAS FIBROSAS EN LA ALIMENTACIÓN AVÍCOLA

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias

Lic. Madyu de las Mercedes Matos Trujillo, MSc.

Tutores: *Lic. Zoraya Rodríguez Alonso, Dr. C.*

Dr. MCV. Aymara Luisa Valdivia Avila, Dr. C.

Matanzas

2021

La presente investigación contó con el financiamiento de:

El proyecto nacional “Obtención de enzimas hidrolasas producidas por *Bacillus* sp. para elevar la calidad del alimento animal” aprobado por el programa nacional de Producción de Alimento Animal (código: P131LH002-051)

Proyecto de colaboración con la Universidad de León en España financiado por la agencia Española de Cooperación Internacional para el desarrollo (AECID) y el Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación de España (MAEC).

A mis padres y hermana por su apoyo incondicional

A mi hija, por su luz

La culminación de esta etapa en la vida profesional, implica la participación de muchas personas que nos acompañaron a lo largo del camino.

Quisiera agradecer en primer lugar a mis padres por mostrarme el camino correcto y el apoyo que me brindaron para lograr las metas profesionales que me propuse.

A mi hija Madiam, por su cariño y comprensión al prescindir de mis atenciones durante horas, días y hasta meses para cumplir este proyecto de vida. ¡Gracias mi niña!

A mi hermana y cuñado por apoyarme en todo momento y cuidar a Mady siempre que lo necesité.

A mis tías, primas y sobrinos por trasmitirme tanto amor y cariño.

Al profesor Bocurt por confiar en mi para desarrollar esta investigación.

A mis tutoras: las doctoras Zoraya y Aymara por su guía, apoyo, entrega, amistad y confianza: ¡Gracias, gracias mil!!!

A los oponentes, miembros de los tribunales y todos los que se tomaron su tiempo en leer el documento y lo enriquecieron con sus aportes.

A mis amigos, asesores y consejeros Irina y Jonathan del Departamento de Química de la UM y el profe Luis de Camagüey que tanto aportaron en mi formación y a quienes agradeceré infinitamente su entrega.

A mi familia del CETENZ, Aymara, Yunel, Camacho, Hectico, Leissy, Yasma, Arlety, Lizdaysi y Yanet por los aportes al conocimiento, preocupación y amistad incondicional a lo largo del camino.

A los colegas del CEBIO y la Facultad de Ciencias Agropecuarias que me apoyaron en esta difícil tarea: Ana, Grethel, Marlen, Marlene, Enildo, Lima, Agustín, Sonita y en especial a mi gran amigo Darías y su esposa Amalia quienes me aportaron gran sabiduría.

A Yadi por su compañía en las noches en el lab.

A Leti por estar cerca de mí en los momentos más difíciles, por velar y cuidar de Mady, como su hija, durante los largos experimentos en el laboratorio.

A los colegas del ICA, María, Marien, las muchachas del departamento de Matemáticas, Barbarita, Niurkita, Yanelis, Yuya, Dania, Daiky Lazarita y Daylin por el apoyo incondicional y hospitalidad.

A mis colegas por el mundo, Karel, Ariel, Marife, Omar, Azucena, Mariajo, Alexey, Ermano y Claudia por su colaboración.

*A **TODOS** los amigos de la vida, quienes estuvieron siempre presentes y preocupados. A los amigos y colegas de la EPICA y el INICA, gracias por su confianza y aportes en mi vida profesional.*

Síntesis

La aplicación de enzimas en los piensos destinados a la alimentación avícola, constituye una alternativa para disminuir los polisacáridos no amiláceos de las dietas. El objetivo de la tesis fue obtener el extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44, para el tratamiento del contenido fibroso de dietas en la alimentación avícola. Se evaluó la síntesis de las enzimas xilanasas, β -mananasas y endocelulasas por la cepa en medios selectivos y durante la fermentación en estado sólido (FES) con salvado de trigo, bagazo de caña, cáscara de arroz y paja de maíz como fuentes de carbono. Se optimizó la FES y la extracción de los biocatalizadores mediante diseño compuesto central. Se determinó la estabilidad de las enzimas β -mananasas al pH y la temperatura porque mostraron mayor actividad. Se evaluó el efecto en la degradación de la fibra y la digestibilidad *in vitro* de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras. La optimización de la FES con el bagazo de caña de azúcar mediante la función de deseabilidad de Derringer favoreció la producción simultánea de β -mananasas y xilanasas en el extracto, con incrementos de 13,59 y 3,06 veces, respectivamente. Las β -mananasas fueron estables a 40 °C y al pH (3 y 7,5). El extracto enzimático modificó la FDN, la hemicelulosa en la dieta e incrementó la digestibilidad *in vitro* de la MS, FDN y HEM.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1.1 Características anátomo- fisiológicas del tracto gastrointestinal de las aves .	5
1.2 Dietas utilizadas en la producción avícola	8
1.2.1 Principales requerimientos nutricionales en las dietas para las aves	8
1.2.2 Polisacáridos amiláceos de reserva en la alimentación avícola.	9
1.2.3 Polisacáridos estructurales de la pared celular en las dietas. Polisacáridos no amiláceos (PNA).....	10
1.2.4 Otras fuentes energéticas de las dietas.....	12
1.3 Aditivos enzimáticos en la alimentación avícola.....	13
1.3.1 Principales enzimas glucolíticas utilizadas como aditivos en la producción avícola.....	14
1.3.2 Resultados de la aplicación de los aditivos enzimáticos en las aves.....	18
1.4 Métodos de digestibilidad <i>in vitro</i> de nutrientes.....	23
1.5 Obtención de enzimas microbianas	25
1.5.1 Fermentación en estado sólido (FES).....	26
1.6 <i>Bacillus subtilis</i> E44 y su empleo en la producción animal	28
CAPÍTULO 2. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE XILANASAS, β -MANANASAS Y ENDOCELULASAS POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i> E44 EN MEDIOS SELECTIVOS Y DURANTE LA FES	30
2.1 Materiales y métodos	31
2.1.1 Síntesis de xilanasas, β -mananasas y endocelulasas por <i>Bacillus subtilis</i> E44 en medios selectivos	31

2.1.2 Síntesis de xilanasas, β -mananasas y endocelulasas por <i>Bacillus subtilis</i> E44 durante la FES con residuos agroindustriales	32
2.1.3 Determinación de la composición química de los residuos agroindustriales	33
2.1.4 Fermentación en estado sólido	34
2.1.5 Extracción de las enzimas	34
2.1.6 Actividades enzimáticas.....	34
2.1.7 Análisis estadístico	35
2.2 Resultados y discusión	35
2.2.1 Síntesis de xilanasas, β -mananasas y endocelulasas por <i>Bacillus subtilis</i> E44 en medios selectivos	35
2.2.2 Síntesis de xilanasas, β -mananasas y endocelulasas por <i>Bacillus subtilis</i> E44 durante la FES con residuos agroindustriales	38
CAPÍTULO 3. OPTIMIZACIÓN DE LA FES CON <i>BACILLUS SUBTILIS</i> E44 PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE XILANASAS, β-MANANASAS Y ENDOCELULASAS.....	45
Introducción.....	45
3.1 Materiales y métodos	46
3.1.1 Tamizado de los factores en estudio mediante un diseño Plackett-Burman	46
3.1.2 Optimización de la FES del bagazo de caña de azúcar con <i>B. subtilis</i> E44	47
3.1.3 Optimización del proceso de extracción de las enzimas del residuo fermentado.....	47
3.2. Resultados y discusión	48
3.2.1 Tamizado de los factores en estudio mediante un diseño experimental Plackett-Burman	48

3.2.2 Optimización de la FES del bagazo de caña de azúcar con <i>B. subtilis</i> E44	53
3.2.3 Optimización del proceso de extracción de las enzimas del residuo fermentado.....	60
CAPÍTULO 4. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LAS β -MANANASAS EN EL EXTRACTO AL pH Y LA TEMPERATURA.....	67
4.1 Materiales y métodos	68
4.1.1 Estabilidad al pH de las enzimas β -mananasas en el extracto enzimático	68
4.1.2 Estabilidad a la temperatura de las enzimas β -mananasas en el extracto	69
4.1.3 Caracterización enzimática del extracto obtenido de <i>Bacillus subtilis</i> E44 liofilizado	69
Actividad de las amilasas.....	69
Actividad proteolítica.....	69
4.1.4 Análisis estadístico	70
4.2 Resultados y discusión	72
4.2.1 Estabilidad al pH de las enzimas β -mananasas del extracto enzimático.....	72
4.2.2 Estabilidad a la temperatura de las enzimas β -mananasas del extracto enzimático.....	74
4.2.3 Caracterización enzimática del extracto obtenido de <i>Bacillus subtilis</i> E44 liofilizado	78
CAPÍTULO 5. EVALUACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO EN LA DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA DIETA DE DESARROLLO PARA POLLITAS DE REEMPLAZO DE GALLINAS PONEDORAS	83
5.1 Materiales y métodos	84

5.1.1 Degradación de la fibra del salvado de trigo tratado con el extracto enzimático.....	84
5.1.2 Dosis efectiva y el tiempo de incubación del extracto enzimático en la degradación de nutrientes de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras.....	85
5.1.3 Degradación de la fibra y digestibilidad <i>in vitro</i> de nutrientes de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras tratadas con el extracto enzimático	86
5.1.4 Análisis estadístico	87
5.2 Resultados y discusión	87
5.2.1 Degradación de la fibra del salvado de trigo tratado con el extracto enzimático.....	87
5.2.2 Dosis efectiva y el tiempo de incubación del extracto enzimático en la degradación de nutrientes de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras.....	89
5.2.3 Degradación de la fibra y digestibilidad <i>in vitro</i> de nutrientes de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras tratadas con el extracto enzimático	91
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN GENERAL	96
CONCLUSIONES.....	100
RECOMENDACIONES	101
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
ANEXOS	159

ABREVIATURAS

TGI: tracto gastrointestinal	μL: microlitros
PNA: polisacáridos no amiláceos	mL: mililitros
FES: fermentación en estado sólido	L: litros
PcB: Plackett Burman	mol: moles
t _{1/2} : tiempo de vida media	mg: miligramos
EE: error estándar	g: gramos
%: porcentaje	kg: kilogramos
FDN: fibra detergente neutra	UI: unidades internacionales
FDA: fibra detergente ácida	h: horas
MS: materia seca	min: minutos
MM: medio mínimo	NaCl: cloruro de sodio
DE: desviación estándar	KH ₂ PO ₄ : dihidrógeno fosfato de potasio
HEM: hemicelulosa	K ₂ HPO ₄ : hidrógeno fosfato de potasio
AEz: actividad enzimática	MgSO ₄ : sulfato de magnesio
CV: coeficiente de variación	KNO ₃ : nitrato de potasio
IP: índice de potencia	(NH ₄) ₂ HPO ₄ : hidrógeno fosfato de amonio
°C: grados Celsius	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Residuos agroindustriales seleccionados para la inducción de las enzimas durante la FES.	32
Tabla 2. Índice de potencia calculado para las enzimas xilanasas, β -mananasas y endocelulasas producidas por <i>Bacillus subtilis</i> E44.	36
Tabla 3. Composición química (%) de los residuos agroindustriales utilizados durante la FES.	36
Tabla 4. Expresión de xilanasas, β -mananasas y endocelulasas en la FES de residuos agroindustriales con <i>Bacillus subtilis</i> E44.	41
Tabla 5. Condiciones de la FES y componentes del medio de cultivo incluidos en el diseño Plackett-Burman	48
Tabla 6. Matriz experimental del diseño Plackett-Burman para la etapa de tamizado.	49
Tabla 7. Condiciones de la FES y del medio de cultivo para el diseño superficie de respuesta.....	49
Tabla 8. Matriz experimental de la optimización de la FES con <i>Bacillus subtilis</i> E44 mediante el diseño compuesto central.	49
Tabla 9. Matriz experimental para la optimización del proceso de la extracción de β -mananasas y xilanasas mediante el diseño superficie de respuesta.	50
Tabla 10. Actividad de las enzimas xilanasas, β -mananasas y endocelulasas obtenidas en el diseño Plackett-Burman.	52
Tabla 11. Resultados de las enzimas xilanasas, β -mananasas y endocelulasas en el diseño Plackett Burman.....	52
Tabla 12. Resultados del diseño superficie de respuesta para las enzimas β -mananasas.....	55
Tabla 13. Optimización de la FES con <i>Bacillus subtilis</i> E44 para la producción de β -mananasas.....	56
Tabla 14. Resultados del diseño superficie de respuesta para la producción de xilanasas durante la FES con <i>B. subtilis</i> E44.	56
Tabla 15. Optimización de respuestas múltiples para la producción de xilanasas y β -mananasas durante la FES con <i>Bacillus subtilis</i> E44.	58

Tabla 16. Resultados del diseño superficie de respuesta para optimizar la extracción de xilanasas y β -mananasas del bagazo de caña de azúcar fermentado.	61
Tabla 17. Comparación de disolventes que se evaluaron para la extracción de xilanasas.	62
Tabla 18. Óptimos para la extracción de xilanasas y β -mananasas del residuo fermentado.	63
Tabla 19. Optimización de respuestas múltiples para la extracción de β -mananasas y xilanasas del residuo fermentado.	63
Tabla 20. Actividades enzimáticas en el extracto de <i>Bacillus subtilis</i> E44 en la FES optimizada y sin optimizar.	65
Tabla 21. Actividades de endocelulasas, amilasas y proteasas en el extracto de <i>Bacillus subtilis</i> E44.	79
Tabla 22. Fraccionamiento de la fibra del salvado de trigo tratado con el extracto enzimático de <i>Bacillus subtilis</i> E44.	88
Tabla 23. Efecto de la dosis y el tiempo de incubación del extracto enzimático en la producción de azúcares reductores en la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras.	90
Tabla 24. Fraccionamiento fibroso de la dieta para pollitas de reemplazo tratada con el extracto enzimático de <i>Bacillus subtilis</i> E44.	92
Tabla 25. Digestibilidad <i>in vitro</i> de los nutrientes de la dieta tratada con el extracto de enzimas de <i>B. subtilis</i> E44.	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tracto gastrointestinal de los pollos.	5
Figura 2. Esquema general simplificado de los principales componentes de la pared celular vegetal.	11
Figura 3. Esquema del mecanismo sinérgico de los componentes celulolíticos... ..	15
Figura 4. Enzimas que participan en la degradación del xilano.....	17
Figura 5. Enzimas que participan en la degradación del galactomanano.....	18
Figura 6. Halo de hidrólisis formado durante el crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> E44 en los medios selectivos.	36
Figura 7. Superficie de respuesta en interacción de la temperatura de incubación y el pH inicial para las β -mananasas durante la optimización de la FES.	56
Figura 8. Superficie de respuesta de la interacción entre la temperatura de incubación y el pH inicial para las xilanasas durante la optimización de la FES. ...	57
Figura 9. Superficie de respuesta de la optimización múltiple de β -mananasas y xilanasas.	58
Figura 10. Superficie de respuesta de la optimización de la extracción múltiple de β -mananasas y xilanasas del residuo fermentado.	63
Figura 11. Metodología para la obtención del extracto de enzimas con actividad β -mananasas y xilanasas durante la FES del bagazo de caña de azúcar con <i>Bacillus subtilis</i> E44.	66
Figura 12. Estabilidad al pH de las enzimas β -mananasas del extracto enzimático.	73
Figura 13. Cinética de inactivación térmica de la β -mananasas a las temperaturas de 40; 50 y 60, 70 y 80 °C.....	74
Figura 14. Tiempo de vida media ($t_{1/2}$) del proceso de inactivación térmica de las enzimas β -mananasas en el extracto enzimático a las temperaturas entre 40-80 °C.	77

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Organización de la tesis	159
Anexo 2. Resultados del diseño experimental Plackett-Burman para la producción de xilanasas.	160
Anexo 3. Resultados del diseño experimental Plackett-Burman para la producción de β -mananasas.....	161
Anexo 4. Resultados del diseño experimental Plackett-Burman para las enzimas endocelulasas.	162
Anexo 5. Composición química de la dieta de crecimiento para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras.....	163

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de la población mundial demanda el incremento de los bienes provenientes del sector ganadero a la cadena de producción alimenticia. Este hecho constituye una de las necesidades más urgentes a resolver a escala global e impone grandes retos a los productores del sector, para satisfacer la demanda sin comprometer los costos de la producción (Raza *et al.*, 2019).

Las aves son una importante fuente de proteínas y micronutrientes de alta calidad para el consumo humano a nivel mundial. La alimentación, en esta especie, constituye el 70-75% de los costos. Se basa fundamentalmente en granos de cereales como maíz, trigo, soya y proteínas vegetales, los que cubren los requerimientos energéticos y proteicos (Thavasiappan *et al.*, 2020).

Los precios de los granos en el mercado internacional, destinados a la alimentación avícola, se incrementaron considerablemente en los últimos años (Raza *et al.*, 2019). Los países pobres son los más afectados, por lo que resulta necesario la búsqueda de alternativas encaminadas a satisfacer los requerimientos de las aves para lograr producciones sostenibles, económicas y saludables (Peinado, 2015; Alagawany *et al.*, 2017).

Debido al paradigma que se presenta, los productores tratan de encontrar fuentes energéticas y proteicas más económicas, sin embargo, poseen menor valor nutricional. Estas materias primas contienen factores antinutricionales como los polisacáridos no amiláceos (PNA) que no se digieren por los monogástricos, debido a la carencia de enzimas endógenas y se comprometen los rendimientos productivos (De Souza *et al.*, 2014 ; Habte-Tsion *et al.*, 2018; Raza *et al.*, 2019).

La adición de enzimas carbohidrasas exógenas a las dietas es una de las estrategias dirigidas a minimizar los efectos negativos de los PNA en la salud gastrointestinal y la productividad de las aves (Alagawany *et al.*, 2018). Estos biocatalizadores hidrolizan los polisacáridos estructurales de las paredes celulares de los vegetales hasta oligosacáridos. Como consecuencia se liberan los nutrientes encapsulados, se incrementa su disponibilidad, mejoran la digestibilidad y el funcionamiento intestinal, que incluye modificaciones tanto en la microbiota como en la morfología del intestino (Saleh *et al.*, 2018).

Las enzimas que se aplican en la alimentación animal se caracterizan por su estabilidad al pH y la temperatura (Aftab *et al.*, 2018). Las β -mananasas, xilanasas y endocelulasas son biocatalizadores utilizados en la avicultura con buenos resultados por los beneficios que aportan. Su efectividad se informa independientemente del tratamiento, ya sea como enzimas únicas, en cócteles y en extractos enzimáticos producidos por diferentes microorganismos (Aftab *et al.*, 2018; Alagawany *et al.*, 2018; Saeed *et al.*, 2019).

El aumento de la producción industrial de enzimas, en las últimas décadas, se debe al desarrollo de los procesos fermentativos, los métodos de recuperación de estas proteínas y a una mejor comprensión de las reacciones bioquímicas que ocurren (Habte-Tsion *et al.*, 2018). Actualmente, el 75% de los biocatalizadores que se comercializan, se producen por compañías internacionales con un mercado altamente competitivo. Según informes del mercado global de enzimas (BCC Research, 2020), en 2020 se alcanzaron 5,9 billones de dólares por la venta de estos productos y se estima que para el 2026 se superen los 8,7 billones.

En Cuba no se utilizan los aditivos enzimáticos para el tratamiento de las dietas destinadas a la producción animal. Las investigaciones desarrolladas por la Universidad de Matanzas y el Instituto de Ciencia Animal identificaron cepas promisorias para la producción de enzimas estables como *Bacillus subtilis* E44 (Milián *et al.*, 2017b), sin embargo, hasta la fecha no se informa la producción de biocatalizadores para el tratamiento a las dietas.

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

En Cuba no se dispone de un aditivo enzimático de producción nacional para disminuir el contenido de los PNA y mejorar la digestibilidad de la fibra en las dietas avícolas.

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

La obtención de enzimas xilanasas, β -mananasas y endocelulasas a partir de *Bacillus subtilis* E44 mediante la fermentación en estado sólido con residuos agroindustriales, mejora la degradación del contenido fibroso de las dietas que se suministran en la alimentación avícola.

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

Objetivo general: Obtener el extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44, para el tratamiento del contenido fibroso de dietas en la alimentación avícola.

Para cumplir el objetivo general, los objetivos específicos fueron:

Objetivos específicos:

1. Evaluar la expresión de las enzimas xilanasas, β -mananasas y endocelulasas por *Bacillus subtilis* E44 en medios selectivos y en la fermentación en estado sólido de residuos agroindustriales.
2. Optimizar los procesos de la FES con *Bacillus subtilis* E44 y la extracción de las enzimas xilanasas, β -mananasas y endocelulasas a escala de laboratorio.
3. Determinar la estabilidad al pH y la temperatura de la enzima de mayor actividad en el extracto de *Bacillus subtilis* E44.
4. Evaluar el extracto enzimático en la degradación y digestibilidad *in vitro* de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras.

Novedad científica

- Se informa el extracto enzimático producido por *Bacillus subtilis* E44 a escala de laboratorio y su efecto en la degradación de la fibra de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras.

Los aportes científicos se resumen en:

- Se informa la metodología de la obtención del extracto enzimático por la cepa *Bacillus subtilis* E44 durante la fermentación en estado sólido del bagazo de caña de azúcar.
- Se caracteriza el extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44 obtenido en las condiciones estudiadas.
- Se informa a la comunidad científica un nuevo producto con acción enzimática para el tratamiento de las dietas destinadas a la alimentación avícola.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Características anátomo- fisiológicas del tracto gastrointestinal de las aves

El tracto gastrointestinal (TGI) de las aves es una región con un hábitat microbiano muy complejo que favorece el proceso de la digestión (McWhorter *et al.*, 2009). Se subdivide en las regiones siguientes: pico, esófago, buche, proventrículo, molleja, intestino delgado e intestino grueso (Józefiak *et al.*, 2004) (figura 1). Se caracteriza por poseer intestinos más pequeños y tiempos de tránsito más cortos que otras especies monogástricas de interés económico. Uno de los factores que afecta el desarrollo de las aves es la dieta ya que el alimento sirve como estímulo para promover el crecimiento del TGI (Jiménez-Moreno *et al.*, 2009).

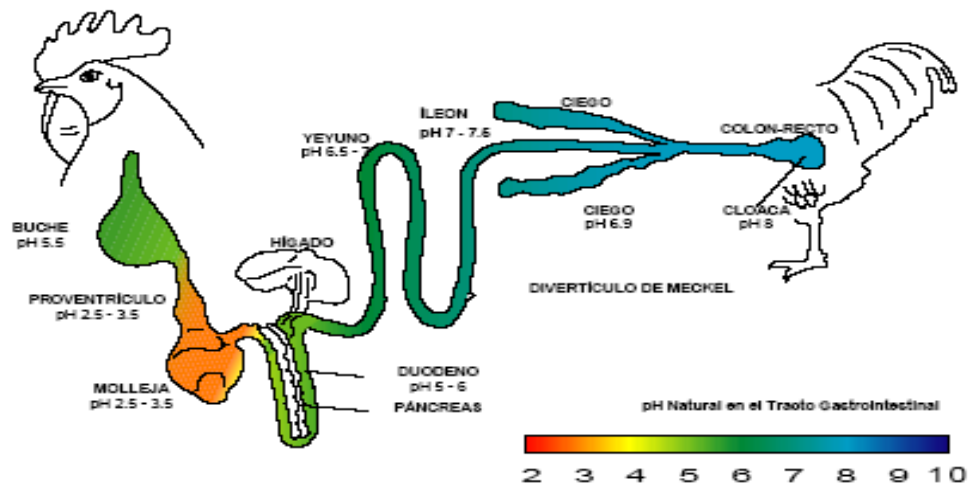


Figura 1. Tracto gastrointestinal de los pollos (Gauthier, 2002).

El pico ejerce la función recolectora del alimento, las glándulas salivares suministran saliva como secreción mucosa, pero carecen de enzimas por lo que no ocurren procesos digestivos en esta región. El alimento continúa su tránsito hasta el buche que se considera un órgano reservorio. Se plantea que en este sitio se segregan enzimas, pero no se conoce si provienen de la regurgitación del contenido intestinal, molleja, proventrículo o de las bacterias existentes (Grist, 2006).

El proventrículo y la molleja son regiones independientes con funciones relacionadas. El primero se encarga de secretar ácido clorhídrico, lo que provoca la disminución del pH (Smith y Berrang, 2006), mientras que la molleja tritura y muele la ingesta (Barnes, 1979).

El bolo pasa después al intestino delgado, en el que ocurre la digestión química y la absorción de nutrientes. Entre las enzimas digestivas más importantes están la tripsina y la quimotripsina, las amilasas y las lipasas que permiten la degradación de las proteínas, el almidón y los acilglicéridos, respectivamente.

El páncreas se encuentra entre las dos ramas del asa duodenal cubierto por la serosa y fijado al duodeno por dos ligamentos pancreáticos duodenales y es el órgano encargado de la secreción de las enzimas. Posteriormente, el producto de la digestión pasa al intestino grueso mediante la válvula ileocecal que desemboca en los dos ciegos (McLelland, 1989).

La función de los ciegos consiste, principalmente, en la degradación de los compuestos menos digestibles, absorber el agua, la glucosa y los ácidos grasos volátiles. Además, se producen inmunoglobulinas y participan en el metabolismo del ácido úrico en aminoácidos.

En los pollos, los ciegos tienen una motilidad activa que mezcla y evacúa periódicamente los contenidos del lumen. Las contracciones propias en este sitio, al parecer no se relacionan con la motilidad ileal (Clench, 1999).

La presencia de microorganismos en los ciegos proporciona condiciones idóneas para la fermentación de almidones resistentes, polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y otros) y oligosacáridos no digestibles. A partir de estos compuestos se producen ácidos orgánicos, especialmente láctico, acético, propiónico y butírico, que se absorben por el epitelio intestinal (Sergeant *et al.*, 2014). Luego pasan a la sangre portal, al hígado y finalmente a los tejidos periféricos y a los músculos donde se metabolizan. Esta constituye la ruta principal por la que el animal hospedero obtiene energía de los carbohidratos no digeridos en el intestino delgado.

El bolo digerido, después del paso por la válvula ileocecal, se traslada al colon, donde la absorción de nutrientes es mínima. Finalmente, el bolo fecal pasa a la cloaca, se mezcla con la orina procedente de los riñones y se expulsa al exterior (Clench, 1999)

En los pollitos y en las aves en general, la capacidad de absorción del intestino delgado aumenta con la ingesta de nutrientes después del nacimiento y en etapas tempranas. El acceso temprano al alimento por parte de los pollitos recién nacidos promueve el desarrollo intestinal mucho más rápido (Obst y Diamond, 1992; Noy y Sklan, 1998; Uni *et al.*, 1999), motivo por lo que la composición de las dietas que se suministran son de vital importancia para garantizar incrementos productivo en esta especie.

1.2 Dietas utilizadas en la producción avícola

1.2.1 Principales requerimientos nutricionales en las dietas para las aves

Los componentes nutricionales de los piensos tienen una función decisiva en el crecimiento y el desarrollo de las aves. Sus requerimientos dependen de la categoría y las etapas de la crianza.

Los requerimientos generales se basan en un suplemento de proteínas y aminoácidos que favorecen el desarrollo muscular y la síntesis de proteínas. De los aminoácidos esenciales, la lisina, la metionina y la treonina son limitantes en la mayoría de las raciones para las aves por lo que se incluyen en las dietas (Ravindran *et al.*, 2014).

Las grasas y los ácidos grasos, además de favorecer el aporte energético, mejoran la palatabilidad de la ración. El ácido linoleico y linolénico se consideran esenciales para las aves y deben estar presentes en la dieta. Son esenciales para el cerebro, espermatogénesis, músculo cardíaco y los bastones de la retina del ojo (Sardiñas, 2005).

Los minerales tienen funciones vitales muy variadas, tales como la formación de los huesos, el metabolismo basal y el mantenimiento del equilibrio ácido-base y electrolítico de las membranas celulares. El calcio y el fósforo mantienen fundamentalmente el esqueleto en buen estado y debido al rápido crecimiento de estos animales, es fundamental que las raciones contengan niveles apropiados de estos nutrientes lograr el desarrollo óseo adecuado (Sardiñas, 2005).

El sodio, el potasio y el cloro deben estar en la proporción adecuada para evitar un desequilibrio ácido-base. Este desbalance puede alterar el pH fisiológico y otros

procesos metabólicos como el crecimiento, el desarrollo óseo, la hidratación corporal y la utilización de aminoácidos, lo que provocaría reducción de los rendimientos (Blair, 2018). Los oligoelementos como el cobre, el yodo o el hierro funcionan básicamente como coenzimas de las reacciones metabólicas y se requieren en la dieta en muy bajas concentraciones (Gous, 2010).

Las vitaminas, tanto las de tipo liposoluble como las hidrosolubles, deben añadirse en el pienso. La vitamina C es un caso excepcional ya que las aves la sintetizan. Estos elementos actúan como mediadores y participan en procesos bioquímicos del organismo (Peinado, 2015).

La energía es esencial en la formulación de los piensos y se obtiene a partir de los carbohidratos simples, las grasas y las proteínas. La fuente energética y los macronutrientes se adquieren a través de la ingestión de alimentos naturales, fundamentalmente cereales y soya, mientras que los minerales, vitaminas y aminoácidos esenciales se suministran como suplementos sintéticos (FAO y OCDE, 2013).

La mayor parte de la energía de la dieta la aportan los cereales en forma de estructuras químicas sencillas, como azúcares libres, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Englyst (1989) clasificó estos compuestos en dos grupos: los polisacáridos amiláceos de reserva (α -glucanos) y los estructurales de la pared celular que se abordan a continuación.

1.2.2 Polisacáridos amiláceos de reserva en la alimentación avícola.

Los hidratos de carbono son los componentes más abundantes en los alimentos destinados a los animales monogástricos, constituyendo generalmente más del 60% de la materia seca. Los cereales proporcionan la mayor parte de la energía de

la dieta en forma de estructuras químicas sencillas, como los azúcares libres, disacáridos, oligosacáridos y complejas, como el almidón.

El almidón representa una fracción importante en los cereales (maíz y trigo) y se encuentra en un rango del 30 al 80%. Su hidrólisis ocurre por acción de las amilasas secretadas en el jugo pancreático (Alvarez *et al.*, 2014).

Los carbohidratos de bajo peso molecular producidos durante los procesos digestivos, se absorben por las células epiteliales del intestino delgado mediante transporte activo dependiente del ion sodio (Na⁺). Los de mayor peso molecular (disacáridos y trisacáridos) no se absorben por la pared intestinal o lo hacen en pequeñas proporciones (Gutiérrez y Savón, 2014).

1.2.3 Polisacáridos estructurales de la pared celular en las dietas.

Polisacáridos no amiláceos (PNA)

Los PNA son polímeros de azúcares simples unidos por enlaces glucosídicos entre el grupo hemiacetal de un azúcar y el hidroxilo del siguiente. Se nombran de acuerdo al número de átomos de carbono en cada azúcar involucrado en el enlace y la orientación del átomo de oxígeno hemiacetal (α o β) (Koolman *et al.*, 2005). La mayoría, forman parte de la pared celular de las plantas y su solubilidad se determina no solo por su estructura primaria, sino también por la relación con otros componentes (Fincher y Stone, 1986).

Los carbohidratos complejos de las plantas representan la fuente de fibra y se digieren muy poco por las aves (Habte-Tsion *et al.*, 2018). En los ciegos de ciertas especies se produce una pequeña hidrólisis de la celulosa, aunque la energía procedente de la fibra es muy limitada comparada con el total (Blair, 2018). La

presencia de tales polisacáridos afecta la digestibilidad debido a la formación de un entorno viscoso en el lumen intestinal que dificulta la digestión (Choct y Annison, 1992; Choct *et al.*, 1996; Smith y Annison, 1996).

La pared celular vegetal (figura 2) está compuesta por: la celulosa, un polímero insoluble formado por residuos de glucosa unidos por enlaces glucosídicos β (1,4). La hemicelulosa agrupa diferentes heteropolisacáridos que incluyen los polímeros de xilosa (llamados genéricamente xilanos), manosa, arabinosa y además la lignina. Este último, es un compuesto polifenólico asociado a la hemicelulosa y forma matrices que rodean a las microfibras de celulosa (Joseleau *et al.*, 1992; Harris y Smith, 2006; Li *et al.*, 2015).

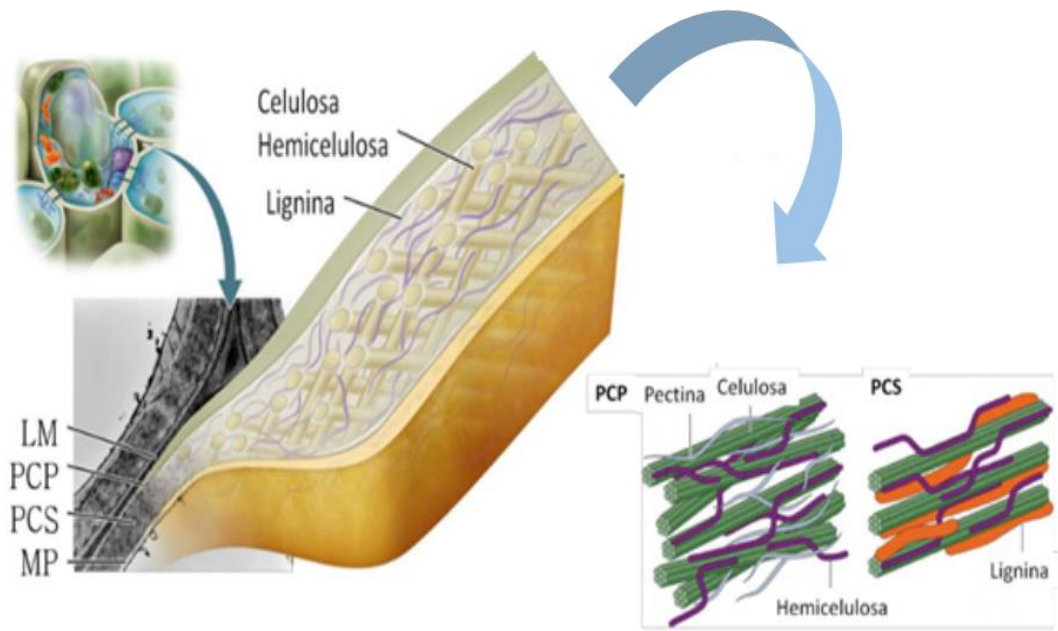


Figura 2. Esquema general simplificado de los principales componentes de la pared celular vegetal, que incluye los polímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina. LM: laminilla media; PCP: pared celular primaria; PCS: pared celular secundaria; MP: membrana plasmática (Ghio, 2018).

Los arabinosidos y los mananos son parcialmente solubles en agua y producen soluciones viscosas. En disoluciones diluidas aumentan ligeramente la viscosidad debido a la interacción directamente con las moléculas de agua. Al aumentar su concentración, las moléculas de PNA interaccionan entre ellas para formar redes que proporcionan dureza y sostén a los tejidos del vegetal (Morris y Ross-Murphy, 1981).

Debido a la formación de redes, los PNA solubles tienen mayor capacidad para aumentar la viscosidad y absorber el agua que los insolubles, y aunque algunos como la celulosa son capaces de atrapar agua, tienen baja capacidad para aumentar la viscosidad. El incremento de la viscosidad como consecuencia del suministro de estos compuestos, reduce de forma significativa la velocidad de paso del alimento por el tracto gastrointestinal (Salih *et al.*, 1991; Almirall y Esteve-García, 1994). Lo que trae como consecuencia, que el consumo de pienso disminuya, las bacterias intestinales se multiplican y emigran hacia el intestino delgado donde compiten por los nutrientes (Bedford *et al.*, 1996).

Las bacterias que proliferan en las condiciones antes mencionadas, producen enzimas que degradan los ácidos biliares y disminuye la capacidad del ave para digerir los lípidos. Los PNA desestabilizan las proteasas pancreáticas, afectan la digestión de las proteínas, reducen la digestión del nitrógeno y la absorción de las grasas (Campbell *et al.*, 1983; Viveros *et al.*, 1994). Por estas razones a los PNA se le confieren el efecto antinutricional .

1.2.4 Otras fuentes energéticas de las dietas

En la mayoría de las dietas, la grasa se adiciona entre 0,5 a 6,5% (Gutiérrez y Savón, 2014). La digestión de las grasas en las aves tiene lugar fundamentalmente

en el duodeno. Cuando llega el alimento a esta región se estimula la secreción de la hormona intestinal colecistoquinina que produce la contracción de la vesícula biliar y la secreción de jugos del páncreas (Gutiérrez y Savón, 2014).

Los movimientos del tracto intestinal, junto con el efecto detergente de las sales biliares, rompen los glóbulos de grasa, lo que aumenta la superficie de contacto entre la grasa y las lipasas pancreáticas encargadas de su hidrólisis. Estos productos son fundamentalmente ácidos grasos libres y monoglicéridos que deben incorporarse en formas de micelas para su absorción por difusión pasiva en la mucosa intestinal (Alvarez *et al.*, 2014).

Las grasas y los aceites se utilizan en la alimentación animal por su alto valor energético. Además, mejoran la eficiencia de la utilización de los nutrientes con menor producción de calor, gasto energético y mayor capacidad adaptativa ante los cambios ambientales (Gutiérrez y Savón, 2014).

Entre las prácticas utilizadas para disminuir el efecto antinutricional de los PNA en los alimentos se destaca el tratamiento enzimático. Su aplicación aporta beneficios en la producción avícola.

1.3 Aditivos enzimáticos en la alimentación avícola

Las enzimas son proteínas cuya función es catalizar las reacciones químicas que ocurren en las células vivas, poseen una extraordinaria eficiencia y especificidad (Nelson y Cox, 2015). El incremento de las investigaciones relacionadas con la tecnología enzimática permite que las aplicaciones de estas proteínas se extiendan a diferentes campos como la alimentación animal (Habte-Tsion *et al.*, 2018).

Actualmente se considera una opción prometedora desde el punto de vista económico, ambiental y de sostenibilidad (Asmare, 2014). Los biocatalizadores se

incorporan a las dietas, por lo que se consideran enzimas exógenas, ya que no pertenecen al sistema digestivo de los animales (Rojo *et al.*, 2007).

Durante la década del 50 del pasado siglo se realizaron estudios encaminados a evaluar la adición de estas biomoléculas en raciones avícolas. Los resultados alcanzados fueron variables y generalmente con una escasa respuesta productiva (Brenes, 1992).

En las últimas décadas el uso de las enzimas se incrementó considerablemente. Esta práctica ofrece nuevas oportunidades en el mercado para cultivos como la canola, el girasol y el algodón (De Souza *et al.*, 2014), además para otras fuentes alternativas como la saccharina (Lon-Wo *et al.*, 2002) y los pastos (Iqbal *et al.*, 2019) al permitir el aprovechamiento de sus propiedades nutricionales.

1.3.1 Principales enzimas glucolíticas utilizadas como aditivos en la producción avícola

Las enzimas utilizadas como aditivos en la alimentación animal son abundantes y variadas. Aquellas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos de los polisacáridos se clasifican como glucosil hidrolasas y constituyen un grupo muy amplio (Iráizoz, 2011).

En la actualidad, también, se aplican aditivos que contienen más de una enzima. Su utilización favorece la acción sinérgica de estas proteínas en los sustratos más complejos presentes en los alimentos (Aftab *et al.*, 2018; Handique *et al.*, 2018). Entre las enzimas que se utilizan como aditivos en los monogástricos para reducir el efecto de los PNA se destacan las celulasas, xilanasas y β -mananasas (Fernández y González, 2011).

Celulasas

Las celulasas agrupa una serie de actividades enzimáticas y su acción sinérgica conduce a la despolimerización de la celulosa. El complejo enzimático está formado

por: β -(1,4) endocelulasa (E.C. 3.2.1.4), celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) y β -(1,4) glucosidasa (E.C. 3.2.1.21) (Lee *et al.*, 1997). El modelo tradicional que describe el mecanismo de degradación de la celulosa se presenta en la figura 3. Las enzimas actúan sinérgica y secuencialmente para liberar los monómeros de glucosa.

Inicialmente las β -(1,4) endocelulasas hidrolizan aleatoriamente los enlaces β -(1,4) glucosídicos internos de la región amorfa de la celulosa, 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 (Sukumaran *et al.*, 2005).

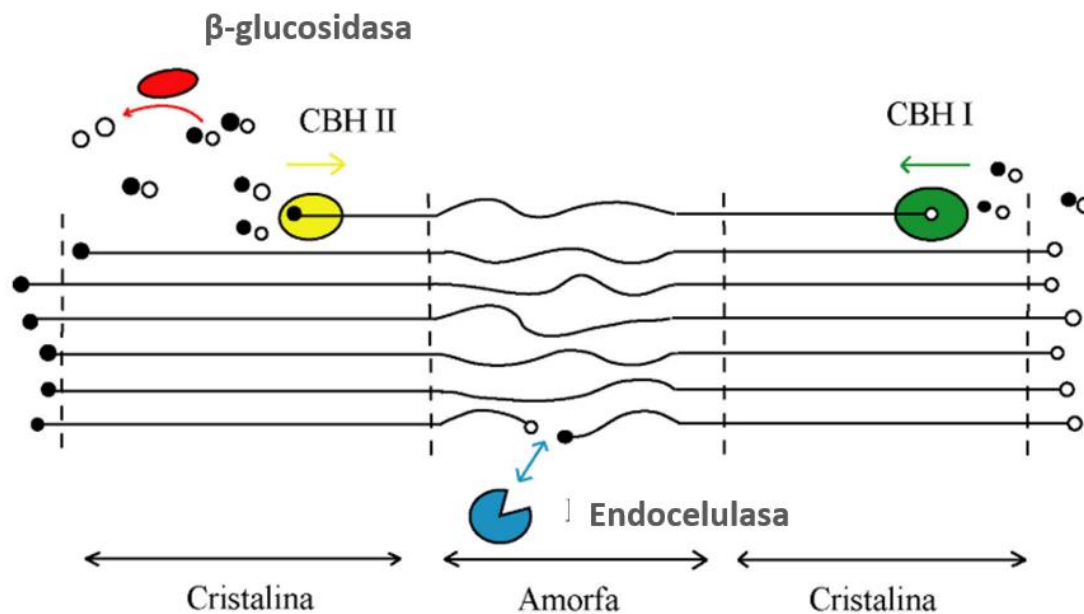


Figura 3. Esquema del mecanismo sinérgico de los componentes celulolíticos (Iráizoz, 2011). CBH I y II: celobiohidrolasas.

Una vez degradadas las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la hidrólisis de la región cristalina por la acción sinérgica de las endo y exocelulasas. Las β -glucosidasas hidrolizan la celobiosa hasta glucosa (Jørgensen *et al.*, 2007).

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 hidrolizan. Se distinguen xilanasas, β -mananasas, xilosidasas, arabinasas y galactosidasas (Iráizoz, 2011). Entre las más utilizadas en la alimentación animal para disminuir el efecto de los PNA se destacan las xilanasas y las β -mananasas (Craig *et al.*, 2019; Saeed *et al.*, 2019).

Xilanasas

Las xilanasas (EC 3.2.1.8) catalizan la hidrólisis al azar de los enlaces β -(1,4) glucosídicos 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 de la planta, por lo que su degradación es fundamental para aprovechar los productos de los materiales lignocelulósicos como fuente de energía útil (Polizeli *et al.*, 2005).

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).

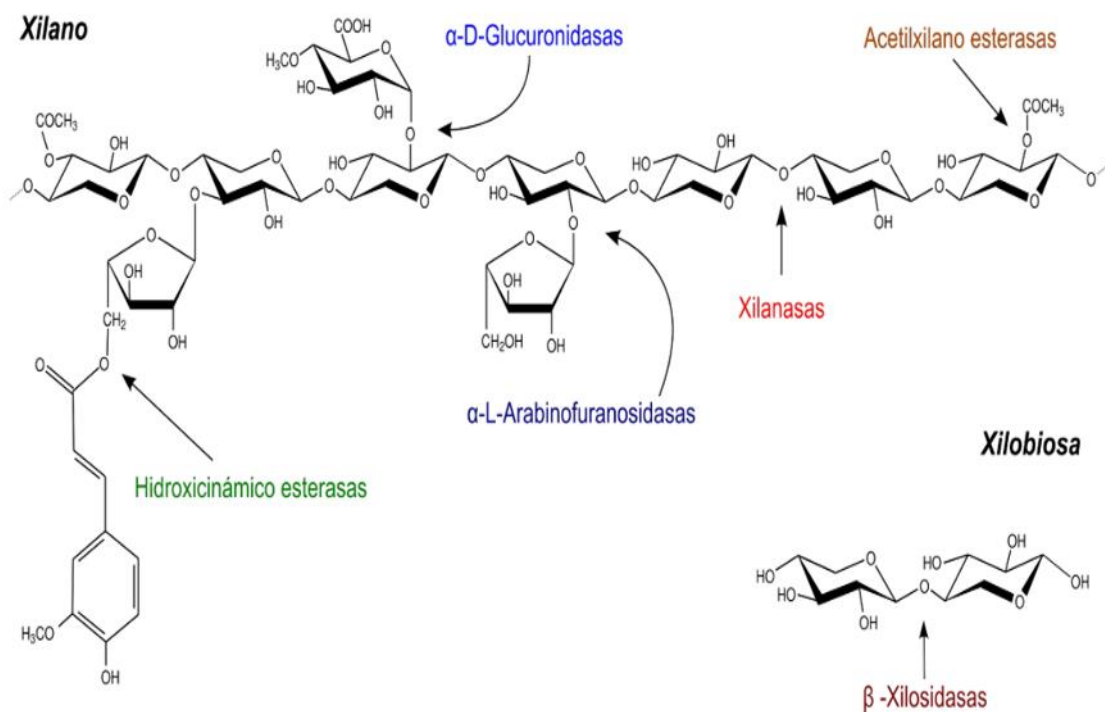


Figura 4. Enzimas que participan en la degradación del xilano (Gallardo, 2007).

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) (figura 5). Se requieren además otras enzimas como las α-galactosidasas

y las acetil-manano esterasas para eliminar los sustituyentes de la cadena lateral (Dhawan y Kaur, 2007; Moreira y Filho, 2008).

La enzima más importante de este complejo es la β -mananasa, la que libera oligómeros cortos de β -(1,4) manano que 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).

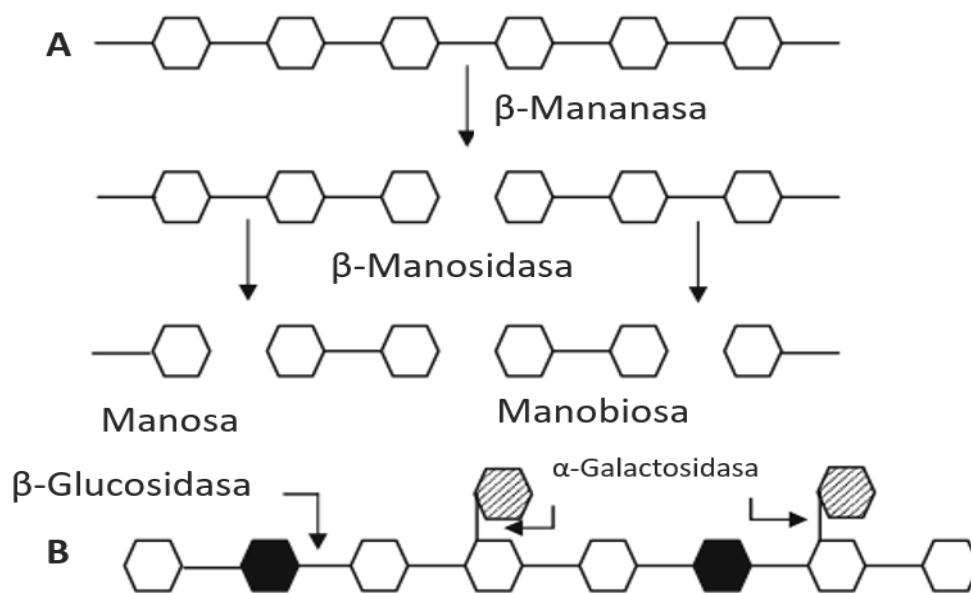


Figura 5. Enzimas que participan en la degradación del galactomanano. Mecanismo de acción de A: β -mananasas y β -manosidasas y B: β -galactosidasas y β -glucosidasas. rombo blanco, negro y gris manosa, glucosa y galactosa, respectivamente (Soni y Kango, 2013).

1.3.2 Resultados de la aplicación de los aditivos enzimáticos en las aves

En los últimos años el uso efectivo de las celulasas, xilanasas y β -mananasas como aditivos en las dietas para monogástricos, generó gran interés por parte de los

productores (Alagawany *et al.*, 2018). Sin embargo, el éxito del tratamiento depende de numerosos factores. Entre ellos se destacan la fuente de obtención de los biocatalizadores, la dosis aplicada, actividades de otras enzimas, composición de la dieta, así como la edad, salud y productividad de los animales en los que se apliquen (Bedford y Cowieson, 2012; Salem *et al.*, 2013).

Los aditivos enzimáticos pueden actuar directamente sobre los alimentos, antes que se consuman o a partir de modificaciones que ocurren durante los procesos digestivos en los animales tratados con estos productos (Carro *et al.*, 2006). Generalmente su utilización se dirige a la solución de dos problemas fundamentales, mejorar la disponibilidad de polisacáridos, lípidos y proteínas, que se encuentran protegidos de las enzimas digestivas por estructuras impermeables de la pared celular de las plantas y degradar compuestos que interfieren en la digestión, absorción y utilización de los nutrientes (McDonald *et al.*, 2011).

La aplicación de biocatalizadores facilita una mejor utilización de los nutrientes en el pienso, favorece el uso de ingredientes de menor calidad, materias primas alternativas y subproductos (Cortés *et al.*, 2002). Además, incrementa la digestibilidad total de las dietas, de determinados nutrientes y complementa la actividad de las enzimas endógenas (Alagawany *et al.*, 2018; Thavasiappan *et al.*, 2020).

Se considera que el suplemento de enzimas exógenas tiene mayor éxito en los animales jóvenes. Estas categorías se caracterizan por poseer una menor

capacidad digestiva y por lo general, no tienen desarrollado completamente su sistema enzimático (Ravindran, 2010; Chotinsky, 2015).

Según Bedford (1996), las enzimas reducen la capacidad formadora de geles de los PNA, por consiguiente mejoran la difusión de los nutrientes a través de la mucosa intestinal y limitan la proliferación microbiana en tramos posteriores del tracto digestivo. Varios autores mostraron mejoras en la salud de las aves al reducir las infecciones ocasionadas por patógenos (Vanderplas, 2010; Martínez-Cummer *et al.*, 2015; Sozcu, 2019).

Desde el punto de vista histológico, Sozcu (2019) sugirió que la reducción de la viscosidad por la suplementación enzimática causa modificaciones estructurales del tracto digestivo, reduce la longitud, el peso intestinal y el espesor de la mucosa. Este efecto puede relacionarse con la disminución del gasto energético y una mejor utilización de los nutrientes. Por otra parte, se comprobó que la suplementación con enzimas incrementa la altura de las microvellosidades del duodeno. Este efecto favorece una máxima absorción de nutrientes debido al incremento del área superficial en esta zona del intestino (Imran y Pasha, 2014).

Los beneficios económicos de la aplicación de enzimas en la alimentación animal dependen de los ingredientes de los piensos, su calidad, proporción, el cultivar, así como del contenido de factores antinutricionales (Asmare, 2014; Suresh *et al.*, 2019). La suplementación enzimática de las dietas permite elevar su calidad nutricional (Alagawany *et al.*, 2017; Jimoh, 2018).

La elección del preparado enzimático se debe realizar de acuerdo con la naturaleza del sustrato contenido en el pienso (Amerah, 2015). En el caso de la alimentación

en especies monogástricos se emplean varios ingredientes con diferentes estructuras químicas, por lo que se recomienda la combinación de varias enzimas para lograr mejores resultados (El-Hack *et al.*, 2017; Bedford *et al.*, 2018).

En la literatura internacional se informan numerosas investigaciones de la aplicación exitosa de enzimas en piensos destinados a la producción avícola. A continuación, se analizan los resultados de algunas investigaciones en dietas compuestas por maíz, soya y trigo las que justifican la selección de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras para la evaluación del extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44.

En pollos de ceba, la aplicación de xilanasas en las dietas compuestas por trigo y maíz favoreció la formación de ácidos grasos volátiles en el ciego, debido al efecto prebiótico de los oligosacáridos producidos después de la hidrólisis. Además se comprobó la disminución de la temperatura del duodeno en los animales alimentados con piensos que contenían trigo debido al incremento en la velocidad de la digestión (Masey-O'Neill *et al.*, 2014a).

En gallinas ponedoras la adición de xilanasas a las dietas de gallinas ponedoras favoreció la producción de huevos (Bobeck *et al.*, 2014). Además se detectaron cambios adaptativos en el microbioma de las aves y se incrementó la capacidad para degradar las fuentes fibrosas que no se hidrolizan en el intestino de esta especie (Bedford, 2018).

Por su parte, la inclusión de β -mananasas en dietas que contenían soya para pollos de ceba en la etapa de inicio, aumentó el contenido de glucosa en sangre, la homeostasis de las hormonas anabólicas y la digestibilidad de los aminoácidos (Caldas *et al.*, 2018). Asimismo, la adición de esta enzima en dietas compuestas

por maíz y soya aumentó el rendimiento de los pollos de ceba al disminuir el contenido de galactomananos del pienso (Latham *et al.*, 2018).

Además, el uso de cócteles enzimáticos en gallinas ponedoras, mejoró la retención de nutrientes y mostró una tendencia al incremento de la actividad de las enzimas en el intestino (Wen *et al.*, 2012). El-Hack *et al.* (2017) señaló que en esta misma categoría, la sustitución de soya por fabas (*Vicia faba* L.), suplementada con celulasas, xilanasas, α -amilasas y proteasas, mejoró la eficiencia alimentaria sin afectar la calidad y la productividad de los huevos.

También Cássia *et al.* (2019) y Polat y Denli (2019) notificaron que los aditivos enzimáticos mejoraron la digestibilidad ileal de las proteínas y la calidad de los huevos en gallinas ponedoras alimentadas con maíz, soya y trigo. Mientras que en pollos de ceba, la adición de estos biocatalizadores aumentó el rendimiento y la ganancia de peso (Nikam *et al.*, 2017).

Las enzimas que degradan los PNA, también benefician el microbioma del íleon y el ciego (Bedford y Apajalahti, 2001; McCracken *et al.*, 2006; González-Ortiz *et al.*, 2015). La degradación y solubilización de estos compuestos por acción de estas proteínas, incrementan la disponibilidad de sustratos para las fermentaciones microbianas en los ciegos de pollos de ceba (Cadogan y Choct, 2015). Como consecuencia, se producen ácidos grasos de cadena corta, que se utilizan como fuente de energía directa (Ravn *et al.*, 2018a).

Tang *et al.* (2014) plantearon que la suplementación de enzimas en dietas de maíz y soya en pollos de ceba mejoró la digestibilidad de la materia seca, la retención de nitrógeno. El efecto se relacionó con la hidrólisis de los PNA, la liberación de los

nutrientes y una mayor disponibilidad. Keyser *et al.* (2018) verificaron que la adición de β -(1,4) xilanasas y β -(1,3 (4)) endocelulasas en dietas con maíz, soya y trigo en pollos de ceba, durante la etapa de inicio y crecimiento, favoreció la degradación de ingredientes fibrosos de las dietas.

Cozannet *et al.* (2017) demostraron la efectividad de las enzimas que hidrolizan los PNA en la digestibilidad de nutrientes en pollos de ceba. Asimismo Tsai *et al.* (2017); Yang *et al.* (2017); Desai *et al.* (2018); Ferreira *et al.* (2018); Gallardo *et al.*, (2018); Hussain *et al.* (2019) y Sun y Kim (2019) informaron efectos positivos de la suplementación de enzimas en la digestibilidad de nutrientes en diferentes categorías avícolas. Para evaluar este indicador con eficiencia se utilizan diversos métodos.

1.4 Métodos de digestibilidad *in vitro* de nutrientes

La digestibilidad es la forma de medir la transformación de los alimentos en sustancias útiles para la nutrición e incluye los procesos digestivos y la absorción (Stein *et al.*, 2007). Estos métodos se utilizan para evaluar la calidad de la dieta administrada y materias primas incorporadas. Permite calcular la disponibilidad de los nutrientes antes y después del tratamiento enzimático, la repercusión en la salud de los animales y su utilización (Alabi *et al.*, 2015; Karunaratne *et al.*, 2018; Jimoh, 2018).

Para determinar la digestibilidad de los nutrientes se utilizan métodos *in vivo*, *in vitro*, e *in situ* los que difieren en cuanto a la precisión y los mecanismos para determinar los coeficientes de digestibilidad (Osorio-Carmona *et al.*, 2012). Los métodos *in vivo*

se consideran procedimientos costosos y consumen más tiempo; mientras que las técnicas de incubación *in vitro* imitan los mecanismos de digestión *in vivo*, son relativamente menos costosos, simples y rápidos (Peiretti, 2020). No obstante, los métodos de laboratorio deben ser fácilmente reproducibles y estar altamente correlacionados con los indicadores *in vivo* (Alabi *et al.*, 2015).

Por su parte, los métodos de digestibilidad *in situ* se desarrollan en la cavidad digestiva y se necesitan animales previamente canulados. Las bolsas que se utilizan deben tener una porosidad adecuada para evitar la pérdida de alimento durante el estudio (López, 2005).

De acuerdo con Karunaratne *et al.* (2018) las técnicas de digestibilidad *in vitro* constituyen una herramienta útil para predecir los ensayos *in vivo*, sin embargo, destacan que ambos métodos deben tener buena correlación. Alabi *et al.* (2015) informaron que existe una buena correlación de la digestibilidad de la fibra en experimentos *in vitro* e *in vivo*. Resultados similares se informaron por Wen *et al.* (2015), Lewis *et al.* (2019) y Recharla *et al.* (2019) en experimentos de digestibilidad de nutrientes en diferentes especies animales.

La digestibilidad *in vitro* se realiza por diferentes métodos y depende del componente de la dieta que se desee evaluar (Peiretti, 2020). Furuya *et al.* (1979) desarrollaron una metodología que utiliza el contenido intestinal de las especies monogástricas, principalmente el cerdo. A partir de estos estudios se realizaron

diferentes modificaciones para predecir la digestibilidad de nutrientes en aves (Marrero *et al.*, 1998).

Las técnicas para predecir la digestibilidad *in vitro* del componente fibroso en la dieta de especies monogástricas requieren un inóculo fecal o cecal que garantice la presencia de las enzimas y/o los microorganismos responsables de su síntesis. Estos métodos se utilizan con éxito para evaluar la inclusión de enzimas fibrolíticas en las dietas de animales monogástricos y rumiantes (García *et al.*, 2019, Alberto, 2020).

Las enzimas que se utilizan para el tratamiento de los piensos se obtiene a partir de microorganismos debido a la síntesis de enzimas estables al pH y la temperatura. Además poseen altas tasas de actividad enzimática durante las fermentaciones y sus productos son fácilmente recuperados (Maki *et al.*, 2009; Chakdar *et al.*, 2016).

1.5 Obtención de enzimas microbianas

Los biocatalizadores se producen generalmente a partir de las bacterias (*Bacillus spp.*), los hongos (*Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus oryzae* y *Asperigillus niger*) y las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Khattak *et al.*, 2006). Los cultivos bacterianos se destacan por la capacidad de crecer en una gran variedad de ambientes y requieren baja demanda de nutrientes para su crecimiento.

Entre los géneros más utilizados para la producción de enzimas se destaca *Bacillus*. Sus especies se distribuyen en diversos hábitats, sobreviven en condiciones adversas debido a la formación de endosporas, no se consideran patógenas y se

recomiendan para la elaboración de productos enzimáticos (Cheng *et al.*, 2016; Milián *et al.*, 2017b, 2014).

Bacillus spp. poseen una capacidad fermentadora excelente. Tienen la ventaja de secretar enzimas al medio de cultivo (Meima *et al.*, 2004), entre las que se destacan las proteasas (Akcan y Uyar, 2011), las amilasas (Unakal *et al.*, 2012; Maity *et al.*, 2015), las β -mananasas (Pangsri y Pangsri, 2017) y las xilanasas (Kallel *et al.*, 2016).

La fermentación es uno de los procesos utilizados para la producción de enzimas microbianas ya sea en condiciones sumergidas (FSm) o en estado sólido (FES). La FSm se desarrolla en un medio acuoso, los nutrientes y los microorganismos se encuentran distribuidos homogéneamente mientras que la FES se desarrolla en una superficie y al interior de esta y en ausencia de agua libre (Fadel *et al.*, 2014).

Entre las ventajas de la FES se destacan que los microorganismos se desarrollan en un hábitat natural, el sistema posee menor riesgo de contaminación, los productos se obtienen más concentrados y se generan menor cantidad de efluentes contaminantes del medio ambiente (Yazid *et al.*, 2017; Ravindran *et al.*, 2018). De acuerdo con Barrios-González (2012) la FES estimula los procesos de transcripción de genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos y por tanto se incrementa su producción.

1.5.1 Fermentación en estado sólido (FES)

En la FES el agua presente se encuentra en forma compleja dentro de la matriz sólida o como una capa fina que se absorbe dentro de las partículas de la superficie con uniones menos fuertes en la región capilar del sólido (Thomas *et al.*, 2013). El

límite de humedad del proceso depende del tipo de sustrato, el microorganismo y el producto que se desea obtener (Raimbault, 1998).

En la FES se utilizan materiales lignocelulósicos como soporte. Las propiedades físico-químicas de estos compuestos sirven como sustratos para el crecimiento de los microorganismos y facilita la separación de los productos (Ravindran *et al.*, 2018). La reutilización de residuos agrícolas e industriales disminuye los costos de producción de los metabolitos y contribuye a reducir contaminantes del medio ambiente (Zhang *et al.*, 2012; Serrano, 2015).

Entre los bioproductos más frecuentes que se obtienen durante de las fermentaciones se encuentran las enzimas debido a sus aplicaciones en diversas industrias (Cerdeña *et al.*, 2019). Para la producción eficiente de biocatalizadores en la FES se deben tener en cuenta factores como el inóculo, la temperatura del sistema, el pH, las fuentes de nitrógeno y el tiempo de fermentación (Immanuel *et al.*, 2006). Para lograr la rentabilidad económica de sus producciones se recomienda la optimización de los procesos involucrados tales como la fermentación y la extracción del producto (Govarthanan *et al.*, 2014).

La optimización de la FES permite obtener las enzimas microbianas eficientemente y se realiza por varios métodos. Algunos autores utilizan el convencional, que consiste en variar los factores individuales y se mantiene el pre-optimizado constante (Irfan *et al.*, 2014). Sin embargo, esta metodología no determina la concentración óptima ni la interacción entre los componentes del medio (Kumar *et al.*, 2018).

En los últimos años, se utilizan con mayor frecuencia métodos estadísticos eficientes y precisos para optimizar la producción de enzimas. La metodología de

superficie de respuesta es una herramienta novedosa y confiable que permite disminuir el número de ensayos experimentales y evalúa el efecto individual de los factores (Montgomery, 2017; Bagewadi *et al.*, 2018).

Entre los diseños utilizados para optimizar la producción microbiana de enzimas se destacan el de Box y Wilson, compuesto central, Box y Hunter, Box-Behnken. Se utilizaron con éxito para producir celulasas (Kazemi *et al.*, 2014; Vijayaraghavan *et al.*, 2016a), xilanasas (Chitchaowana *et al.*, 2016; Kallel *et al.*, 2016), mananasas (El-Sharouny *et al.*, 2015; Ahirwar *et al.*, 2016) y la producción simultánea de enzimas en el medio de cultivo (Machado de Castro *et al.*, 2014; Raza, 2018).

1.6 *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. La cepa se aisló de productos alterados de la industria de alimentos (jugo de tomate) y se realizó la evaluación taxonómica por métodos morfológicos, bioquímicos y moleculares (Milián 2009).

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. Su aplicación mejoró la respuesta inmunológica y hematológica de pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras, mientras que en ponedoras mejoró la conversión alimenticia e

incrementó el número de huevos (Piad *et al.*, 2005; 2006). Además, 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).

SUBTILPROBIO[®], es un bioproducto con capacidades probióticas elaborado a partir de las endosporas de *B. subtilis* E44 (Milián *et al.*, 2017b, 2014). Se evaluó en la salud pulmonar de cerdos y en pollos de ceba como promotor del crecimiento, indicadores digestivos e inmunológicos con resultados satisfactorios (Ayala *et al.*, 2012; Milián *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2015).

Por otra parte, Pérez *et al.* (2012) evaluaron la acción de una mezcla de *Lactobacillus salivarius* C65 y *Bacillus subtilis* E44. en gallinas ponedoras. Los autores verificaron el aumento del número de las posturas y mejoras en los indicadores de conversión en huevos por kg de alimento. Además, Rodríguez *et al.*, (2015) resaltaron los beneficios del producto en aves de inicio de líneas puras pesadas B4 con incrementos del peso, mejoras en la conversión alimenticia por ave, el porcentaje de mortalidad y la viabilidad.

Estos resultados avalan las potencialidades de *Bacillus subtilis* E44 para la producción de enzimas estables y su utilidad en la producción avícola cubana. Los biocatalizadores obtenidos mediante la FES de residuos agroindustriales podrían potenciar el tratamiento de las dietas que se suministran a las aves y mejorar la digestibilidad de los nutrientes.

CAPÍTULO 2. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE XILANASAS, β -MANANASAS Y ENDOCELULASAS POR *BACILLUS SUBTILIS* E44 EN MEDIOS SELECTIVOS Y DURANTE LA FES

Introducción

Las especies del género *Bacillus* poseen sistemas de expresión que favorecen la producción de enzimas industriales. Los procesos fermentativos permiten la obtención de los biocatalizadores a partir de residuos agroindustriales que son relativamente baratos y aportan nutrientes para el crecimiento microbiano (Liu *et al.*, 2013).

La utilización de las fuentes renovables en los procesos fermentativos es cada vez más frecuente. Sin embargo, el desarrollo de sistemas de expresión estables, viables económicamente y que permitan su producción sustentable (Ravindran y Jaiswal, 2016; Bharathiraja *et al.*, 2017; Ravindran *et al.*, 2018).

A partir de lo anteriormente expuesto el objetivo del presente capítulo se dirigió a:

- ✓ Evaluar la expresión de las enzimas xilanasas, β -mananasas y endocelulasas por *Bacillus subtilis* E44 en medios selectivos y en la FES de residuos agroindustriales como fuentes de carbono.

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Síntesis de xilanasas, β -mananasas y endocelulasas por *Bacillus subtilis* E44 en medios selectivos

Cultivo microbiano

La secuencia experimental del presente capítulo se ilustra en el anexo 1. 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 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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. A partir del cultivo se realizó una suspensión microbiana equivalente a una concentración de 10^8 UFC mL^{-1} (densidad óptica a 600 nm de 0,8) y se adicionó a dos Erlenmeyers que contenían 50 mL de caldo nutriente (relación 1:10). Luego se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en zaranda orbital a 110 rpm hasta obtener una densidad óptica a 600 nm entre 0,8-1.

Los sustratos de las enzimas (carboximetilcelulosa (1%)-endocelulasas, xilano de haya (1%)-xilanasas y resina del grano de algarrobo (0,5%)- β -mananasas) se adicionaron al medio mínimo (MM) compuesto por NaCl (0,1%), KH_2PO_4 (0,3%), K_2HPO_4 (0,6%), MgSO_4 (0,12%), peptona (0,5%) y extracto de levadura (0,3%), se ajustó el pH a 7,5 con KOH (1 mol L^{-1}). Se dispensaron 50 mL en tres Erlenmeyer de 250 mL de capacidad y se adicionó 15 g L^{-1} de agar microbiológico a cada frasco, se esterilizaron a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min, se sirvieron en placas Petri y se enfriaron a temperatura ambiente. La suspensión bacteriana se sembró por punción con la

aguja y se incubaron a 37 °C durante 72 h. Se realizaron seis repeticiones para cada enzima. Los reactivos se adquirieron de la firma Sigma-Aldrich.

Para el revelado de los halos de hidrólisis se adicionaron 5 mL de la disolución de rojo congo (0,5%) a cada placa Petri. Se mantuvieron en reposo a temperatura ambiente durante 5 min y se luego se realizaron tres lavados sucesivos con NaCl 1 mol L⁻¹. Los diámetros de los halos y las colonias se midieron con un pie de rey Vernier (marca Suertek cap. Sensibilidad de ± 0,02 mm). El índice de potencia (IP) se calculó a través de la ecuación:

$$IP = \frac{\phi \text{ halo hidrólisis}}{\phi \text{ halo colonia}} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

2.1.2 Síntesis de xilanasas, β-mananasas y endocelulasas por *Bacillus subtilis* E44 durante la FES con residuos agroindustriales

Los residuos agroindustriales se seleccionaron de acuerdo a su disponibilidad en la provincia de Matanzas (tabla 1). El trigo (*Triticum aestivum* L.) se importó desde Alemania en junio de 2015 con la clasificación de grano semi duro, según datos aportados por la empresa molinera.

Tabla 1. Residuos agroindustriales seleccionados para la inducción de las enzimas durante la FES.

Residuo agroindustrial	Procedencia	Municipios
Salvado de trigo	Empresa molinera de trigo	Cárdenas
Bagazo de caña de azúcar	Complejo agroindustrial Mario Muñoz Monroy	Colón
Paja de maíz	Cultivo de maíz en finca particular	Jovellanos
Cáscara de arroz	Molino artesanal	Jovellanos

El salvado se obtuvo en las etapas sucesivas del proceso de molturación y cernido del trigo para la obtención de la harina. La colecta se realizó de forma aleatoria de 83 sacos y se trasladó al laboratorio en una bolsa de polietileno con 1,98 kg de peso. El bagazo de caña se colectó de forma aleatoria en diferentes puntos de la casa de almacenamiento del complejo agroindustrial. En el caso de la paja de maíz se recogió directamente del campo después de la cosecha en cinco puntos de la parcela. Las muestras se trasladaron al laboratorio en sacos de polietileno con 1,2 y 1,67 kg de cada residuo, respectivamente.

La cáscara de arroz se colectó de forma aleatoria en seis sacos obtenidos después del proceso de descascarado del arroz (*Oryza sativa* L.) en el molino artesanal. Se trasladó al laboratorio en una bolsa de polietileno con 1,53 kg del subproducto.

2.1.3 Determinación de la composición química de los residuos agroindustriales

Los residuos se secaron en una estufa a 60 °C durante 72 h. Se trituraron en un molino de martillos tipo Fritsch modelo GmbH con un tamaño máximo de partícula de 2 mm. El contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina se determinó mediante la técnica secuencial descrita por Van Soest *et al.* (1991), con 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 unas dimensiones de 4,5 x 5,5 cm. El nitrógeno se cuantificó mediante el método Kjeldahl (AOAC, 2012), con el uso de un equipo de destilación Kjeltex System 1002 (Tecator). La proteína bruta se obtuvo al multiplicar el contenido de nitrógeno de la muestra por el factor de

conversión 6,25 según se describe en la metodología citada anteriormente (AOAC, 2012). Se realizaron tres repeticiones de cada determinación por cada residuo.

2.1.4 Fermentación en estado sólido

Se pesó 1 g de cada residuo en matraces de 250 mL de capacidad. Se esterilizaron a 121 °C durante 15 min y luego se secaron en la estufa a 60 °C durante 48 h hasta eliminar completamente la humedad. Cada matraz se inoculó con la suspensión microbiana (10% (p/v)) descrita en el acápite 2.1.1 y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se realizaron tres repeticiones por cada residuo.

2.1.5 Extracción de las enzimas

Para la extracción de las enzimas de los residuos fermentados se adicionó a cada matraz tampón fosfato de sodio, 0,02 mol L⁻¹, pH 7,0 a la relación 1:10 (p/v). Se colocaron en la zaranda orbital a 110 rpm durante 30 min. El contenido de los matraces se filtró por gasa, se colectaron en tubos de ensayo de polietileno y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 15 min a 4 °C. Los extractos se conservaron a -20 °C hasta su evaluación.

2.1.6 Actividades enzimáticas

A partir de los extractos enzimáticos se determinaron las actividades enzimáticas xilanasas, β-mananasas y endocelulasas por triplicado. La reacción se desarrolló en tubos de ensayo de cristal que contenían 0,1 mL del extracto enzimático y 0,4 mL del sustrato específico para cada enzima disueltos en tampón acetato de sodio 0,1 mol L⁻¹, pH 5,5 y se incubó en baño termostático a 50 °C durante 10 min.

Los azúcares reductores se cuantificaron por la metodología descrita por Miller (1959) y la densidad óptica se determinó a 546 nm. Los equivalentes de glucosa,

xilosa y manosa se calcularon a partir de curvas de calibración para cada monosacárido. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir $1 \mu\text{mol mL}^{-1}$ de glucosa, xilosa y manosa por minuto. Se estableció como control negativo la mezcla de la reacción enzimática sin el extracto enzimático.

2.1.7 Análisis estadístico

Los ensayos de la expresión de las enzimas en medios selectivos y la FES con los residuos agroindustriales se realizaron según diseño completamente aleatorizado y para su evaluación se utilizó un análisis de varianza simple. En el caso de la composición química de los sustratos se utilizó la estadística descriptiva, se determinó la media, desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV). Todos los procedimientos estadísticos se realizaron con el programa InfoStat (Di-Rienzo *et al.*, 2012) y en los casos necesarios se aplicó la dócima de Duncan (1995).

2.2 Resultados y discusión

2.2.1 Síntesis de xilanasas, β -mananasas y endocelulasas por *Bacillus subtilis*

E44 en medios selectivos

La capacidad de *B. subtilis* E44 para utilizar los sustratos celulósicos y hemicelulósicos como fuente de carbono se evidenció por la presencia de zonas claras alrededor de las colonias después del revelado con el colorante (figura 6). El rojo congo forma interacciones fuertes con los polisacáridos unidos por enlaces β -1,4 y β -1,3, mientras que, en el área donde ocurrió la hidrólisis no se observa la

coloración. El diámetro del halo es equivalente al potencial enzimático del microorganismo (Teather y Wood, 1982).

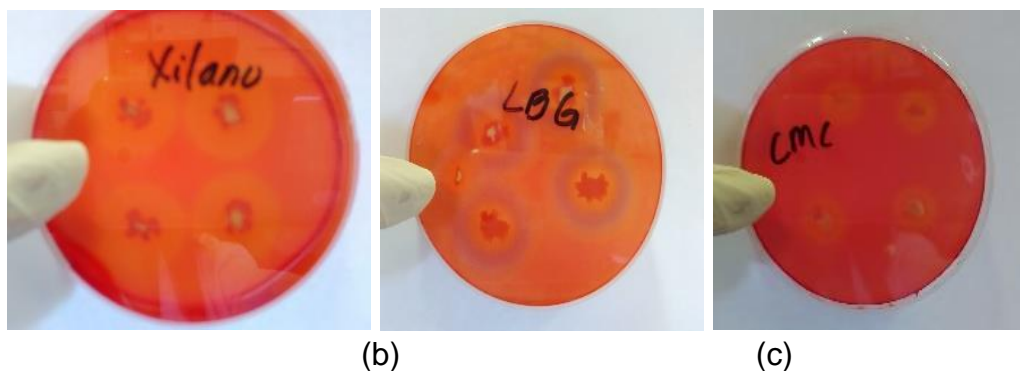


Figura 6. Halo de hidrólisis formado durante el crecimiento de *Bacillus subtilis* E44 en los medios selectivos con: (a) xilano de haya, (b) resina del grano de algarrobo y (c) carboximentilcelulosa.

La formación del halo de hidrólisis se utiliza por varios autores para la selección de microorganismos productores de enzimas. En la tabla 2 se destaca que el mayor diámetro del halo corresponde a las β -mananasas seguido por xilanasas y celulasas.

Tabla 2. Índice de potencia calculado para las enzimas xilanasas, β -mananasas y endocelulasas producidas por *Bacillus subtilis* E44.

Enzimas	ϕ Halo hidrólisis (mm)	Índice de potencia	\pm EE	Signif.
Xilanasas	24,66 \pm 0,15	4,22 ^a		
β -Mananasas	29,0 \pm 0,03	3,67 ^b	0,06	P= 0,0001
Endocelulasas	14,06 \pm 0,25	3,23 ^c		

^{a, b, c} Letras distintas indican diferencias significativas entre las filas ($P < 0,05$).

EE: error estándar

Los resultados del experimento coinciden con los informados por otros autores para las enzimas en estudio en el género *Bacillus* y se realizaron en condiciones similares

(Adebayo-Tayo *et al.*, 2013; Mathew *et al.*, 2017). Sin embargo, según Ghio (2018) el IP aporta mayor información porque es una estimación cuantitativa de la habilidad de un microorganismo para secretar enzimas que hidrolizan un sustrato determinado.

Los IP de las xilanasas difieren ($P < 0,05$) de las β -mananasas y de las endocelulasas. De acuerdo a la escala de evaluación propuesta por Jani *et al.* (2012), los microorganismos con IP entre 2 y 5 son buenos productores de enzimas por lo que *B. subtilis* E44 se incluye en esta categoría.

Un aspecto importante de la síntesis enzimática son los mecanismos bioquímicos de la inducción y regulación, los que podrían implicar el incremento o la disminución de estos sistemas (Nelson y Cox, 2015). Además, el paso de las proteínas a través de la membrana es un proceso complejo en el que participan sistemas de secreción específicos que involucran varios genes y moléculas reguladores tal como señaló Song *et al.* (2021).

Los resultados presentados por Latorre *et al.* (2015) mostraron cierta similitud con los informados en el presente estudio para las xilanasas. Dos de las cepas de *Bacillus* en presentaron IP entre 4 y 5, mientras que la tercera cepa superó (IP 6,3) el informado en la presente investigación. En el caso de las celulasas del mismo estudio, los IP superaron el obtenido por *B. subtilis* E44 mientras que las investigaciones de Akaracharanya *et al.* (2014) fueron menores (IP entre 1,65 y 2,95) en *Bacillus* spp.

Las β -mananasas, por su parte, también presentan variaciones del IP entre especies de *Bacillus*. Tres de las seis cepas de *B. megaterium* evaluadas por Ríaz *et al.* (2019) para la selección de la enzima mostraron IP menor que *B. subtilis* E44

y las restantes fueron superiores. Sin embargo, los resultados en la presente investigación superaron los informados por Blibech *et al.* (2019) en cinco cepas de *Bacillus*.

La diferencia de los resultados en la literatura consultada puede relacionarse a factores genéticos de la cepa utilizada según se informó por Latorre *et al.* (2016). En todos los casos, los experimentos se realizaron en condiciones similares a las informadas en este estudio (sustratos, temperatura y tiempos de incubación). Además, podría atribuirse a la habilidad de la bacteria de secretar enzimas activas con velocidades de difusión diferentes tal como se notificó por Rattanasuk y Ketudat-Caims (2009).

En el presente estudio se demuestra el potencial de *Bacillus subtilis* E44 para obtener enzimas que degradan la celulosa y la hemicelulosa. Sin embargo, para la producción sostenible de estas biomoléculas por la bacteria, se requieren sistemas económicos rentables que garanticen su síntesis.

La fermentación en estado sólido constituye una metodología eficaz para la producción de biocatalizadores. Los residuos agroindustriales utilizados como sustratos para el crecimiento de los microorganismos, aportan una fuente importante de nutrientes e inducen la síntesis de enzimas (Mansour *et al.*, 2016, Ravindran y Jaiswal, 2016).

2.2.2 Síntesis de xilanasas, β -mananasas y endocelulasas por *Bacillus subtilis* E44 durante la FES con residuos agroindustriales

La composición química de los residuos seleccionados para la FES se muestra en la tabla 3. Los resultados evidencian diferencias en el porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina entre los residuos. El bagazo de caña de azúcar tiene el mayor contenido de celulosa y el salvado de trigo el menor. En el caso de la hemicelulosa, la paja de maíz tiene el valor más alto y la cáscara de arroz el menor. También se observan diferencias en la lignina y la proteína bruta.

Tabla 3. Composición química (%) de los residuos agroindustriales utilizados durante la FES.

	Sustratos			
	Bagazo de caña	Salvado de trigo	Cáscara de arroz	Paja de maíz
Celulosa (%)	42,22	4,31	23,68	41,41
DE	0,97	0,03	0,78	0,60
CV (%)	1,74	0,43	1,98	1,32
Hemicelulosa (%)	33,95	22,58	20,45	40,02
DE	0,61	0,40	1,38	0,71
CV (%)	0,68	1,40	2,30	2,53
Lignina (%)	13,44	1,62	15,80	4,24
DE	0,31	0,16	0,66	0,14
CV	2,32	3,75	4,18	3,29
Proteína bruta (%)	2,01	14,31	7,87	3,59
DE	0,09	0,30	0,20	0,58
CV (%)	4,31	2,12	2,53	3,81

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

Según Behera y Ray (2016), el porcentaje de celulosa en los residuos lignocelulósicos es de 35–50% de su pesos seco, mientras que, para la hemicelulosa y la lignina informaron 20–35% y 10–25%, respectivamente,. Sin embargo, los rangos no siempre coinciden con los resultados mostrados en la tabla 3.

En el bagazo de caña de azúcar, el contenido de celulosa se encuentra entre el 40 y 50 % y coincide con Saelee *et al.* (2016), mientras que la hemicelulosa difiere del informado por Singh *et al.* (2012) y Melati *et al.* (2017) quienes encontraron 16,35% y el 26,85% respectivamente. Por su parte, en el salvado de trigo la celulosa y la hemicelulosa son menores a los informados por Raghu *et al.*, (2018) los que establecieron que la celulosa se ubica en el rango entre 9 y 12% y la hemicelulosa con el 55%.

En la cáscara de arroz, los resultados no coinciden con Raheem y Kareem (2017) los que informaron el 35% y 25% a la celulosa y la hemicelulosa, respectivamente. Sin embargo, la celulosa de la paja del maíz en el presente estudio se encuentra en el rango de 28 a 44 % propuesto por Titiloye *et al.* (2013), aunque es uno de los residuos menos estudiados.

Las diferencias observadas entre investigaciones pueden asociarse a diversos factores. Por una parte, se considera que el genotipo es una fuente importante de variabilidad del contenido de la pared celular. A pesar que las comparaciones se realizan entre residuos de la misma especie vegetal, cada una posee una

composición varietal que no se tiene en cuenta en la selección de los residuos (Wang *et al.*, 2016).

Por otra parte, las condiciones edafoclimáticas en las que se desarrollan los cultivos, las épocas de siembra, los procesos agroindustriales que se realizan así como las condiciones fisiológicas de las plantas influyen en la composición química de la pared celular (Bhatia *et al.*, 2017). Igualmente inciden en la variabilidad del contenido de celulosa y hemicelulosa los tratamientos post cosechas (químicos, físicos y mecánicos) según se informó por Merali *et al.* (2015); Raheem y Kareem (2017) y Raghu *et al.* (2018).

Además de los factores mencionados, los métodos utilizados en las determinaciones analíticas inciden en la variabilidad de los resultados. Según Hatfield y Fukushima (2005) las concentraciones de proteínas, minerales y otros compuestos orgánicos afectan la exactitud de los análisis químicos.

Pese a la variabilidad en la composición química observada entre los sustratos, se informa su uso en la producción de enzimas (Ravindran *et al.*, 2018). A pesar de las diferencias en el contenido de celulosa y hemicelulosa de los residuos, se detectaron actividades de las enzimas xilanasas, β -mananasas y endocelulasas durante la FES por *B. subtilis* E44 (tabla 4).

Las xilanasas mostraron la mayor actividad con los residuos agroindustriales evaluados. El salvado de trigo fue el mejor inductor de la síntesis de estas enzimas y las endocelulasas. En ambos casos el bagazo de caña de azúcar ocupó el segundo lugar, mientras que para las β -mananasas se destacó el bagazo de caña de azúcar como el mejor inductor.

Tabla 4. Expresión de xilanasas, β -mananasas y endocelulasas en la FES de residuos agroindustriales con *Bacillus subtilis* E44.

Residuos	AEz (UI mL ⁻¹)		
	Xilanasas	β -Mananasas	Endocelulasas
Salvado de trigo	25,08 ^a	2,15 ^{bc}	2,75 ^a
Bagazo de caña de azúcar	9,32 ^b	2,52 ^a	2,58 ^b
Cáscara de arroz	6,92 ^c	2,07 ^c	0,07 ^c
Paja de maíz	6,95 ^c	2,19 ^b	2,47 ^b
± EE	0,08	0,05	0,04
Signif.	P=0,0001	P=0,0001	P=0,0001

^{a, b, c, d} Letras distintas indican diferencias significativas entre las columnas ($P < 0,05$);
EE: error estándar

El salvado de trigo es un residuo fácilmente degradable por los microorganismos y se utiliza con frecuencia para la síntesis de xilanasas (Yazid *et al.*, 2017). También Gowdhaman *et al.* (2014) notificaron que este residuo fue el mejor inductor de xilanasas en una cepa de *Bacillus* sp., comparada con el bagazo de caña de azúcar, el maíz y la cáscara de arroz. Además, se presentaron resultados similares en otros géneros microbianos como *Aspergillus* spp. (Kaushik *et al.*, 2014) y *Penicillium* spp. (Zhang y Sang, 2015).

Una de las posibles causas de la elevada actividad xilanolítica obtenida con el salvado de trigo en la FES puede relacionarse con su contenido de xilano. Según Batalha *et al.* (2015) este representa el 70% de su peso seco lo que podría favorecer el reconocimiento molecular entre el sustrato y las xilanasas, enzimas constitutivas en *B. subtilis* E44 de acuerdo a lo notificado por Matos *et al.* (2018).

La actividad xilanolítica de *B. subtilis* E44 obtenida en la FES en el presente estudio es superior al informado por Matos *et al.* (2018) durante la FSm con *B. subtilis* E44 (0,32 UI mL⁻¹). Este resultado justifica la selección de la FES como metodología para la producción de biocatalizadores y confirma las ventajas del proceso tal como indicaron Cerda *et al.* (2019).

Las endocelulasas, por su parte, mostraron menor actividad enzimática que las xilanasas. Mejias *et al.* (2018) planteó que en los residuos que tienen menos de 30% de celulosa, las actividades celulolíticas no superan el valor de 3 UI mL⁻¹. En la presente investigación, el bagazo de caña de azúcar y la paja de maíz mostraron porcentajes de celulosa superior al 30%, sin embargo, las actividades celulolíticas no alcanzaron 3 UI mL⁻¹. Los resultados indican que la síntesis de estas enzimas podría estar relacionada, además, con tipo de fibra presente en los subproductos evaluados.

Según Bhatia *et al.* (2017) la composición de la pared celular de los residuos varía de acuerdo al tipo de tejido, la capa de la pared celular de la que se obtenga y la taxonomía de la planta. El trigo es un cultivo que se cosecha en climas templados. El salvado se obtiene de la capa externa del pericarpio del grano y la estructura de la pared celular es menos compleja comparada con las hojas y tallos de las gramíneas tropicales como la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), maíz (*Zea mays* L.) y arroz (*Oryza sativa* L.) las que están compuestas por una estructura física más rígida y resistentes a la hidrólisis.

La cáscara de arroz no fue un buen residuo para la obtención de endocelulasas. Los resultados pueden relacionarse con el tipo de molino utilizado para realizar el descascarado del arroz (artesanales o industriales) debido a las diferencias

observadas en las concentraciones de azúcares fermentables según refirió Martín (2006).

En la presente investigación, la cáscara de arroz se colectó en un molino artesanal y según López (2013) la concentración de glucosa en este residuo es superior a los procesados en molinos industriales (33,5 y 2,1 g L⁻¹, respectivamente) debido a la presencia de glucanos fácilmente hidrolizables. La glucosa es el producto final del complejo enzimático y a la vez el represor de la síntesis de las enzimas (Sukumaran *et al.*, 2005), lo que puede constituir una de las posibles causas de la baja actividad endocelulolítica.

Por otra parte, la cáscara de arroz de los molinos artesanales contiene hidroximetilfurfural (0,3 g L⁻¹) y ácido fórmico (0,2 g L⁻¹) (López, 2013). El hidroximetilfurfural a bajas concentraciones, inhibe el complejo enzimático de las celulasas y provoca la precipitación de los biocatalizadores (Kim *et al.*, 2011).

A pesar de los resultados mostrados en el estudio para las endocelulasas con la cáscara de arroz, Dhillon *et al.* (2011) refirieron la obtención de la enzima por *Aspergillus niger* con este residuo. Por su parte, Annamalai *et al.* (2013) informaron además, que fue uno de los mejores para la obtención del biocatalizador por *Bacillus halodurans*. En ninguno de los casos se notificó la procedencia del subproducto.

Las β -mananasas, a diferencia de xilanasas y endocelulasas, mostraron la mayor actividad con el bagazo de caña. Los resultados del presente experimento fueron similares a los de Rahmani *et al.* (2017) quienes informaron 2 UI mL⁻¹ de actividad β -mananolítica durante la FES con *B. subtilis* en bagazo de caña de azúcar. Igualmente, Neelkant *et al.* (2019) consideraron el residuo como el mejor inductor para la síntesis de β -mananasas por *Sphingobacterium* sp. ksn-1.

El bagazo de caña de azúcar es un residuo rico en galactomananos según informó Melati *et al.* (2017) lo que beneficia la producción de β -mananasas. De acuerdo con Kaira y Kapoor (2020) los biocatalizadores son inducibles y según Ravindran *et al.* (2018) las especies del género *Bacillus* tienen una capacidad excelente para producir enzimas que hidrolizan el manano en presencia de sustratos ricos en galactomananos. Los residuos del coco, el café y la soya se destacan también entre los desechos más utilizados para la producción de enzimas mananolíticas (Zurmiati *et al.*, 2017; David *et al.*, 2018; Favaro *et al.*, 2020).

En la presente investigación se demostró el beneficio de los residuos agroindustriales para la obtención de enzimas xilanasas, β -mananasas y endocelulasas durante la FES con *B. subtilis* E44. Christianah y Ajoke (2020) señalaron que la selección de la fuente de carbono depende del costo del residuo agroindustrial y su disponibilidad.

Según los resultados mostrados, el salvado de trigo fue el mejor inductor de las enzimas xilanasas y endocelulasas, sin embargo, en Cuba el trigo se importa para la industria alimenticia y el salvado que se genera se utiliza para la fabricación de piensos destinados a diferentes especies animales. El bagazo de caña de azúcar, por su parte, resultó el mejor inductor de las mananasas y el segundo para xilanasas y endocelulasas. Estas razones motivaron la selección del bagazo de caña de azúcar para la producción de las enzimas.

Se conoce que las actividades enzimáticas se pueden incrementar hasta 80 veces con la optimización de procesos (Reis *et al.*, 2015; Zhang y Sang, 2015). De ahí la necesidad de realizar estos procedimientos para lograr la eficiencia de los sistemas involucrados en la síntesis de las enzimas deseadas.

CAPÍTULO 3. OPTIMIZACIÓN DE LA FES CON *BACILLUS SUBTILIS* E44 PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE XILANASAS, β -MANANASAS Y ENDOCELULASAS

Introducción

La evaluación del potencial enzimático demostró la capacidad de *Bacillus subtilis* E44 para producir las enzimas en estudio durante la FES del bagazo de caña de azúcar. Para garantizar la eficiencia y sostenibilidad de su producción se requiere optimizar los procesos involucrados para garantizar la máxima síntesis enzimática. La temperatura, el pH, el inóculo, el tiempo de incubación y la fuente de nitrógeno son factores que inciden en la síntesis de las enzimas (Yadav *et al.*, 2020). La etapa de tamizado permite la selección eficaz y rápida de varios factores en un único experimento y favorece ahorrar tiempo en la experimentación (Montgomery, 2017). Los métodos de superficie de respuesta se aplican en la optimización de procesos fermentativos para la producción y extracción de las enzimas (Bagewadi *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2019). De acuerdo con la importancia de estos procesos los objetivos del presente capítulo se dirigen a:

- ✓ Optimizar la FES del bagazo de caña de azúcar con *Bacillus subtilis* E44 para incrementar las actividades de las enzimas xilanasas, β -mananasas y endocelulasas.
- ✓ Optimizar el proceso de extracción de las enzimas del residuo fermentado.

3.1 Materiales y métodos

La optimización de la FES se realizó en tres etapas (anexo 1):

1) tamizado de factores: Selección las condiciones y componentes del medio de cultivo de la FES con el bagazo de caña de azúcar por *Bacillus subtilis* E44 que inciden en la actividad de las enzimas en estudio.

2) optimización de la FES para la máxima síntesis enzimática.

3) optimización de la extracción de las enzimas del residuo fermentado.

3.1.1 Tamizado de los factores en estudio mediante un diseño Plackett-Burman

Se evaluó el efecto de la temperatura, humedad, pH inicial, inóculo, tiempo de incubación y como fuentes de nitrógeno: urea, extracto de levadura, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KNO_3 y peptona en la actividad enzimática. Para ello se utilizó el diseño PcB (Ramírez y Castellanos, 2017; Mount-Batten, 2017; Aita *et al.*, 2019). Los factores se estudiaron en dos niveles (tabla 5). Se realizaron 14 combinaciones de acuerdo con la matriz experimental obtenida por el programa y las variables respuestas fueron las actividades de las enzimas xilanasas, β -mananasas y endocelulasas (tabla 6).

El experimento se realizó en matraces de 250 mL de capacidad que contenían 5 g de bagazo de caña de azúcar. Los factores se establecieron de acuerdo a la matriz experimental. El medio mínimo se preparó con las sales y se les agregó las fuentes de nitrógeno según correspondió a cada caso. El procedimiento para la preparación del inóculo, el material vegetal, la extracción y cuantificación de las enzimas se describió en el capítulo 2, epígrafe 2.1. Cada corrida se realizó por triplicado.

Tabla 5. Condiciones de la FES y componentes del medio de cultivo incluidos en el diseño Plackett-Burman

Factores	Niveles		Referencias
	Inferior	Superior	
A: Temperatura (°C)	30	50	(Abo-State <i>et al.</i> , 2013)
B: Humedad (%)	40	80	(El-Shishtawy <i>et al.</i> , 2014)
C: pH inicial	6	8	(Guo <i>et al.</i> , 2012; Panwar <i>et al.</i> , 2014)
D: Inóculo (%)	5	20	(Panwar <i>et al.</i> , 2014)
E: Tiempo de incubación (h)	24	120	(Garg <i>et al.</i> , 2011; Kumar <i>et al.</i> , 2013)
F: Urea (%)	0,2	0,7	(Adebayo-Tayo <i>et al.</i> , 2013)
G: Extracto de levadura (%)	0,2	0,5	(Dan <i>et al.</i> , 2012)
H: (NH ₄) ₂ HPO ₄ (%)	0,1	0,5	(Saha y Ghosh, 2014)
I: KNO ₃ (%)	0,1	0,5	(Nagar <i>et al.</i> , 2010; Kumar <i>et al.</i> , 2014)
J: Peptona (%)	0,2	0,5	(Chauhan <i>et al.</i> , 2014a)

Tabla 6. Matriz experimental del diseño Plackett-Burman para la etapa de tamizado.

Corridas experimentales	Factores									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	30	40	8	20	120	0,2	0,5	0,5	0,1	0,5
2	40	60	7	12,5	72	0,45	0,35	0,3	0,3	0,35
3	30	40	6	5	24	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2
4	50	80	8	5	120	0,7	0,2	0,5	0,1	0,2
5	50	40	8	20	24	0,7	0,2	0,1	0,1	0,5
6	50	40	6	5	120	0,7	0,5	0,1	0,5	0,5
7	30	80	8	20	24	0,7	0,5	0,1	0,5	0,2
8	30	80	6	5	24	0,7	0,5	0,5	0,1	0,5
9	50	40	8	5	24	0,2	0,5	0,5	0,5	0,2
10	30	80	8	5	120	0,2	0,2	0,1	0,5	0,5
11	30	40	6	20	120	0,7	0,2	0,5	0,5	0,2
12	50	80	6	20	24	0,2	0,2	0,5	0,5	0,5
13	50	80	6	20	120	0,2	0,5	0,1	0,1	0,2
14	40	60	7	12,5	72	0,45	0,35	0,3	0,3	0,35

A: Temperatura (°C); B: Humedad (%); C: pH inicial; D: Inóculo (%); E: Tiempo de incubación (h); F: Concentración de urea (%); G: Concentración de extracto de levadura (%); H: Concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (%); I: Concentración del KNO_3 (%); J: Concentración de peptona (%).

3.1.2 Optimización de la FES del bagazo de caña de azúcar con *B. subtilis* E44

Los factores seleccionados en el diseño PcB se optimizaron mediante el diseño superficie de respuesta compuesto central rotacional con dos niveles para cada factor (tabla 7). Se realizaron las 44 corridas experimentales que incluyeron los puntos estrellas que se establecen fuera del límite establecido para cada factor (tabla 8). Las FES se efectuó según se describió en el acápite anterior. Las variables respuesta fueron la actividad xilanasas y β -mananasas. Cada corrida se realizó por triplicado.

3.1.3 Optimización del proceso de extracción de las enzimas del residuo fermentado

Las condiciones para la extracción de las enzimas del bagazo fermentado se optimizaron mediante el diseño de superficie de respuesta compuesto central rotacional en 3 bloques. La matriz experimental se muestra en el tabla 9. Los factores a optimizar fueron:

- Tipo de disolventes (se evaluó en los bloques): agua destilada, tampón acetato de sodio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5) y tampón fosfato de sodio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7) (Zhang y Sang, 2015; Vijayaraghavan *et al.*, 2016b)
- Volúmenes del disolvente: 5, 10, 15 y 20 mL g^{-1} de sustrato fermentado (Díaz-Sanchez, 2009).
- Tiempo en la zaranda: 15, 30, 45 y 60 min (Machado de Castro *et al.*, 2014).

Las condiciones de las FES se definieron a partir de los resultados de la optimización. Para la extracción, el disolvente, volumen y tiempo en la zaranda se establecieron según la matriz experimental. Una vez retirados los frascos de la zaranda, se realizó la filtración por gasa y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 15 min a 4 °C. Las variables respuesta fueron la actividad xilanasas y β -mananasas. Cada corrida se realizó por triplicado.

Tabla 7. Condiciones de la FES y del medio de cultivo para el diseño superficie de respuesta.

Identificador	Factores	Niveles	
		Inferior	Superior
A	Temperatura de incubación (°C)	30	50
B	pH inicial MM	5,0	8,0
C	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (%)	0,1	0,5
D	KNO ₃ (%)	0,1	0,5
E	Urea (%)	0,2	0,7

Tabla 8. Matriz experimental de la optimización de la FES con *Bacillus subtilis* E44 mediante el diseño compuesto central.

Corridas	A	B	C	D	E	Corridas	A	B	C	D	E
1	50	5	0,1	0,1	0,2	23	30	5	0,5	0,5	0,2
2	30	8	0,5	0,1	0,7	24	50	8	0,5	0,5	0,7
3	40	6,5	0,3	0,3	0*	25	30	5	0,1	0,5	0,7
4	30	5	0,1	0,5	0,2	26	40	6,5	0,3	0,3	0,45
5	64*	6,5	0,3	0,3	0,45	27	40	6,5	0,3	0*	0,45
6	30	5	0,5	0,1	0,7	28	40	6,5	0,8*	0,3	0,45
7	40	3	0,3	0,3	0,45	29	30	5	0,1	0,1	0,7
8	50	5	0,1	0,5	0,7	30	50	8	0,5	0,1	0,7
9	50	8	0,5	0,5	0,2	31	30	8	0,5	0,5	0,2
10	50	5	0,1	0,5	0,2	32	30	8	0,1	0,1	0,2
11	50	5	0,5	0,5	0,7	33	30	5	0,5	0,1	0,2
12	40	6,5	0,3	0,3	1,04*	34	40	6,5	0,3	0,3	0,45
13	30	8	0,5	0,5	0,7	35	50	8	0,5	0,1	0,2
14	16*	6,5	0,3	0,3	0,45	36	40	6,5	0*	0,3	0,45
15	40	10*	0,3	0,3	0,45	37	50	5	0,5	0,1	0,2
16	30	8	0,1	0,5	0,2	38	30	5	0,5	0,5	0,7
17	40	6,5	0,3	0,8*	0,45	39	30	8	0,5	0,1	0,2
18	50	8	0,1	0,5	0,2	40	30	8	0,1	0,5	0,7
19	50	5	0,5	0,1	0,7	41	50	8	0,1	0,1	0,7
20	50	8	0,1	0,1	0,2	42	50	8	0,1	0,5	0,7
21	30	5	0,1	0,1	0,2	43	50	5	0,1	0,1	0,7
22	50	5	0,5	0,5	0,2	44	30	8	0,1	0,1	0,7

A: Temperatura (°C); B: pH inicial; C: Concentración de NH₄HPO₄ (%), D: Concentración de KNO₃ (%); E: Concentración de urea (%); *puntos estrella

Tabla 9. Matriz experimental para la optimización del proceso de la extracción de β -mananasas y xilanasas mediante el diseño superficie de respuesta.

Bloques: Disolvente	Volumen del disolvente (ml)	Tiempo en la zaranda (min)	Bloques: Disolvente	Volumen del disolvente (ml)	Tiempo en la zaranda (min)
1	15	45	2	10	15
1	15	15	2	5	15
1	10	30	2	5	45
1	10	15	2	15	30
1	5	30	2	15	60
1	5	60	2	5	60
1	10	60	2	15	45
1	15	60	2	5	30
1	5	45	3	15	30
1	20	45	3	20	60
1	5	15	3	10	45
1	20	30	3	10	30
1	20	60	3	20	15
1	15	30	3	10	60
1	10	45	3	15	60
1	20	15	3	5	60
2	20	45	3	5	15
2	20	60	3	20	30
2	20	15	3	15	45
2	10	45	3	20	45
2	20	30	3	15	15
2	15	15	3	10	15
2	10	60	3	5	45
2	10	30	3	5	30

Disolvente 1: agua destilada; 2: tampón acetato de sodio (0,05 mol L⁻¹, pH 5,5); 3: tampón fosfato de sodio (0,05 mol L⁻¹ pH 7)

3.1.4 Análisis estadístico

Durante la etapa de tamizado se aplicó el diseño Plackett Burman (PcB) (Plackett y Burman, 1946). Se establecieron dos criterios de selección de los factores analizados: $P < 0,05$ y el segundo $P < 0,5$.

En las etapas de la optimización de la FES y la extracción se utilizó el método de superficie de respuesta compuesto central (Montgomery, 2017). Se aplicó la función de deseabilidad de Derringer (Derringer y Suich, 1980) para la obtención simultánea de las enzimas en estos procesos.

Para comparar las actividades enzimáticas en las tres etapas se utilizó el análisis de varianza simple con el programa STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.2.04, 2013. En los casos que fue necesario determinar las diferencias significativas entre las medias se aplicó la dócima de rangos múltiples de Duncan (1955) ($P < 0,05$).

3.2. Resultados y discusión

3.2.1 Tamizado de los factores en estudio mediante un diseño experimental Plackett-Burman

Las actividades enzimáticas en las corridas experimentales se muestran en la tabla 10. Los datos se ajustaron a una distribución normal ya que los coeficientes de asimetría y curtosis se encuentran en el intervalo entre -2 y 2.

Las actividades de las enzimas estuvieron en los rangos siguientes: xilanasas 11-23 UI mL⁻¹, β-mananasas 8-24 UI mL⁻¹ y endocelulasas 7-10 UI mL⁻¹. Los CV muestran la variabilidad de las actividades enzimáticas en las condiciones

experimentales establecidas, debido a que los biocatalizadores en estudio utilizan diferentes mecanismos de síntesis, expresión y regulación (Chen *et al.*, 2013).

En el diseño PcB se analizó el efecto de 10 factores a la vez en la producción de xilanasas, β -mananasas y endocelulasas lo que podría incidir en la variabilidad observada. Sin embargo, es una etapa necesaria porque permite establecer los factores de mayor incidencia en la producción de enzimas. La variación observada demuestra la importancia de la optimización de la FES para incrementar las actividades enzimáticas en el extracto microbiano (Kuddus, 2015).

El análisis de varianza de las enzimas en el diseño experimental, se presenta en los Anexos 2, 3 y 4. La temperatura de incubación fue el único factor que influyó de forma significativa en la actividad de las xilanasas. En el caso de las endocelulasas y las β -mananasas ningún factor mostró significación en el intervalo estudiado.

La temperatura es importante para el crecimiento microbiano e incide en los procesos de transcripción y síntesis enzimática (Brock y Madigan, 2008). Su incremento, acelera la velocidad de crecimiento microbiano y las reacciones químicas. Cuando la temperatura excede el valor óptimo, las funciones celulares empiezan a decaer drásticamente (Ordaz, 2008).

Durante la FES, la variación de la temperatura puede acelerar o desacelerar la velocidad de la producción de las enzimas microbianas (Tao *et al.*, 1997) o detenerla por completo (Shah y Madamwar, 2005). En otros casos, su aumento puede ocasionar pérdidas excesivas de agua en los soportes y afectar el crecimiento y la síntesis de proteínas (Mazutti *et al.*, 2007).

Tabla 10. Actividad de las enzimas xilanasas, β -mananasas y endocelulasas obtenidas en el diseño Plackett-Burman.

Corridas Experimentales	AEz (UI mL⁻¹)		
	Xilanasas	β-Mananasas	Endocelulasas
1	17,95 ± 0,63	24,59 ± 0,08	8,54 ± 0,55
2	17,31 ± 0,18	19,64 ± 3,37	9,11 ± 0,38
3	17,19 ± 1,60	18,93 ± 2,83	9,91 ± 0,51
4	15,01 ± 0,73	10,34 ± 0,27	10,04 ± 0,210
5	17,29 ± 1,26	24,76 ± 2,1	8,48 ± 0,20
6	15,40 ± 0,45	10,77 ± 0,24	7,16 ± 0,40
7	13,28 ± 0,85	11,09 ± 0,62	9,26 ± 0,25
8	12,95 ± 0,96	10,85 ± 0,28	9,79 ± 0,72
9	11,82 ± 0,27	9,56 ± 0,87	8,63 ± 0,15
10	12,55 ± 0,66	8,25 ± 0,87	8,04 ± 0,14
11	20,92 ± 0,58	21,39 ± 1,20	10,49 ± 0,14
12	23,78 ± 0,81	21,71 ± 1,07	10,97 ± 0,79
13	15,30 ± 0,22	11,98 ± 0,28	9,82 ± 0,13
14	15,74 ± 0,25	10,02 ± 0,40	9,61 ± 0,29
Parámetros estadísticos			
Media (UI mL ⁻¹)	16,18	15,28	9,28
Coefficiente de Variación (%)	20,34	41,66	10,99
Coefficiente Asimetría	1,40	-0,58	-0,71
Coefficiente de Curtosis	0,75	-1,35	0,03

En la etapa de tamizado no hubo significación del resto de los factores para la producción de las enzimas por *B. subtilis*. El resultado puede deberse a que el diseño PcB no analiza las interacciones. No obstante, existen parámetros indispensables que afectan el desarrollo microbiano y la síntesis de moléculas que deben tenerse en cuenta durante las fermentaciones (Immanuel *et al.*, 2006).

En las investigaciones realizadas por Rojas *et al.* (2009) para la estandarización del medio de cultivo de *Rhizobium* sp. también informaron que ninguno de los factores analizados en la etapa de tamizado (PcB) fueron significativos para el crecimiento. Los autores establecieron el segundo criterio de selección de acuerdo a la disponibilidad y el costo de los componentes del medio de cultivo, pero estos pueden variar según los objetivos de la investigación.

Debido a la importancia de los factores incluidos en el estudio para la síntesis de las enzimas en estudio, se decidió establecer como segundo criterio de selección el valor de la probabilidad menor que 0,5. Los factores que cumplieron con este criterio fueron el pH inicial y las fuentes de nitrógeno: KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ y la urea.

De acuerdo con Sepahy *et al.* (2011), el pH inicial afecta el crecimiento microbiano, las reacciones enzimáticas e influye en el transporte de varios compuestos a través de la membrana. Las bacterias del género *Bacillus* producen enzimas xilanasas, β -mananasas y celulasas a pH entre 3 y 10 (Kallel *et al.*, 2016; Islam *et al.*, 2019).

Respecto a las fuentes de nitrógeno el KNO_3 mostró mayor incidencia en la producción de endocelulasas y β -mananasas, mientras que la urea, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ y KNO_3 tuvieron mayor efecto en la síntesis de xilanasas. La selección y optimización

de las fuentes de nitrógeno durante la degradación de sustratos lignocelulósicos limita la síntesis de proteasas en el extracto enzimático lo que favorece su estabilidad a la proteólisis (Subramaniyan *et al.*, 2001).

La humedad, el porcentaje de inóculo y el tiempo de incubación no mostraron criterios para su selección, por lo que se establecieron por el método del camino al máximo ascenso del diseño experimental. La humedad en los procesos fermentativos, depende en gran medida del sustrato que se utiliza. La disminución de la humedad reduce la difusión de los nutrientes, el crecimiento microbiano, la estabilidad enzimática y la degradación del sustrato (Pandey, 1992).

De acuerdo a los resultados, el 80% de humedad favorece la producción de las enzimas por *B. subtilis* E44. Según Martínez (2007) la producción de metabolitos en las bacterias se beneficia a valores superiores al 70% por lo que el resultado favorecerá la obtención de los biocatalizadores.

En cuanto al inóculo, los resultados sugieren utilizar el 20% para lograr incrementos de las actividades enzimáticas. La velocidad de colonización en la FES depende de la concentración del inóculo (Krishna, 2005). Este factor influye en la disminución de contaminaciones durante el proceso fermentativo (Alshelmani *et al.*, 2013). Raghuwanshi *et al.* (2014), informó que el 40% del inóculo incrementa la producción de endocelulasas y celulasas totales, mientras que al 20% favorece la síntesis de β -glucosidasas. Las investigaciones realizadas por otros autores presentan diferentes porcentajes del inóculo para la producción eficiente de enzimas, lo que demuestra la necesidad de un balance adecuado entre los nutrientes y el crecimiento celular para la producción de los biocatalizadores (Ramachandran *et al.*, 2004).

El tiempo de incubación seleccionado para la FES de *B. subtilis* E44 fue de 24 h. La reducción de este parámetro conlleva a ahorros energéticos e incide en la disminución de los gastos del proceso. Olaniyi *et al.* (2013), observaron diferencias en los tiempos de fermentación para producir β -mananasas en cepas bacterianas. *Bacillus subtilis* mostró la máxima actividad enzimática a las 24 h. Por su parte, Kaur *et al.* (2016) informaron 22 h para la producción xilanasas por *Bacillus pumilus* 3GAH mientras que Angural *et al.* (2020) recomendaron 24 h para la producción de un cóctel de enzimas lignocelulolíticas y hemicelulolíticas por *Bacillus tequilensis* LXM 55.

El análisis de varianza de las actividades enzimáticas en el diseño PcB mostró que, en las condiciones del ensayo, las xilanasas y β -mananasas difieren de las endocelulasas (tabla 11). Este resultado puede asociarse a la disposición de la hemicelulosa y la celulosa en la pared celular donde, los residuos de xilanos envuelven las miofibrillas de celulosa (Li *et al.*, 2015), mientras que Qing *et al.* (2010) indicaron que el xilano y los xilooligosacáridos son inhibidores de las celulasas y se dificulta la inducción del complejo celulolítico.

Tabla 11. Resultados de las enzimas xilanasas, β -mananasas y endocelulasas en el diseño Plackett Burman.

Enzimas	AEz (UI mL ⁻¹)	± EE	Signif.
Xilanasas	16,18 ^a		
β -Mananasas	15,28 ^a	1,08	P= 0,0001
Endocelulasas	9,28 ^b		

^{a, b} Letras distintas indican diferencias significativas entre las filas ($P < 0,05$)
EE: error estándar

Las celulasas, además, poseen un mecanismo riguroso de control metabólico mediado por la glucosa, producto final del complejo enzimático que actúa como represor de la síntesis (Behera *et al.*, 2017). Este metabolito se produce también por la acción de otras enzimas, por lo que su concentración se incrementa durante el crecimiento microbiano. A partir de los resultados se decidió excluir las endocelulasas como variable respuesta en las etapas siguientes de la optimización.

3.2.2 Optimización de la FES del bagazo de caña de azúcar con *B. subtilis* E44

La temperatura y el pH inicial resultaron los factores de mayor significación ($P < 0,05$) en la actividad de las β -mananasas durante la FES (tabla 12). También fueron significativos el KNO_3 , las interacciones temperatura-pH inicial, $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ - urea y las cuadráticas de la temperatura, el pH inicial y la urea.

Los resultados contrastan con los obtenidos en el diseño PcB donde ningún factor fue significativo en la actividad de las β -mananasas y puede asociarse a que el diseño compuesto central sí evalúa las interacciones entre los factores (Dean *et al.*, 2017). Se demuestra además la importancia de la fuente de nitrógeno para el crecimiento microbiano, la síntesis enzimática y refuerza la inclusión en la optimización.

El valor de probabilidad de la prueba de Fisher es igual a 0,00 e indica que el modelo matemático es representativo para un 5% de significación. Por su parte, la probabilidad de la prueba de Durbin-Watson ($P = 0,40$) es mayor que 0,05 para una confianza del 95% lo que significa que los errores experimentales no se encuentran correlacionados entre sí. Este indicador es importante para evaluar la calidad del trabajo experimental, ya que indica que las variables experimentales que inciden en la actividad de las enzimas β -mananasas permanecieron controladas durante el desarrollo de la experimentación o se contemplaron como factores experimentales en la modelación matemática (Neter *et al.*, 1996).

Tabla 12. Resultados del diseño superficie de respuesta para las enzimas β -manananasas.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Valor de probabilidad
A: temperatura	66,24	1	66,24	0,0012
B: pH inicial	127,20	1	127,20	0,0000
C: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	5,78	1	5,78	0,2852
D: KNO_3	30,52	1	30,52	0,0193
E: urea	7,91	1	7,91	0,2133
AA	186,79	1	186,79	0,0000
AB	28,94	1	28,94	0,0224
AC	3,12	1	3,12	0,4296
AD	6,02	1	6,02	0,2755
AE	4,35	1	4,35	0,3523
BB	86,72	1	86,72	0,0003
BC	0,08	1	0,08	0,8997
BD	13,08	1	13,08	0,1132
BE	1,37	1	1,37	0,5990
CC	17,64	1	17,64	0,0684
CD	1,71	1	1,71	0,5578
CE	36,89	1	36,89	0,0110
DD	16,62	1	16,62	0,0764
DE	0,78	1	0,78	0,6914
EE	36,58	1	36,58	0,0113
Error total	110,98	23	4,82	
Total (corr.)	669,24	43		
Fisher				0,00

El modelo matemático que relaciona los factores que influyen en la actividad de las β -mananasas (Y) se representa por la ecuación siguiente:

$$Y = 78,555 + 2,2617 * A + 12,811 * B - 16,288 * D - 0,024 * A^2 - 0,063 * A * B - 0,729 * B^2 - 21,472 * C * E - 17,040 * E^2 \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Las β -mananasas fueron más sensible a la variación del pH inicial (B) que a la temperatura de incubación (A). El signo positivo de estos factores en la ecuación indica que se favorece de manera positiva la producción de la enzima, no sucede igual con el resto de los factores.

En la figura 7 se muestra el gráfico de superficie de respuesta para las β -mananasas. La respuesta de la variable dependiente se incrementa cuando la temperatura y el pH inicial se encuentran en niveles intermedios, lo que confirma el efecto significativo de la interacción. El óptimo de la temperatura, el pH, las fuentes de nitrógeno y la predicción de la actividad enzimática en las condiciones establecidas para la producción de β -mananasas por *Bacillus subtilis* se muestran en la tabla 13.

Se conoce que las bacterias poseen un rango amplio de temperatura y pH para su desarrollo lo que puede incidir en las variaciones de estos parámetros entre autores. Sin embargo, el incremento máximo del crecimiento microbiano se corresponde con los valores óptimos de temperatura y pH, y varía de acuerdo a la procedencia de la cepa, el medio de cultivo y los metabolitos que se desean obtener (Stahl y Olsson, 1977).

$c[\text{KNO}_3]: 0,20 \%$; $c[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]: 0,32 \%$; $c[\text{urea}]: 0,50 \%$

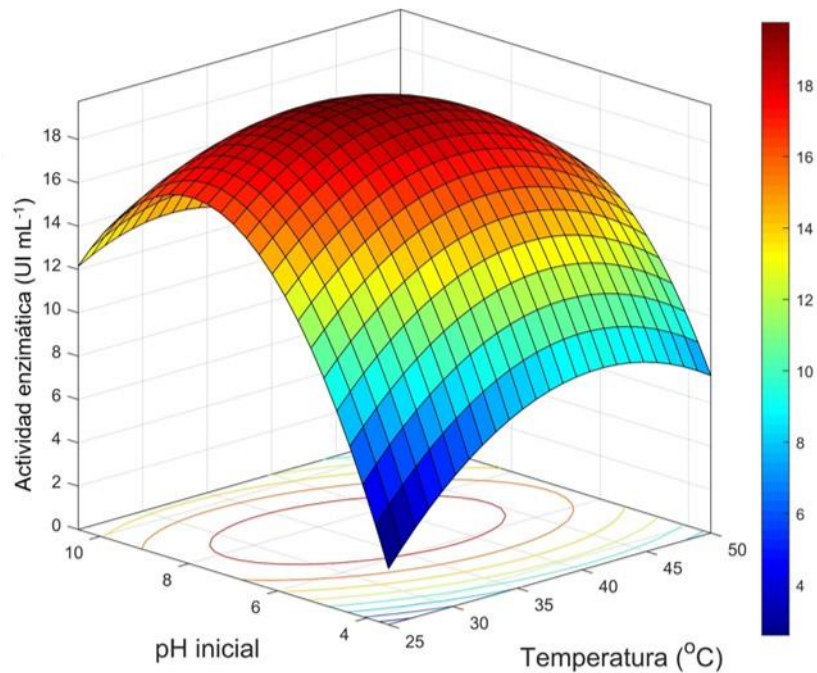


Figura 7. Superficie de respuesta en interacción de la temperatura de incubación y el pH inicial para las β -mananasas durante la optimización de la FES.

Tabla 13. Optimización de la FES con *Bacillus subtilis* E44 para la producción de β -mananasas.

Factores	Óptimos
Temperatura (°C)	35,71
pH inicial	7,31
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (%)	0,32
KNO_3 (%)	0,20
Urea (%)	0,50
Actividad β -mananasa optimizada (UI mL ⁻¹)	20,0

La temperatura óptima que favorece la síntesis de β -mananasas en el presente estudio es similar a la informada por Ríaz *et al.* (2019) en dos cepas de *Bacillus megaterium* (MBL-CW01 y MBL-GN02) (35°C). Sin embargo, difiere con la cepa MBL-SP02 (45°C) y además con los resultados de Norizan *et al.* (2020) para la temperatura y el pH (30°C y 6, respectivamente) durante la optimización de β -mananasas por *Bacillus subtilis* ATCC11774.

Los resultados del pH óptimo mostrados coinciden con los informados Chauhan *et al.* (2014b) y Rahmani *et al.* (2017) en cepas de *Bacillus* spp. productoras de β -mananasas (7–8). Mientras que Zurmiati *et al.* (2017) y Ríaz *et al.* (2019) obtuvieron el óptimo entre 5 y 7.

Las tres fuentes de nitrógeno evaluadas están incluidas en el medio de cultivo para la producción de β -mananasas. Según Yin *et al.* (2013) el nitrógeno inorgánico se utiliza más rápido por los microorganismos. Sus resultados indicaron que el sulfato de amonio fue la mejor fuente de nitrógeno durante la optimización de β -mananasas por *Aspergillus niger* SN-09, mientras que las investigaciones de Mabrouk y Ahwany (2008), con *Bacillus amyloliquefaciens* 10A1, permitieron seleccionar el nitrato de amonio por sus resultados en la síntesis de la enzima.

Sin embargo, Rashid *et al.* (2012) evidenciaron que las fuentes orgánicas mejoran la producción de β -mananasas por *Bacillus* spp. Resultados similares se informaron por Adebayo-Tayo *et al.* (2013) en cepas de *Bacillus* spp. productoras de la enzima. Por su parte, Chauhan *et al.* (2014a) informaron la bactopectona como la mejor fuente de nitrógeno para la producción de estas enzimas por *Bacillus nealsonii* PN-11, no obstante el nitrato de amonio y la combinación entre el nitrato de sodio con el extracto de levadura y el extracto de carne también mostraron buenos resultados.

Las investigaciones citadas anteriormente se realizaron con diferentes residuos agroindustriales. Los requerimientos de nitrógeno difieren entre microorganismos y dependen, además, del residuo que se utilice según se notificó por Chauhan *et al.* (2014a).

La optimización de xilanasas por *B. subtilis* E44 muestra que los factores estudiados no son significativos, para la obtención de la enzima, en el rango establecido en la experimentación (tabla 14). En la figura 8 se destaca una superficie cóncava con un punto crítico central que representa un mínimo de actividad xilanolítica y difiere del máximo obtenido para las β -mananasas. La forma de la curva confirma la falta de interacción de los factores para la obtención de esta enzima (Angural *et al.*, 2020).

Los estudios de la optimización de β -mananasas y xilanasas por *B. subtilis* E44 indican que las enzimas se producen en condiciones diferentes. Zhang y Sang (2015) refirieron efectos similares en sus investigaciones para la producción de xilanasas y mananasas por *Penicillium chrysogenum* QML-2. Igualmente se notificó por Veerabhadrapa *et al.* (2017) en la optimización de lipasas y proteasas en cepas de *Aspergillus versicolor* CJS-98.

Por su parte, Mahadeo *et al.* (2018), informaron resultados similares para las xilanasas y proteasas alcalinas por *Bacillus* spp. durante la optimización. Igualmente sucedió en los trabajos publicados por David *et al.* (2018) en la síntesis de proteasas y mananasas a partir de *Bacillus nealsonii* PN-11, así como Angural *et al.* (2020) con lacasa, mananasa y xilanasas producidas por *Bacillus tequilensis* LXM 55.

Tabla 14. Resultados del diseño superficie de respuesta para la producción de xilanasas durante la FES con *B. subtilis* E44.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Valor de P
A: temperatura	3,62	1	3,62	0,4837
B: pH inicial	14,85	1	14,85	0,1629
C: NH ₄ PO ₄	0,36	1	0,36	0,8242
D: KNO ₃	7,08	1	7,08	0,3297
E: urea	0,14	1	0,14	0,8885
AA	10,96	1	10,96	0,2280
AB	1,59	1	1,59	0,6413
AC	1,31	1	1,31	0,6721
AD	5,78	1	5,78	0,3774
AE	0,24	1	0,24	0,8549
BB	20,49	1	20,49	0,1038
BC	0,06	1	0,07	0,9227
BD	0,37	1	0,38	0,8198
BE	8,41	1	8,41	0,2892
CC	3,65	1	3,65	0,4819
CD	7,05	1	7,05	0,3308
CE	24,19	1	24,19	0,0787
DD	23,41	1	23,42	0,0833
DE	22,24	1	22,24	0,0909
EE	8,13	1	8,13	0,2970
Error total	164,35	23	7,14	
Total (corr.)	293,65	43		

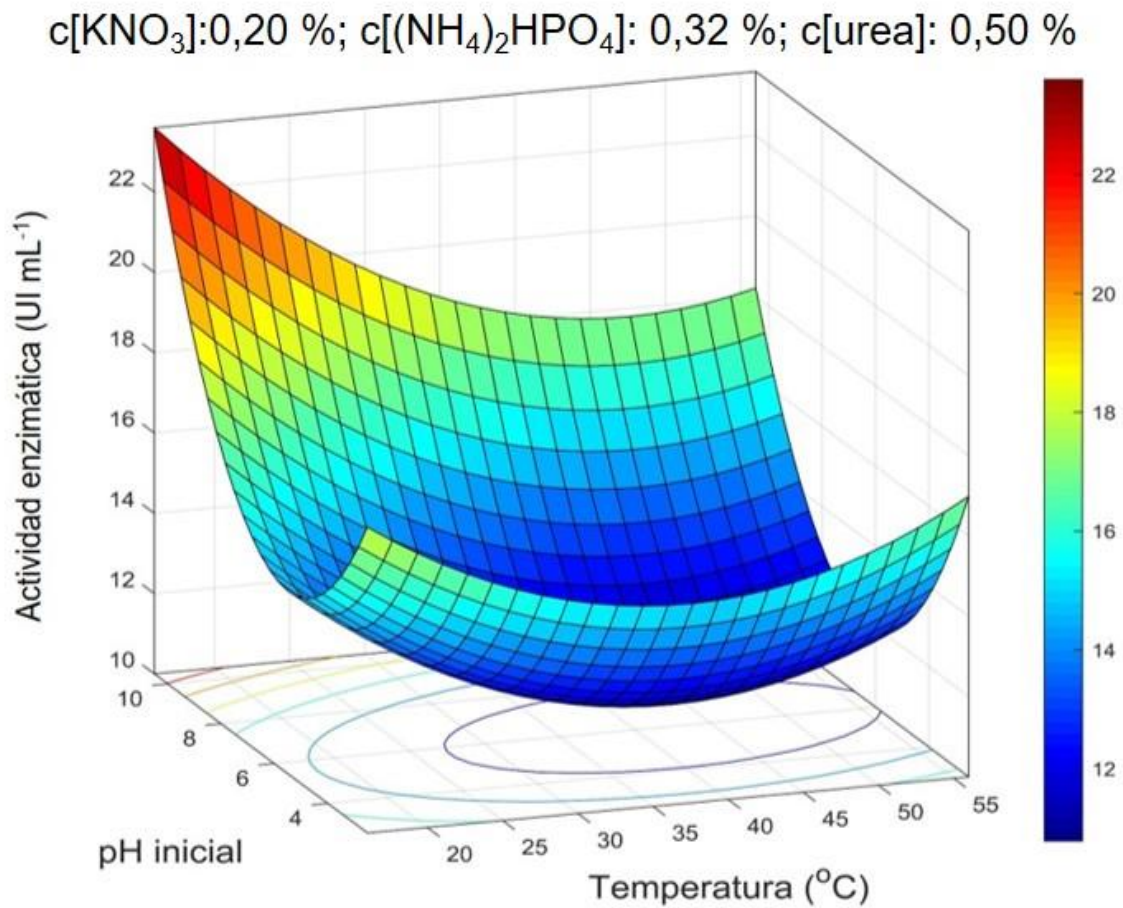


Figura 8. Superficie de respuesta de la interacción entre la temperatura de incubación y el pH inicial para las xilanasas durante la optimización de la FES.

Al igual que las investigaciones anteriormente citadas, Machado de Castro *et al.* (2014) y Raza *et al.* (2018) informaron también diferencias entre las enzimas durante la optimización conjunta de procesos fermentativos microbianos. Sin embargo, en ambos casos, los autores aplicaron la función de deseabilidad de Deringer (Derringer y Suich, 1980) para lograr la combinación de los factores que satisfagan simultáneamente los requerimientos para cada respuesta. La metodología se utilizó satisfactoriamente en procedimientos analíticos o biomédicos (Candiotti *et al.*, 2014), en la industria textil (Kalantzi *et al.*, 2019) y alimenticia (Natabirwa *et al.*, 2018).

Optimización múltiple de xilanasas y β -mananasas por *Bacillus subtilis* E44 con la función de deseabilidad

El modelo matemático permitió establecer los niveles de los factores que producen simultáneamente la mejor actividad de las enzimas (tabla 15). En esas condiciones el modelo predice actividades de 17,1 y 19,0 UI mL⁻¹ para β -mananasas y xilanasas, respectivamente. El gráfico de superficie de respuesta (figura 9) muestra que las variaciones de los factores provocan disminución del coeficiente de deseabilidad ($D=83,4\%$) y se afecta la producción simultánea de las enzimas. Según Zivorad (2004) el coeficiente de deseabilidad superior al 80% se considera muy bueno para la experimentación.

Tabla 15. Optimización de respuestas múltiples para la producción de xilanasas y β -mananasas durante la FES con *Bacillus subtilis* E44.

Factores	Óptimos
Temperatura (°C)	32,80
pH inicial	7,49
Urea (%)	0,84
Coeficiente de deseabilidad (%)	83,4

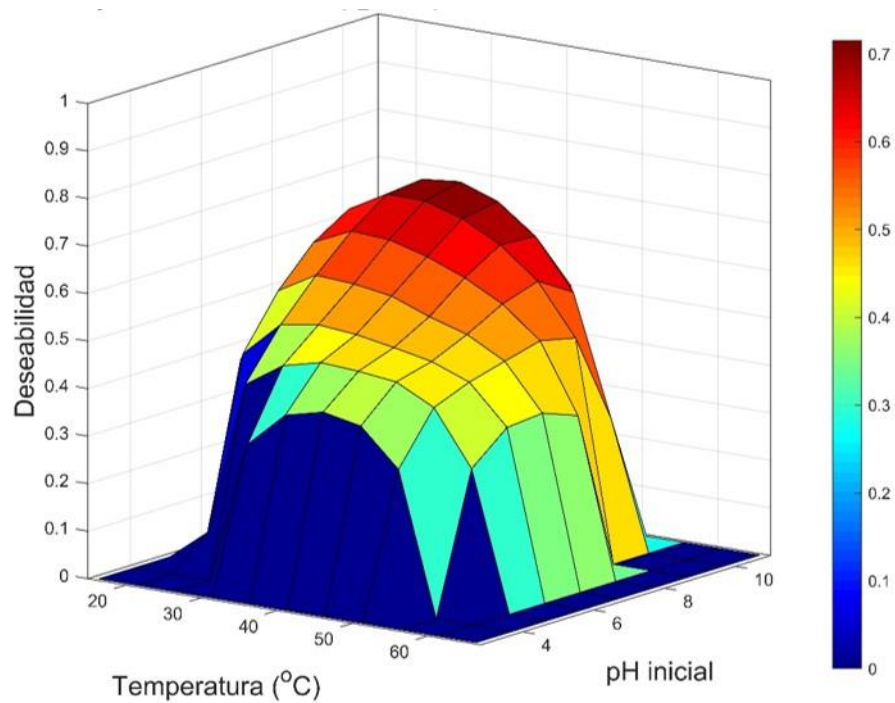


Figura 9. Superficie de respuesta de la optimización múltiple de β -mananasas y xilanasas.

En la literatura internacional varios autores informan coeficientes de deseabilidad superiores al 80 %. En ese caso se destacan los informados por Machado de Castro *et al.* (2014) para la producción de amilasas, celulasas, xilanasas y proteasas por *Aspergillus awamori* (D=92,5%) y Tabssum *et al.* (2018) en la obtención de exo y endoglucanasas por *Bacillus cereus* (D=82,5%). Además, Das *et al.* (2013) durante la optimización de enzimas celulolíticas producidas por *Aspergillus fumigatus* quienes denunciaron que el coeficiente obtenido fue alto pero no mostraron su valor. La temperatura óptima para β -mananasas informada en el diseño compuesto central y en las respuestas múltiples difiere en 2,91 °C, mientras que el pH en 0,18 unidades. La temperatura regula la síntesis enzimática a nivel transcripcional y translocacional por lo que su estudio es de gran importancia para la síntesis de proteínas microbianas (Rahman *et al.*, 2005).

Durante la producción de xilanasas y β -mananasas por *Bacillus* spp. se informan diferentes temperaturas en la literatura consultada. Por ejemplo, Kumar *et al.* (2014b) notificaron 30°C para la síntesis de xilanasas por *Bacillus pumilus* VLK-1, mientras que Mahadeo *et al.* (2018); Chitchaowana *et al.* (2016) y Alokika y Singh (2020) revelaron 33; 37 y 40 °C, respectivamente en *Bacillus subtilis*.

Por su parte, para la obtención de β -mananasas, Kumar y Kapoor (2017) notificaron temperaturas entre 37–50 °C para *Bacillus* spp. La temperatura óptima en el presente experimento difiere de la informada por Milián *et al.* (2017a) para producir el crudo enzimático de *B. subtilis* E44 (37°C) con acción proteolítica durante la fermentación sumergida. La diferencia puede asociarse al método fermentativo

utilizado, los componentes del medio de cultivo y las enzimas que se desean sintetizar.

El pH óptimo para la producción simultánea de xilanasas y β -mananasas por *B. subtilis* E44 se encuentra en el entorno de la neutralidad y coincide con lo descrito por Milián *et al.* (2017a) para *B. subtilis* E44. La producción de enzimas depende del pH y determina el estado de ionización de metabolitos y nutrientes. En la literatura consultada para el género *Bacillus*, se notifican rangos similares para la síntesis de las enzimas en estudio. En el caso de xilanasas se informan valores de pH entre 5 y 10 (Kallel *et al.*, 2016), mientras que para β -mananasas ente 5 y 9 (Rahmani *et al.*, 2017).

Los resultados de la optimización múltiple, muestran que la urea es la fuente de nitrógeno idónea para la producción conjunta de las enzimas por *B. subtilis* E44 lo que se evidencia en los valores óptimos determinados por el programa estadístico. Adebayo-Tayo *et al.* (2013) y Suganthi *et al.* (2013) informaron también que la urea fue la mejor fuente de nitrógeno para el crecimiento y la síntesis de enzimas en *Bacillus* spp. Mientras que Gowdhaman *et al.* (2014) estudiaron varias fuentes de nitrógenos, sin embargo no recomendaron la urea para la producción de xilanasas por *Bacillus aerophilus* KGJ2.

En la literatura consultada existen incongruencias respecto a las fuentes de nitrógeno utilizadas por *Bacillus* spp. según se refiere, lo que dificulta establecer un criterio general. Sin embargo, *Bacillus subtilis* posee genes estructurales para la

síntesis de ureasa que se activan en presencia de urea como única fuente de nitrógeno (Cruz-Ramos *et al.*, 1997).

Las ureasas microbianas, forman ácido carbónico y dos moléculas de amonio que se incorporan al metabolismo intracelular (Moblely *et al.*, 1995). A pesar de los diferentes hábitat y ciclos de vida de *Bacillus subtilis* existen pocas diferencias fisiológicas respecto a la asimilación del amonio (Fisher, 1999), su incorporación al metabolismo ocurre solamente a través de la glutamina sintetasa (Wray *et al.*, 1994). La urea se encuentra en los ambientes donde se desarrollan muchas de las especies de *Bacillus* que incluyen el suelo y los alimentos (Mols y Abee, 2008). Según Milián *et al.* (2014), *Bacillus subtilis* E44 se aisló de alimentos alterados (jugo de tomate) lo que podría justificar la preferencia de la bacteria para utilizar la urea como fuente de nitrógeno.

3.2.3 Optimización del proceso de extracción de las enzimas del residuo fermentado

El análisis de varianza de la optimización del proceso de extracción de las β -mananasas y xilanasas se muestra en la tabla 16. El modelo matemático es representativo de los datos para el 95% de confianza debido a los valores de Fisher y Durbin Watson obtenidos para ambas enzimas.

Los efectos del volumen del disolvente, el tiempo en la zaranda y la interacción cuadrática de esos factores influyeron en la extracción de β -mananasas. En el caso de las xilanasas incidieron además la interacción volumen * tiempo y los bloques, en los que se evaluaron tres disolventes ($P < 0,05$).

Tabla 16. Resultados del diseño superficie de respuesta para optimizar la extracción de xilanasas y β -mananasas del bagazo de caña de azúcar fermentado.

Fuente	β -Mananasas	Xilanasas
	Valor de P	Valor de P
A: volumen	0,0000	0,0000
B: tiempo	0,0005	0,0093
AA	0,0031	0,0019
AB	0,1867	0,0015
BB	0,0058	0,4503
Bloques	0,2593	0,0000
P-Fisher	0,0000	0,0001
P-Durbin-Watson	0,2900	0,1030

Las ecuaciones 3.2 y 3.3 muestran ecuaciones que correlacionan las actividades de las enzimas y los factores.

$$Y_{man} = 9,59 - 0,17 * t - 0,93 * V - 0,004 * t * V - 0,004 * t^2 - 0,04 * V^2 \quad \text{Ecuación 3.2}$$

$$Y_{xil} = -3,24 + 0,01 * t + 2,33 * V - 0,01 * t * V + 0,00 * t^2 - 0,05 * V^2 \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Donde:

Y_{man} : actividad enzimática de las β -mananasas (UI mL⁻¹)

Y_{xil} : actividad enzimática de las xilanasas (UI mL⁻¹)

t: tiempo de incubación (h)

V: volumen del disolvente (mL)

Las diferencias entre los disolventes para la extracción de xilanasas se muestran en la tabla 17. El mejor disolvente para la extracción de la enzima fue el agua destilada.

Tabla 17. Comparación de disolventes que se evaluaron para la extracción de xilanasas.

Bloque: Disolventes	Medias AEz (UI mL⁻¹)	± EE	Signif.
Tampón fosfato de sodio 0,01 mol L ⁻¹ pH 7	5,00 ^b		
Tampón acetato de sodio 0,01 mol L ⁻¹ pH 5,5	8,09 ^b	0,92	P= 0,0001
Agua destilada	23,96 ^a		

^{a, b} Letras distintas indican diferencias significativas entre filas ($P < 0,05$); EE: error estándar

Zhang y Sang (2015) utilizaron el agua destilada para la extracción de xilanasas y mananasas por *Penicillium chrysogenum* QML-2. Los autores refirieron que el disolvente posee una constante dieléctrica relativamente elevada que permite reducir las fuerzas interactivas entre la enzima y los sustratos lo que favorece su separación del residuo.

Los óptimos de los factores para la extracción conjunta de las enzimas muestran diferencias para cada biocatalizador (tabla 18). Las β -mananasas requieren menor volumen del disolvente y mayor tiempo en la zaranda, mientras que para las xilanasas ocurre lo contrario. El volumen del disolvente afecta el proceso, a pequeños volúmenes del disolvente se dificulta su penetración en el residuo fermentado, mientras que los volúmenes elevados incrementan la dilución de los extractos. La eficiencia de la extracción de las enzimas depende de su solubilidad, la distribución en el sustrato y las características físicas del sistema de filtración empleado (Ikasari y Mitchell, 1996).

Tabla 18. Óptimos para la extracción de xilanasas y β -mananasas del residuo fermentado.

Factores	β-Mananasas	Xilanasas
Volumen (mL)	8,71	20,00
Tiempo (min)	60,00	15,00
Respuesta optimizada AEz (UI mL ⁻¹)	32,71	37,95

En la literatura internacional existen pocos informes sobre la optimización de la extracción conjunta de enzimas. Díaz *et al.* (2007) evaluaron las condiciones para la extracción de xilanasas y poligalacturonasas del residuo de uvas. El tipo de disolvente, la velocidad de agitación en la zaranda y la temperatura de extracción fueron diferentes entre las enzimas, sin embargo, los autores establecieron los óptimos para xilanasas con el argumento que en esas condiciones se incrementaba también la actividad de la poligalacturonasa.

Por su parte, Zhang y Sang (2015) informaron la extracción conjunta de β -mananasas y xilanasas producidas por *Penicillium chrysogenum* QML-2 mediante la metodología de superficie de respuesta. Sin embargo, las condiciones óptimas para la separación de las enzimas fueron similares lo que facilitó el proceso.

Debido a las diferencias en los óptimos del volumen del disolvente y el tiempo en la zaranda para la extracción de β -mananasas y xilanasas, al igual que en la optimización de la FES, se aplicó la función de deseabilidad para obtener ambas enzimas maximizadas en el proceso (tabla 19). El coeficiente obtenido fue de 90,8% por lo que la experimentación se considera muy buena (Zivorad, 2004). Las variaciones de los factores causan disminución del coeficiente tal como se muestra en la figura 10.

Tabla 19. Optimización de respuestas múltiples para la extracción de β -mananasas y xilanasas del residuo fermentado.

Factores	Óptimos
Volumen (mL)	12,27
Tiempo (min)	60,00
Coeficiente de Deseabilidad (%)	90,80

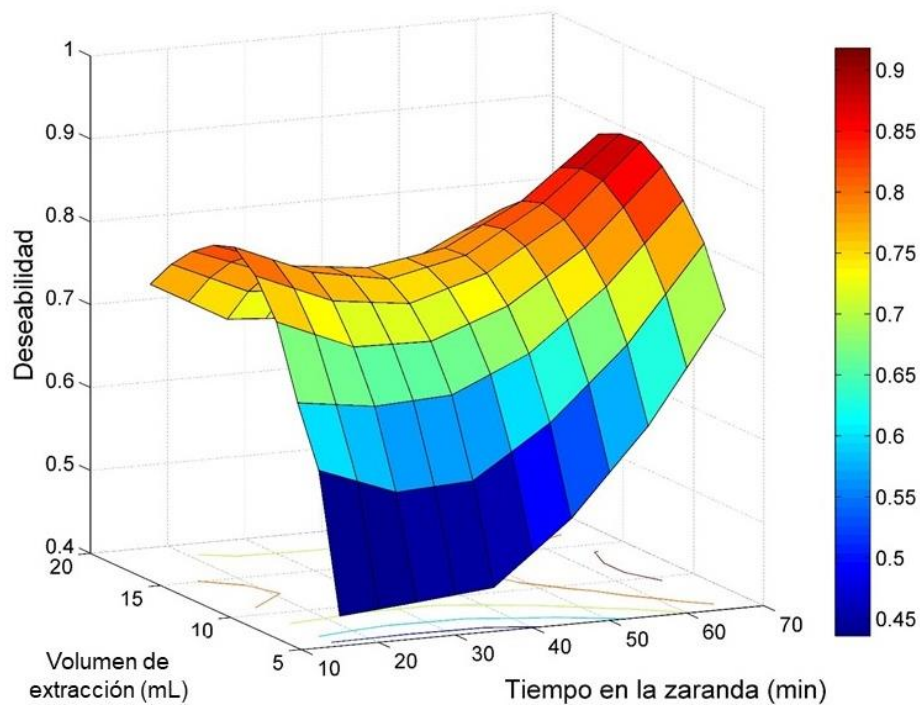


Figura 10. Superficie de respuesta de la optimización de la extracción múltiple de β -mananasas y xilanasas del residuo fermentado.

Las actividades de las enzimas β -mananasas y xilanasas que se predicen durante la etapa son de 31,73 y 25,60 UI mL⁻¹. El volumen óptimo para la extracción conjunta se ubica entre los obtenidos para las enzimas independientes, mientras que el tiempo de extracción favoreció las β -mananasas. Este resultado podría justificar la disminución de la actividad xilanolítica respecto a la predicción de la etapa anterior. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente capítulo se establecieron las condiciones óptimas para la producción y extracción de xilanasas y β -mananasas durante la FES del bagazo de caña de azúcar con *Bacillus subtilis* E44 (figura 11) y se realizó la FES para validar las predicciones del programa.

Las actividades de las enzimas en las condiciones óptimas superaron la FES inicial (tabla 20). Los resultados demuestran la utilidad de estas herramientas durante los procesos fermentativos para la producción de enzimas microbianas y coincide con lo informado por Abdella *et al.*, 2020 y Chantorn *et al.*, 2021.

Sin embargo, la ausencia de un método único para determinar la actividad de las enzimas dificulta la comparación entre autores debido a que los ensayos se realizan a diferentes temperaturas, pH, tiempos de reacción y sustratos. Estos factores inciden en las velocidades de las reacciones enzimáticas por lo que resulta más conveniente realizar el análisis entre las etapas de la misma investigación (Chen *et al.*, 2013).

Figura 11. Metodología para la obtención del extracto de enzimas con actividad β -mananasas y xilanasas durante la FES del bagazo de caña de azúcar con *Bacillus subtilis* E44. En rojo los factores optimizados.

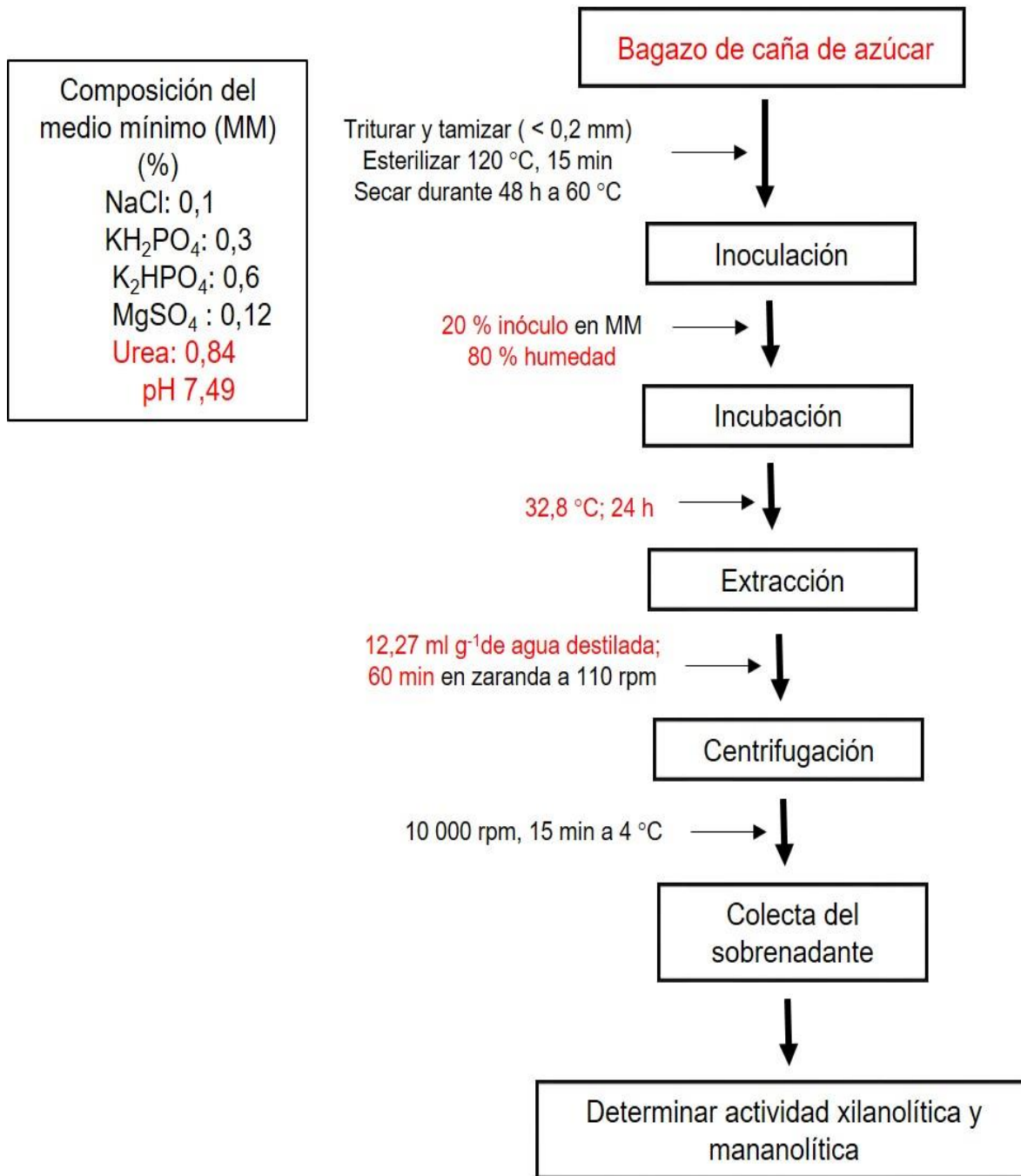


Tabla 20. Actividades enzimáticas en el extracto de *Bacillus subtilis* E44 en la FES optimizada y sin optimizar.

Etapa	Xilanasas (UI mL ⁻¹)	β-mananasas (UI mL ⁻¹)
FES sin optimizar	9,32	2,52
FES optimizada	28,56	34,25

La actividad xilanólítica de *Bacillus subtilis* E44 se incrementó 3,06 veces después de la optimización de la FES. Los resultados superan los informados por Mahadeo *et al.* (2018) y Raza *et al.* (2018) quienes notificaron 1,27; 1,46; 1,68 veces, respectivamente, en cepas de *Bacillus* spp. Por el contrario, Kallel *et al.* (2016) y Alokika y Singh (2020) informaron incrementos de 6 y 4,82 veces, respectivamente. Por su parte, la actividad mananolítica de la presente investigación, aumentó 13,59 y fue superior a la xilanólítica. Las β-mananasas superaron los incrementos informado por David *et al.* (2018), Norizan *et al.* (2020) y Blibech *et al.* (2020) con 11,12; 4 y 5,91 veces, respectivamente en especies del género *Bacillus*. Según Ravindran *et al.* (2018) la optimización de procesos incrementa varias veces la producción de enzimas por lo que los resultados de la presente investigación reafirman la utilidad de las metodologías aplicadas.

En el presente capítulo se optimizaron los procesos para la obtención de xilanasas y β -mananasas por *Bacillus subtilis* E44. Las AEz xilanolítica debe ser igual o mayor a 25,60 UI mL⁻¹, mientras la mananolítica 31,73 UI mL⁻¹.

Para lograr la aplicabilidad de los resultados es necesario conocer la estabilidad al pH y la temperatura de las enzimas en el extracto. Además, resultaría de gran interés determinar la presencia de otras enzimas como las endocelulasas, amilasas y proteasas ya que la acción conjunta de varias enzimas podría favorecer la degradación de las dietas en la alimentación avícola.

CAPÍTULO 4. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LAS β -MANANASAS EN EL EXTRACTO AL pH Y LA TEMPERATURA

Introducción

La obtención del extracto enzimáticos de *Bacillus subtilis* E44 con actividad mananolítica y xilanolítica incrementa las expectativas para su aplicación en dietas destinadas a la producción avícola. Sin embargo, la estabilidad al pH y la temperatura de los biocatalizadores es un requisito indispensable para su aplicación en diversos procesos (Bedford y Partridge, 2011). Los extractos enzimáticos producidos por bacterias contienen diferentes catalizadores que actúan sinérgicamente en la reducción del tamaño molecular de los PNA (Bedford, 1995). La determinación de las enzimas presentes en estos cócteles permite seleccionar los sustratos a los que se le aplicará, predecir sus productos y el efectos en los animales (Masey-O'Neill *et al.*, 2014b).

Los resultados del capítulo anterior revelaron que la actividad de las β -mananasas fue superior por lo que los objetivos del presente capítulo se dirigen a:

- ✓ Determinar la estabilidad al pH y la temperatura de las β -mananasas en el crudo enzimático de *Bacillus subtilis* E44.
- ✓ Evaluar la actividad de las enzimas endocelulasas, amilasas y proteasas en el extracto enzimático.

4.1 Materiales y métodos

La secuencia experimental se muestra en el anexo 1. El extracto enzimático se produjo a partir de las condiciones optimizadas en el capítulo anterior. Se liofilizó y se conservó a temperatura ambiente (aproximadamente 30 °C). Las determinaciones en este capítulo se realizaron con el producto liofilizado a una concentración de 10 mg mL⁻¹ (p/v) en agua destilada estéril.

4.1.1 Estabilidad al pH de las enzimas β-mananasas en el extracto enzimático

Para el estudio de la estabilidad al pH se prepararon soluciones de tampones acetato de sodio a pH 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 y 5,5 y para pH superiores se utilizó la solución tampón de fosfato de sodio (6,0; 6,5; 7,0 y 7,5). Se incubaron 100 μL del extracto enzimático diluido 1:5 (concentración de proteínas de 0,02 mg ml⁻¹) en 0,2 mmol L⁻¹ del tampón correspondiente.

El extracto enzimático se incubó a 30 °C en baño termostatado durante 60 min. Posteriormente, las muestras se retiraron del baño y se determinó la actividad enzimática como se describe en el acápite 2.1.3. Para el cálculo de la actividad residual de la enzima, se fijó el 100% de actividad en el valor de pH al cual se obtuvo la mayor actividad enzimática. Se realizaron tres repeticiones para cada determinación.

4.1.2 Estabilidad a la temperatura de las enzimas β -mananasas en el extracto

Se incubaron 150 μ L del extracto enzimático en tubos de 1,5 mL de capacidad a las temperaturas de 40, 50, 60, 70 y 80 °C en baño termostatado durante 48 h. Para cada temperatura ensayada se retiraron tres tubos a los tiempos $t = 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 36$ y 48 h y se colocaron inmediatamente en hielo durante 2 min. Posteriormente se determinó la actividad enzimática como se describe en el acápite 2.1.3.

4.1.3 Caracterización enzimática del extracto obtenido de *Bacillus subtilis* E44 liofilizado

Se determinó la actividad de las enzimas β -mananasas, xilanasas y endocelulasas por la metodología descrita en el acápite 2.1.3. La cuantificación de amilasas y proteasas se realizó según se describe a continuación:

Actividad de las amilasas

Se añadieron 100 μ L del extracto enzimático a 400 μ L de una disolución de almidón al 1%, disuelto en el tampón acetato de sodio 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,5) y la reacción se incubó durante 10 min a 50 °C. Para calcular los equivalentes de glucosa liberados se realizó una curva patrón de glucosa a una concentración de 1 mg mL⁻¹. Una unidad de actividad enzimática (UI mL⁻¹) representa la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de glucosa por minuto. El ensayo se realizó por triplicado.

Actividad proteolítica

Se añadieron 150 μ L del extracto enzimático a tubos de ensayos que contenían 250 μ L de una disolución de azocaseína al 0,5% (p/v) disuelta en el tampón Tris/HCL, 0,1 mol L⁻¹, pH 9,0. La reacción se incubó a 37 °C durante 30 min. Posteriormente

se añadieron 1,2 mL de ácido tricloacético 10% (v/v) a cada tubo para inactivar la enzima y la reacción se neutralizó al adicionar 800 μL de NaOH 1,8 mol L^{-1} . Se midió la absorbancia a 420 nm contra un blanco sin extracto enzimático. Una unidad de actividad enzimática (UI mL^{-1}) representa la cantidad de enzima que produce una diferencia unitaria entre el blanco y la muestra por minuto bajo las mismas condiciones experimentales. El ensayo se realizó por triplicado.

La concentración de proteínas se determinó mediante la metodología descrita por Lowry *et al.* (1951). Se utilizó la albúmina bovina sérica (1 mg mL^{-1}) como estándar para la curva patrón. Para todas las enzimas determinadas, las actividades específicas se calcularon al dividir la actividad enzimática entre la concentración de proteínas (UI mg^{-1}).

4.1.4 Análisis estadístico

Para el cálculo de la actividad enzimática residual a cada temperatura, se fijó el 100% de actividad a $t=0$.

Los datos obtenidos se ajustaron a una cinética de inactivación térmica irreversible de primer orden de acuerdo al modelo: $\mathbf{N} \rightarrow \mathbf{I}$

Donde:

N: representa el estado nativo de la enzima (población de moléculas con actividad enzimática)

I: el estado inactivo de la enzima (población de moléculas carentes de actividad enzimática).

Para el análisis del efecto de la temperatura en la estabilidad de las enzimas β -mananasas se realizó el ajuste no lineal de los datos, a un modelo de decrecimiento mono exponencial para cada temperatura con el programa GraphPad Prism versión 5.0 (San Diego, California, 2003 E.E.U.U.).

$$A(t)/A_0 = e^{-k(T)t} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

$$t_{1/2}(T) = \ln 2/k(T) \quad \text{Ecuación 4.2}$$

Dónde:

$A(t)$ [U mL^{-1}]: actividad enzimática de la muestra a un tiempo dado.

A_0 [U mL^{-1}]: actividad enzimática inicial (0 h)

$k(T)$ [h^{-1}]: constante de velocidad de primer orden del proceso de inactivación térmica a una temperatura dada.

t [h]: tiempo.

$t_{1/2}(T)$ [h]: tiempo de vida media de la enzima a una temperatura dada (tiempo que tarda en reducirse a la mitad la actividad enzimática inicial).

Se determinó la energía de activación del proceso de inactivación térmica de la β -mananasas en el intervalo de temperatura de 40 a 80 °C según la ecuación de Arrhenius. Se realizó un ajuste lineal de la ecuación logarítmica mediante el programa GraphPad Prism versión 5.0 (San Diego, California, 2003 E.E.U.U.).

$$K(T) = Ae^{-E_a/RT} \quad \text{Ecuación 4.3}$$

$$\ln(k(T)) = \ln A - E_a(1/RT) \quad \text{Ecuación 4.4}$$

Donde:

$k(T)$ [h^{-1}]: constante de velocidad de primer orden del proceso de inactivación térmica a una temperatura dada.

A: factor pre-exponencial o factor de frecuencia.

E_a [$kJ\ mol^{-1}$]: energía de activación del proceso de inactivación térmica de la β -mananasa.

R: constante universal de los gases $8,314\ J\ mol^{-1}\ k^{-1}$

T[K]: temperatura absoluta.

Para la comparación de las medias en todos los casos se utilizó el programa InfoStat (Di-Rienzo *et al.*, 2012) y en los casos necesarios se aplicó la d \acute{o} cima de Duncan (1955), para establecer las diferencias entre las medias.

4.2 Resultados y discusión

4.2.1 Estabilidad al pH de las enzimas β -mananasa del extracto enzimático

Las enzimas son polielectrolitos con diferentes grupos cargados en su estructura. La carga neta y los grupos catalíticamente funcionales dependen del pH del medio (Nelson y Cox, 2015).

El perfil de estabilidad de pH de las β -mananasa en el extracto muestra que la enzima retuvo entre el 80 y 100% de su actividad inicial en el rango entre 4,0 y 6,0 (figura 12). Mientras que, desde 3,0 hasta 4,0 y de 6,0 a 7,5 se conserva entre el 60 y el 80% de su actividad.

Los resultados evidencian que las β -mananasa son estables al pH entre 3,0 a 7,5. Blibech *et al.* (2019) informaron que, la misma obtenida de *Bacillus* spp, fue estable al pH entre 3 y 9. Por su parte, Regmi *et al.* (2017) y Kim *et al.* (2017) notificaron

que estos biocatalizadores, obtenidos de *Bacillus* conservaron su actividad a pH entre 5 y 11.

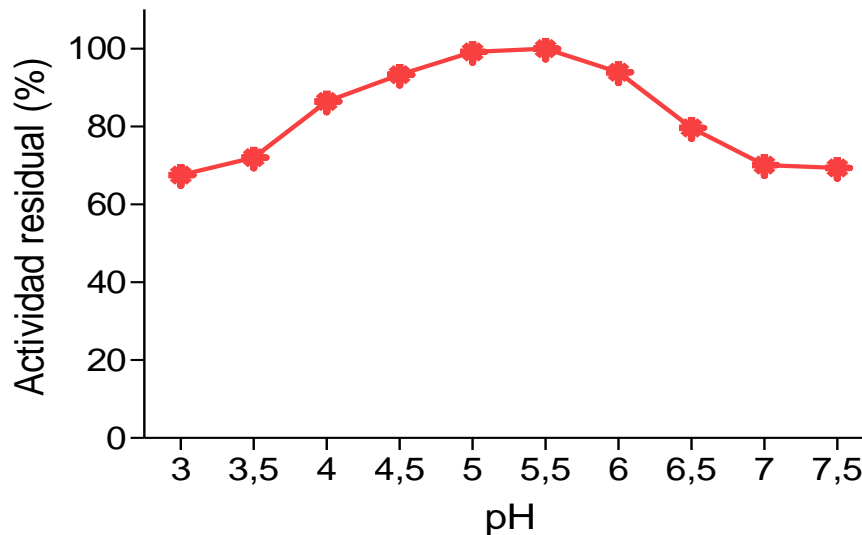


Figura 12. Estabilidad al pH de las enzimas β -mananasas del extracto enzimático. Los valores representan la media y la desviación estándar (n=3).

Según Xu *et al.* (2013) el perfil de estabilidad de las β -mananasas se relaciona con características estructurales como la carga superficial, el número de residuos hidrofóbicos y polares así como el pKa de los residuos catalíticos. Además, la mayoría de las reacciones enzimáticas tienen lugar en medios acuosos por lo que las proteínas son sensibles a las modificaciones del pH.

Los extractos enzimáticos contienen proteínas y sales que pueden ejercer efecto tampón sobre los biocatalizadores lo que favorece la estabilidad de las proteínas, sin embargo, este efecto se pierde durante los procesos de purificación. Este hecho constituye una ventaja de los extractos enzimáticos respecto a las enzimas purificadas según se informó por Camacho (2009).

Las β -mananasas sintetizadas por *Bacillus* spp. son estables en un rango amplio de pH lo que favorece su utilización en diferentes industrias (Kaira y Kapoor, 2020). La adición de biocatalizadores estables al pH a los piensos avícolas favorece la funcionalidad de las biomoléculas a las variaciones de pH que ocurren en el TGI.

4.2.2 Estabilidad a la temperatura de las enzimas β -mananasas del extracto enzimático

La mayoría de las enzimas se desnaturalizan cuando se someten a temperaturas elevadas, se desestabiliza su conformación estructural, casi siempre irreversiblemente y como consecuencia se pierde la actividad catalítica (Purich, 2010). La figura 13 muestra los perfiles de estabilidad térmica de las β -mananasas en el extracto enzimático de *B. subtilis* E44 de 40 a 80 °C.

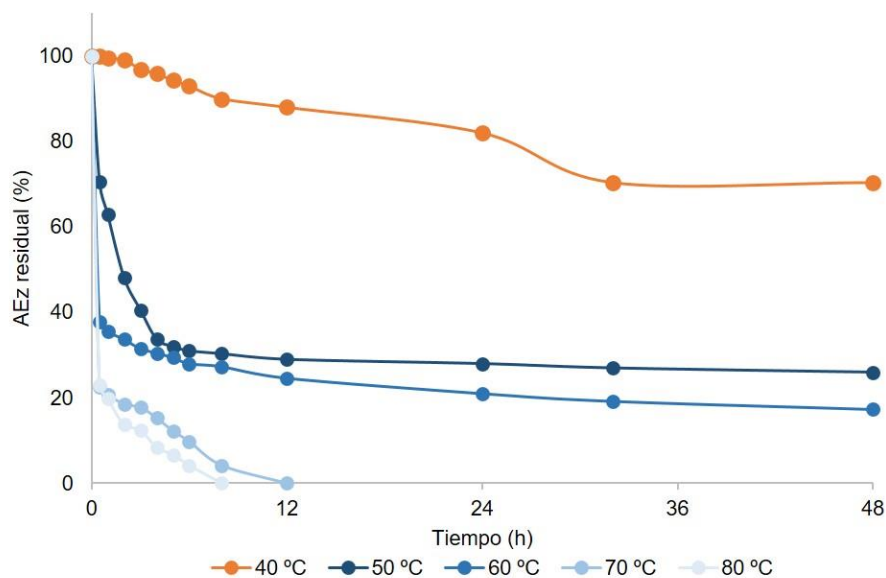


Figura 13. Cinética de inactivación térmica de la β -mananasas a las temperaturas de 40; 50 y 60, 70 y 80 °C.

Durante la incubación del extracto a 40 °C las β -mananasas conservaron el 80% de su actividad a las 24 h, pero a las 48 h solo el 70 %. Mientras que a 50 °C la actividad disminuyó drásticamente, aunque después de 1 h conservó más del 45 % de actividad. A temperaturas superiores (60, 70 y 80 °C) la actividad de la enzima disminuyó por debajo del 40% a las 0,5 h.

Los estudios de estabilidad térmica que se informan en la literatura se obtienen a partir de la incubación durante 1 o 2 h. En la presente investigación, a 40 °C la enzima fue muy estable las primeras horas, razón por la cual se extendió el tiempo de incubación hasta 48 h. Después de 1 h de incubación a 50, 60, 70 y 80 °C la enzima conservó el 63; 35,5; 20,8 y 19,8% de su actividad, respectivamente. Sin embargo, al incubar el extracto 2 h a 50 °C las β -mananasas conservaron todavía el 50,3% de su actividad.

Purohit y Yadav (2020) notificaron la máxima actividad mananolítica en el crudo de *Microbacterium* sp. CIAB417 a 50 °C, sin embargo no informaron el tiempo de incubación. En la mayoría de las investigaciones publicadas se estudia la estabilidad de enzimas purificadas, lo que podría dificultar su comparación ya que la presencia de moléculas e iones en los extractos pueden favorecer o afectar su termoestabilidad.

Por otra parte, Selvarajan y Veene (2017) plantearon que la estabilidad térmica de las β -mananasas varía, fundamentalmente, de acuerdo al microorganismo que las produce y la vía de obtención. Según Lindsay y Creaser (1975) las bacterias poseen genes de adaptación térmica en plásmidos que sustituyen aminoácidos específicos en las proteínas e incrementan la termoestabilidad.

Wang *et al.* (2018) consideran que las características estructurales de las β -mananasas como los puentes salinos, los módulos de unión a carbohidratos y las estructuras multimodales, afectan su estabilidad. Para incrementar la síntesis de enzimas estables se utilizan metodologías de transformación genética dirigidas a mejorar sus estructuras y también la identificación de las familias de β -mananasas obtenidas de diferentes géneros microbianos (Zhang *et al.*, 2019; Kaira y Kapoor, 2020; Song *et al.*, 2021).

Otro parámetro importante que relaciona la desactivación enzimática es el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), que se define como el tiempo al que la actividad de la enzima se reduce un 50%. En la figura 14 se muestran los $t_{1/2}$ para las β -mananasas a las temperaturas estudiadas. El mayor corresponde a 40 °C, a partir de 50 °C se aprecia una disminución del parámetro con el aumento de la temperatura tal como se informó por Cayetano-Cruz *et al.* (2016) y Ismail *et al.* (2019).

El $t_{1/2}$ mostrado en la presente investigación para las β -mananasas a 60 °C es superior a los obtenidos por Zhou *et al.* (2016) quienes refirieron 25 min para la enzima Man1312. Además, Zang *et al.* (2015) en investigaciones similares, notificaron 10 min como el $t_{1/2}$ a 70 °C para el biocatalizador. Según Singh *et al.* (2019) los puentes salinos en la estructura de la enzima desempeñan una función importante en la estabilidad térmica. Su desestabilización en la ManB-1601 disminuyó el $t_{1/2}$ a 70 °C en 4,09 y 22,5 veces, sin embargo, no se alteró su estabilidad funcional.

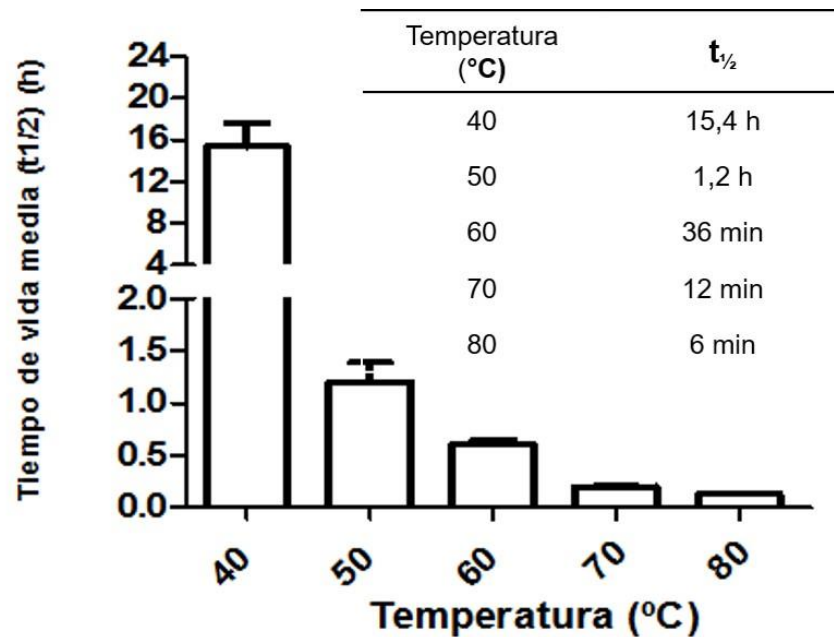


Figura 14. Tiempo de vida media ($t_{1/2}$) del proceso de inactivación térmica de las enzimas β -mananasas en el extracto enzimático a las temperaturas entre 40-80 °C. El $t_{1/2}$ permite evaluar las condiciones en las que se aplicará el extracto enzimático de forma tal que garantice el funcionamiento de las enzimas. Los resultados favorecen la aplicación del extracto en condiciones de producción debido a que tienen un $t_{1/2}$ a 40 °C de 15,4 horas. Asimismo, se garantiza la estabilidad de las enzimas en el TGI donde los procesos digestivos ocurren a 39 °C y el tiempo de tránsito de la digesta desde que se consume el alimento hasta que se comienza a excretar es de 2 a 2,5 h, aunque puede extenderse hasta 8 h. Los resultados de la estabilidad de las β -mananasas en el extracto a temperaturas elevadas como 50, 60, 70 y 80 °C permiten valorar su aplicación en procesos industriales relacionados con el procesamiento de alimentos los cuales se realizan a elevadas temperaturas.

La energía de activación (E_a) de las β -mananasas para el proceso de inactivación térmica fue $106,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($R^2=0,9172$). Según Tananchai y Chisti (2009), generalmente, la E_a de las proteínas de este proceso se encuentra entre $100\text{--}400 \text{ kJ mol}^{-1}$. Por su parte, Kumar *et al.* (2016) notificaron $87,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ para la misma enzima aislada de *Bacillus* sp. CFR1601 de, lo que evidencia una menor estabilidad del biocatalizador. Mientras que Díaz-Sanchez (2009) informó valores de $137,25$ y $128,91 \text{ kJ mol}^{-1}$ para las xilanasas y exo-poligalacturonasas, respectivamente, producidas por *Aspergillus awamori*.

La estabilidad al pH y la temperatura de las β -mananasas en el extracto de *B subtilis* E44, incrementan las expectativas para su aplicación en la alimentación animal. La presencia de otras enzimas en el extracto favorecería la digestibilidad nutrientes en las dietas (Dai *et al.*, 2018).

4.2.3 Caracterización enzimática del extracto obtenido de *Bacillus subtilis* E44 liofilizado

La capacidad de un microorganismo para crecer en sustratos lignocelulósicos está directamente relacionada con su posibilidad de producir diferentes enzimas. Estas actúan sinérgicamente en la degradación de la compleja estructura de la pared celular hasta obtener azúcares más simples (Lopes *et al.*, 2018).

La cuantificación de β -mananasas, xilanasas, endocelulasas, amilasas y proteasas en el extracto enzimático liofilizado de *B. subtilis* E44 se muestra en la tabla 21. Se

presentan las actividades enzimáticas y específicas, sin embargo, en la mayoría de las investigaciones publicadas se refieren a las actividades enzimáticas.

Tabla 21. Actividades de endocelulasas, amilasas y proteasas en el extracto de *Bacillus subtilis* E44.

Enzimas	AEz (UI mL ⁻¹)	AEsp (UI mL ⁻¹ mg ⁻¹)
β-Mananasas	272,4 ± 8,24	9,72 ± 3,44
Xilanasas	137,2 ± 9,98	4,89 ± 4,22
Endocelulasas	8,7 ± 0,27	0,31 ± 5,24
Amilasas	283,9 ± 3,75	10,1 ± 1,94
Proteasas	4,7 ± 0,39	0,16 ± 3,48

Los resultados mostraron que después de la liofilización se incrementaron las actividades de las enzimas β-mananasas y xilanasas. Durante este proceso se elimina el agua previamente congelada mediante un vacío que permite la sublimación directa hasta la fase gaseosa (Zhai *et al.*, 2005). Esta técnica no sólo ofrece la posibilidad de concentrar los extractos enzimáticos, sino que también favorece su conservación durante largos períodos de tiempos. Además, debido a la estructura porosa que presentan estos productos tras ser liofilizados, se rehidratan fácilmente (Díaz-Sánchez, 2009).

Las actividades de las enzimas endocelulasas, β-mananasas y xilanasas en el extracto optimizado, están en correspondencia con los resultados obtenidos en el Capítulo 3. Se demostró que el extracto de *B. subtilis* E44 posee baja actividad

celulolítica, razón que motivó que no se incluyeran las endocelulasas en la segunda etapa del proceso de optimización.

López *et al.* (2013) también encontraron una menor actividad celulolítica ($1,2 \text{ UI mL}^{-1}$) en comparación con la xilanolítica ($12,3 \text{ UI mL}^{-1}$) en el crudo de *Aspergillus awamori* IOC-3914. Por su parte, Delabona *et al.* (2012) informaron valores de actividad xilanolítica de $1055,62 \text{ UI g}^{-1}$, mientras que la celulolítica fue de $160,1 \text{ UI g}^{-1}$ en el crudo de *Aspergillus fumigatus*. En otros ensayos donde se determinó solamente la actividad celulolítica en extractos de especies de *Bacillus*, se obtuvieron actividades de la enzima de $0,43 \text{ UI mL}^{-1}$ (Deka *et al.*, 2013) y $2,76 \text{ UI mL}^{-1}$ (Islam *et al.*, 2019).

Según Pengilly *et al.* (2015) la acción sinérgica de las xilanasas y celulasas incrementa la producción de oligosacáridos de glucosa durante la degradación de los sustratos lignocelulósicos. Los autores obtuvieron hasta el 80% de conversión de la celulosa con una actividad celulolítica menor respecto a la xilanolítica ($0,8$ y $7,39 \text{ UI mL}^{-1} \text{ g}^{-1}$, respectivamente).

Las amilasas en el extracto de *B. subtilis* E44 presentaron niveles altos de actividad. Es un complejo enzimático integrado por α -amilasas, β -amilasas y glucoamilasas, que actúan en conjunto en la degradación progresiva del almidón hasta obtener moléculas de dextrinas y glucosa (Windish y Mhatre, 1995). Varios autores coinciden en la efectiva producción de este catalizador por *Bacillus subtilis* a partir de los residuos lignocelulósicos. Además, se sintetizan de forma constitutiva en diferentes géneros microbianos (Maity *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2015).

La aplicación de amilasas en la alimentación animal, ya sea solas o en combinación con otras enzimas, mejora la calidad de los alimentos (Amerah *et al.*, 2016). Según Munir y Maqsood (2013) y Stefanello *et al.* (2016), la adición del biocatalizador con otras enzimas que degradan PNA, incrementa la asimilación de los nutrientes de las dietas compuestas por maíz y soya destinadas a la alimentación de las aves, por lo que su presencia en el extracto aumenta el espectro de los sustrato susceptibles a la hidrólisis enzimática.

La actividad proteolítica en el extracto fue la más baja de todas las enzimas determinadas ($4,7 \text{ UI mL}^{-1}$). La producción de estas enzimas durante las fermentaciones microbianas depende de factores como las fuentes de carbono y nitrógeno, la concentración del inóculo, la temperatura y el tiempo de incubación (Boominadhan *et al.*, 2009). Sin embargo, la presencia de proteasas en el extracto enzimático, aún en bajas proporciones, puede favorecer la degradación de las proteínas atrapadas en las paredes celulares de los vegetales y constituye otra fuente de aminoácidos disponibles para el animal (Aftab *et al.*, 2018).

Singh *et al.* (2017) plantearon que la adición de proteasas (4 UI g^{-1} de pienso) combinadas con amilasas y xilanasas mejoró la asimilación de alimentos fibrosos en pollos de ceba. En otra investigación realizada por Olukosi *et al.* (2015), en la misma categoría animal, demostraron que bajas dosis de esta enzima ($2,5 \text{ UI g}^{-1}$ de dieta) mezcladas con xilanasas y amilasas (5 y 10 UI g^{-1} , respectivamente) incrementan la solubilidad de los PNA.

La producción de extractos multienzimáticos a partir de microorganismos se informó por Farhat-Khemakhem *et al.* (2018), Neelkant *et al.* (2019) y Angural *et al.* (2020).

La presencia de varias enzimas en los extractos microbianos ofrece nuevas posibilidades en el mercado de los biocatalizadores.

En el presente capítulo se demostró la estabilidad al pH y la temperatura de las β -mananasas en el extracto de *Bacillus subtilis* E44 lo que favorece su utilización en la alimentación avícola. En el extracto liofilizado se elevó la actividad de las β -mananasas y xilanasas y se mantienen las endocelulasas. Además, se comprobó la presencia de enzimas amilasas y proteasas. La acción sinérgica de estos biocatalizadores podría lograr una mayor degradación de los componentes de las dietas.

Los resultados evidencian la necesidad de evaluar el efecto del extracto enzimático *in vitro* en raciones que se utilizan en la producción avícola. Para este propósito se seleccionó la dieta que posee el mayor porcentaje fibroso en la avicultura.

CAPÍTULO 5. EVALUACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO EN LA DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE LA DIETA DE DESARROLLO PARA POLLITAS DE REEMPLAZO DE GALLINAS PONEDORAS

Introducción

La efectividad de las enzimas en la alimentación animal depende del sustrato, las dosis aplicadas y la extensión de la hidrólisis (De Souza *et al.*, 2014; Masey-O'Neill *et al.*, 2014b; Kryukov *et al.*, 2019). Su utilización genera resultados variables, por lo que se requiere realizar ensayos que permitan evaluar las posibles respuestas en los procesos digestivos (Walk *et al.*, 2019).

La digestibilidad de los nutrientes se puede determinar a nivel ileal o fecal, con o sin corrección de las pérdidas endógenas, y se determina a través de experimentos *in vivo* e *in vitro* (Wu *et al.*, 2017). Los ensayos *in vitro* son más económicos, permiten evaluar varios tratamientos, predecir la efectividad de la adición de las enzimas a las dietas, determinar las dosis y la respuesta en los animales. Además se pueden estimar con facilidad el recobrado de un nutriente determinado (Cowieson *et al.*, 2017; Jimoh, 2018).

A partir de la información que brindan los ensayos de digestibilidad *in vitro* y sus ventajas para evaluar la aplicación de enzimas en las dietas, el presente capítulo tuvo como objetivo:

- ✓ Evaluar el extracto enzimático en la degradación y digestibilidad *in vitro* de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras.

5.1 Materiales y métodos

5.1.1 Degradación de la fibra del salvado de trigo tratado con el extracto enzimático

La secuencia experimental se muestra en el anexo 1. Se evaluó la capacidad de degradación del extracto enzimático en la modificación de la FDN y la FDA del salvado de trigo porque constituye la materia prima que aporta el contenido fundamental de la fibra en la dieta de desarrollo de pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras. El material se trituró en un molino de martillos tipo Fritsch modelo GmbH (tamaño de partícula de 1 mm) y se pesaron 0,4 g en bolsas de poliéster (ANKOM Corp #57) de 4,5 x 5,5 cm de dimensiones y un tamaño de poro de 30 μm . Se evaluaron tres tratamientos que consistieron en dos dosis del extracto enzimático antes de liofilizar y el control que se le agregó agua destilada. La nomenclatura utilizada para los tratamientos y las dosis fueron: control (SE= sin enzima), extracto sin diluir ($E_{s/d} = 36 \text{ UI mL}^{-1} \text{ g}^{-1}$) y extracto diluido 1:2 ($E_{1/2} = 18 \text{ UI mL}^{-1} \text{ g}^{-1}$). La actividad enzimática referida corresponde a la mananolítica.

Las bolsas se colocaron en bandejas plásticas de 20 x 50 cm según diseño completamente aleatorizado y se mantuvieron a temperatura ambiente ($27 \pm 0.8 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 24 h. Posteriormente se sellaron con calor y se determinó el contenido de FDN y FDA mediante la técnica secuencial descrita por Van Soest *et al.* (1991) y las modificaciones propuestas por ANKOM (1998). El contenido de hemicelulosa se calculó mediante la diferencia entre la FDN y la FDA.

5.1.2 Dosis efectiva y el tiempo de incubación del extracto enzimático en la degradación de nutrientes de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras

Para determinar el tiempo de incubación y la dosis efectiva del extracto enzimático se seleccionaron tres tiempos (2, 4 y 6 h) y cuatro dosis del extracto enzimático. Se evaluaron cinco tratamientos (SE: sin enzima; D₁: 135 UI mL⁻¹ g⁻¹; D₂: 90 UI mL⁻¹ g⁻¹; D₃: 45 UI mL⁻¹ y D₄: 25 UI mL⁻¹ g⁻¹). En todos los casos la actividad enzimática del extracto está referida a la actividad de las enzimas β-mananasas y se cuantificaron los azúcares reductores producidos.

Se pesaron 180 mg del extracto liofilizado y se disolvieron en 1 mL de agua destilada. La disolución se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,2 μm para eliminar las esporas bacterianas. El experimento se realizó en placas Petri de 4 cm de diámetro que contenían 0,1 g de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras. El extracto se aplicó por aspersión y las muestras se incubaron a 40 °C porque fue la temperatura a la que las β-mananasas mostraron el mayor tiempo de vida media (Capítulo 4). La composición de la dieta se muestra en el anexo 5.

La extracción de los productos de hidrólisis se realizó al adicionar agua destilada (1:5 p/v) a las placas y se colocaron en la zaranda orbital a 110 rpm durante 30 min. Las muestras se colectaron por decantación en tubos de 5 mL de capacidad y se centrifugaron a 5 000 rpm durante 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes se conservaron y posteriormente se determinaron los azúcares reductores mediante el método descrito por Miller (1959). La cuantificación de los azúcares reductores para los

monosacáridos se realizó a partir de las curvas patrón de manosa, xilosa y glucosa a 1 mg mL^{-1} .

5.1.3 Degradación de la fibra y digestibilidad *in vitro* de nutrientes de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras tratadas con el extracto enzimático

En el presente acápite se realizaron dos experimentos, el primero consistió en la evaluación del extracto enzimático en la degradación de la FDN, FDA y la HEM de la dieta seleccionada. El ensayo se realizó en bolsas de muselina que contenían 5 g del alimento y el extracto enzimático se aplicó mediante aspersion a la dosis de $25 \text{ UI mL}^{-1} \text{ g}^{-1}$ y se incubó a 40 °C durante 6 h. La FDN y FDA se determinó según se describió en el acápite 5.1.1, la MS según AOAC (2012) y la HEM se calculó mediante la diferencia de la FDN y la FDA. Se incluyó como control la dieta sin tratar. El segundo experimento consistió en la digestibilidad de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras. Se utilizó la técnica *in vitro* descrita por Marrero *et al.* (1998) con inóculo fecal de cerdo. Como donante se utilizaron cerdos mestizos (Yorkshire, Landrace x Duroc), las heces se colectaron en bolsas de poliestireno después de la estimulación anal. Los animales se alimentaron con 1,5 kg de pienso compuesto por maíz-soya y el agua se suministró *ad libitum*.

Se evaluaron tres tratamientos: la dieta sin tratar, la dieta previamente hidrolizada con el extracto enzimático (D_4 : $25 \text{ UI mL}^{-1} \text{ g}^{-1}$, 6 horas a 40 °C) y la dieta mezclada con el extracto enzimático sin incubar. Se realizaron seis repeticiones de cada tratamiento. Posteriormente se determinó en los residuos el contenido de MS, FDN,

la FDA y HEM según se describió en el acápite 5.1.1. Para calcular la digestibilidad se utilizó como blanco el medio de incubación.

5.1.4 Análisis estadístico

Los experimentos de la degradación de la fibra del salvado de trigo y en la dieta de desarrollo de pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras con el extracto enzimático, así como el de digestibilidad *in vitro*, se realizaron de acuerdo al diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones. En el ensayo para determinar la dosis efectiva y el tiempo de incubación del extracto se utilizó el diseño completamente aleatorizado en arreglo factorial (3x5) donde el factor A fueron los tres tiempos de incubación y B las dosis.

Todos los datos se procesaron según el modelo de clasificación simple, con la ayuda del paquete estadístico InfoStat, versión 1.0 (2012) (Di-Rienzo *et al.*, 2012). En los casos necesarios comparar las medias se aplicó la dócima de Duncan (1955).

5.2 Resultados y discusión

5.2.1 Degradación de la fibra del salvado de trigo tratado con el extracto enzimático

En la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras el salvado de trigo aporta la fibra (26,0%). El tratamiento con el extracto enzimático disminuyó el porcentaje de FDN y de HEM respecto al control. No se observaron diferencias entre las dosis del extracto enzimático (tabla 22).

Tabla 22. Fraccionamiento de la fibra del salvado de trigo tratado con el extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44.

Indicadores	Tratamientos			± EE	Signf.
	SE	E _{s/d}	E _{1/2}		
FDN (%)	32,93 ^b	28,94 ^a	28,22 ^a	0,42;	P=0,0410
FDA (%)	6,28	6,15	5,95	0,24;	P=0,6366
HEM (%)	26,82 ^b	23,10 ^a	22,26 ^a	0,69	P=0,0075

^{a, b} Letras diferentes indican diferencias significativas entre columnas ($P < 0,05$)

SE: sin enzima, E_{s/d}: extracto enzimático sin diluir, E_{1/2}: dilución 1:2 del extracto enzimático

Los resultados sugieren que la disminución del porcentaje de FDN y HEM se deben a la acción hidrolítica de las enzimas xilanasas y β -mananasas. Por otra parte, no se modificó la FDA, lo que puede relacionarse con la ausencia de las enzimas que participan en su descomposición, o sus actividades son muy bajas para provocar la hidrólisis de esta fracción.

Se conoce que los xilanos y los mananos son los componentes mayoritarios de la hemicelulosa de la pared celular de las plantas. Según Tahir *et al.* (2008), la hidrólisis de esta fracción, constituye una reacción limitante en la degradación posterior de otros nutrientes que quedan atrapados, mientras que las celulasas son menos efectivas en la hidrólisis de los PNA.

La degradación de la fibra debido al efecto de las enzimas se investigó con diversas fuentes fibrosas. Saenphoom *et al.* (2011), informaron la reducción de la FDN y la hemicelulosa del palmiche por la acción de enzimas comerciales que contenían β -mananasas, celulasas y α -galactosidasas. A diferencia de los resultados en la

presente investigación, los autores notificaron disminución de la FDA y la celulosa debido a la presencia de celulasas en el cóctel enzimático.

Feng *et al.* (2019) informaron también la disminución de la FDN y HEM en el salvado de trigo tratado con xilanasas, amilasas y proteasas obtenidas de *B. cereus*, pero no se modificó la FDA. Por su parte, Yacoubi *et al.* (2018) evidenciaron la disminución en el grado de polimerización de la fibra bruta del salvado de trigo con el tratamiento con xilanasas y glucanasas.

Los resultados en el experimento demuestran la capacidad de las enzimas del extracto para catalizar la hidrólisis de la FDN y hemicelulosa en el salvado de trigo. Sin embargo, el éxito del tratamiento enzimático depende además de la composición química de la dieta, la dosis y la extensión de la hidrólisis (Kryukov *et al.*, 2019; Hosseindoust *et al.*, 2019), por lo que se requiere evaluar su efecto en la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras y determinar las condiciones adecuadas para su aplicación.

5.2.2 Dosis efectiva y el tiempo de incubación del extracto enzimático en la degradación de nutrientes de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras

Los resultados de este experimento se muestran en la tabla 23. Se observan interacciones entre los factores en estudio. Se observó una relación directamente proporcional entre el tiempo de incubación y la concentración de azúcares reductores, mientras que fue inversa para la dosis de enzima ($P < 0,05$).

Tabla 23. Efecto de la dosis y el tiempo de incubación del extracto enzimático en la producción de azúcares reductores en la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras.

Azúcares reductores (mg g ⁻¹)	Tiempo (h)	Dosis del extracto enzimático					± EE	Signif
		SE	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄		
Manosa	2	3,69 ^a	8,22 ^b	11,08 ^c	15,54 ^e	15,61 ^e	0,26	P=0,0001
	4	3,38 ^a	13,92 ^d	19,35 ^g	21,86 ^h	22,15 ^h		
	6	3,72 ^a	17,14 ^f	19,05 ^g	28,00 ⁱ	28,25 ⁱ		
Xilosa	2	4,49 ^a	8,10 ^b	10,96 ^c	14,79 ^e	14,80 ^e	0,28	P=0,0001
	4	4,54 ^a	13,20 ^d	17,46 ^g	19,86 ^h	19,64 ^h		
	6	4,75 ^a	16,47 ^f	19,26 ^h	24,35 ⁱ	24,26 ⁱ		
Glucosa	2	5,05 ^a	11,80 ^b	13,73 ^c	19,03 ^e	18,86 ^e	0,28	P=0,0001
	4	5,57 ^a	16,80 ^d	22,75 ^g	26,67 ^h	27,21 ^h		
	6	5,11 ^a	21,07 ^f	27,55 ^l	33,40 ⁱ	33,58 ^j		

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j Letras diferentes muestran diferencias significativas entre filas y columnas para cada monosacárido ($P < 0,05$)

SE: Sin enzima; D₁ (135 UI mL⁻¹g⁻¹); D₂ (90 UI mL⁻¹g⁻¹); D₃ (45 UI mL⁻¹g⁻¹); D₄ (25 UI mL⁻¹g⁻¹); EE: error estándar

En cuanto a las dosis evaluadas se aprecian diferencias entre D₁, D₂ y D₃ y no entre D₃ y D₄ ($P < 0,05$). Los resultados demuestran que, a menor dosis del extracto, se incrementan los azúcares reductores. Este efecto puede asociarse con la acción inhibitoria que ejercen los productos de hidrólisis de la dieta sobre las enzimas o al efecto competitivo entre las moléculas proteicas y el sustrato a altas dosis, mientras que a menores se favorece la adhesión (Bedford y Partridge, 2010).

Existen evidencias en la literatura internacional que demuestran que la respuesta al incremento de la dosis de enzimas que hidrolizan los PNA no es proporcional (Masey-O'Neill *et al.*, 2014b). Las investigaciones publicadas por Chapla *et al.* (2012) demostraron que la menor de las dosis de xilanasas fue efectiva para la degradación del xilano del maíz, mientras que Braga *et al.* (2014) informaron que durante la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar se requieren dosis más altas de la misma enzima.

Por su parte, Rad-Spice (2017) seleccionó la menor dosis de carbohidrasas para la degradación efectiva de los PNA de la harina de canola en experimentos *in vitro* e *in vivo*. La variabilidad entre los resultados puede asociarse al tipo de sustrato y la afinidad de las enzimas por los mismos (Kryukov *et al.*, 2019). La selección correcta del alimento al cual se le aplicarán estos biocatalizadores influye en el éxito del tratamiento en los animales (Masey-O'Neill *et al.*, 2014b).

De acuerdo con los resultados en el presente experimento se seleccionó 6 h como el tiempo de incubación del extracto con la dieta. Respecto a la dosis, se seleccionó 25 UI mL⁻¹ g⁻¹ como la dosis efectiva del extracto enzimático debido a que conlleva un ahorro de extracto enzimático.

5.2.3 Degradación de la fibra y digestibilidad *in vitro* de nutrientes de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras tratadas con el extracto enzimático

El tratamiento a la dieta con el extracto enzimático disminuyó ($P < 0,05$) el porcentaje de la FDN y de la HEM, mientras que los contenidos de MS y de la FDA no se modificaron (tabla 24). La variación de la fracción fibrosa obtenida puede deberse a

la acción de las β -manannasas y xilanasas sobre las estructuras de los PNA de la dieta y a la vez se modifican sus propiedades físico-químicas según se informó por Habte-Tsion *et al.* (2018).

Las investigaciones realizadas por Díaz *et al.* (2013), informaron la disminución de la FDN y la FDA del maíz y la paja de arroz después del tratamiento con enzimas comerciales xilanasas y endoglucanasas. Sin embargo, los autores notificaron que la reducción del contenido de la fibra, por sí sola, no explica su efecto en los animales por lo que se recomienda el estudio *in vivo* o *in vitro*.

Tabla 24. Fraccionamiento fibroso de la dieta para pollitas de reemplazo tratada con el extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44.

Indicadores (%)	Tratamientos		± EE	Signf.
	Dieta control	Dieta tratada		
MS	88,0	89,02	0,68	P= 0,3530
FDN	20,48 ^a	15,54 ^b	0,35	P= 0,0006
FDA	4,13	4,16	0,08	P= 0,2360
HEM	15,76 ^a	11,37 ^b	0,41	P= 0,0017

^{a, b} Letras distintas indican diferencias significativas entre columnas ($P < 0,05$)

MS: materia seca, FDN: fibra detergente neutra, FDA: fibra detergente ácida, HEM: hemicelulosa, EE: error estándar

No obstante, la transformación enzimática de los sustratos permite una mayor disponibilidad de la fibra para su posterior digestión. Los resultados del ensayo *in vitro* de la digestibilidad así lo confirmaron. La digestibilidad de la MS, la FDN y la HEM (tabla 25) se incrementó después del tratamiento enzimático ($P < 0,05$).

Sin embargo, la DFDA no se modificó con el tratamiento enzimático. Este resultado confirma la ausencia o la baja actividad de las enzimas que catalizan la degradación de esta fracción. De los tratamientos enzimáticos evaluados, la incubación previa de la dieta con el extracto mostró los mejores resultados de la digestibilidad de la MS, la FDN y la HEM.

Tabla 25. Digestibilidad *in vitro* de los nutrientes de la dieta tratada con el extracto de enzimas de *B. subtilis* E44.

Digestibilidad (%)	Tratamientos			± EE	Signf.
	Dieta sin Enzimas	Dieta incubada con enzimas	Dieta mezclada con enzimas		
MS	81,01 ^c	90,71 ^a	85,95 ^b	0,67	P= 0,0001
FDN	76,62 ^c	88,79 ^a	83,25 ^b	0,22	P= 0,0001
FDA	64,16	64,82	66,62	0,44	P= 0,0958
HEM	88,12 ^c	96,37 ^a	93,16 ^b	0,34	P= 0,0003

^{a, b, c} Letras distintas indican diferencias significativas entre columnas ($P < 0,05$)

MS: materia seca, FDN fibra detergente neutra, FDA: fibra detergente ácida, HEM: hemicelulosa, EE: error estándar.

Según Handique *et al.* (2018), la aplicación de enzimas exógenas en soluciones acuosas a los alimentos antes del consumo, tiene un efecto positivo en el rendimiento animal. Esta acción permite la hidrólisis pre ingestiva de la fibra vegetal lo que favorece la formación de un complejo estable entre los alimentos y las enzimas que protege a estas proteínas de la proteólisis (Rode *et al.*, 1999).

Jimoh y Atteh (2015) informaron incrementos de la digestibilidad de la fibra detergente neutra del salvado de trigo tratado con cócteles enzimáticos. Por su parte, Jimoh (2018) evaluó combinaciones de enzimas en la degradación de la FDN y la FDA del palmiche y observó incrementos significativos en su digestibilidad

mientras que, Park *et al.* (2016) y Recharla *et al.* (2019) demostraron que el tratamiento del maíz, el salvado y la soya con carbohidrasas incrementó la digestibilidad de la MS.

Entre los componentes fundamentales de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedora se destacan el salvado de trigo, maíz y soya según se muestra en el anexo 5. Las enzimas presentes en el extracto podrían actuar sobre estas materias primas y descomponer algunas de sus estructuras.

La soya se encuentra al 14% y contiene β -mananos que se consideran factores antinutricionales para los monogástricos (Blibech *et al.*, 2019). Según Ferreira *et al.* (2016) el tratamiento con β -mananasas mejora la digestibilidad de los nutrientes y aporta beneficios al crecimiento y la salud animal.

Por su parte, Ryu *et al.* (2017) demostraron que las β -mananasas mejoraron el valor nutritivo de las dietas compuestas por maíz y soya. Además, los biocatalizadores favorecieron la producción de oligosacáridos de manano a partir de sustratos naturales, los que poseen efecto prebiótico en los animales (Harnpicharnchai *et al.*, 2016).

El salvado de trigo se encuentra al 26 % en la dieta y se conoce que contiene arabinoxilanos, los que se hidrolizan por la acción de las xilanasas. Se favorece la liberación del almidón, proteínas atrapadas en las paredes celulares del cereal y se reduce así la viscosidad de la digesta (Masey-O'Neill *et al.*, 2014a; Aftab *et al.*, 2018). Según Cowieson (2010), en las aves alimentadas con maíz y soya, no se aprovechan entre 400 y 450 kcal de energía por kg de dieta, por lo que la aplicación

de xilanasas en estas raciones incrementa la eficiencia de la utilización energética de los alimentos (Govil *et al.*, 2017; Habte-Tsion *et al.*, 2018).

El maíz, por su parte, aporta el 56% en la dieta evaluada. Los arabinoxilanos de este cereal son más complejos estructuralmente que los del trigo y poseen mayor grado de sustituciones (Ravindran, 2013). Según notificó Rios *et al.* (2017) su contenido de PNA varía de acuerdo al lugar de cosecha y la variedad. El tratamiento enzimático, en este caso, podría constituir una alternativa cuando se utilice esta materia de menor calidad.

La aplicación de xilanasas a las dietas compuestas por maíz incrementa la absorción de nutrientes según afirmó Regassa *et al.* (2017). Por su parte, las investigaciones realizadas por Lee *et al.* (2017) y Vangsøea *et al.* (2021) revelaron que estas enzimas no actúan directamente sobre la pared celular del maíz, sino que su acción se relaciona con mecanismos indirectos que incrementan la capacidad de absorción de los nutrientes en las aves.

Los resultados del presente capítulo demuestran la capacidad degradativa del extracto enzimático al disminuir la FDN y la HEM del salvado de trigo y la dieta. Además, su aplicación incrementó la digestibilidad *in vitro* de la FDN, HEM y la MS de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras.

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN GENERAL

La búsqueda de alternativas para minimizar el efecto de los polisacáridos no amiláceos presentes en las dietas destinadas a la alimentación avícola constituye un reto para los investigadores y productores del sector. La adición de enzimas que degradan estas moléculas constituye una práctica frecuente utilizada a nivel mundial.

La presente investigación cumplió con el objetivo propuesto de obtener un extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44 a escala de laboratorio, que mejore la digestibilidad *in vitro* de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de ponedoras ya que se logró demostrar la expresión de las enzimas xilanasas, β -mananasas y endocelulasas por *Bacillus subtilis* E44 en medios selectivos y durante la FES del bagazo de caña a escala de laboratorio. Una vez optimizado los procesos de síntesis y extracción se maximizó la actividad enzimática en el crudo. El empleo de la dosis mínima en la dieta, establecida, mejoró de forma significativa el porcentaje de digestibilidad *in vitro* de la MS, FDN y la HEM.

Las xilanasas fueron las enzimas de mayor actividad seguidas por las β -mananasas y las endocelulasas. Los IP obtenidos en medios selectivos (4,22; 3,67 y 3,23, respectivamente), demuestran que la bacteria es buena productora de estas enzimas según la escala de evaluación propuesta por Jani *et al.* (2012).

Por su parte, Ravindran *et al.* (2018) planteó que los residuos agroindustriales favorecen la síntesis de estos catalizadores en la FES. Al evaluar la FES de varios residuos para la obtención del extracto a escala de laboratorio, se seleccionó el bagazo de caña de azúcar como fuente de carbono más promisorio no solo por los valores de actividad enzimática obtenidos sino por su disponibilidad en la provincia. Los resultados de la etapa de tamizado de los factores en la FES mostraron una baja actividad celulolítica de la cepa, lo que motivó su exclusión como variable de respuesta. La optimización de los procesos de la FES de *B. subtilis* para la síntesis de las xilanasas y β -mananasas, así como su extracción del residuo fermentado permitió maximizar las actividades de los biocatalizadores en el extracto y establecer las condiciones óptimas del proceso.

A partir de estos resultados se estableció que: el medio mínimo (MM), además de las sales, requiere 0,84 % de urea como fuente de nitrógeno y el pH final de la disolución es de 7,49. La bacteria se inocula al 20 %, se completa la humedad de la FES con el MM hasta el 80 % y el proceso se incuba a la temperatura de 32,8 °C durante 24 h. La extracción de las enzimas se realiza con 12,27 mL de agua destilada por gramo de bagazo fermentado y se coloca en la zaranda orbital durante 60 min.

Según Raza (2018) la optimización de varias enzimas microbianas en un extracto incrementa las potencialidades del mismo en la degradación de sustratos fibrosos y aumenta el valor agregado de estos productos. El proceso mostró actividades de 34,25 UI mL⁻¹ para β -mananasas y 28,56 UI mL⁻¹ para xilanasas (13,59 y 3,06 veces las actividades enzimáticas iniciales, respectivamente). Después de liofilizar, para

su conservación, las actividades fueron de 272,4 y 137,2 UI mL⁻¹, respectivamente. Al estudiar la estabilidad de las β -mananasas (enzimas que presentaron la actividad más alta en el extracto) se demostró que el biocatalizador mantiene su actividad al pH (3 – 7,5) y a 40 °C ($t_{1/2}$ = 15,4 h).

El extracto enzimático presenta además actividades amilolíticas y proteolíticas, (283,9; 4,7 UI mL⁻¹, respectivamente) y mantuvo la actividad endocelulolíticas notificadas al inicio de la investigación (8,7 UI mL⁻¹). La aplicación de productos con múltiples enzimas en la alimentación animal favorece la degradación de los sustratos indigestibles de las dietas y se incrementan los indicadores de la salud intestinal (Govil *et al.*, 2017; Yacoubi *et al.*, 2018).

Para comprobar la actividad degradativa del extracto en los componentes de la fibra, se seleccionó la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras porque es la de mayor contenido de fibra en la producción avícola. Con la menor dosis del extracto (25 UI mL⁻¹ g¹) y el tiempo de incubación de 6 h a 40 °C se incrementaron los azúcares reductores en la dieta.

La transformación de sustratos con enzimas permite una mayor disponibilidad de la fibra para su posterior digestión (Handique *et al.*, 2018) lo cual se demostró en los resultados de la digestibilidad *in vitro* de la FDN, la HEM y la MS de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras. La degradación de los PNA en las dietas mediante el tratamiento enzimático, incrementa la producción de los oligosacáridos disponibles para las fermentaciones microbianas en los ciegos (Cadogan y Choct, 2015). Además contribuye al aporte energético y generalmente promueve el crecimiento de bacterias benéficas (Ravn *et al.*, 2018b)

Hasta la fecha, en Cuba no se desarrollan productos enzimáticos para mejorar la calidad de las dietas que se aplican en la alimentación avícola. Desde el punto de vista práctico, los resultados de la presente investigación brindan la metodología de la obtención del extracto enzimático (figura 11).

El extracto enzimático de *Bacillus subtilis* E44 se obtiene fundamentalmente a partir del bagazo de caña de azúcar, residuo de la industria azucarera de fácil accesibilidad en la provincia de Matanzas. El precio de comercialización de la tonelada es de 363,00 pesos cubanos por consiguiente la obtención del extracto tendrá ventajas económicas.

La fermentación en estado sólido a nivel industrial es un proceso complejo que implica una etapa de escalado por lo que se dificulta realizar la valoración económica anticipada. No obstante, a partir del precio de las materias primas, el costo estimado para obtener 10 L del producto, a escala de laboratorio, es del extracto es de 0,07 USD y con esa cantidad se tratan, aproximadamente, 7 kg de la dieta. Los precios de comercialización de los aditivos enzimáticos en el mercado internacional oscilan entre \$ 20,00 (1 kg) de SUNSON (hasta 297,00 (50 g) de Pentopan mono BG® (Ravindran *et al.*, 2018)

CONCLUSIONES

1. *Bacillus subtilis* E44 tiene mayores potencialidades para la síntesis de las enzimas xilanasas y β -mananasas durante la FES con la utilización del bagazo de caña de azúcar como fuente de carbono.
2. El proceso de optimización de la FES a escala de laboratorio incrementó las actividades de las enzimas xilanasas y β -mananasas en el extracto.
3. Las β -mananasas son estables a la temperatura y variaciones del pH. Se detectaron además en el extracto enzimático, actividades endocelulolíticas, amilolíticas y proteolíticas.
4. El extracto de *B. subtilis* E44 mejoró la digestibilidad *in vitro* de la dieta de desarrollo para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar el efecto del extracto enzimático de *B. subtilis* E44 en la digestibilidad de otras fuentes fibrosas utilizadas en la alimentación avícola.
2. Determinar la estabilidad al pH y la temperatura de las enzimas del extracto.
3. Incorporar los resultados de la investigación en la formación académica de estudiantes de pregrado y postgrado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdella, A., Segato, F., Wilkins, M.R., 2020. Optimization of process parameters and fermentation strategy for xylanase production in a stirred tank reactor using a mutant *Aspergillus nidulans* strain. *Biotechnol. Rep.* 26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00457>
- Abo-State, M.A.M., Ghaly, M.F., Abdellah, E.M., 2013. Optimization of Cellulase (s) and Xylanase Production by Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus* Isolates. *Am. J. Agri. Environ. Sci* 13, 553-564. <https://doi.org/10.5829/idosi.aejaes.2013.13.04.15513>
- Adebayo-Tayo, B., Elelu, T., AKinola, G., O, I., 2013. Screening and production of mannanase by *Bacillus* strains isolated from fermented food condiments. *Innov. Rom. Food Biotechnol.* 13, 53-62. <https://doi.org/https://www.gup.ugal.ro/ugaljournals/index.php/IFRB/article/view/3485>
- 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>
- Ahirwar, S., Soni, H., Rawat, H.K., Prajapati, B.P., 2016. Experimental design of response surface methodology used for utilisation of palm kernel cake as solid substrate for optimised production of fungal mannanase. *Mycology* 7, 143-153. <https://doi.org/10.1080/21501203.2016.1229697>

- Aita, B.C., Spannemberg, S.S., Schmaltz, S., Zobot, G.L., Tres, M. V, Kuhn, R.C., Mazutti, M.A., 2019. Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates. *J. Environ. Chem. Eng.* 7, 103193. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103193>
- Akaracharanya, A., Taprig, T., Sitdhipol, J., Tanasupawat, S., 2014. Characterization of cellulase producing *Bacillus* and *Paenibacillus* strains from Thai soils. *J. Appl. Pharm. Sci.* 4, 64-72. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2014.40502>
- Akcan, N., Uyar, F., 2011. Production of extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* RSKK96 with solid state fermentation. *EurAsian J. Biosci.* 5, 64-72. <https://doi.org/10.5053/ejobios.2011.5.0.8>
- Alabi, O.O., Atteh, J.O., Adejumo, I.O., 2015. Comparative Evaluation of in Vitro and in Vivo Nutrient Digestibility of Dietary Levels of Rice Husk Supplemented With or Without Commercial Enzyme. *Int. J. Res. Agric. frestry* 2, 15-19. <https://doi.org/http://www.ijraf.org/pdf/v2-i6/3.pdf>
- Alagawany, M., Attia, A.I., Ibrahim, Z.A., Mahmoud, R.A., El-sayed, S.A., 2017. The effectiveness of dietary sunflower meal and exogenous enzyme on growth , digestive enzymes , carcass traits , and blood chemistry of broilers. *Environment Sci. Pollut.* 24, 12319-12327. <https://doi.org/https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11356-017-8934-4>
- Alagawany, M., Elnesr, S.S., Farag, M.R., 2018. The role of exogenous enzymes in promoting growth and improving nutrient digestibility in poultry. *Iran. J. Vet. Res.*

- 19, 157-164.
<https://doi.org/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6184034/>
- Alberto, M., 2020. Obtención y caracterización de enzimas fúngicas tipo lacasa y su empleo en la degradación de sustratos fibrosos para la alimentación animal. Tesis presentada en opción del Grado de Doctor en Ciencias. Universidad Agraria de la Habana.
- Almirall, M., Esteve-García, E., 1994. Rate of passage of barley diets with chromium oxide: Influence of age and poultry strain and effect of 6- glucanase supplementation. *Poult. Sci.* 73, 1433-1440.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3382/ps.0731433>
- Alokika, Singh, B., 2020. Enhanced production of bacterial xylanase and its utility in saccharification of sugarcane bagasse. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 43, 1081-1091. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00449-020-02306-8>
- Alshelmani, M.I., Loh, T.C., Foo, H.L., Lau, W.H., Sazili, A.Q., 2013. Characterization of Cellulolytic Bacterial Cultures Grown in Different Substrates. *Sci. World J.* 2013, 1-7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2013/689235>
- Alvarez, C., Pérez, H., Quintosa, J., De la Cruz, T., Pompa, A., Torres, E., 2014. *Fisiología animal básica*, Primera. ed. La Habana.
- Amerah, A.M., 2015. Interactions between wheat characteristics and feed enzyme supplementation in broiler diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 199, 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.09.012>
- 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 of broilers fed corn / soy diets. *Poult. Sci.* 96, 1-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.3382/ps/pew297>
- Angural, S., Kumar, A., Kumar, D., Warmoota, R., Sondhi, S., Gupta, N., 2020. Lignolytic and hemicellulolytic enzyme cocktail production from *Bacillus tequilensis* LXM 55 and its application in pulp biobleaching. *Bioprocess Biosyst. Eng.* <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02407-4>
- ANKOM, 1998. Procedures for fibre and in vitro analysis. <https://doi.org/http://www.ankom.com>.
- Annamalai, N., Rajeswari, MV., Elayaraja, S., Balasubramanian, T., 2013. Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes. *Carbohy Poly* 94, 409-415. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.066>
- AOAC, 2012. *Methods of Analysis*, 18th ed, Official methods of analysis of AOAC International. Gaithersburg, MD, USA. Gaithersburg, USA. <https://doi.org/DOI:10.5740/jaoacint.12-129>
- Asmare, B., 2014. Effect of common feed enzymes on nutrient utilization of monogastric animals. *Int. J. Biotechnol. Mol. Biol. Res.* 5, 27-34. <https://doi.org/10.5897/IJBMBR2014.0191>
- Ayala, L., Bocourt, R., Milián, G., Castro, M., Herrera, M., Guzmán, J., 2012. Assessment of a probiotic based on *Bacillus subtilis* and its endospores in the obtainment of healthy lungs of pigs. *Cuba. J. Agric. Sci.* 46, 391-394.

<https://doi.org/http://www.cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/152>

Bagewadi, Z., Mulla, S., Ninnekar, H., 2018. Optimization of endoglucanase production from *Trichoderma harzianum* strain HZN11 by central composite design under response surface methodology. *Biomass Convers. Biorefinery* 8, 305-316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13399-017-0285-3>

Barnes, E.M., 1979. The intestinal microflora of poultry and game birds during life and after storage. *J. Appl. Bacteriol.* 46, 407-419. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1979.tb00838.x>

Barrios-González, J., 2012. Solid-state fermentation : Physiology of solid medium , its molecular basis and applications. *Process Biochem.* 47, 175-185. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.11.016>

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. *Bioresour. Technol.* 180, 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.060>

BCC Research, 2020. , Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. Wellesley, Wellesley, MA, USA. <https://doi.org/https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html>

Bedford, M., Partridge, G., 2011. Thermostability of feed enzymes and their practical application in the feed mill, en: Bedford, M., Partridge, G. (Eds.), *Enzymes in farm animal Nutrition*. CABI, Wallingford, UK/Cambridge, USA

- (2010)., pp. 282-284. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.090>
- Bedford, M.R., 1995. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes 53, 145-155. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)02018-U](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)02018-U)
- Bedford, M.R., Apajalahti, J., 2001. Microbial interactions in the response to exogenous enzyme utilization, en: 2001, C. (Ed.), Enzymes in Farm Animal Nutrition. Oxon, UK, p. 406.
- Bedford, M.R., Cowieson, A.J., 2012. Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. Anim. Feed Sci. Technol. 173, 76-85. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.018>
- Bedford, M.R., Partridge, G.G.G.G., 2010. Enzymes in Farm Animal Nutrition, CAB Intern. ed, CAB International. MPG Books Group, Bodmin, Reino Unido.
- Bedford, M.R.M.. M.R., Vista, A.B., M.R., B., Bedford, M.R.M.. M.R., 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>
- Bedford, M.R.R., House, M., Marlborough, H.S., 1996. Interaction between ingested feed and the digestive system in poultry. J. Appl. Poult. Res. 5, 86-95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/japr/5.1.86>
- Behera, B.C., Sethi, B.K., Mishra, R.R., Dutta, S.K., Thatoi, H.N., 2017. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment : A review. J. Genet. Eng. Biotechnol. 15, 197-210.

<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.001>

Behera, S.S., Ray, R.C., 2016. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. *Int. J. Biol. Macromol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.090>

Bharathiraja, S.; Suriya, J.; Krishnan, M.; Manivasagan, P.; Kim, S.-K., 2017. Production of Enzymes From Agricultural Wastes and Their Potential Industrial Applications. *Adv. Food Nutr. Res.* 80, 125-148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.11.003>

Bhatia, R., Gallagher, J.A., Gomez, L.D., Bosch, M., 2017. Genetic engineering of grass cell wall polysaccharides for biorefining. *Plant Biotechnol. J.* 15, 1071-1092. <https://doi.org/10.1111/pbi.12764>

Blair, R., 2018. Nutrition and feeding of organic poultry, First. ed. CABI, Boston, MA. <https://doi.org/https://books.google.com/cu/books?id=LchwDwAAQBAJ&dq=Blair,+R.,+2018.+Nutrition+and+Feeding+of+Organic+Pou><https://doi.org/10.3382/japr.2013-00841>

Blibech, M., Mouelhi, S., Farhat-Khemakhem, A., Boukhris, I., Ayeb, A. El, Chouayekh, H., 2019. Selection of *Bacillus subtilis* US191 as a mannanase-producing probiotic candidate. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 66, 858-869. <https://doi.org/10.1002/bab.1798>

Blibech, M., Mouna, A.F., Boukhris, I., Alghamdi, O.A., Chouayekh, H., Aslouj, R., 2020. Optimization of β -mannanase production by *Bacillus subtilis* US191 using economical agricultural substrates. *Biotechnol. Prog.* 1-9.

<https://doi.org/10.1002/btpr.2989>

Bobeck, E.A., Nachtrieb, N.A., Batal, A.B., Persia, M.E., 2014. Effects of xylanase supplementation of corn-soybean meal-dried distiller ' s grain diets on performance , metabolizable energy , and body composition when fed to first-cycle laying hens. *Appl.Poult. Res.* 23, 174-180.

<https://doi.org/https://doi.org/10.3382/japr.2013-00841>

Boominadhan, U., Rajakumar, R., Karpaga, P., Sivakumaar, V., Joe, M.M., 2009. Optimization of Protease Enzyme Production Using Bacillus sp. Isolated from Different Wastes. *Bot. Resaerch Int.* 2, 83-87.

[https://doi.org/https://www.researchgate.net/profile/Melvin-](https://doi.org/https://www.researchgate.net/profile/Melvin-Joe/publication/285001052_Optimization_of_Protease_Enzyme_Production_Using_Bacillus_Sp_Isolated_from_Different_Wastes/links/54704a700cf216f8cfa9ecff/Optimization-of-Protease-Enzyme-Production-Using-Bacillus-Sp-Isolated-from-Different-Wastes.pdf)

[Joe/publication/285001052_Optimization_of_Protease_Enzyme_Production_Using_Bacillus_Sp_Isolated_from_Different_Wastes/links/54704a700cf216f8cfa9ecff/Optimization-of-Protease-Enzyme-Production-Using-Bacillus-Sp-Isolated-from-Different-Wastes.pdf](https://doi.org/https://www.researchgate.net/profile/Melvin-Joe/publication/285001052_Optimization_of_Protease_Enzyme_Production_Using_Bacillus_Sp_Isolated_from_Different_Wastes/links/54704a700cf216f8cfa9ecff/Optimization-of-Protease-Enzyme-Production-Using-Bacillus-Sp-Isolated-from-Different-Wastes.pdf)

Brenes, A., 1992. Influencia de la adición de enzimas sobre el valor nutritivo de las raciones en la alimentación aviar. *Sel. avícolas* 787-788.

https://doi.org/https://ddd.uab.cat/pub/selavi/selavi_a1992m12v34n12/selavi_a1992m12v34n12p787.pdf

Brock, T.D., Madigan, M.T., 2008. *Biology of Microorganisms*. Editorial Félix Varela, La Habana.

Cadogan, D.. D.J., Choct, M., 2015. Pattern of non-starch polysaccharide digestion along the gut of the pig: contribution to available energy. *Anim Nutr* 1, 160-165.

<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.08.011>

Caldas, J. V, Vignale, K., Boonsinchai, N., Wang, J., Putsakum, M., England, J.A., Coon, C.N., 2018. The effect of β -mannanase on nutrient utilization and blood parameters in chicks fed diets containing soybean meal and guar gum. *Poult. Sci.* 0, 1-11. <https://doi.org/10.3382/ps/pey099/4995450>

Camacho, R.M., 2009. Producción y caracterización de esterasas/lipasas a partir de arqueas halófilas, con aplicaciones potenciales en biocatálisis. Tesis presentada en opción del título de Doctor en Ciencias. Universidad de Guadalajara, México.

Campbell, G.L., Classen, H.L., Goldsmith, K.A., 1983. Effect of fat retention on the rachitogenic effect of rye fed to broiler chicks. *Poult. Sci.* 62, 2218-2223. <https://doi.org/https://doi.org/10.3382/ps.0622218>

Candioti, L., De Zan, M., Camara, M., Goicoechea, H., 2014. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* 124, 123-138. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.034>

Carro, M.D., Ranilla, M.J. & Tejido, M.L., 2006. Utilización de aditivos en la alimentación del ganado ovino y caprino. *Pequeños Rumiantes* 7, 26-37. <https://doi.org/https://seoc.eu/wp-content/uploads/2016>

Cássia, J. De, Roana, C., Oliveira, C. De, 2019. Enzyme complex at different levels in diets with enriched ingredients for commercial laying hens. *Brazilian J. Anim. Sci.* 48, e20180109.

- Cayetano-Cruz, M., Itzel, A., Santos, P.D.L., García-huante, Y., Santiagohernández, A., Pavón-orozco, P., Eric, V., Hidalgo-lara, M.E., 2016. High level expression of a recombinant xylanase by *Pichia pastoris* cultured in a bioreactor with methanol as the sole carbon source: Purification and biochemical characterization of the enzyme. *Biochem. Eng. J.* 112, 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.04.014>
- Cerda, A., Artola, A., Barrena, R., Font, X., Gea, T., Sánchez, A., 2019. Innovative production of bioproducts from organic waste through solid-state fermentation. *Front. Sustain. Food Syst.* 3, 63. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00063>
- 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>
- Chantorn, S., Aekkawatchai, N., Chunya, P., Oontawee, S., Khumphai, P., Charoenrat, T., 2021. Lignocellulolytic bacteria isolated from organic rice field soils for enzyme production using agricultural wastes: Screening, medium optimization, and co-culture Author links open overlay panel. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101988>
- Chapla, D., Pandit, P., Shah, A., 2012. Bioresource Technology Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. *Bioresour. Technol.* 115, 215-221. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.083>
- Chauhan, P.S., Bharadwaj, A., Puri, N., Gupta, N., 2014a. Optimization of medium

- composition for alkali-thermostable mannanase production by *Bacillus nealsonii* PN-11 in submerged fermentation. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3, 1033-1045. <https://doi.org/https://www.ijcmas.com/vol-3-10/Prakram%20Singh%20Chauhan,%20et%20al.pdf>
- 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>
- Chauhan, P.S., Sony, S.K., Sharma, P., Saiini, A., Gupta, N., 2014b. A mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11: Statistical optimization of production and application in biobleaching of pulp in combination with xylanase. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 5, 237-251. [https://doi.org/https://www.researchgate.net/publication/259678837 A](https://doi.org/https://www.researchgate.net/publication/259678837_A)
- Chen, W.L., Liang, J.B., Jahromi, M.F., Ho, Y.W., Abdullah, N., 2013. Optimization of multi-enzyme production by fungi isolated from palm kernel expeller using response surface methodology. *BioResources* 8, 3844-3857. <https://doi.org/http://ncsu.edu/bioresources> ISSN: 1930-2126
- Cheng, L., Duan, S., Feng, X., Zheng, K., Yang, Q., Liu, Z., 2016. Purification and Characterization of a Thermostable Mannanase from *Bacillus subtilis* BE-91: Potential Application in Inflammatory Diseases. *BioMed. Res. Int.* 17, 1-7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2016/6380147>
- Chitchaowana, N., Klaweck, W., Sutthimusik, S., Lertworapreecha, M., 2016.

- Characterization and optimization of xylanase producing strain of *Bacillus subtilis* isolated from the cabbage looper (*Trichoplusia ni* (Hübner)) intestine. *Malays. J. Microbiol.* <https://doi.org/10.21161/mjm.78215>
- Choct, M., Annison, G., 1992. Anti-nutritive effect of wheat pentosans in broiler chickens: Roles of viscosity and gut microflora. *Br. Poult. Sci.* 33, 821-834. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/00071669208417524>
- Choct, M., Hughes, R.J.J., Wang, J., Bedford, M.R.R., Morgan, A.J.J., Annison, G., 1996. Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. *Br. Poult. Sci.* 37, 609-621. <https://doi.org/10.1080/00071669608417891>
- Chotinsky, D., 2015. The use of enzymes to improve utilization of nutrient in poultry diets. *Bulg. J. Agric. Sci.* 21, 429-435. <https://doi.org/http://www.agrojournal.org/21/02-36.pdf>
- Christianah, A.B., Ajoke, O.D., 2020. Production , Optimization , Purification and Characterization of Mannanase Produced by *Bacillus Subtilis*. *J. Adv. Microbiol.* 20, 52-67. <https://doi.org/10.9734/JAMB/2020/v20i630254>
- Clench, M.H., 1999. The Avian Cecum: Update and Motility Review. *J. Exp. Zool.* 283, 441-447. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19990301/01\)283:4/5<441::AID-JEZ13>3.0.CO;2-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19990301/01)283:4/5<441::AID-JEZ13>3.0.CO;2-8)
- Cortés, C.A., Águila, S.R., Ávila, G.E., 2002. La utilización de enzimas como aditivos en dietas para pollos de engorda. *Vet. México* 33, 1-9. <https://doi.org/https://www.redalyc.org/pdf/423/42333101.pdf>

- Cowieson, A.J., 2010. Strategic selection of exogenous enzymes for corn-soya based poultry diets. *J. Poult. Sci.* 47, 1-17. <https://doi.org/https://doi.org/10.2141/jpsa.009045>
- Cowieson, A.J., Ruckebusch, J.P., Sorbara, J.O.B., W.Wilson, Guggenbuhl, P., Roos., F.F., 2017. A systematic review on the effect of phytase on ileal amino acid digestibility in broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 225, 182-194.
- Cozannet, P., Kidd, M.T., Neto, R.M., Geraert, P.A., 2017. Next-generation non-starch polysaccharide-degrading, multi-carbohydrase complex rich in xylanase and arabinofuranosidase to enhance broiler feed digestibility. *Poult. Sci.* 96, 2743-2750. <https://doi.org/10.3382/ps/pex084>
- 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>
- Cruz-Ramos, H., Glaser, P., Wray, L. V, Fisher, S.H., 1997. The Bacillus subtilis ureABC Operon. *J. Bacteriol.* 179, 3371-3373. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/jb.179.10.3371-3373.1997>
- Dai, B., Hou, Yanbin, Hou, Yong, Qian, L., 2018. Effects of multienzyme complex and probiotic supplementation on the growth performance , digestive enzyme activity and gut microorganisms composition of snakehead (*Channa argus*). *Aquac. Nutr.* 25, 15-25. <https://doi.org/10.1111/anu.12825>

- Dan, Z., Gang, S., Hongzhi, L., Xue, L., 2012. Optimization of mannanase production by *Bacillus* sp . HDYM-05 through factorial method and response surface methodology. *African J. Microbiol. Res.* 6, 176-182. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.1219>
- Das, A., Paul, T., Halder, S.K., Jana, A., Maity, C., Mohapatra, P.K. Das, Pati, B.R., Mondal, K.C., Das Mohapatra, P.K., Pati, B.R., Mondal, K.C., Mohapatra, P.K. Das, Pati, B.R., Mondal, K.C., Das Mohapatra, P.K., Pati, B.R., Mondal, K.C., 2013. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus fumigatus* ABK9 in wheat bran-rice straw mixed substrate and use of cocktail enzymes for deinking of waste office paper pulp. *Bioresour. Technol.* 128, 290-296. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.080>
- David, A., Singh, P., Kumar, A., Angural, S., Kumar, D., Puri, N., Gupta, N., 2018. Coproduction of protease and mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11 in solid state fermentation and their combined application as detergent additives. *Int. J. Biol. Macromol.* 108, 1176-1184. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.037>
- De Souza, G., Arruda, E., Lanna, T., Pedreira, M.M., 2014. Enzymes in animal diets: benefits and advances of the last 25 years. *ZOOTECNIA* 1, 25-35. https://doi.org/https://www.researchgate.net/profile/Guilherme-Moura/publication/269101427_Enzymes_in_animal_diets_benefits_and_advances_of_the_last_25_years/links/56fbcb7808ae1b40b8063bf8
- Dean, A., Voss, D., Draguljic, D., 2017. *Design and Analysis of Experiments*, 2th (ed). ed. Springer.

- Deka, D., Das, S.P., Sahoo, N., Das, D., Jawed, M., Goyal, D., Goyal, A., 2013. Enhanced Cellulase Production from *Bacillus subtilis* by Optimizing Physical Parameters for Bioethanol Production. *ISRN Biotechnol.* 2013. <https://doi.org/https://doi.org/10.5402/2013/965310>
- Delabona, P., Rosangela, D., Pirota, B., Codima, C., Tremacoldi, C., Rodrigues, A., Farinas, C., 2012. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass and Bioenergy* 37, 243-250. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.12.006>
- Derringer, G., Suich, R., 1980. Simultaneous optimization of several response variables. *J Qual Technol* 12, 214-219. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>
- Desai, A.S., Beibeia, T., Brennan, M.A., Guo, X., Zeng, X., Brennan, C.S., 2018. Vitro Digestibility of Bread Fortified with *Oncorhynchus tshawytscha* Powder 1-17. <https://doi.org/10.3390/nu10121923>
- Dhawan, S., Kaur, J., 2007. Microbial Mannanases: An Overview of Production and Applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 27, 197-216. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/07388550701775919>
- Dhillon, G.S., Oberoi, H.S., Kaur, S., Bansal, S., Brar, S.K., 2011. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Ind. Crops Prod.* 34, 1160-1167. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.001>
- Di-Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M., Robledo,

- C.W., 2012. InfoStat. version 2012, [Windows]. Univ. Nac. Córdoba, Argentina Grup. InfoStat.
- Díaz-Sanchez, A.B., 2009. Reciclado del orujo de uva como medio sólido de fermentación para la producción de enzimas hidrolíticas de interés industrial. Tesis presentada para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias. Universidad de Cádiz, España.
- 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.D., Caro, I., Ory, I., Blandino, A., 2007. Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolitic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 302-306. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.02.006>
- Dudley-Cash, B., 2014. La respuesta de las aves a las enzimas NSP varían. *Sel. avícolas.* Enero, 16-18. <https://doi.org/http://seleccionesavicolas.com/pdf-files/2014/1/016-018-Alimentacion-Respuesta-aves-enzimas-NSP-Dudley-Cash-SA201401.pdf>
- Duncan, D.B., 1995. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11, 11. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/3001478>
- Duran, R., 1992. Utilización de enzimas en la alimentación del lechón. *Mundo Ganad.* 4, 38-44.

https://doi.org/https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_MG/MG_1992_4_92_38_44.pdf

- El-Hack, M.E.A., Alagawany, M., Laudadio, V., Demauro, R., Tufarelli, V., 2017. Dietary inclusion of raw faba bean instead of soybean meal and enzyme supplementation in laying hens : Effect on performance and egg quality. Saudi J. Biol. Sci. 24, 276-285. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.05.009>
- El-Sharouny, E.E., El-toukhy, N.M.K., El-sersy, N.A., El-gayar, A.A.E., 2015. Optimization and purification of mannanase produced by an alkaliphilic-thermotolerant *Bacillus cereus* N1 isolated from Bani Salama Lake in Wadi El-Natron. Biotechnol. Equip. 29, 315-323. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.995932>
- El-Shishtawy, R.M., Mohamed, S. a, Asiri, A.M., Gomaa, A.M., Ibrahim, I.H., Al-Talhi, H. a, 2014. Solid fermentation of wheat bran for hydrolytic enzymes production and saccharification content by a local isolate *Bacillus megatherium*. BMC Biotechnol. 14, 29. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-29>
- Englyst, H., 1989. Classification and measurement of plant polysaccharides. Anim. Feed Sci. Technol 23, 27-42. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0377-8401\(89\)90087-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0377-8401(89)90087-4)
- Fadel, M., Keera, A.A., Abdel-Aziz, S.M., Kahil, T., 2014. Clean production of xylanase from white corn flour by *Aspergillus fumigates* F-993 under solid state fermentation. World Appl. Sci. J. 29, 326-336. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2014.29.03.13848>

- FAO y OCDE, 2013. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) -Perspectivas Agrícolas 2013-2022.
- Farhat-Khemakhem, A., Blibech, M., Boukhris, I., Makni, M., Chouayekh, H., 2018. Assessment of the potential of the multi-enzyme producer *Bacillus amyloliquefaciens* US573 as alternative feed additive. *J. Sci. Food Agric.* 98, 1208-1215. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8574>
- Favaro, C.P., Baraldi, I.J., Casciatori, F.P., Farinas, C.S., 2020. β -Mannanase Production Using Coffee Industry Waste for Application in Soluble Coffee Processing. *Biomolecules* 10. <https://doi.org/10.3390/biom10020227>
- Feng, Y., Wang, L., Khan, A., Zhao, R., Wei, S., Jing, X., 2019. Fermented wheat bran by xylanase-producing *Bacillus cereus* boosts the intestinal microflora of broiler chickens. *Poultry_Science* 99, 263-271. <https://doi.org/10.3382/ps/pez482>
- Fernández, J.I., González, D., 2011. Polisacáridos no amiláceos y complejos multienzimáticos; como mejorar el valor nutricional de los piensos. *Sel. avícolas*. <https://doi.org/https://seleccionesavicolas.com/pdffiles/2011/10/6309-polisacaridos-no-amilaceos-y-complejos-multienzimaticos-como-mejorar-el-valor-nutricional-delpienso.pdf>
- Ferreira, H., Hannas, M.I., Albino, L., Rostagno, H., Neme, R., Faria, B.D., Xavier, M., Rennó, L.N., 2016. Effect of the addition of β -mannanase on the performance, metabolizable energy, amino acid digestibility coefficients, and

- immune functions of broilers fed different nutritional levels. *Poult. Sci.* 95, 1848–1857. <https://doi.org/10.3382/ps/pew076>
- Ferreira, H.C., Hannas, M.I., Albino, L.F.T.T., Rostagno, H.S., Neme, R., Faria, B.D., Xavier, M.L., Renn, L.N., Rennó, L.N., 2018. Effect of the addition of β -mannanase on the performance , metabolizable energy , amino acid digestibility coefficients , and immune functions of broilers fed different nutritional levels. *Poult. Sci.* 95, 1848-1857. <https://doi.org/10.3382/ps/pew076>
- Fincher, G.B., Stone, B.A., 1986. Cell walls and their components in cereal grain technology. *Adv. Cereal Sci. Technol.* 8 (Ed. Pom, 207-295. <https://doi.org/http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=7415418>
- Fisher, S.H., 1999. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis* : *Mol. Microbiol.* 32, 223-232. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01333.x>
- Furuya, S., Sakamoto, K., Takahashi, S., 1979. A New in vitro Method for Estimating Digestibility of Animal Feeds. *Brit. J Nutr.* 61, 677.
- Gallardo, C., Dadalt, J.C., Alves, M., Neto, T., 2018. Nitrogen retention , energy , and amino acid digestibility of wheat bran , without or with multicarbohydase and phytase supplementation , fed to broiler chickens 1. *J. Anim. Sci.* 96, 2371-2379. <https://doi.org/10.1093/jas/sky062>
- 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, J., Ranilla, M.J., France, J., Alaiz, H., Carro, M.D., López, S., 2019. Chemical Composition, In Vitro Digestibility and Rumen Fermentation Kinetics of Agro-Industrial By-Products. *Animals* 9, 861.
- Garg, G., Mahajan, R., Kaur, A., Sharma, J., 2011. Xylanase production using agro-residue in solid-state fermentation from *Bacillus pumilus* ASH for biodelignification of wheat straw pulp. *Biodegradation* 22, 1143-1154. <https://doi.org/10.1007/s10532-011-9470-4>
- Gauthier, R., 2002. La Salud intestinal: clave de la productividad (El caso de los ácidos orgánicos)., en: *Memorias del 2º Precongreso Científico Avícola IASA. XXVII Convención ANECA-WPDC. 30 de Abril. Puerto Vallarta, Jalisco, México.*
- Ghio, S., 2018. Prospección y caracterización de bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas. Tesis presentada para optar por el título de Doctor en Ciencias. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- González-Ortiz, G., Mirza, W., Pirgoliev, V., Bedford, M., 2015. Efecto de la adición de xilanasa y fitasa en pollos broiler alimentados con dietas en base a trigo, en: *LII Simposio Científico de Avicultura. Málaga, España, pp. 241-250.*
- Gous, R.M., 2010. Nutritional limitations on growth and development in poultry. *Livest. Sci.* 130, 25-32.
- Govarathanan, M., Park, S., Kim, J., Lee, J., Cho, M., Kamala-kannan, S., Oh, B., Sciences, B., Korea, S., 2014. Statistical optimization of alkaline protease

- production from brackish environment *Bacillus* sp . SKK11 by ssf. Prep. Biochem. Biotechnol. 44, 119-131. <https://doi.org/10.1080/10826068.2013.792277>
- Govil, K., Nayak, S., Baghel, R.P.S., Patil, A.K., Malapure, C.D., Thakur, D., 2017. Performance of broiler chicken fed multicarbohydases supplemented low energy diet. Vet. World 10, 727-731. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.727-731>
- Gowdhaman, D., Jeyalakshmi, G., Sugumaran, K., Subramanian, N.S., Santhosh, R.S., Ponnusami, V., 2014. Optimization of the xylanase production with the newly isolated *Bacillus aerophilus* KGJ2. Turkish J. Biochem. 39, 70-77. <https://doi.org/10.5505/tjb.2014.92300>
- Grist, A., 2006. Anatomy, physiology and disease conditions, Poultry Inspection. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Guo, G., Liu, Z., Xu, J., Liu, J., Dai, X., Xie, D., Peng, K., Feng, X., Duan, S., Zheng, K., Cheng, L., Fu, Y., 2012. Purification and characterization of a xylanase from *Bacillus subtilis* isolated from the degumming line. J. Basic Microbiol. 52, 419-428. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100262>
- Gutiérrez, O., Savón, L., 2014. Aspectos bioquímicos y fisiológicos de la Nutrición Animal. Selección de temas.
- Habte-Tsion, H.M., Kumar, V., Rossi, W., 2018. Perspectives of nonstarch polysaccharide enzymes in nutrition, en: Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives. Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00011-3>

Handique, B., Maurya, L.K., Devi, Y.R., 2018. Supplementation of exogenous fibrolytic enzyme in livestock nutrition. *J. Entomol. Zool. Stud.* 6, 302-305.

Harnpicharnchai, P., Pinngoen, W., Teanngam, W., Sornlake, W., Sae-Tang, K., Manitchotpisit, P., Tanapongpipat, S., 2016. Production of high activity *Aspergillus niger* BCC4525 β -mannanase in *Pichia pastoris* and its application for manno oligosaccharides production from biomass hydrolysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 2298-2305.
<https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1230003>

Harris, P., Smith, B.G., 2006. Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. *Int. J. Food Sci. Technol.* 41, 129-143.

Hatfield, R.D., Fukushima, R.S., 2005. Can lignin be accurately measured? *Crop Sci.* 45, 823-839.

Hosseindoust, A., Lee, S.H., Gook Nho, W., Song, Y.H., Shin, J.S., Laxman Ingale, S., Rathi, P.C., Choi, J.W., Chae, B.J., Kim, J.S., 2019. A dose–response study to evaluate the effects of pH-stable β -mannanase derived from *Trichoderma citrinoviride* on growth performance, nutrient retention, and intestine morphology in broiler chickens. *Ital. J. Anim. Sci.* 18, 147-154.
<https://doi.org/10.1080/1828051X.2018.1500872>

Hussain, H., Mirza, M., Nawaz, G., Ahmed, M., Asghar, M., 2019. Effect of Exogenous Protease, Mannanase, and Xylanase Supplementation in Corn and

- High Protein Corn DDGS Based Diets on Growth Performance, Intestinal Morphology and Nutrient Digestibility in Broiler Chickens. *Brazilian J. Microbiol.* 21. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2019-1088>
- Ikasari, L., Mitchell, D.A., 1996. Leaching and characterization of *Rhizopus* oligosporous acid protease from solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 19, 171-175.
- Immanuel, G., Dhanusha, R., Prema, P., Palavesam, A., 2006. Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. *Int J Env. Sci Technol* 3, 25–34.
- Imran, M., Pasha, T.N., 2014. Effect of β -Mannanase on Broilers Performance at Different Dietary Energy Levels. *Glob. Vet.* 12, 622-626. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2014.12.05.83128>
- Iqbal, Z., Metzger, F., Singh, M., Morgan, N., Swick, R.A., Perez-maldonado, R.A., M'Sadeq, S.A., Zentek, J., Ruhnke, I., 2018. Enzymes and / or combination of organic acid and essential oils supplementation in pasture-fed free-range laying hens increased the digestibility of nutrients and non-starch polysaccharides. *Poult. Sci.* 98, 1410-1424. <https://doi.org/10.3382/ps/pey479>
- 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.
- Irfan, M., Nadeem, M., Syed, Q., 2014. One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of

- xylanase production from *Trichoderma viride*-IR05 in solid-state fermentation. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 7, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.04.004>
- Islam, M., Sarkar, P.K., Engineering, G., Science, M.B., Officer, S., Division, M.B., Science, M.B., 2019. Optimization of fermentation condition for cellulase enzyme production from *Bacillus* sp. *Malaysian J. Halal Res. J.* 2, 19-24. <https://doi.org/10.2478/mjhr-2019-0009>
- Ismail, S.A., Hassan, A.A., Emran, M.A., 2019. Economic production of thermo-active endo β -mannanase for the removal of food stain and production of antioxidant manno-oligosaccharides. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 101387. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101387>
- Jani, S., Chudasama, C., Patel, D., Bhatt, P., Patel, H., 2012. Optimization of extracellular protease production from alkali thermo tolerant actinomycetes: *Saccharomonospora viridis* SJ-21. *Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci.* 1, 84–92.
- Jiménez-Moreno, E., González-Alvarado, J.M., González-Serrano, A., Lázaro, R., Mateos, G.G., 2009. Effect of dietary fiber and fat on performance and digestive traits of broilers from one to twenty-one days of age. *Poult. Sci.* 88, 2562-2574.
- Jimoh, A., 2018. Effects of enzyme cocktails on in vitro digestibility of palm kernel cake. *J. Cent. Eur. Agric.* 19, 114-125.
- Jimoh, A., Atteh, J.O., 2015. Efficacy of enzyme cocktails on in vitro digestibility of wheat offal., en: Adebisi, E.A., Ogunwole, O.A., Babayemi, O.J., Iyayi, E.A. (Eds.), *Proceedings of 20th Annual conference of Animal Science Association of Nigeria*. Ibadan, Nigeria,.

- Jørgensen, H., Kristensen, J.B., Felby, C., 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels. Bioprod. Biorefin.* 119-134.
- Joseleau, J.P., Cartier, N., Chambat, G., Faik, A., Ruel, K., 1992. Structural features and biological activity of xyloglucans from suspension- cultured plant cells. *Biochimie* 74, 81-88.
- Józefiak, D., Rutkowski, A., Martin, S.A., 2004. Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 113, 1-15.
- Kaira, G.S., Kapoor, M., 2020. Molecular advancements on over-expression , stability and catalytic aspects of endo- β - mannanases. *Crit. Rev. Biotechnol.* 0, 1-15. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1825320>
- Kalantzi, S., Kekos, D., Mamma, D., 2019. Bioscouring of cotton fabrics by multienzyme combinations: application of Box – Behnken design and desirability function. *Cellulose* 9. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02272-9>
- Kallel, F., Driss, D., Chaari, F., Zouari-ellouzi, S., Chaabouni, M., Ghorbel, R., Chaabouni, S.E., 2016. Statistical optimization of low-cost production of an acidic xylanase by *Bacillus mojavensis* UEB-FK: Its potential applications. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 5, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.11.005>
- Karunaratne, N.D., Abbott, D.A., Chibbar, R.N., Hucl, P.J., Pozniak, C.J., Classen, H.L., 2018. In vitro assessment of the starch digestibility of western Canadian wheat market classes and cultivars 476, 463-476.
- Kaur, P., Bhardwaj, N.K., Sharma, J., 2016. Process optimization for hyper

- production of xylanase via statistical methodology from isolated *Bacillus pumilus* 3GAH using lignocellulosic waste. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 6, 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.03.009>
- Kaushik, P., Mishra, A., Malik, A., 2014. Dual application of agricultural residues for xylanase production and dye removal through solid state fermentation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 96, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.08.006>
- Kazemi, A., Rasoul-Amini, S., Shahbazi, M., Safari, A., Ghasemi, Y., 2014. Isolation, identification, and media optimization of high-level cellulase production by *Bacillus* sp. BCCS A3, in a fermentation system using response surface methodology. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 44, 107-118. <https://doi.org/10.1080/10826068.2013.792276>
- Keyser, K. De, Kuterna, L., Maigret, O., Kaczmarek, S., Rutkowski, A., Vanderbeke, E., 2018. Non-starch Polysaccharide Degrading Enzymes in Corn and Wheat-Based Broiler Diets: Dual Activity for Major Substrates. *J. Agric. Sci. Technol.* 8, 76-88. <https://doi.org/10.17265/2161-6256/2018.02.004>
- Khattak, F.M.M., Pash, T.N., Hayat, Z., Mahmud, A., 2006. Enzymes in poultry nutrition. *J. Anim. Pl. Sci.* 16, 1-7.
- Kim, S., Lee, M.-H., Lee, E.-S., Young-Do, N., Seo, D.-H., 2017. Characterization of mannanase from *Bacillus* sp ., a novel *Codium fragile* cell wall-degrading bacterium. *Food Sci. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0210-3>
- Kim, Y., Ximenes, E., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., 2011. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass.

- Enzyme Microb. Technol. 48, 408-415.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.01.007>
- Koolman, J., Roehm, K.-H., 2005. Color Atlas of Biochemistry, 2nd editio. ed. Thieme Stuttgart, New York.
- Krishna, C., 2005. Solid state fermentation system: an overview. Crit. Rev. Biotechnol 25, 1-30.
- 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>
- Kuddus, R.M., 2015. Statistical optimization of cold-active chitinase production by mutagenized cells of multi-enzyme producing *Bacillus cereus*. Rend. Lincei. <https://doi.org/10.1007/s12210-015-0447-9>
- Kumar, Amit, Kumar, Amit, Kumar, Alok, Dutt, D., 2018. Exploitation of *Parthenium hysterophorous* biomass as low-cost substrate for cellulase and xylanase production under solid-state fermentation using *Talaromyces stipitatus* MTCC 12687. J. Radiat. Res. Appl. Sci. 11, 271-280.
<https://doi.org/10.1016/j.jrras.2018.01.003>
- Kumar, B.D., Mizanur, R.M., Kumar, S.P., 2015. Molecular Identification of a Newly Isolated *Bacillus subtilis* BI19 and Optimization of Production Conditions for Enhanced Production of Extracellular Amylase. Biomed Res. Int. 1-9.
<https://doi.org/10.1155/2015/859805>
- Kumar, L., Kumar, D., Nagar, S., 2014. Modulation of xylanase production from

- alkaliphilic *Bacillus pumilus* VLK-1 through process optimization and temperature shift operation. *Biotechnology* 4, 345-356.
<https://doi.org/10.1007/s13205-013-0160-2>
- Kumar, P., Kapoor, M., 2017. Production, properties, and applications of endo- β -mannanases. *Biotechnol. Adv.* 35, 1-19.
- Kumar, P., Kapoor, M., Srivastava, P.K., Kapoor, M., Kumar, P., Kapoor, M., Srivastava, P.K., Kapoor, M., 2013. System, Extracellular endo-mannanase from *Bacillus* sp. CFR1601: Economical production using response surface methodology and downstream processing using aqueous two phase system. *Food Bioprod. Process.* 91, 672-681. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.06.006>
- Kumar, P., Rao, A., Rao, G.A., Kapoor, M., Srivastava, P.K., Rao, A., Rao, G.A., Kapoor, M., Kumar, P., Rao, A., Rao, G.A., Kapoor, M., 2016. Metal-dependent thermal stability of recombinant endo-mannanase (ManB-1601) belonging to family GH 26 from *Bacillus* sp . CFR1601. *Enzyme Microb. Technol.* 84, 41-49.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.12.010>
- Latham, R.E., Williams, M.P., Walters, H.G., Carter, B., Lee, J.T., 2018. Efficacy of β -mannanase on broiler growth performance and energy utilization in the presence of increasing dietary galactomannan. *Poult. Sci.* 97, 549-556.
<https://doi.org/10.3382/ps/pex309>
- Latorre, J.D., Hernandez-Velasco, X., Kuttappan, V.A., Wolfenden, R.E., Vicente, J.L., Wolfenden, A.D., Bielke, L.R., Prado-Rebolledo, O.F., Morales, E., Hargis, B.M., Tellez, G., 2015. Selection of *Bacillus* spp. for cellulase and xylanase

- production as direct-fed microbials to reduce digesta viscosity and *Clostridium perfringens* proliferation using an in vitro digestive model in different poultry diets. *Front. Vet. Sci.* 2, 25. <https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00025>
- Latorre, J.D., Hernandez-Velasco, X., Wolfenden, R.E., Vicente, J.L., Wolfenden, A.D., Menconi, A., Bielke, L.R., Hargis, B.M., Tellez, G., 2016. Evaluation and selection of *Bacillus* species based on enzyme production, antimicrobial activity, and biofilm synthesis as direct-fed microbial candidates for poultry. *Front. Vet. Sci.* 3. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00095>
- Lee, J., Hong, J., Lim, H., 1997. Experimental optimization of fed – batch culture for poly- γ -hydroxybutyrate acid production. *Biotechnol. Bioeng.* 56, 697–705.
- Lee, S.A., Masey O, H. V, Scholey, D. V, Burton, E.J., Hill, S.E., Neill, H.V.M.O., Scholey, D. V, Burton, E.J., Hill, S.E., Masey O, H. V, Scholey, D. V, Burton, E.J., Hill, S.E., Neill, H.V.M.O., Scholey, D. V, Burton, E.J., Hill, S.E., 2017. Understanding the Direct and Indirect Mechanisms of Xylanase Action on Starch Digestion in Broilers. *J. World's Poult. Res.* 7, 35-47.
- Lewis, M.J., Francis, D.S., Blyth, D., Moyano, F.J., Smullen, R.P., Turchini, G.M., Booth, M.A., 2019. A comparison of in-vivo and in-vitro methods for assessing the digestibility of poultry by-product meals using barramundi (*Lates calcarifer*); impacts of cooking temperature and raw material freshness. *Aquaculture* 498, 187-200. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.032>
- Li, L., Pérré, P., Frank, X., Mazeau, K., 2015. A coarse-grain force-field for xylan and its interaction with cellulose. *Carbohydr. Polym.* 127, 438-450.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.003>

Lindsay, J.A., Creaser, E.H., 1975. Enzyme thermostability is a transformable property between *Bacillus* spp. *Nat.* 255, 650-652.
<https://doi.org/10.1038/255650a0>

Liu, L., Liu, Y., Shin, H.D., Chen, R.R., Wang, N.S., Li, J., Du, G., Chen, J., 2013. Developing *Bacillus* spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 6113-6127.
<https://doi.org/10.1007/s00253-013-4960-4>

Lon-Wo, E., Dale, N., Cárdenas, M., 2002. Complejo enzimático celulasa . Su potencialidad en dietas con Saccharina. *Rev. Cuba. Cienc. Agrícola* 36, 231-234.

Lopes, A.M., Filho, E.X.F., Moreira, L.R.S., 2018. An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown. *J. Appl. Microbiol.* 125, 632-645.
<https://doi.org/10.1111/jam.13923>

López, J.A., da Costa, C., Castilho, R., Maria, D., Freire, G., Machado, A., Castro, D., 2013. Characterization of multienzyme solutions produced by solid-state fermentation of babassu cake , for use in cold hydrolysis of raw biomass. *Biochem. Eng. J.* 77, 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.06.006>

López, S., 2005. *In Vitro and In Situ Techniques for Estimating Digestibility*. CAB International, León, España.

López, Y., 2013. Propuesta y evaluación técnico – económica de un proceso de

- sacarificación de cáscara de arroz para la producción de etanol. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias. Universidad de Matanzas.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193, 265-275.
- Mabrouk, M.E.M., Ahwany, A.M.D. El, 2008. Production of 946-mannanase by *Bacillus amylolequifaciens* 10A1 cultured on potato peels. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 1123-1128.
- Machado de Castro, A., Castilho, L.R., Guimarães, D., 2014. Multivariate Optimization and Supplementation Strategies for the Simultaneous Production of Amylases , Cellulases , Xylanases , and Proteases by *Aspergillus awamori* Under Solid-State Fermentation Conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1368-2>
- Mahadeo, B.L., Shweta, V.P., Virendra K. Rathod, 2018. Statistical optimization of xylanase and alkaline protease coproduction by *Bacillus* spp using Box-Behnken Design under submerged fermentation using wheat bran as a substrate Reference: To appear in: *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* *Biocatal. Agric. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.12.008>
- Maity, S., Mallik, S., Basuthakur, R., Gupta, S., 2015. Optimization of Solid State Fermentation Conditions and Characterization of Thermostable Alpha Amylase from *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). *Bioprocess. Biotech.* 5, 1-7. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000218>

- Maki, M., Leung, K., Qin, W., 2009. The Prospects of Cellulase-Producing Bacteria for the Bioconversion of Lignocellulosic Biomass. *Int. J. Biol. Sci.* 5, 500–516.
- Malhotra, G., Chapadgaonkar, S., 2018. Production and applications of xylanases : an overview. *J. Biotechnol. Comput. Biol. Bionanotechnol.* 99, 59-72.
- Mansour, A.A., Arnaud, T., Maria, M.F., Moreira, T., 2016. Review of solid state fermentation for lignocellulolytic enzyme production: challenges for environmental applications. *Rev. Env. Sci. Biotechnol.* 15, 31-46. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9389-7>
- Marrero, A.I., Dihigo, L.E., Savón, L., Machín, L., Orta, M., 1998. Uso del contenido fecal del cerdo para determinar in vitro la digestión de la fibra dietética en pollos de ceba. *Rev. Cuba. Cienc. Agríc.* 32, 177.
- Martín, C., 2006. Characterization of agricultural and agro-industrial residues as raw materials for ethanol production. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 20, 443-446.
- Martínez-Cummer, M., Poulsen, K., Olmedo-Genie, N., Alemi, F., Klasing, K., 2015. Use of feed grade enzymes to reduce the impact of feed borne immunogens on broiler, en: 20th European Symposium on Poultry Nutrition. Pragua, p. 2015.
- Martínez, L.C.C., 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto 132. [https://doi.org/10.1016/S0181-1584\(01\)01073-9](https://doi.org/10.1016/S0181-1584(01)01073-9)
- Masey-O'Neill, H. V., Singh, M., Cowieson, A.J., Masey-O'Neill, H. V., Singh, M., Cowieson, A.J., 2014a. Effects of exogenous xylanase on performance , nutrient digestibility , volatile fatty acid production and digestive tract thermal

- profiles of broilers fed on wheat- or maize-based diet. *Br. Poult. Sci.* 55, 351-359. <https://doi.org/10.1080/00071668.2014.898836>
- 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>
- Mathew, L., Sharad, V., Divya, A., Rishi, S., Mandhan, P., 2017. Cost-effective screening and isolation of xylano-cellulolytic positive microbes from termite gut and termitarium. *3 Biotech* 7, 1-7. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0733-6>
- Matos, M.M., Valdivia, A., Rodríguez, Z., , R. Boucourt, M.A.B., Portilla, Y., Ramírez, Yasmary 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.
- Mazutti, M., Ceni, G., Di Luccio, M., Treichel, H., 2007. Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. *Bioprocess Biosyst. Enginerring* 30, 297-304.
- McCracken, K.J., Murphy, T.C., M.R.Bedford, Apajalahti, J., 2006. Chicken Caecal Microflora Correlates with ME:GE Using Wheat-Based Diets., en: WPSA XII European Poultry Conference. Verona, Italy, p. 140.
- McDonald, P., Edwards, R. a, Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C. a, Sinclair, L. a, Wilkinson, R.G., 2011. *Food Aditives*, Seven. ed, Animal nutrition. Pearson.

- McLelland, J., 1989. Anatomy of the avian cecum. *J. Exp. Zool. Suppl.* 3.
- McWhorter, T.J., Caviedes-Vidal, E., Karasov, W.H., 2009. The integration of digestion and osmoregulation in the avian gut. *Biol. Rev.* 84, 533-565.
- Meima, R., Van Dijk, J., Holsappel, S., Bron, S., 2004. Expression systems in *Bacillus*. In *Expression technologies: current status and future trends*. Horizon Scientific Press, UK.
- Mejias, L., Cerda, A., Barrena, R., Gea, T., Sánchez, A., 2018. Microbial strategies for cellulase and xylanase production through solid-state fermentation of digestate from biowaste. *Sustainability* 10, 2433. <https://doi.org/doi:10.3390/su10072433>
- Melati, R.B., Schwatz, A.A., Pagnocca, F.C., Contiero, J., Brienzo, M., 2017. Sugarcane bagasse: Production, composition, properties and feedstock potencial, en: Murphy, R. (Ed.), *Sugarcane: Production Systems Uses and Economic importance*. Nova, New York, p. 324.
- Merali, Z., Collins, S.R.A., Elliston, A., Wilson, D.R., Käsper, A., Waldron, K.W., 2015. Characterization of cell wall components of wheat bran following hydrothermal pretreatment and fractionation. *Biotechnol. Biofuels* 8, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0207-1>
- Milián, G., 2009. Obtención de cultivos de *Bacillus* spp. y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos (*Gallus gallus domesticus*).
- Milián, G., Rondón, A.J., Pérez, M., Arteaga, F., Bocourt, R., Portilla, Y., Rodríguez, M., Pérez, Y., Beruvides, A., Laurencio, M., 2017a. Methodology for the isolation

- , identification and selection of *Bacillus* spp . strains for the preparation of animal additives Metodología para el aislamiento , identificación y selección de cepas de *Bacillus* spp . para la elaboración de aditivos zotécni 51, 197-207.
- Milián, G., Rondón, A.J., Pérez, M., Boucourt, R., Rodríguez, M., Portilla, Y., Pérez, Y., Beruvides, A., Laurencio, M., 2017b. Characterization of *Bacillus subtilis* strains as candidates for the preparation of animal additives. Cuba. J. Agric. Sci. 51, 1-8.
- Milián, G., Rondón, A.J., Pérez, M., Boucourt, R., Rodríguez, Z., Ranilla, M.J., Rodríguez, M., Carro, M., 2013. Evaluación de biopreparados de *Bacillus subtilis* como promotores del crecimiento en pollos. Rev. Cuba. Cienc. Agrícola 47, 61-66.
- Milián, G., Rondón, A.J., Pérez, M., Samaniego, L.M., Riaño, J., Bocourt, R., Ranilla, M.J., 2014. Isolation and identification of strains of *Bacillus* spp . in different ecosystems , with probiotic purposes , and their use in animals. Cuba. J. Agric. Sci. 48, 347-351.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicyclic reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31, 426-428.
- Mobley, H.L.T., Island, M.D., Hausinger, R.P., 1995. Molecular biology of microbial ureases. Microbiol. Rev. 59, 451–480.
- Mols, M., Abee, T., 2008. Role of ureolytic activity in *Bacillus cereus* nitrogen metabolism and acid survival. Appl. Environ. Microbiol. 74, 2370-2378. <https://doi.org/10.1128/AEM.02737-07>

- Montgomery, D.C., 2017. Design and Analysis, Ninth. ed. John Wiley & Sons, Inc.
- 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>
- Morris, E.R., Ross-Murphy, S.B., 1981. Chain flexibility of polysaccharides viscosity measurements. *Tech. Carbohydr. Metab.* B310, 1-46.
- Mount-Batten, B., 2017. The utilization of wastewater for microalgal biomass propagation and saccharification of carbohydrates into fermentable sugars for bioethanol production. Tesis presentada para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias. Kwazulu-Natal, South Africa.
- Munir, K., Maqsood, S., 2013. A review on role of exogenous enzyme supplementation in poultry production 25, 66-80.
<https://doi.org/10.9755/ejfa.v25i1.9138>
- Nagar, S., Gupta, V.K., Kumar, D., Kumar, L., Kuhad, R.C., 2010. Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37, 71-83.
<https://doi.org/10.1007/s10295-009-0650-8>
- Natabirwa, H., Nakimbugwe, D., Lungaho, M., Muyonga, J.H., 2018. Optimization of Roba1 extrusion conditions and bean extrudate properties using response surface methodology and multi-response desirability function. *LWT - Food Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.040>
- Neelkant, K.S., Shankar, K., Jayalakshmi, S.K., Sreeramulu, K., 2019. Optimization

- of conditions for the production of lignocellulolytic enzymes by *Sphingobacterium* sp. ksn-11 utilizing agro-wastes under submerged condition. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 49, 927-934.
<https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1643735>
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2015. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Cuarta. ed. Universidad de Wisconsin, Madison.
- Neter, J., Kutner, M.H., Nachtsheim, C.J., Neter, J., Kutner, M.H., Nachtsheim, C.J., Wasserman, W., 1996. *Applied linear statistical models* (4th ed.), 4th (ed). ed. Chicago.
- Nikam, M.G., Reddy, V.R., Reddy, K.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. *Int. J. Livest. Res.* 7, 180-190.
<https://doi.org/10.5455/ijlr.20170209070638>
- Norizan, N.A.B.M., Halim, M., Tan, J.S., Abbasiliasi, S., Sahri, M.M., Othman, F., Ariff, A., 2020. Enhancement of β -Mannanase Production by *Bacillus subtilis* ATCC11774 through Optimization of Medium Composition. *Molecules* 25, 3516.
<https://doi.org/10.3390/molecules25153516>
- Noy, Y., Sklan., D., 1998. Are metabolic responses affected by early nutrition? *J. Appl. Poult. Res.* 7, 437-451.
- Obst, B.S., Diamond, J., 1992. Ontogenesis of intestinal nutrient transport in domestic chickens (*Gallus gallus*) and its relation to growth. *Auk* 109, 451-464.

- Olaniyi, O.O., Igbe, F.O., Ekundayo, T.C., Ayantola, K.J., 2013. Screening Of Bacterial Strains For Beta-Mannanases Production In Solid State Fermentation. *Nat. Sci.* 11, 133-140.
- Olukosi, O.A., Beeson, L.A., Englyst, K., Romero, L.F., 2015. Effects of exogenous proteases without or with carbohydrases on nutrient digestibility and disappearance of non-starch polysaccharides in broiler chickens. *Poult. Sci.* 94, 2662-2669. <https://doi.org/10.3382/ps/pev260>
- Ordaz, A., 2008. Efecto de la temperatura en la producción de enzimas lignocelulolíticas por *Trametes* sp. EUM1 en cultivo. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Osorio-Carmona, E., Giraldo-Carmona, J., Narváez-Solarte, W., 2012. Metodologías para determinar la digestibilidad de los alimentos utilizados en la alimentación canina. *Vet. y Zootec.* 6, 87-97.
- Pandey, A., 1992. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochem.* 27, 109-117.
- Pangsri, P., Pangsri, P., 2017. Mannanase enzyme from *Bacillus subtilis* P2-5 with waste management. *Energy Procedia* 138, 343-347. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.10.136>
- Panwar, D., Srivastava, K., Kapoor, M., 2014. Production, extraction and characterization of alkaline xylanase from *Bacillus* sp. PKD-9 with potential for poultry feed. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3, 118-125. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.006>

- Park, K., Park, C., Kim, B., 2016. An enzyme complex increases in vitro dry matter digestibility of corn and wheat in pigs. Springerplus 5.
- Peinado, M.J., 2015. Efectos de nuevos aditivos alimentarios sobre la composición de la microbiota digestiva en pollos broiler. Universidad de Granada.
- Peiretti, P.G., 2020. Introduction to the Special Issue : In Vitro Digestibility in Animal Nutritional Studies. Animals 10, 1-6.
- Pengilly, C., García-Aparicio, M.P., Diedericks, D., Brienzo, M., Görgens, J.F., 2015. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated sweet sorghum bagasse by combinations of cellulase and endo-xylanase. Fuel 154, 352-360. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.03.072>
- 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.
- 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., Laurencio, M., Milián, G., Rondón, A.J., Arteaga, F., 2012. Evaluation of a probiotic mixture on laying hens feeding in a commercial farm. Cuba. J. Agric. Sci. 35, 311-320.
- Pérez, M., Milián, G., Rondón, A.J., Bocourt, R., Torres, V., 2015. Efecto de endosporas de *Bacillus subtilis* E-44 con actividad probiótica sobre indicadores

- fermentativos en órganos digestivos e inmunológicos de pollos de engorde. Rev. la Soc. Venez. Microbiol. 35, 89-94.
- Piad, R. Samaniego, L. M., Pérez, M. & Boucourt, R., 2006. Actividad prebiótica de un hidrolizado enzimático de crema de levadura en indicadores productivos de gallinas ponedoras. Soc. Mex. Nutr. y Tecnol. Aliment. 5, 226-230.
- Piad, R., Pérez, M., Milián, G., Laurencio, M., Sánchez, L., Medina, E., M., S.L., 2005. Efecto de un hidrolizado enzimático de *Saccharomyces cerevisiae* en pollitas de reemplazo de ponedora. Indicadores inmunológicos y hematológicos. Rev. Salud Anim 27, 109-114.
- Plackett, R., Burman, J., 1946. The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika 33, 305-324.
- Polat, Ö., Denli, M., 2019. Effect of dietary supplementation of different multi-enzymes on production performance and egg quality characteristics in laying hens. Middle-East J. Sci. Res. 5, 113-119. <https://doi.org/10.23884/mejs.2019.5.2.02>
- 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>
- Purich, D.L., 2010. Enzyme Kinetics : Catalysis & Control University of Florida College of Medicine, First edit. ed. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380924-7.10014-6>
- Purohit, A., Yadav, S.K., 2020. Characterization of a thermotolerant and acidophilic

- mannanase producing *Microbacterium* sp . CIAB417 for mannoooligosachharide production from agro-residues and dye decolorization. *Int. J. Biol. Macromol.* 163, 1154-1161. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.114>
- Qing, Q., Yang, B., Wyman, C.E., 2010. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresour. Technol.* 101, 9624–9630.
- Rad-Spice, M., 2017. Means to improve the utilization of canola meal by broiler chickens: new low-fiber canola and the use of exogenous enzymes. Universidad de Manitoba.
- Raghu, C.B., Harsha, K., Sheik, K.B., Viswanatha, C.K., 2018. Wheat Bran-Composition and Nutritional Quality: A Review. *Biotechnol. Microbiol.* 9, 555754. <https://doi.org/10.19080/AIBM.2018.09.555754>
- Raghuwanshi, S., Deswal, D., Karp, M., Chander, R., 2014. Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. *FUEL* 124, 183-189. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.01.107>
- Raheem, A.A., Kareem, M.A., 2017. Chemical Composition and Physical Characteristics of Rice Husk Ash Blended Chemical Composition and Physical Characteristics of Rice Husk Ash Blended Cement. *Int. J. Eng. Res. Africa* 32, 22-35. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/JERA.32.25>
- Rahman, R.N.Z.A., Geok, L.P., Basri, M., Salleh, A.B., 2005. Physical factors affecting the production of organic solvent-tolerant protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K. *Bioresour. Technol.* 96, 429-436.

- Rahmani, N., Jannah, A.M., Nugraha, I.P., 2017. Production of Mannanase from *Bacillus Subtilis* LBF-005 and Its Potential for Manno-oligosaccharides Production, en: Proceeding of the 3rd International Symposium on Applied Chemistry. American Institute of Physics Articles, pp. 0200221-9. <https://doi.org/10.1063/1.5011879>
- Raimbault, M., 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electron. J. Biotechnol.* 1.
- Ramachandran, S., Patel, AK., Nampoothiri, K.M., Francis, F., Nagy, V., Szakacs, G., 2004. Coconut oil cake – a potential raw material for the production of α -amylase. *Bioresour Technol* 93, 169-174.
- Ramírez, H.E., Castellanos, R., 2017. Producción de celulasas bacterianas termoestables utilizando papel periódico reciclado como sustrato. *Rev. Cienc. y Tecnol. para el Desarro.* 3, 8-21.
- Rashid, J.I.A., Samat, N., Yusoff, W.M., 2012. Screening and optimization of medium composition for mannanase production by *Aspergillus terreus* SUK- 1 in solid state fermentation using statistical experimental methods. *Res. J. Microbiol.* 7, 242-255.
- Rattanasuk, S., Ketudat-Caims, M.C., 2009. *Chryseobacterium indologenes*, novel Mannanase producing bacteria. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 31, 395-399.
- Ravindran, R., Hassan, S.S., Williams, G.A., Jaiswal, A.K., 2018. A Review on Bioconversion of Agro-Industrial Wastes to Industrially Important Enzymes. *Bioengineering* 5, 1-20. <https://doi.org/10.3390/bioengineering5040093>

- Ravindran, R., Jaiswal, A.K., 2016. Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. *Trends Biotechnol.* 34, 58-69.
- Ravindran, V., 2013. Feed enzymes : The science , practice , and metabolic realities. *Poult. Sci. Assoc.* 22, 628-636.
- Ravindran, V., 2010. Aditivos en alimentación animal: Presente y Futuro. XXVI Curso Espec. FEDNA 3-26.
- Ravindran, V., Abdollahi, M.R., Bootwalla, S.M., 2014. Nutrient analysis, metabolizable energy, and digestible amino acids of soybean meals of different origins for broilers. *Poult. Sci.* 93, 2567-2577.
- Ravn, J., Glitsø, V., Pettersson, D., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., Pedersen, N.R., 2018a. Combined endo - β -1 , 4-xylanase and α - L -arabinofuranosidase increases butyrate concentration during broiler cecal fermentation of maize glucurono-arabinoxylan. *Anim. Feed Sci. Technol.* 236, 159-169. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.12.012>
- Ravn, J., Martens, H.J., Pettersson, D., Pedersen, N.R., 2018b. A commercial GH 11 xylanase mediates xylan solubilisation and degradation in wheat, rye and barley as demonstrated by microscopy techniques and wet chemistry methods. *Anim. Feed Sci. Technol.* 219. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.06.020>
- Raza, A., Bashir, S., Romana, T., 2018. Statistical based experimental optimization for co-production of endo-glucanase and xylanase from *Bacillus sonorensis* BD92 with their application in biomass saccharification. *Folia Microbiol. (Praha)*. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0654-8>

- Raza, A., Bashir, S., Tabassum, R., 2019. An update on carbohydrases: growth performance and intestinal health of poultry. *Heliyon* 5, e01437. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01437>
- Recharla, N., Kim, D., Ramani, S., Song, M., Park, J., Balasubramanian, B., Puligundla, P., Park, S., 2019. Dietary multi-enzyme complex improves in Vitro nutrient digestibility and hind gut microbial fermentation of pigs. *PLoS One* 14, 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217459>
- Regassa, A., Sands, J.S., Walsh, M.C., Kim, W.K., Kiarie, E., Nyachoti, C.M., 2017. Nutritional and metabolic implications of replacing corn starch with D-xylose in broiler chickens fed corn and soy bean meal based diet. *Poult. Sci.* 96, 388–396.
- Regmi, S., Yoo, H.Y., Choi, Y.H., Choi, Y.S., Yoo, J.C., Kim, S.W., 2017. Prospects for Bio-Industrial Application of an Extremely Alkaline Mannanase From *Bacillus subtilis* subsp . *inaquosorum* CSB31. *Biotechnol. J.* 12, 1-8. <https://doi.org/10.1002/biot.201700113>
- Reis, L., Ritter, C.E.T., Fontana, R.C., Camassola, M., Dillon, A.J.P., 2015. Statistical optimization of mineral salt and urea concentration for cellulase and xylanase production by *Penicillium echinulatum* in submerged fermentation. *Brazilian J. Chem. Eng.* 32, 13-22.
- Ríaz, T., Khan, F., Shakoori, F., 2019. Screening and optimization of cultural conditions for production of thermophilic mannanase from *Bacillus megaterium*. *Punjab Univ. J. Zool.* 34, 175-183.

- Rios, H. V., Vieira, S.L., Stefanello, C., Kindlein, L., Soster, P., Santos, P.I., Toscan, A.B., dos Santos, P.I., Toscan, A.B., 2017. Energy and nutrient utilisation of maize-soy diet supplemented with a xylanase- β -glucanase complex from *Talaromyces versatilis*. *Anim. Feed Sci. Technol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.08.009> 232.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.08.009>
- Rode, L., Yang, W., Beauchemin, K., 1999. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 82, 2121-2126.
- 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.
- 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.
- Rojas, T., Fernando, D., Garrido, R., Fernanda, M., Bonilla, B., Rebeca, R., T, D.F.R., R, M.F.G., B, R.R.B., 2009. Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium sp*. *Rev. Corpoica - Cienc. y Tecnol. Agropecu.* 10, 70-80.
- Rojo, R., Mendoza, G.D., Crosbi, Montañez, O.D., Rebollar, S., Cardoso, D., Hernández, J., González, F.J., 2007. Enzimas amilolíticas exógenas en la alimentación de rumiantes. *Univ. y Cienc.* 23, 173-182.
- Ryu, M.H., Hosseindoust, A., Kim, J.S., Choi, Y.H., Lee, S.H., Kim, M.J., Lee, J.H.,

- Chae, B.J., 2017. β -Mannanase Derived from *Bacillus Subtilis* WL-7 Improves the Performance of Commercial Laying Hens Fed Low or High Mannan-Based Diets. *Japan Poult. Sci. Assoc.* 54, 212-2017. <https://doi.org/doi:10.2141/jpsa.0160021>
- 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>
- Saelee, K., Yingkamhaeng, N., Nimchua, T., Sukyai, P., 2016. An environmentally friendly xylanase-assisted pretreatment for cellulose nanofibrils isolation from sugarcane bagasse by high-pressure homogenization. *Ind. Crop. Prod.* 82, 149-160. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.064>
- Saenphoom, P., Liang, J.B., Ho, Y.W., Loh, T.C., Rosfarizan, M., 2011. Effect of enzyme treatment on chemical composition and production of reducing sugars in palm (*Elaeis guineensis*) kernel expeller. *African J. Biotechnol.* 10, 15372-15377. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1211>
- Saha, S.P., Ghosh, S., 2014. Optimization of xylanase production by *Penicillium citrinum* xym2 and application in saccharification of agro-residues. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3, 188-196. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.03.003>
- Saleh, A.A., Ali, H., Abdel-Latif, M.A., Emam, M.A., Ghanem, R., El-Hamid, H.S.A., 2018. Exogenous dietary enzyme formulations improve growth performance of broiler chickens fed a low-energy diet targeting the intestinal nutrient transporter

- genes. PLoS One 13, e0198085.
- Salem, A.Z.M., Odongo, N. & Pattanaik, A.K., 2013. Exogenous Enzymes in animal nutrition benefits and limitations. Anim. Nutr. Feed Technol. 13, 335-336.
- Salih, M.E., Classen, H.L., Campbell, G., 1991. Response of chickens fed on huU-less barley to dietary β -glucanase of different ages. Anim. Feed Sci. Technol. 33, 139-140.
- Sardiñas, B.B., 2005. Nutrición y alimentación animal. La Habana.
- Selvarajan, E., Veene, R., 2017. Recent advances and future perspectives of thermostable xylanase of Thermostable Xylanase. Biomed. Pharmacol. J. 10, 261-279.
- Sepahy, A.A., Ghazi, S., Sepahy, M.A., 2011. Cost-effective production and optimization of alkaline xylanase by indigenous *Bacillus mojavensis* AG137 fermented on agricultural waste. Enzym. Res. 20, 111-119.
- Sergeant, M.J., Constantinidou, C., Cogan, T.A., Bedford, M.R., Penn, C.W., Pallen, M.J., 2014. Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome. PLoS One 21 9, e91941.
- Serrano, A., 2015. Tratamiento de residuos y subproductos agroindustriales mediante co- digestión anaerobia. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias. Universidad de Córdoba, España.
- Shah, R., Madamwar, D., 2005. Xylanase production under solid-state fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus foetidus* in India. World J. Microbiol. Biotechnol. 21, 233-243.

- Singh, A.K., Berrocoso, J.F.D., Dersjant-Li, Y., Awati, A., Jha, R., 2017. Effect of a combination of xylanase, amylase and protease on growth performance of broilers fed low and high fiber diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 232. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.07.012>
- Singh, G., Usharani, D., Kapoor, M., 2019. Salt bridges are pivotal for the kinetic stability of GH26. *Int. J. Biol. Macromol.* 133, 1236-1241. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.175>
- Singh, R., Kapoor, V., Kumar, V., 2012. Utilization of agro-industrial wastes for the simultaneous production of amylase and xylanase by Thermophilic actinomycetes. *Brazilian J. Microbiol.* 1545-1552.
- Smith, C.H.M., Annison, G., 1996. Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition- towards a physiologically valid approach to their determination. *World's Poult. Sci. J.* 52, 203-221.
- Smith, D.P., Berrang, M.E., 2006. Prevalence and numbers of bacteria in broiler crop and gizzard contents. *Poult. Sci.* 85, 144-147.
- Song, Y, Fu, G., Dong, H., Li, J., Du, Y., Zhang, D., 2021. High-efficiency secretion of β -mannanase in *Bacillus subtilis* through protein synthesis and secretion optimization, en: Song, Yafeng (Ed.), *Developing Bacillus subtilis as a versatile bioproduct platform for agricultural and pharmaceutical applications*. University of Groningen, Groningen, pp. 24-49. <https://doi.org/10.33612/diss.168189909>
- 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>

Sozcu, A., 2019. Growth performance, pH value of gizzard, hepatic enzyme activity, immunologic indicators, intestinal histomorphology, and cecal microflora of broilers fed diets supplemented with processed lignocellulose. *Poult. Sci.* 98, 6880-6887. <https://doi.org/10.3382/ps/pez449>

Stahl, S., Olsson, O., 1977. Temperature range variants of *Bacillus megaterium*. *Arch. Microbiol.* 113, 221-229. <https://doi.org/10.1007/BF00492029>

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. *Anim. Feed Sci. Technol.* 221, 267-273. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.06.005>

Stein, H., Sève, B., Fuller, M.F., Moughan, P.J., de Lange, C.F., 2007. Invited review: amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: terminology and application. *J. Anim. Sci.* 85, 172–180.

Subramaniyan, S., Sandhia, G.S., Prema, P., 2001. Control of xylanase production without protease activity in *Bacillus sp.* by selection of nitrogen source. *Biotechnol. Lett.* 3, 369-370.

Suganthi, C., Mageswari, A., Karthikeyan, S., Anbalagan, M., Sivakumar, A., Gothandam, K.M., 2013. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 11, 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2013.02.002>

Sukumaran, R.K., Singhania, R.R., Pandey, A., 2005. Microbial cellulases -

- Production, applications and challenges. *J. Sci. Ind. Res. (India)*. 64, 832-844.
- Sun, H.Y., Kim, I.H., 2019. Effects of multi-enzyme on production performance, egg quality, nutrient digestibility, and excreta noxious gas emission of early phase Hy-line brown hens. *Poult. Sci.* 98, 4889-4895. <https://doi.org/10.3382/ps/pez237>
- Suresh, G., Ubaldo, D., Rouissi, T., Kaur, S., Mehdi, Y., Godbout, S., Chorfi, Y., Avalos, A., 2019. Production and in-vitro evaluation of an enzyme formulation as a potential alternative to feed antibiotics in poultry. *Process Biochem.* 80, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.01.023>
- Tabssum, F., Irfan, M., Shakir, H.A., Qazi, J.I., 2018. RSM based optimization of nutritional conditions for cellulase mediated Saccharification by *Bacillus cereus* 1-10.
- Tahir, M., Saleh, F., Ohtsuka, A., Hayashi, K., 2008. An effective combination of carbohydrases that enables reduction of dietary protein in broilers: importance of hemicellulase. *Poult. Sci.* 87, 713–718.
- Tananchai, P., Chisti, Y., 2009. Stabilization of Invertase by Molecular Engineering. *Biotechnol. Prog.* 26, 111-117. <https://doi.org/10.1002/btpr.314>
- 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 J. Anim. Sci.* 27, 1755-1762. <https://doi.org/10.5713/ajas.2014.14255>
- Tao, S., Beihui, L., Deming, L., Zuohu, L., 1997. Effect of elevated temperature on

- Trichoderma viride SL-1 in solid state fermentations. *Biotechnol. Letters* 19, 171-174.
- Teather, R.M., Wood, P.J., 1982. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen 43, 777-780.
- Thavasiappan, V., Selvaraj, P., Jayachandran, S., Visha, P., 2020. Influence of enzyme supplementation on intestinal physio chemical characteristics and nutrient digestability in broilers. *J. Entomol. Zool. Stud.* 8, 506-509.
- Thomas, L., Larroche, C., Pandey, A., 2013. Current developments in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 81, 146-161.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>
- Titiloye, J., Abu Bakara, M., Odetoyeb, T., 2013. (2013) *Ind* 47:199. *Crop. Prod* 47, 199.
- Tsai, T., Dove, C.R., Cline, P.M., Owusu-Asiedu, A., Walsh, M.C., Azain, M., 2017. The effect of adding xylanase or β -glucanase to diets with corn distillers dried grains with solubles (CDDGS) on growth performance and nutrient digestibility in nursery pigs. *Livest. Sci.* 197. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.01.008>
- Unakal, C., Kallur, R.I., Kaliwal, B.B., 2012. Production of α -amylase using banana waste by *Bacillus subtilis* under solid state fermentation. *Eur. J. Exp. Biol.* 2, 1044-1052.
- Uni, Z., Noy, Y., Sklan, D., 1999. Posthatch development of small intestinal function in the poultry. *Poult. Sci.* 78, 215-222.

- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal production. *Dairy Sci.* 74, 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vanderplas, S., 2010. Attempt to develop treatments based on bacteria-enzyme combination to reduce broiler contamination by two main human bacterial food-born enteric pathogens. Université de Liège.
- Vangsøea, C.T., Bonninb, E., Joseph-Aimeb, M., Saulnierb, L., Rouxc, V.N.-, Knudsen, K.E.B., 2021. Improving the digestibility of cereal fractions of wheat, maize, rice by a carbohydrase complex rich in xylanases and arabinofuranosidases: An in vitro digestion study. *J. Sci. Food Agric.* 101, 1910-1919. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10806>
- Veerabhadrapa, M.B., Shivakumar, S.B., Devappa, S., 2017. Solid-state fermentation of Jatropha seed cake for optimization of lipase , protease and detoxification of anti-nutrients in Jatropha seed cake using *Aspergillus versicolor* CJS-98. *J. Biosci. Bioeng.* 117, 208-214. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.07.003>
- Vijayaraghavan, P., Arun, A., Abdullah, N., Dhahi, A., Gnana, S., Vincent, P., Arasu, M. V, Choi, K.C., 2016a. Novel *Bacillus subtilis* IND19 cell factory for the simultaneous production of carboxy methyl cellulase and protease using cow dung substrate in solid - substrate fermentation. *Biotechnol. Biofuels* 9, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0481-6>
- Vijayaraghavan, P., Vincent, S.G.P., Dhillon, G.S., 2016b. Solid-substrate

- bioprocessing of cow dung for the production of carboxymethyl cellulase by *Bacillus halodurans* IND18. *Waste Manag.* 48, 513-520. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.10.004>
- Viveros, A., Brene, A., Pizarro, M., Castaño, M., 1994. Effect of enzyme supplementation of a diet based on barley and autoclave treatment on apparent digestibility, growth performance and gut morphology of broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 237-251.
- Walk, C.L., Juntunen, K., Paloheimo, M., Ledoux, D.R., 2019. Evaluation of novel protease enzymes on growth performance and nutrient digestibility of poultry: enzyme dose response. *Poult. Sci.* 98, 5525-5532. <https://doi.org/10.3382/ps/pez299>
- Wang, H., Li, K., Hu, X., Liu, Z., Wu, Y., Huang, C., 2016. Genome-wide association analysis of forage quality in maize mature stalk. *BMC Plant Biol.* 16, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0919-9>
- Wang, X.C., You, S.P., Zhang, J.X., Dai, Y.M., Zhang, C.Y., Qi, W., Dou, T.Y., Su, R.X., He, Z.M., 2018. Rational design of a thermophilic β -mannanase from *Bacillus subtilis* TJ-102 to improve its thermostability. *Enzyme Microb. Technol.* 118, 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.07.005>
- Wen, 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. Tech.* 172, 180–186.

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.11.012>

Wen, S., Zhou, G., Song, S., Xu, X., Voglmeir, J., Liu, L., Zhao, F., Li, M., Li, L., Yu, X., Bai, Y., Li, C., 2015. Discrimination of in vitro and in vivo digestion products of meat proteins from pork , beef , chicken , and fish 3688-3698. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500179>

Windish, W.W., Mhatre, N.S., 1995. Microbial amylases, en: W.U.Wayne (Ed.), *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, New York, New York, pp. 273-304.

Wray, L. V, Atkinson, M.R., Fisher, S.H., 1994. The Nitrogen-Regulated *Bacillus subtilis* nrgAB Operon Encodes a Membrane Protein and a Protein Highly Similar to the *Escherichia coli* glnB-Encoded PI , Protein. *J. Bacteriol.* 176, 108-114.

Wu, S. B., M. Choct, y G.P., 2017. Historical flaws in bioassays used to generate metabolizable energy values for poultry feed formulation: a critical review. *Poult. Sci.* 96, 7173.

Xu, M., Zhang, R., Liu, X., 2013. Improving the acidic stability of a b-mannanase from *Bacillus subtilis* by site-directed mutagenesis. *Process Biochem.* 48, 1166-1173.

Yacoubi, N., Saulnier, L., Bonnin, E., Devillard, E., Eeckhaut, V., Rhayat, L., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., 2018. Short-chain arabinoxylans prepared from enzymatically treated wheat grain exert prebiotic effects during the broiler starter period. *Poult. Sci.* 97, 412-424. <https://doi.org/10.3382/ps/pex297>

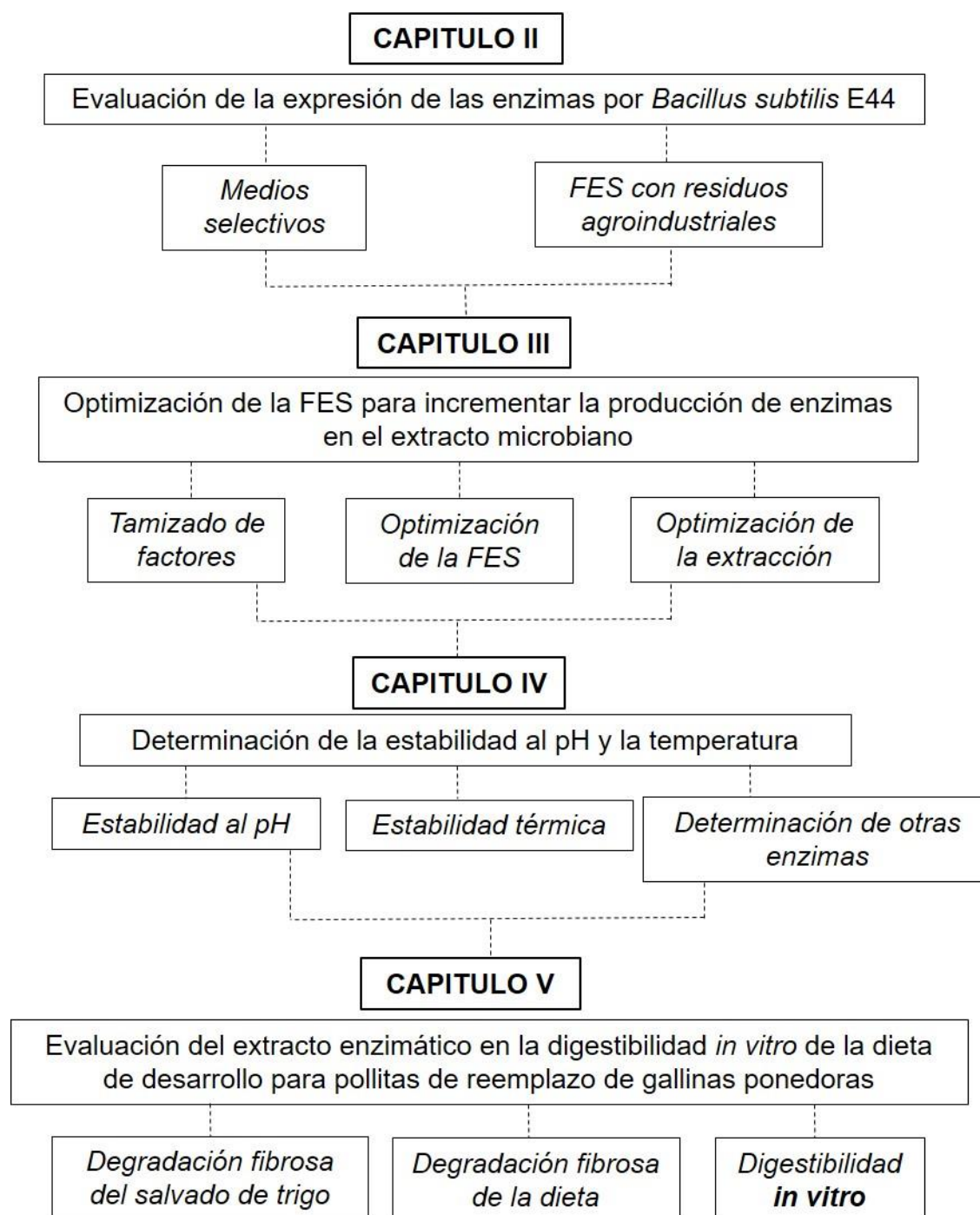
- Yadav, A., Ahmed, A., Ali, M., Ingawale, M., Raychaudhuri, S., Gantayet, L., Pandit, A., 2020. Enhanced co-production of pectinase, cellulase and xylanase enzymes from *Bacillus subtilis* ABDR01 upon ultrasonic irradiation. *Process Biochem.* <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.01.011>
- Yamabhai, 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, 32-42. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923372>
- Yang, Y.Y., Fan, Y.F., Cao, Y.H., Guo, P.P., Dong, B., Ma, Y.X., 2017. Effects of exogenous phytase and xylanase, individually or in combination, and pelleting on nutrient digestibility, available energy content of wheat and performance of growing pigs fed wheat-based diets. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 30. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0876>
- Yazid, N.A., Barrena, R., Komilis, D., Sánchez, A., 2017. Solid-State Fermentation as a Novel Paradigm for Organic Waste Valorization : A Review. *Sustainability* 9, 224. <https://doi.org/10.3390/su9020224>
- Yin, J.S., Liang, Q.L., Li, D.M., Sun, Z.T., 2013. Optimization of production conditions for B-mannanase using apple pomace as raw material in solid-state fermentation. *Ann. Microbiol.* 63, 101-108. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0449-0>
- Zang, H., Xie, S., Wu, H., Wang, W., Shao, X., Wu, L., Rajer, F.U., Gao, X., 2015. A novel thermostable GH5 7 β -mannanase from *Bacillus pumilus* GBSW19 and its application in manno-oligosaccharides (MOS) production. *Enzyme Microb.*

- Technol. 78, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.007>
- Zhai, S., Su, H., Taylor, R., Slater, N., 2005. Pure ice sublimation within vials in a laboratory lyophiliser; comparison of theory with experiment. *Chem. Eng. Sci.* 60, 1167-1176.
- Zhang, H., Sang, Q., 2015. Production and extraction optimization of xylanase and mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn cob. *Biochem. Eng. J.* 97, 101-110. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.02.014>
- Zhang, Y., Geary, T., Simpson, B.K., 2019. Genetically modified food enzymes : a review. *Curr. Opin. Food Sci.* 25, 14-18.
- Zhang, Z., Donaldson, A.A., Ma, X., 2012. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. *Biotechnol. Adv.* 30, 913-919. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.020>
- Zhao, D., Wang, Y., Na, J., Ping, W., Ge, J., 2019. The response surface optimization of β -mannanase produced by *Lactobacillus casei* HDS-01 and its potential in juice clarification. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 49. <https://doi.org/http://10.1080/10826068.2019.1566151>
- Zhou, H., Yang, W., Tian, Y., Wu, Y., 2016. N -terminal truncation contributed to increasing thermal stability of mannanase Man1312 without activity loss. *J. Sci. Food Agric.* 96, 1390-1395. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7240>
- Zivorad, R.L., 2004. *Design of experiments in chemical engineering: A practical guide.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim.

Zurmiati, W., Abbas, M.H., EndoMahata, M., 2017. Production of Extracellular β -mannanase amyloliquefaciens on a Coconut Waste Substrate Bacillus. Pakistan J. Nutr. 16, 700-707. <https://doi.org/10.3923/pjn.2017.700.707>

ANEXOS

Anexo 1. Organización de la tesis



Anexo 2. Resultados del diseño experimental Plackett-Burman para la producción de xilanasas.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Valor de P
A: temperatura	47,38	1	47,38	0,0385
B: humedad	4,31	1	4,31	0,3641
C: pH inicial	28,49	1	28,49	0,0712
D: % inóculo	5,63	1	5,63	0,3098
E: tiempo incubación	2,54	1	2,54	0,4729
F: urea	7,98	1	7,98	0,2426
G: extracto levadura	1,18	1	1,18	0,6150
H: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	17,90	1	17,90	0,1181
I: KNO_3	13,54	1	13,54	0,1551
J: peptona	0,46	1	0,46	0,7491
Error total	11,36	3	3,78	
Total (corr.)	140,82	13		

Anexo 3. Resultados del diseño experimental Plackett-Burman para la producción de β -manananasas.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor de P
A: temperatura	147,33	1	147,33	0,2399
B: humedad	0,36	1	0,36	0,9464
C: pH inicial	40,63	1	40,63	0,4985
D: % inóculo	38,75	1	38,75	0,5078
E: tiempo incubación	11,36	1	11,36	0,7120
F: urea	0,56	1	0,56	0,9336
G: extracto levadura	0,07	1	0,07	0,9764
H: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3,35	1	3,35	0,8396
I: KNO_3	38,53	1	38,53	0,5089
J: peptona	2,18	1	2,18	0,8699
Error total	206,82	3	68,94	
Total (corr.)	489,99	13		

Anexo 4. Resultados del diseño experimental Plackett-Burman para las enzimas endocelulasas.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Valor de P
A: temperatura	0,34	1	0,34	0,7053
B: humedad	1,01	1	1,01	0,5281
C: pH inicial	1,39	1	1,39	0,4645
D: % inóculo	1,05	1	1,05	0,5198
E: tiempo de incubación	0,01	1	0,01	0,9576
F: urea	0,02	1	0,02	0,9217
G: extracto de levadura	0,52	1	0,52	0,6442
H: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,02	1	0,02	0,9217
I: KNO_3	2,76	1	2,76	0,3245
J: peptona	0,45	1	0,45	0,6673
Error total	6,00	3	2,00	0,7053
Total (corr.)	13,61	13		

Anexo 5. Composición química de la dieta de crecimiento para pollitas de reemplazo de gallinas ponedoras.

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 ⁽¹⁾ –minerales ⁽²⁾	0,30
Aporte de nutrientes calculados	
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.