

Efecto de celulasas y xilanasas sobre la digestibilidad *in vitro* de la broza de espárrago (*Asparagus officinalis*), panca de maíz (*Zea mays*) y cáscara de maní (*Arachis hypogaea*) en rumiantes

The effect of Cellulases and Xylanases on the *in vitro* digestibility of Asparagus browse (*Asparagus officinalis*), Corn stover (*Zea mays*) and Peanut hulls (*Arachis hypogaea*) in ruminants

Edis Geovanny Macías-Rodríguez¹ , Carlos Alfredo Gómez-Bravo² , Jimmy Roberto Álava-Moreira¹  y Ernesto Antonio Hurtado^{3*} 

¹Universidad Técnica de Manabí, Facultad de Ciencias Veterinarias, Departamento de Veterinaria. Portoviejo, Manabí, Ecuador. ²Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Zootecnia. Lima, Perú. ³Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Carrera de Medicina Veterinaria. Calceta, Manabí, Ecuador. Correo electrónico: ernestohurta@gmail.com

RESUMEN

Los residuos de cosecha juegan un papel importante en la producción animal a nivel mundial. Aumentar el potencial nutricional de opciones de baja calidad con enzimas fibrolíticas mejoraría la digestibilidad y la utilización del forraje. Utilizando un método *in vitro* se evaluó el efecto de celulasas (EC:3.2.1.4) y xilanasas (EC:3.2.1.8) aplicados a cuatro niveles: 0 (control); 2.000; 4.000 y 8.000 UI·kg⁻¹ MS en panca de maíz (PM), broza de espárrago (BE) y cáscara de maní (CM). Al aplicar celulasas a la PM, la digestibilidad de la materia seca (DIVMS) y fibra detergente neutra (DIVFDN) fueron mayores ($P<0,001$) que el grupo de control (63,7 vs. 61,8 % y 51,9 vs. 50,1 %); efectos similares se encontraron con xilanasas (64,1 vs. 61,8 % y 53,0 vs. 51,6 %). La DIVMS y DIVFDN de la BE no fueron afectadas por la aplicación de celulasas o xilanasas ($P<0,05$). En el caso de la CM, la aplicación de celulasas o xilanasas mejoró la DIVMS (24,9 vs. 22,3 % y 24,6 vs. 22,3 %, respectivamente), pero no la DIVFDN. Además, la producción de gas *in vitro* a las 48 horas no fue influenciada por el tipo de enzimas ni por sus niveles de aplicación a los residuos evaluados. Las celulasas o xilanasas aplicadas sobre la PM y la BE no influyeron sobre la concentración de AGVt (acético + propiónico + butírico). En el caso de la CM, la concentración de AGVt fue similar entre el control y el aplicado con celulasas, mientras que la aplicación de xilanasas resultó en menor concentración de AGVt que el control. Las celulasas y xilanasas influyen la DIVMS, DIVFDN y la concentración de AGVt dependiendo del sustrato utilizado.

Palabras clave: Enzimas; digestibilidad; ácidos grasos volátiles; residuos de cosecha

ABSTRACT

Crop residues play an important role in animal production worldwide. Improving the nutritional potential of low-quality options with fibrolytic enzymes would improve forage digestibility and utilization. Using an *in vitro* method, it was evaluated the effect of Cellulases (EC: 3.2.1.4) and Xylanases (EC: 3.2.1.8) applied at 4 levels: 0 (control), 2,000; 4,000 and 8,000 UI·kg⁻¹ MS in Corn stover (CS), Asparagus browse (AB) and Peanut hulls (PH). When applying Cellulases to CS, the *in vitro* digestibility of dry matter (IVDMD) and the *in vitro* digestibility of neutral detergent fiber (IVNDFD) were higher ($P<0.001$) than the control group (63.7 vs. for 61.8% and 51.9 vs. 50.1%). Similar effects were found with Xylanases (64.1 vs. for 61.8% and 53.0 vs. 51.6%). The IVDMD and IVNDFD of AB were not affected by the application of Cellulases or Xylanases. In the case of PH, the application of Cellulases or Xylanases improved the IVDMD (24.9 vs. 22.3% and 24.6 vs. 22.3%), but not the IVNDFD. Also, the *in vitro* gas production at 48 hours was not influenced by the type of enzymes or by their levels of application to the residues evaluated. Cellulases or Xylanases applied to CS and AB had no effect on the concentration of tVFA (acetic acid + propionic acid + butyric acid). In the case of PH, the concentration of tVFA was similar between the control and those treated with Cellulases, while the application of Xylanases resulted in lower concentrations of tVFA than the control. Cellulases and Xylanases influenced IVDMD, IVNDFD and the concentration of tVFA depending on the substrate used.

Key words: Enzymes; digestibility; volatile fatty acids; crop residue

INTRODUCCIÓN

El uso de enzimas fibrolíticas exógenas (EFE) en algunos trabajos reporta un incremento en la digestibilidad de forrajes y subproductos fibrosos que consumen los rumiantes [1, 7, 28, 33, 37]. Las EFE presentan dos mecanismos de acción: hidrólisis de un alimento, que resulta en liberación de los hidratos de carbono solubles que pueden mejorar la palatabilidad, y modificación de las fibras mediante la reducción de sus barreras estructurales, que dificultan su digestión [10, 27]. Recientes investigaciones *in vitro* e *in vivo* indican una mayor producción lechera, ganancia de peso, eficiencia en conversión alimenticia [22] y reducción de gases de efecto invernadero por cada kilogramo de leche o carne [17, 30] al suministrar EFE en la dieta; sin embargo, también existen resultados inconsistentes, sobre todo al evaluar alimentos con alto contenido fibroso [1, 9, 32, 38].

En América Latina existe limitada información respecto al uso de las EFE. Recientemente se ha evaluado aditivos químicos y biológicos en la mejora de la digestibilidad y consumo voluntario de los alimentos [3, 9, 21]. La disponibilidad y bajos costos de residuos de cosecha, como la panca de maíz (*Zea mays*), la broza de espárrago (*Asparagus officinalis*) y la cáscara de maní (*Arachis hypogaea*), entre otros, determina que los hatos ganaderos se racionen con alternativas alimenticias con altos contenidos de fibras.

El actual estudio *in vitro* tuvo el objetivo de establecer los efectos de las enzimas celulasa y xilanasas sobre la digestibilidad de materia seca (MS), fibra detergente neutra (FDN), hemicelulosa, celulosa y materia orgánica (MO); asimismo, la producción de gas (PG) total en residuos de cosecha (broza de espárrago, panca de maíz y cáscara de maní), alternativas alimenticias utilizadas en rumiantes. Por consiguiente, la posibilidad de que tenga aplicación en el campo, con la expectativa de obtener un incremento en la productividad vacuna dentro de un marco amigable con el medio ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos (LENA) de la Facultad de Zootecnia y en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.

Residuos de cosechas y enzimas fibrolíticas exógenas evaluadas

Los residuos de cosechas fueron recolectados de las ganaderías de los departamentos de La Libertad y Lima, en Perú (panca de maíz -PM-, y broza de espárrago -BE-); además de las provincias Manabí, El Oro y Loja, en Ecuador (cáscara de maní -CM-). Los residuos (TABLA I) se secaron en estufa universal marca Memmert (UN30- Alemania) durante 72 horas (h) a 60°C y después pasaron a la molienda con una pantalla de un milímetro (mm) de diámetro usando un molino marca

tecna, tipo Willye (TE-650/1-Brasil) de cuchillas de acero. El análisis químico se realizó con técnicas acreditadas por la Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist (AOAC) tal como refiere Van Soest y col. [41].

Las enzimas fibrolíticas exógenas evaluadas fueron celulasas (EC: 3.2.1.4) y xilanasas (EC: 3.2.1.8), obtenidas de Dyadic Internacional Inc. (Jupiter, FL, EUA). La actividad enzimática de las celulasas se determinó usando como sustrato carboximetil celulosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) [43]; mientras que, para las xilanasas se utilizó xilano de madera (Sigma Chemical Co.) como sustrato puro, con 10 miligramos-mililitros⁻¹ (mg·mL⁻¹) en 0,1 molar (M) de buffer citrato de fosfato a 39°C y pH 6,6 [6]. Los resultados de la actividad enzimática para celulasas fue 566 unidades internacionales·mL⁻¹ (UI·mL⁻¹) y para xilanasas 635 UI·mL⁻¹, y los niveles usados en la digestibilidad *in vitro* fueron: 0 (control); 2.000; 4.000 y 8.000 UI·kilogramos⁻¹ (UI·kg⁻¹) MS.

Digestibilidad *in vitro*

La digestibilidad *in vitro* de la MS (DIVMS), la fibra detergente neutra (DIVFDN), la fibra detergente ácida (DIVFDA) y de la materia orgánica (DIVMO) se realizó a las 48 h de incubación a 39,5°C, en una incubadora (Modelo BD56, Binder, Alemania), usando el líquido ruminal obtenido de tres ovinos fistulado (*Ovis orientalis aries*) 2 h luego del suministro de heno de alfalfa (*Medicago sativa*). La metodología utilizada fue la de Goering y Van Soest [20], acreditada por la AOAC [2].

Producción de gas total *in vitro*

Simultáneamente, cuando se realizaba la digestibilidad *in vitro*, se llevó a cabo la medición de PG total a diferentes tiempos (3; 6; 12; 24 y 48 h) a través de un transductor de presión tipo T443A conectado a un lector digital (Bailey y Mackey, Inglaterra), adaptado a una aguja número 23 (0,6 mm). Los valores fueron reportados en mL·gramos⁻¹ (mL·g⁻¹) MO sustrato, estimándose mediante la ecuación cuadrática:

$$\text{volumen de gas} = 0,18 + 3,697 \times \text{presión de gas (PSI)} + 0,0824 (\text{PG}^2) [26].$$

Concentración de ácidos grasos volátiles totales (AGVt)

Una vez finalizada la digestibilidad *in vitro* se procedió a tomar muestras de fluidos ruminal filtrados después de 48 h de incubación, se midió el pH (potenciómetro Accumet, modelo HP-71 Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA) y se acidificó con H₂SO₄ a una concentración de 9,0 M, una proporción del 1 %, para posteriormente almacenarlo en congelación (-25°C), en un congelador tipo vertical (Modelo 390L -25C, Marca CareBios, China) hasta su posterior análisis. Previo al análisis se descongelaron las muestras y se procesaron con un filtro de 22 micrones de diámetro y luego se realizó la cromatografía líquida de alto rendimiento con un detector de arreglo Waters 2996 fotodiodo (HPLC-PAD, Milford, EUA) usando una columna X-terra R RP-C18 (5 Micromol (µm) 250 x

TABLA I
Composición química de los residuos de cosechas en base seca (%)

	PrC (%)	CEN (%)	MO (%)	FDN (%)	FDA (%)	LDA (%)	HEMI (%)	CEL (%)
Panca de maíz	5,3 ± 0,2	8,3 ± 0,2	91,7 ± 0,2	75,8 ± 1,1	40,4 ± 1,0	2,9 ± 0,5	33,7 ± 0,9	37,5 ± 1,1
Broza de espárrago	10,5 ± 0,2	13,8 ± 0,4	86,2 ± 0,4	59,0 ± 1,1	40,4 ± 0,8	12,8 ± 0,5	18,4 ± 1,3	27,5 ± 0,7
Cáscara de maní	6,1 ± 0,3	3,9 ± 0,2	96,1 ± 0,2	86,0 ± 1,4	71,9 ± 1,5	33,5 ± 1,5	13,2 ± 1,6	38,4 ± 1,5

PrC: proteína cruda, CEN: cenizas, MO: materia orgánica, FDN: fibra detergente neutra, FDA: fibra detergente ácida, LDA: lignina detergente ácida, HEMI : hemicelulosa, CEL: celulosa

4,6 mm). Se utilizó estándares de ácidos grasos volátiles -AGV- (ácido acético, propiónico y butírico) con un estándar interno en mezclas de concentración de 10 a 1.000 (mg·L⁻¹) de cada uno [13].

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con un diseño completamente al azar. Cada residuo de cosechas tuvo cuatro niveles EFE con seis repeticiones. Las medias de los niveles fueron comparadas usando la prueba de Tukey (P<0,05). El análisis estadístico fue realizado mediante el uso del PROC GLM [36].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Digestibilidad *in vitro*

• Uso de celulasas

La DIVMS de la PM fue mayor (P<0,001) al aplicar celulasas en niveles de 4.000 y 8.000 UI·kg⁻¹ de MS. en comparación con el control. Los resultados concuerdan con los de Eun y Beauchemin [14], quienes encontraron mayor DIVMS en aquellos tratamientos a los cuales se les aplicó celulasas a 690; 1.030 y 1.370 UI·kg⁻¹ MS sobre ensilaje de

maíz. De la misma manera, Tang y col. [39], aplicaron celulasas sobre la PM, también observaron mejoras frente al control, sin embargo, existe una limitante al comparar la dosis, por no estar disponible información sobre la actividad enzimática. La DIVFDN de la PM también fue mayor en los niveles tratados (2.000; 4.000 y 8.000 UI·kg⁻¹ MS) que el control (P<0,001) en el presente trabajo. En ensayos similares con pasto bermuda (*Cynodon dactylon*), Romero y col. [35] encontraron incremento en DIVFDN (P<0,05) en los tratamientos a los cuales se aplicó celulasas en dosis de 3.000 y 4.000 UI·kg⁻¹ MS. De la misma manera, Titi y Tabbaa [40] también encontraron aumento en DIVFDN (P<0,01) sobre paja de cebada -PC- (*Hordeum vulgare*) y paja de trigo -PT- (*Triticum aestivum*). Esto hace presumir que existiría una mayor degradabilidad de la fibra total por parte de los animales en función de las dosis de celulasas aplicadas (TABLA II).

Para la BE, la DIVMS y DIVFDN no se modificaron al comparar los grupos tratados y el de control, posiblemente a la composición química en base seca (TABLA I). Respecto a la CM únicamente existió diferencia (P<0,001) en DIVMS con el nivel 8000 UI·kg⁻¹ MS, que fue superior al control (24,9 vs. 22,3 %, respectivamente), pero en la DIVFDN fueron similares los tratamientos con el control, motivado a lo ineficiente de las enzimas fibrolíticas en sustratos con tan altos niveles de lignina. Estos resultados coinciden con Malik y Bandla [25], quienes encontraron

TABLA II
Digestibilidad *in vitro* (%) aplicando celulasas y xilanasas a los residuos de cosecha a 48 horas de incubación

Tratamientos	Celulasas (EC:3.2.1.4)					Xilanasas (EC:3.2.1.8)				
	Panca de maíz (PM)									
	DIVMS ²	DIVFDN ³	DIVHEM ⁴	DIVCEL ⁵	DIVMO ⁶	DIVMS ²	DIVFDN ³	DIVHEM ⁴	DIVCEL ⁵	DIVMO ⁶
0 UI·kg ⁻¹ MS (control)	61,8 ^c	50,1 ^b	48,5 ^b	56,4	61,9 ^c	61,8 ^c	51,6 ^c	50,0	58,1	61,9 ^c
2.000 UI·kg ⁻¹ MS	63,0 ^{bc}	51,1 ^{ab}	49,6 ^{ab}	58,4	63,1 ^{bc}	63,4 ^b	52,0 ^{bc}	51,6	59,0	63,6 ^b
4.000 UI·kg ⁻¹ MS	63,6 ^{ab}	51,8 ^{ab}	50,3 ^{ab}	58,7	63,7 ^{ab}	64,4 ^{ab}	53,4 ^{ab}	52,2	59,2	64,6 ^{ab}
8.000 UI·kg ⁻¹ MS	64,4 ^a	53,0 ^b	51,9 ^a	58,6	64,5 ^a	64,6 ^a	53,5 ^a	51,7	59,1	64,7 ^a
Probabilidad estadística	***	***	*	ns	***	***	***	ns	ns	***
EEM ¹	0,158	0,264	0,331	0,527	0,163	0,203	0,169	0,371	0,428	0,128
Broza de espárrago (BE)										
0 UI·kg ⁻¹ MS (control)	58,2	32,5	28,3	38,9 ^b	55,9	58,2	31,1	23,8	42,5	55,9
2.000 UI·kg ⁻¹ MS	59,8	34,0	29,8	40,3 ^{ab}	57,5	59,0	32,7	26,6	43,3	56,7
4.000 UI·kg ⁻¹ MS	59,5	33,7	29,9	41,0 ^a	57,3	59,1	33,0	27,1	44,8	56,8
8.000 UI·kg ⁻¹ MS	60,3	35,0	31,5	41,9 ^a	58,1	59,2	33,1	29,0	45,0	56,9
Probabilidad estadística	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns
EEM ¹	0,354	0,400	0,435	0,207	0,393	0,462	0,418	0,851	0,439	0,511
Cáscara de maní (CM)										
0 UI·kg ⁻¹ MS (control)	22,3 ^b	6,4	3,3	9,6	21,6 ^b	22,3 ^b	9,5	6,4	11,2	21,5 ^b
2.000 UI·kg ⁻¹ MS	22,8 ^b	7,0	3,6	11,8	22,0 ^b	24,3 ^a	10,6	5,3	13,4	23,5 ^a
4.000 UI·kg ⁻¹ MS	23,5 ^b	7,9	3,9	11,7	22,7 ^b	23,9 ^{ab}	10,1	5,3	13,6	23,1 ^{ab}
8.000 UI·kg ⁻¹ MS	24,9 ^a	9,6	3,9	11,8	24,1 ^a	24,6 ^a	11,1	4,6	13,8	23,9 ^a
Probabilidad estadística	***	ns	ns	ns	***	***	ns	ns	ns	*
EEM ¹	0,147	0,479	0,108	0,318	0,182	0,206	0,377	0,247	0,437	0,244

¹Error estándar de la media. El número de observaciones usadas fue n=24; ²DIVMS: digestibilidad *in vitro* de la materia seca, ³DIVFDN: digestibilidad *in vitro* de la fibra detergente neutra, ⁴DIVHEM: digestibilidad *in vitro* de la hemicelulosa, ⁵DIVCEL: digestibilidad *in vitro* de la celulosa, ⁶DIVMO: digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 y ns: no significativo. ^{a,b,c}superíndices distintos difieren estadísticamente

mayor DIVMS en aquellos tratamientos en que se usó celulasas en dosis de 4.000 y 8.000 UI·kg⁻¹ MS sobre PT. Sin embargo, al contrario, Eun y col. [16] y Holshausen y col. [22], indicaron respuestas similares al aplicar celulasas sobre ensilaje de maíz (EM) y alfalfa. Cabe señalar que estos forrajes tienen mejor digestibilidad que los residuos de cosecha evaluados, así como menor contenido de lignina, por lo que parecería que las enzimas fibrolíticas exógenas también mejoran los resultados en estos tipos de sustratos y no en alimentos con mayor contenido de fibra; sin embargo, dado que hay limitados trabajos sobre residuos de cosechas, esto ameritaría confirmarse (TABLA II).

• Uso de xilanasas

La DIVMS de la PM se incrementó ($P<0,001$) al aplicar xilanasas en los niveles de 4.000 y 8.000 UI·kg⁻¹ MS. De modo semejante, Moreno y col. [31] y Avellaneda y col. [5] encontraron mejoras al aplicar xilanasas para heno de alfalfa (HA) y *Brachiaria spp.*, respectivamente, aunque con menores dosis (200 y 100 UI·kg⁻¹ MS). Por el contrario, Dean y col. [11] reportaron similares respuestas al aplicar xilanasas sobre ensilaje de pasto bermuda en dosis de 2.600; 5.200 y 10.400 UI·kg⁻¹ MS. La DIVFDN de la PM fue mayor ($P<0,001$) en los grupos tratados con 4.000 y 8.000 UI·kg⁻¹ MS vs. el grupo de control (TABLA II). Estos resultados concuerdan con los de Moreno y col. [31], quienes indicaron diferencias ($P<0,001$) sobre HA al aplicar xilanasas en dosis de 200 UI·kg⁻¹ MS. Pero, por el contrario, Dean y col. [11] y Holtshausen y col.

[22] encontraron niveles similares para la DIVFDN al aplicar xilanasas sobre ensilaje de alfalfa (EA) y pasto bermuda (PB), con dosis también similares a las utilizadas en este trabajo.

Para la BE, la aplicación de xilanasas no cambió la DIVMS y DIVFDN, por lo tanto, no existió efecto en este residuo. En el caso de la CM, en la DIVMS se observó mayor porcentaje ($P<0,001$) al aplicar xilanasas con los niveles de 2.000; 4.000 y 8.000 UI·kg⁻¹ MS, pero en el caso de la DIVFDN fueron similares las dosis de xilanasas comparadas con las del grupo control (TABLA II). Trabajos similares como el de Elwakeel y col. [22], quienes aplicaron xilanasas sobre cáscara de soya (*Glycine max*) y ensilaje de maíz (EM) en dosis de 112; 560; 1.680 y 3.360 UI·kg⁻¹ MS, indicaron mayores efectos de digestibilidad *in vitro*, a diferencia de Dean y col. [11], quienes al aplicar xilanasas señalaron resultados iguales de la DIVMS sobre EPB en dosis de 5.200 y 10.400 UI·kg⁻¹ MS.

Producción de gas (PG) *in vitro*

• Uso de celulasas

En la PM durante las 3; 6; 12; 24 y 48 h de medición de gas, solo a las 2 h fue mayor ($P<0,05$) en los niveles tratados (TABLA III), mientras que para el resto de los tiempos de medición, la PG fue similar, resultado que coincide con el de Wang y col. [42], quienes reportaron una mayor

TABLA III
Producción de gas *in vitro* (mL·g⁻¹ MO) aplicando celulasas o xilanasas a los residuos de cosecha

Tratamientos	Celulasas (EC: 3.2.1.4)					Xilanasas (EC: 3.2.1.8)				
	Panca de maíz									
	3 Horas	6 Horas	12 Horas	24 Horas	48 Horas	3 Horas	6 Horas	12 Horas	24 Horas	48 Horas
0 UI·kg ⁻¹ MS (control)	17,3 ^b	33,7	95,0	357,4	749,0	20,8	37,2	97,2	373,9	742,1
2.000 UI·kg ⁻¹ MS	19,0 ^{ab}	36,1	96,7	363,8	753,5	29,7	38,8	99,6	386,0	769,3
4.000 UI·kg ⁻¹ MS	17,9 ^{ab}	35,0	96,6	362,1	753,2	22,4	39,3	99,9	388,9	767,8
8.000 UI·kg ⁻¹ MS	21, 4 ^a	39,6	98,8	371,6	755,1	23,5	40,2	100,2	383,0	756,4
Probabilidad estadística	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
EEM ¹	0,511	1,094	2,364	4,023	6,133	0,357	1,145	2,253	6,542	7,964
Broza de espárrago										
0 UI·kg ⁻¹ MS (control)	34,0	65,2	126,6	306,4	494,3	34,0	66,5	128,9 ^b	311,8	480,2
2.000 UI·kg ⁻¹ MS	36,0	68,0	131,3	307,4	501,6	35,3	67,4	132,2 ^{ab}	314,4	484,1
4.000 UI·kg ⁻¹ MS	37,7	69,5	132,7	315,5	495,1	36,2	67,9	132,8 ^{ab}	315,7	488,2
8.000 UI·kg ⁻¹ MS	38,0	70,3	134,1	315,2	502,3	36,2	67,9	133,6 ^a	315,5	485,3
Probabilidad estadística	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
EEM ¹	0,912	0,965	1,000	3,577	2,813	1,337	1,172	0,521	3,000	3,487
Cáscara de maní										
0 UI·kg ⁻¹ MS (control)	19,4	32,7 ^b	51,9	89,6	125,2	19,0	34,5	51,3	86,9	127,6
2.000 UI·kg ⁻¹ MS	21,4	34,2 ^{ab}	54,0	91,2	127,6	22,6	35,6	58,7	96,3	131,2
4.000 UI·kg ⁻¹ MS	20,3	35,0 ^{ab}	53,5	92,1	129,7	21,2	36,7	57,3	93,7	128,9
8.000 UI·kg ⁻¹ MS	21,8	36, 2 ^a	54,1	92,8	128,4	21,3	36,6	55,5	92,7	130,0
Probabilidad estadística	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
EEM ¹	0,496	0,411	1,247	1,289	2,833	0,464	0,338	1,539	1,566	2,672

¹Error estándar de la media. El número de observaciones usadas fue n=24.* $P<0,05$ y ns: no significativo. ^{ab}superíndices distintos difieren estadísticamente

PG en el nivel tratado con 4.190 UI·kg⁻¹ MS de celulasas sobre PT a las 2 h. En el caso de la BE no hubo diferencias al comparar el control en ninguno de los tiempos de medición. La CM solo produjo una mayor cantidad de gas *in vitro* a las 6 h de incubación ($P < 0,05$) en los grupos tratados con celulasas en los niveles de 2.000; 4.000 y 8.000 UI·kg⁻¹ MS (TABLA III). Asimismo, Jalilvand y col. [23] y Colombato y col. [10], reportaron mayor PG a las 6 h ($P < 0,001$) en los grupos tratados con celulasas con dosis de 12600 y 25200 UI·kg⁻¹ MS, a diferencia de Wang y col. [42], quienes reportaron resultados similares sobre la PT con dosis de 4.190 UI·kg⁻¹ MS, también a las 6 h.

Uso de xilanasas

En el caso de la PM, la PG fue similar en todos los tiempos de medición (3; 6; 12; 24 y 48 h). Estos resultados coinciden con los de Jalilvand y col. [23], quienes al aplicar xilanasas sobre HA en dosis de 12.600 y 25.200 UI·kg⁻¹ MS no encontraron diferencias. Para la BE, la producción solo fue mayor al aplicar xilanasas las 12 h ($P < 0,05$) en los niveles de 2.000; 4.000 y 8.000 UI·kg⁻¹ MS (TABLA III). Igualmente, Colombato y col. [10], Eun y col [15] y Wang y col. [42], al aplicar xilanasas sobre EM y EC, reportaron también mayor PG *in vitro* a las 12 h. Jalilvand y col. [23], por el contrario, indicaron que la PG no demostró ningún efecto

a dosis de 12.600 y 25.200 UI·kg⁻¹ MS sobre HA. En el caso de la CM, la PG fue similar en todos los tiempos de medición (3; 6; 12; 24 y 48 h) durante el desarrollo de la investigación (TABLA III).

Para tal efecto, Khattab y Tawab [24] concluyen que, la adición de enzimas fibrolíticas mejoró la utilización de las hojas de palma (*Arecaceae* spp.) como forraje alternativo sin efectos negativos sobre la digestibilidad de los nutrientes y redujo la PG, lo que mejora los aspectos ambientales de la alimentación de los animales rumia

Concentración de ácidos grasos volátiles (AGVt)

• Uso de celulasas

En la PM, BE y CM, la concentración de AGVt al aplicar celulasas no fue diferente, de la misma manera que entre las concentraciones en forma individual (acético, propiónico o butírico) (TABLA IV). Eun y col. [15], Giraldo y col. [18], Romero y col. [34] y Wang y col. [42], también encontraron repuestas similares en el uso de celulasas al hacer comparaciones con un control sobre HC, PB, PT o HA, con dosis un poco similares; pero, al contrario, Elwakeel y col. [12] y Medina y col. [29] indicaron una mayor concentración de AGVt cuando se aplicaba celulasas

TABLA IV
Concentración de ácidos grasos volátiles totales (AGVt): acético + propiónico + butírico después de la digestibilidad *in vitro* a 48 horas aplicando celulasas o xilanasas

Tratamientos	Celulasas (EC:3.2.1.4)					Xilanasas (EC:3.2.1.8)				
	AGVt ³ (mM)	Individual (mM)			Relación ² A:P	AGVt ³ (mM)	Individual (mM)			Relación ² A:P
		Acético	Propiónico	Butirico			Acético	Propiónico	Butirico	
Panca de maíz										
0 UI·kg ⁻¹ MS (control)	64,3	43,7	14,2	6,5	3,1	71,3	47,3	15,8 ^{ab}	8,2	3,0
2.000 UI·kg ⁻¹ MS	63,8	43,3	14,0	6,5	3,1	69,5	46,7	15,0 ^{ab}	7,8	3,1
4.000 UI·kg ⁻¹ MS	65,3	43,8	14,7	6,8	3,0	75,3	50,2	16,7 ^a	8,3	3,0
8.000 UI·kg ⁻¹ MS	60,8	41,0	13,5	6,3	3,0	67,3	44,8	14,8 ^b	7,7	3,0
Probabilidad estadística	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
EEM ¹	0,968	0,631	0,231	0,138	0,014	1,119	0,786	0,228	0,147	0,024
Broza de espárrago										
0 UI·kg ⁻¹ MS (control)	58,5	40,0	11,5	7,0	3,5	49,8	34,3	10,0	5,5	3,4
2.000 UI·kg ⁻¹ MS	62,5	45,0	11,5	6,0	3,9	52,2	35,8	10,3	6,0	3,5
4.000 UI·kg ⁻¹ MS	61,2	43,8	11,3	6,0	3,8	50,2	34,7	10,0	6,0	3,5
8.000 UI·kg ⁻¹ MS	56,2	38,7	11,5	6,0	3,4	50,3	34,8	10,0	5,5	3,5
Probabilidad estadística	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
EEM ¹	2,128	1,867	0,110	0,194	0,134	1,263	0,857	0,271	0,137	0,028
Cáscara de maní										
0 UI·kg ⁻¹ MS (control)	38,0	26,2	7,3	4,5	3,6	43,7 ^a	29,3 ^a	8,0 ^a	6,3	3,7
2.000 UI·kg ⁻¹ MS	39,8	27,3	7,5	5,0	3,6	41,5 ^{ab}	28,2 ^{ab}	7,8 ^{ab}	5,5	3,6
4.000 UI·kg ⁻¹ MS	39,8	27,3	7,5	5,0	3,6	40,7 ^b	27,5 ^b	7,3 ^{ab}	5,8	3,8
8.000 UI·kg ⁻¹ MS	40,0	26,8	7,7	5,5	3,5	39,5 ^b	26,8 ^b	7,2 ^b	5,5	3,8
Probabilidad estadística	ns	ns	ns	ns	ns	**	***	*	ns	ns
EEM ¹	0,715	0,443	0,109	0,188	0,032	0,315	0,207	0,102	0,122	0,042

¹Error estándar de la media. El número de observaciones usadas fue n=24. ²A: acético, P: propiónico; ³AGVt: ácidos grasos volátiles totales. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ y ns: $P > 0,05$. mM: milimoles; ^{a,b}superíndices distintos difieren estadísticamente

sobre harina de nopal-HP- (*Opuntia ficus-indica*) cáscara de soja (CS) y EM destinados a la alimentación de vacas (*Bos taurus*) lecheras.

• Uso de xilanasas

El uso de xilanasas sobre la PM no modificó la concentración de AGVt, pero al analizar en forma individual la concentración de ácido propiónico fue mayor ($P<0,05$) con las dosis de 2.000 y 4.000 UI·kg⁻¹ MS frente al nivel de 8.000 UI·kg⁻¹ MS (15,0 y 16,7 vs. 14,8 mM, respectivamente). De la misma manera, Giraldo y col. [18] reportaron mayor concentración de propiónico al aplicar xilanasas en dosis de 40 y 80 UI·g⁻¹ MS de heno de pasto guinea-HPG- (*Megathyrus maximus*). Pero, a diferencia de Arriola y col. [4] y Medina y col. [29], encontraron concentraciones de propiónico similares al aplicar xilanasas sobre EM, HA o HP.

En el caso de la BE, la concentración de AGVt e individuales (acético, propiónico y butírico) fue similar a la concentración luego de la aplicación de xilanasas en las diferentes dosis. Para la CM presentó diferencias en la concentración de AGVt ($P<0,01$), y fueron mayores los niveles de 0 y 2000 versus los de 4.000 y 8.000 UI·kg⁻¹ MS. De modo similar, Arriola y col. [4] reportaron mayor concentración de AGVt al usar xilanasas sobre EM y HA con dosis de 12.342 UI·kg⁻¹ MS. La concentración de AGVt en forma individual, en el caso del acético, fue mayor ($P<0,001$) en los niveles de 0 y 2.000 en comparación con los de 4.000 y 8.000 UI·kg⁻¹ MS (TABLA IV), al contrario que Arriola y col. [4]. Romero y col. [35] reportaron concentraciones similares al aplicar xilanasas sobre EM, HA y HPB. La concentración de propiónico en la CM fue mayor ($P<0,05$) en los tratamientos de 0; 2.000 y 4.000 Vs. 8.000 UI·kg⁻¹ MS (TABLA IV) en este ensayo. Giraldo y col. [19] también encontraron diferencia en las concentraciones de propiónico al aplicar xilanasas sobre HPG en dietas de vacas lecheras. A diferencia de Arriola y col. [4] indicaron concentraciones similares de propiónico al aplicar xilanasas y compararlo con el testigo sobre EM y HA. Estos resultados observados indican que, en la mayoría de los casos, luego de la aplicación de xilanasas en la CM la concentración de AVGt, en el control es más alta que, en los grupos tratados, hecho que no tiene explicación, pero concuerda con que el efecto de las enzimas fibrolíticas exógenas es inconsistente [8, 28], por lo que las cantidades aplicadas varían en función del sustrato evaluado y el tipo de enzima.

CONCLUSIONES

Al aplicar las EFE (celulasas o xilanasas) tuvieron mayores DIVMS y DIVFDN sobre la PM, mientras en la BE existieron efectos similares para ambas enzimas y ambos parámetros. Para la CM en la DIVMS, también fue mayor con celulasas o xilanasas en el nivel 8.000 UI·kg⁻¹ MS versus control, pero para la DIVFDN no cambiaron los resultados con ambas enzimas. La PG *in vitro* con celulasas o xilanasas sobre la PM, BE y CM a las 48 h no tuvo diferencia. Las concentraciones de AGVt en PM y BE fueron similares al aplicar celulasas o xilanasas, pero en CM solo fue similar con celulasas; al contrario de las xilanasas, fue mayor el control que el nivel 8.000 UI·kg⁻¹ MS (43,7 vs 39,5 mM).

Se concluye que las enzimas fibrolíticas (celulasas o xilanasas), influyen la DIVMS, DIVFDN y la concentración de AGVt dependiendo del sustrato utilizado.

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) por el financiamiento parcial de los equipos de laboratorio (Ankom²⁰⁰FiberAnalyzer) y la Secretaría Nacional de Educación Superior,

Ciencia y Tecnología (Senescyt-Ecuador) por el financiamiento de gastos operativos en el desarrollo de la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADESOGAN, A; MA, Z; ROMERO, J; ARRIOLA, K. Ruminant Nutrition Symposium: Improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes. **J. Anim. Sci.** 92(4): 1317-1330. 2014.
- [2] ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURE CHEMIST (AOAC). Molecular biology methods. Official Methods of Analysis. Washington, D.C. 125 pp. 2005.
- [3] ARANDA, E; MENDOZA, G; RAMOS, J; DA SILVA, I; VITTI, A. Effect of fibrolytic enzymes on rumen microbial degradation of sugarcane fiber. **J. Sci. Anim. Brazilian. Goiania.** 11(3): 488-495. 2010.
- [4] ARRIOLA, K; KIM, S; STAPLES, C; ADESOGAN, A. Effect of fibrolytic enzyme application to low-and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. **J. Dairy Sci.** 94: 832-841. 2011.
- [5] AVELLANEDA, J; GONZALES, S; PINOS-RODRÍGUEZ, J; HERNÁNDEZ, A; MONTANEZ, O; SEGUERA, J. Enzimas fibrolíticas exógenas en la digestibilidad *in vitro* de cinco ecotipos de *Brachiaria*. **Agron. Mesoamer.** 18(1): 11-17. 2007.
- [6] BAILEY, M; BIELY, P; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **J. Biotech.** 23: 257-270. 1992.
- [7] BEAUCHEMIN, K; RODE, L; MAEKAWA, M; MORGAVI, D; KAMPEN, R. Evaluation of a nonstarch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. **J. Dairy Sci.** 83: 543-553. 2003.
- [8] BEAUCHEMIN, K; HOLTSHAUSEN, L. Developments in Enzyme Usage in Ruminants. **Enzymes in Farm Animal Nutrition.** 2nd. Ed. CABI Pub. Cambridge. Pp 206-225. 2010.
- [9] CARREÓN, L; PINOS-RODRÍGUEZ, J; BÁRCENA, R; GONZALES, S; MENDOZA, G. Influence of fibrolytic enzymes on ruminal disappearance and fermentation in steers fed diets with short and long particle length of forage. **Italian J. Anim. Sci.** 9(e17): 83-87. 2010.
- [10] COLOMBATTO, D; HERVÁS, G; YANG, W; BEAUCHEMIN, K. Effects of enzyme supplementation of a total mixed ration on microbial fermentation in continuous culture, maintained at high and low pH. **J. Anim. Sci.** 81: 2617-2627. 2003.
- [11] DEAN, D; ADESOGAN, A; KRUEGER, N; LITTELL, R. Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, aerobic stability, and digestibility of Bermuda grass silage. **J. Dairy Sci.** 88: 994-1003. 2005.
- [12] ELWAKEEL, E; TITGEMEYER, E; JOHNSON, B; ARMENDARIZ, C; SHIRLEY, J. Fibrolytic enzymes to increase the nutritive value of dairy feed stuffs. **J. Dairy Sci.** 90: 5226-5236. 2007.
- [13] ERWIN, E; MARCO, G; EMERY, E. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **J. Dairy Sci.** 44: 1768-1771. 1961.
- [14] EUN, J; BEAUCHEMIN, K. Enhancing *in vitro* degradation of Alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. **J. Dairy Sci.** 90: 2839-2851. 2007.
- [15] EUN, J; BEAUCHEMIN, K; SCHULZE, H. Use of an *in vitro* fermentation bioassay to evaluate improvements in degradation of alfalfa hay due to exogenous feed enzymes. **J. Anim. Feed Sci.** 135: 315-328. 2007a.

- [16] EUN, J; BEAUCHEMIN, K; SCHULZE, H. Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance *in vitro* fermentation of Alfalfa hay and corn silage. **J. Dairy Sci.** 90: 1440-1451. 2007b.
- [17] FLACHOWSKY, G. Carbon-footprints for food of animal origin, reduction potentials and research need. **J. Appl. Anim. Res.** 39(1): 2-14. 2011.
- [18] GIRALDO, L; TEJIDO, M; RANILLAAND, M; CARRO, M. Effects on exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates ratios. **J. Anim. Feed Technol.** 141: 306-325. 2008a.
- [19] GIRALDO, L; TEJIDO, M; RANILLAAND, M; CARRO, M. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay-based diet. **J. Anim. Sci.** 86: 1617-1623. 2008b.
- [20] GOERING, H; VAN SOEST, P. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Agric. Handbook. Nº 379. ARS-USDA. Washington, DC, USA. 20 pp. 1970.
- [21] GÓMEZ, A; MENDOZA, G; PINOS, J. Comparison of *in vitro* degradation of elephant grass and sugarcane by exogenous fibrolytic enzymes. **African J. Microbiol. Res.** 5(19): 3051-3053. 2011.
- [22] HOLTSHAUSEN, L; CHUNG, Y; GERARDO, H; OBA, M; BEAUCHEMIN, K. Improved milk production efficiency in early lactation dairy cattle with dietary addition of a developmental fibrolytic enzyme additive. **J. Dairy Sci.** 94: 899-907. 2011.
- [23] JALILVAND, G; ODONGO, N; LÓPEZ, S; NASERIA, A; VALIZADEH, R; EFTEKHAR, F; KEBREAB, E; FRANCE, J. Effects of different level of an enzyme mixture on *in vitro* gas production parameter of contrasting forage. **J. Anim. Feed Sci. Technol.** 146: 289-301. 2008.
- [24] KHATTAB, M; TAWAB, A. *In vitro* evaluation of palm fronds as feedstuff on ruminal digestibility and gas production. **Acta Scientif. Anim. Sci.** 40: e39586. 2018.
- [25] MALIK, R; BANDLA, S. Effect of source and dose of probiotics and exogenous fibrolytic enzymes (EFE) on intake, feed efficiency and growth of male buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. **Tropic. Anim. Health Prod.** 42(6): 1263-1269. 2010.
- [26] MAURICIO, R; MOULD, F; DHANOA, M; OWEN, E; CHANNA, K; THEODOROU, M. Asemi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Feed Sci. Technol.** 79(4): 321-330. 1999.
- [27] MCALLISTER, T; HRISTOV, A; BEAUCHEMIN, K; RODE, L; CHENG, K. Enzymes in ruminants diets. In: Bedford, M.R.; Partridge, G.G. (Eds.). **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. CAB International, Wiltshire. Pp 273-298. 2001.
- [28] MEALE, S; BEAUCHEMIN, K; HRISTOV, A; CHAVES, A; MCALLISTER, T. Board-Invited review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve ruminant production. **J. Anim. Sci.** 92: 427-442. 2013.
- [29] MEDINA, M; TIRADO, G; MEJÍA, I; CAMARILLO, I; CRUZ, C. Digestibilidad *in situ* de dietas con harina de nopal deshidratado conteniendo un preparado de enzimas fibrolíticas exógenas. **Pesquisa Agrop. Brasil.** 41(7): 1173-1177. 2006.
- [30] MENDOZA, G; LOERA, O; PLATA, F; HERNÁNDEZ, P; RAMÍREZ, M. Considerations on the use of exogenous fibrolytic enzymes to improve forage utilization. **The Scientif. World J.** 2014: e247437. 2014.
- [31] MORENO, R; PINOS, J; GONZÁLES, S; ÁLVAREZ, G; GARCÍA, J; MENDOZA, G; BÁRCENA, R. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación ruminal *in vitro* de dietas para vacas lecheras. **J. Inter.** 32(12) 850-853. 2007.
- [32] RAN, T; SALEEM, A; SHEN, Y; RIBEIRO, G; BEAUCHEMIN, K; TSANG, A; MCALLISTER, T. Effects of a recombinant fibrolytic enzyme on fiber digestion, ruminal fermentation, nitrogen balance, and total tract digestibility of heifers fed a high forage diet. **J. Anim. Sci.** 97(8): 3578-3587. 2019.
- [33] RIBEIRO, G; BADHAN, A; HUANG, J; BEAUCHEMIN, K; YANG, Z; WANG, Y; TSANG, A; MCALLISTER, T. New recombinant fibrolytic enzymes for improved *in vitro* ruminal fiber degradability of barley straw. **J. Anim. Sci.** 96: 3928-3942. 2018. <https://doi.org/jb4w>.
- [34] ROMERO, J; ZARATE, M; QUEIROZ, O; HAN, J; SHIN, J; STAPLES, C; BROWN, W; ADESOGAN, A. Fibrolytic enzyme and ammonia application effects on the nutritive value, intake, and digestion kinetics of bermuda grass hay in beef cattle. **J. Anim. Sci.** 91: 4345-4356. 2013.
- [35] ROMERO, J; ZARATE, M; ADESOGAN, A. Effect of the dose of exogenous fibrolytic enzyme preparation on preingestive fiber hydrolysis, ruminal fermentation, and *in vitro* digestibility of Bermuda grass haylage. **J. Dairy Sci.** 98: 406-417. 2015.
- [36] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). The SAS System for Microsoft Windows, release 8.2. SAS. 2001.
- [37] SELZER, K; HASSEN, A; AKANMU, A; SALEM, A. Digestibility and rumen fermentation of a high forage diet pre-treated with a mixture of cellulase and xylanase enzymes. **South Afric. J. Anim. Sci.** 51(3): 399-406. 2021.
- [38] SUTTON, J; PHIPPS, R; BEEVER, D; HUMPHRIES, D; HARTNELL, G; VICINI, J; HARD, D. Effect of method of application of a fibrolytic enzyme product on digestive processes and milk production in Holstein-Friesian cows. **J. Dairy Sci.** 86: 546-556. 2003.
- [39] TANG, S; TAYO, G; TAN, Z; SUN, Z; SHEN, L; SHOW, C; XIAO, C; REN, G; HAN, X; SHEN, S. Effects of yeast culture and fibrolytic enzyme supplementation on *in vitro* fermentation characteristics of low-quality cereal straws. **J. Anim. Sci.** 86: 1164-1172. 2008.
- [40] TITI, H; TABBAA, M. Efficacy of exogenous cellulase on digestibility in lambs and growth of dairy calve. **J. Livest. Prod. Sci. J.** 87: 207-214. 2004.
- [41] VAN SOEST, P; ROBERTSON, J; LEWIS, B. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **J. Dairy Sci.** 74: 3583-3597. 1991.
- [42] WANG, Y; SPRATLING, B; ZOBELL, D; WIEDMEIER, R; MCALLISTER, T. Effect of alkali pretreatment of wheat straw on the efficacy of exogenous fibrolytic enzymes. **J. Anim. Sci.** 82: 198-208. 2004.
- [43] WOOD, T; BHAT, K. Methods for measuring cellulase activities. En: **Methods in Enzymology**. Academic Press. Pp 87-112. 1988.