

ENZIMAS FIBROLÍTICAS: UNA ALTERNATIVA PARA INCREMENTAR LA UTILIZACIÓN DE PARED CELULAR POR RUMIANTES

PALMA PARODI, F.¹ & LANDI, H. G.²

RESUMEN

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante de la biosfera y junto con la hemicelulosa, la lignina y otros constituyen la pared celular vegetal. Es el principal componente dietario de rumiantes, sobre todo en condiciones pastoriles. Se realizó una actualización sobre el papel estratégico del uso de enzimas celulolíticas producidas por diferentes microorganismos y su utilización en el aprovechamiento de residuos agrícolas y/o como suplemento, buscando aumentar la degradabilidad de la fibra y consecuentemente la producción animal. Actualmente la reducción en costos de obtención y mayor especificidad de las preparaciones comerciales demuestran ser potencialmente una herramienta importante en la alimentación bovina; será necesario a partir de nuevas investigaciones conocer y optimizar factores tales como formulación y dosis del producto; tipo, pH, temperatura y humedad del forraje a utilizar; método y momento de aplicación, y efecto animal esperado; para de esta forma asegurar la eficacia del producto enzimático en rumiantes.

Palabras claves: celulosa, alimentación, enzimas, rumiantes, residuos agrícolas.

SUMMARY

Fibrolitic enzymes: an alternative to increase the utilization of cell wall by ruminants.

Cellulose is the most abundant organic compound in the biosphere and, together with hemicellulose, lignin and others are the constituents of plant cell walls. It is the main dietary component of ruminants, especially in grazing conditions. This article updates strategic role of the use of cellulolytic enzymes produced by different microorganisms and their use in the exploitation of agricultural residues and/or as supplements, with the aim of increasing the degradability of dietary

1.- Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA. CIC (1329/2010)

2.- Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA. SECYT (03/H213)

Manuscrito recibido el 9 de abril de 2012 y aceptado para su publicación el 31 de julio de 2012.

fiber and consequently animal production. Currently the reduction of production costs and greater specificity in commercial preparations shows that it is potentially an important tool in feeding cattle. However, it will be necessary further research to optimize factors such as formulation and dosage of the product; type, pH and temperature of forage, method and time of application and the animal effects expected to ensure efficiency of the enzymatic product in ruminants.

Key words: cellulose, feeding, enzymes, ruminants, agricultural residues.

INTRODUCCIÓN

IMPORTANCIA DEL INCREMENTO DE LA CALIDAD EN LA FIBRA PARA RUMIANTES

La celulosa es el principal producto de la fotosíntesis en el ámbito terrestre y el más abundante para ser reciclado en la biosfera (aproximadamente 100 billones de Tn. en materia seca/año) (Jarvis, 2003; Zhang & Lynd, 2004). La celulosa y hemicelulosa, que representan alrededor del 70 % de la biomasa vegetal (Ladisch, *et al.* 1983); son macromoléculas compuestas por diferentes azúcares; mientras que la lignina es un polímero aromático sintetizado de precursores fenilpropanoides.

Las limitantes de utilizar, directamente en la alimentación de rumiantes, materiales con altos contenidos lignocelulósicos, como subproductos agrícolas o forrajes conservados de baja calidad (deficientes nutricionalmente por incorrecta elección, momento o conservación del material de origen), son en general, el bajo contenido de proteína, alto contenido de fibra, bajo coeficiente de digestibilidad, y presencia de algunos factores limitantes como taninos y alcaloides. Una medida interesante a implementar para aumentar la degradabilidad de dichos recursos sería lograr destruir las uniones entre celulosa, hemicelulosa y lignina, mediante el uso estratégico de celulasas microbianas exógenas, agregadas como suplemento dietario o bien como macerador del alimento.

Un punto importante a tener en cuenta en

la evaluación, será el costo de oportunidad para el sistema productivo de extraer “residuos” agrícolas para el consumo animal por sobre las ventajas o necesidades de incorporar los restos vegetales como materia orgánica en el ciclo agrícola.

La biodegradabilidad de la celulosa por celulasas, producidas por numerosos microorganismos es muy importante en diferentes procesos aplicados sobre residuos agrícolas (Hamer, 2003; Angenent *et al.*, 2004, Das & Singh, 2004, Haight, 2005). Avances recientes en biotecnología y tecnología fermentativa han posibilitado la producción de grandes cantidades de enzimas biológicamente activas como las celulasas y que pueden ser usadas como suplementos en la alimentación del ganado (McAllister *et al.*, 2001, Graminha *et al.*, 2008, Colina *et al.*, 2009, Costa *et al.*, 2010, Izarra *et al.*, 2010).

Las dietas suplementadas con celulasas pueden mejorar la utilización del forraje y el desarrollo animal por incremento en la degradación de la fibra (El-Adawy *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008), *in situ* (Lewis *et al.*, 1996; Tricarico *et al.*, 2005; Kruger *et al.*, 2008), ó *in vivo* (Yang *et al.*, 1999) y aumentos en la producción de leche bovina (Lewis *et al.*, 1995; Tricarico *et al.*, 2005; Stella *et al.*, 2007) y en rumiantes menores (Stella *et al.*, 2007, Murad *et al.*, 2009).

A partir de la última década, preparaciones con enzimas fibrolíticas comenzaron a ser económicamente evaluadas como herramientas mejoradoras de procesos digestivos en rumiantes (Yang *et al.*, 2001; Bowman *et*

al., 2002; Knowlton *et al.*, 2007; Gado *et al.*, 2009). Hoy en día, es poco lo que se conoce acerca de los mecanismos que utilizan las enzimas fibrolíticas para mejorar el aprovechamiento del alimento. Varios modelos de acción han sido propuestos para explicarlos, entre los que se incluyen:

a-) incrementando la colonización microbiana de las partículas del alimento (Yang *et al.*, 1999),

b-) favoreciendo la unión y/o mejorando el acceso a la matriz de la pared celular para los microorganismos y las enzimas microbianas ruminales y así acelerar la tasa de digestión (Nsereko *et al.*, 2000) y

c-) favoreciendo la capacidad hidrolítica del rumen debido a la adición de enzimas activas y/o por un efecto sinérgico con las enzimas microbianas ruminales (Morgavi *et al.*, 2000a).

MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE CELULASAS

Las enzimas celulolíticas son producidas por diferentes microorganismos, bacterias y hongos, incluyendo aerobios, anaerobios, mesófilos, termófilos y extra mesófilos (Immanuel *et al.*, 2006). Las bacterias y hongos aeróbicos producen generalmente celulosas extracelulares. Dentro de los principales hongos mesófilos aeróbicos encontramos *Trichoderma viride*, *T. reesei*, *T. koningii*, *Penicillium pinophilum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium solani*, *Talaromyces emersonii* (Grigelmo & Belloso, 1998).

Las bacterias anaeróbicas (*Clostridium thermocellum*, *C. cellulovorans*, *Ruminococcus albus*, *R. flavsfaciens*, *Fibrobacter succinogenes* y *Acetivibrio cellulolyticus*) y hongos anaeróbicos (*Neocallimastix frontalis*, *N. patriciarum* y *Piromyces equi*) producen celulosas en la forma de complejos multienzimáticos (Gilbert & Hazlewood, 1993; Begun & Lemaire, 1996; Bhat & Bhat,

1997). En las dos décadas pasadas, se ha evaluado que otros microorganismos tales como hongos termófilos (*Sporotrichum thermophile*, *Thermoascus aurantiacus*, *Chaetomium thermophile* y *Humicola insolens*), hongos mesófilos anaeróbicos (*Neocallimastix frontalis*, *N. patriciarum*, *Piromonas communis*, *Sphaeromonas communis*, *Piromyces equi* y *Orpinomyces* sp.), bacterias aeróbicas mesófilas y termófilas (*Cellulomonas fimi*, *Pseudomonas fluorescens* subsp. *Cellulosa*, *Cellvibrio* sp., *Microspora bispora*, *Clostridium cellulolyticum*, *C. cellulovorans* y otras) y bacterias anaeróbicas mesófilas y termófilas (*Acidothermus cellulolyticus*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *R. flavefacions*, *Clostridium thermocellum* y *C. stercorarium*), también como actinomicetes (*Thermomonospora fusca*), producen sistemas enzimáticos celulíticos muy activos (Beguin & Lemaire, 1996, Claeysens *et al.*, 1998).

Hongos tales como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Trichoderma* han sido ampliamente estudiados con respecto a su capacidad enzimática celulolítica (Lynd *et al.*, 2002).

En el Cuadro 1 se presenta una lista de organismos y su actividad, aprobados para el uso alimentario en rumiantes (Beauchemin *et al.*, 2003).

EFFECTO DE LAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE LOS ALIMENTOS

Los beneficios de la adición de complejos enzimáticos de celulosas a la dieta de rumiantes se están estudiando actualmente. En estudios *in vitro* se ha evaluado su asociación con la digestión de la fibra en el rumen (El-Adawy *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008).

*Cuadro 1: Lista parcial de organismos aptos para ser incorporados en alimentos para rumiantes aprobados por la Asociación Americana Oficial de Control de Alimentos, AAFCO 2002, (Beauchemin *et al.*, 2003).*

Actividad	Organismo productor	Actividad	Organismo productor
Celulasa	<i>Aspergillus Níger</i>	Hemicelulasa	<i>Aspergillus Níger</i>
Celulasa	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (<i>T. reesei</i> , <i>T. viride</i>)	Hemicelulasa	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (<i>T. reesei</i> , <i>T. viride</i>)
Celulasa	<i>Humicola insolens</i>	Hemicelulasa	<i>Bacillus lentus</i>
Beta-glucanasa	<i>Aspergillus niger</i>	Hemicelulasa	<i>Bacillus subtilis</i>
Beta-glucanasa	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Hemicelulasa	<i>Humicola insolens</i>
Beta-glucanasa	<i>Bacillus lentus</i>	Hemicelulasa	<i>Aspergillus aculeatus</i>
Beta-glucanasa	<i>Bacillus subtilis</i>	Xylanasa	<i>Aspergillus Níger</i>
Beta-glucanasa	<i>Humicola insolens</i>	Xylanasa	<i>Bacillus lentus</i>
Beta-glucanasa	<i>Penicillium funiculosum</i>	Xylanasa	<i>Bacillus subtilis</i>
Beta-glucanasa	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (<i>T. reesei</i> , <i>T. viride</i>)	Xylanasa	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (<i>T. reesei</i> , <i>T. viride</i>)
		Xylanasa	<i>Penicillium funiculosum</i>
		Xylanasa	<i>Humicola insolens</i>

La hidrólisis del sustrato lignocelulósico depende de las características de las enzimas, incluyendo factores como: a-) Adsorción de la enzima dentro de la biomasa previo a la reacción, b-) Competitividad o no competitividad con los productos finales inhibitorios, c-). Sinergia entre los componentes de varias enzimas y d-). Limitaciones de transferencia de masa que afecta el transporte de la enzima sobre el sustrato. La hidrólisis enzimática también depende de la composición del sustrato, como la distribución de la lignina, presencia de otros compuestos tales como hemicelulosa, proteínas y grasas, tamaño de la partícula y cristalización (Brown *et al.*, 2010).

La respuesta favorable es generalmente evaluada como un aumento en la tasa de digestión de la materia seca y materia orgánica, y en la tasa de desaparición de la fibra detergente neutra y ácida, alteración del pH

ruminal, mejora en la eficiencia de fermentación, incremento en el desarrollo microbiano ruminal y en la síntesis de la proteína microbiana (Lewis *et al.*, 1996; Colombatto *et al.*, 2007; Giraldo *et al.*, 2008; Krueger & Adesogan, 2008). También se ha evaluado el efecto positivo sobre la producción de leche y/o carne, a partir del agregado de celulasas exógenas al alimento, mejorando la producción de producto por un aumento en el consumo de materia seca, en la digestibilidad de nutrientes y en la síntesis proteica microbiana (Feng *et al.*, 1996; Dong *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999; Gado *et al.*, 2009).

Las enzimas exógenas en el rumen son generalmente más estables que lo que se suponía (Hristov *et al.*, 1998; Morgavi *et al.*, 2000b, 2001), especialmente cuando se asocian al alimento previo al consumo. La aplicación de la enzima al alimento posibilita la unión al sustrato incrementando la resistencia a la proteólisis y prolonga su

tiempo de acción dentro del rumen (Murad & Azzaz, 2010).

Dong *et al.* (1999) han demostrado que el efecto de la celulasa puede comenzar cuando la enzima entra en contacto con el alimento, así la interacción enzima-alimento resulta muy importante, por algún efecto beneficioso asociado. Otros autores evaluaron que el periodo de interacción previo es necesario dado que incrementa la digestión de la fibra (Lewis *et al.*, 1996; McAllister *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001; Krugger & Adesogan, 2008).

Se han evaluado efectos positivos sobre la digestibilidad total de alimentos, en rumiantes, a lo largo del tracto digestivo en respuesta a la adición de enzimas fibrolíticas, obteniendo incrementos en la digestión de la materia seca, materia orgánica, FDN, FDA y nitrógeno del alimento.

ESTRATEGIAS PARA POTENCIAR LA DEGRADABILIDAD DE LA PARED CELULAR

A partir de estudios realizados sobre la estructura de la pared celular de las plantas, se ha hecho evidente que elementos de carácter organizacional determinan la naturaleza de los procesos de biodegradación de dichas barreras físicas en el material vegetal. El más importante de estos factores lo constituye la distribución del tamaño de los polímeros individuales, que contribuyen a la estructura de la pared celular. La medición directa ha demostrado que la mayoría de estos espacios o poros tienen un diámetro de 2 a 4 nm (Gardner *et al.*, 1999) y su composición cambia muy poco durante su degradación (Chesson *et al.*, 1986). Estas dimensiones no son suficientes para permitir la difusión libre por dentro de la pared de enzimas globulares con masas mayores de 20 KDa.

Las bacterias y hongos ruminales han optimizado un sistema de actividades de

degradación de la pared celular en forma de celulosoma (enzimas individuales que se acoplan en un complejo multienzimático) que reconoce las limitaciones de difusión impuestas por la pared celular de las plantas, y que esta altamente adaptado a un modo de acción superficial. Considerando la erosión como mecanismo fundamental de la degradación de la pared, dos factores son importantes: la cantidad de área superficial disponible para la colonización microbiana y la composición química del forraje. La superficie disponible está determinada por la preparación del alimento y los procesos de masticación y/o rumia. La eliminación subsiguiente de los polisacáridos de la superficie, en los materiales más lignificados puede conducir al desarrollo de una superficie inerte en el cual algunos polisacáridos remanentes estén protegidos por compuestos fenólicos. La cantidad de material que escapa a este proceso depende de la cantidad de lignina presente y el grado de entrelazamiento a otros polímeros de la estructura de la pared celular (González García, 2004).

Otros factores importantes a tener en cuenta son la temperatura y el pH óptimos para que actúe la enzima sobre el sustrato. Por encima de la temperatura correcta y dependiendo de su naturaleza, la enzima es desnaturalizada o inhibida a actuar. Los procesos de manufacturas de los alimentos y/o normales ambientes ruminales pueden inhibir y/o limitar su acción. Ambientes a 60°C y con un pH de 4 a 5 suelen ser los óptimos para muchas enzimas fibrolíticas, aunque son parámetros diferentes a lo observado en condiciones ruminales fisiológicas. Para las enzimas de *Trichoderma* y *Aspergillus* sp. los valores en los cuales se manifestó la máxima capacidad fibrolítica fueron a 45°C y a pH 5 (González García, 2004). En otro estudio, Colombatto *et al.* (2007), concluyeron que los efectos positivos de la evaluación

de un producto enzimático fueron independientes del periodo de pre-tratamiento, pero que el pH influyó en las respuestas a la suplementación enzimática exógena, pareciendo funcionar mejor en condiciones de neutralidad cercanas al pH ruminal.

Otro factor que condiciona la variabilidad en la respuesta al agregado de enzimas exógenas en dietas para rumiantes es la cantidad, ya sea insuficiente o excesiva. La respuesta a la adición de enzimas *in vivo* es no lineal (Beauchemin *et al.*, 1997; Kung *et al.*, 2000), en producción de leche y ganancia de peso vivo. Feng *et al.* (1996) observaron una mejora positiva, pero inconsistente, en el consumo voluntario y en la digestibilidad del forraje, cuando la preparación enzimática con actividades celulasa y xilanasas se aplicó al forraje seco. Beauchemin *et al.* (1995) evaluaron que en animales en engorde, alimentados con heno de alfalfa de buena calidad, la ganancia de peso vivo diaria se incrementó entre un 24 y un 30% ($p < 0,10$) con bajos niveles de adición de enzimas (0,25 a 1 ml/Kg. de materia seca) explicado por un aumento en la ingestión de MSD (materia seca digestible), pero a altos niveles de suplemento enzimático (2 y 4 ml/Kg. de materia seca) no fueron efectivos. Estos estudios demuestran que altos niveles de adición de enzimas puede ser menos efectivos y que el nivel óptimo de suplementación de una enzima puede depender de la dieta utilizada. Menor respuesta a bajos niveles de adición de la enzima podría indicar insuficiente capacidad de actividad enzimática siendo menos explicable la menor acción a altos niveles. Nsereko *et al.* (2002) reportó una respuesta cuadrática en el número total de bacterias en el fluido ruminal cuando se incrementaban los niveles de un producto enzimático del *Trichoderma longibrachiatum* adicionado a la dieta de vacas lecheras. Estos autores atribuyeron estos resultados a que niveles

moderados de enzimas, adicionados al alimento del rumiante causan algún efecto benéfico en la ruptura de la superficie de la estructura del alimento antes y/o después de su ingestión.

Krueger *et al.* (2008b) en un ensayo en el que usaron Bermuda grass o gramillón (*Cynodon dactylon*), en la alimentación de novillos, obtuvieron mayor consumo adicionando el complejo enzimático al forraje en el momento del corte y de la alimentación, pero no obtuvieron diferencias de consumo cuando agregaron las enzimas en el forraje destinado a almacenar. Igualmente todos los tratamientos aumentaron significativamente la digestibilidad de la materia seca consumida, y a su vez las enzimas agregadas al corte y al almacenaje incrementaron la digestibilidad de la FDN y de la proteína bruta. A partir de esto concluyeron que las enzimas son más eficaz en la mejora de la digestión y la ingesta cuando se aplican en corte, aunque también aumentaron la digestión cuando se aplicaron en el momento del consumo o empaclado.

Nsereko *et al.* (2000) encontraron una positiva correlación entre la actividad de xilanasas y la degradación del heno de alfalfa *in vitro*, y reportaron correlación negativa entre glucanasas (incluyendo la celulasa) y la degradación de la fibra. Los mecanismos para esta inhibición aparente no son conocidos, pero podrían bloquear los sitios de actividad enzimática (Nsereko *et al.*, 2000), decreciendo el ataque microbiano a los alimentos (Morgavi *et al.*, 2000b), o tener un efecto inhibitorio directo sobre la producción de enzimas microbianas desde los microorganismos ruminales.

Los mecanismos por los cuales las enzimas utilizadas en alimentación animal aumentan la digestibilidad y aprovechamiento de los alimentos en las dietas de rumiantes se ven complicados por tres factores principales. En

primer lugar y como se mencionó anteriormente, por la complejidad estructural de los alimentos, que contienen una gran variedad de polisacáridos, proteínas, lípidos, lignina, ácidos fenólicos y, que a menudo están interrelacionados. En segundo lugar, los productos fibrolíticos son mezclas de enzimas que contienen diferentes actividades, sustratos y especificidades óptimas. Finalmente, el fluido ruminal es, por naturaleza, un ecosistema microbiano muy complejo, que contiene cientos de especies microbianas y sus enzimas secretadas (Colombatto *et al.*, 2003).

El efecto variable de una enzima obedece al resultado en la especificidad enzimático-alimento y de la cantidad y/o concentración óptima de enzima dependiendo el forraje tratado. Factores tales como especificidad de sustrato, nivel de humedad y temperatura del alimento, y tiempo requerido para que las enzimas interactúen con el alimento podrían afectar la interacción enzima-sustrato (Beauchemin *et al.*, 1995).

Teniendo en cuenta los factores anteriores es necesario establecer el mejor método de aplicación. Las nuevas investigaciones se encargarán de perfeccionar la preparación y uso de enzimas dando respuestas a las condiciones de uso y desarrollando tecnologías que minimizen el efecto del costo de su aplicación.

CONCLUSIONES

En la última década el desarrollo biotecnológico de preparaciones comerciales de enzimas fibrolíticas y su reducción en costos de obtención han demostrado ser una posible herramienta para mejorar económicamente procesos digestivos en los rumiantes.

Factores tales como especificidad enzima-sustrato, concentración, pH, temperatura, humedad y tiempo requerido para que las

enzimas interactúen con el alimento estarían afectando la óptima respuesta celulolítica. Por lo tanto resta investigar y establecer el mejor método y momento de aplicación.

Es necesario considerar e investigar los factores que optimizan la acción enzimática para mejorar las características nutricionales del material de origen. Dilucidado esto, resultará en un valioso método consignado para el aprovechamiento de residuos agrícolas o forrajes de bajo nivel nutricional, como así también permitirá maximizar la digestibilidad de recursos nutricionalmente valiosos.

BIBLIOGRAFÍA

- ANGENENT, L.T.; K. KARIM; M. H. AL-DAHLAN; B. A. WRENN & R. DOMIQUEZ-ESPINOSA. 2004. Production of bioenergy and biochemical from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.*, 22: 477-485. <http://angenent.bee.cornell.edu/research/TIBTECH-04.pdf>
- BEAUCHEMIN, K. A.; L. M. RODE & V. J. H. SEWALT, 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. *Can. J. Anim. Sci.*, 75: 641-644.
- BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D. & MORGAVI, D. P. 2003. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. *Agriculture and Agri-Food Canada*. <http://pubs.aic.ca/doi/pdf/10.4141/A02-103>
- BEAUCHEMIN, K. A.; JONES, S. D. M.; RODE, L. M. & SEWALT, V. J. H. 1997. Effects of fibrolytic enzymes in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.*, 77: 645-653.
- BEGUIN, P. & M. LEMAIRE. 1996. The cellulose-some: An exocellular, multiprotein complex specialised in cellulose degrada-

- tion. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 31: 201-236.
- BHAT, M.K. & S. BHAT.** 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol. Adv.*, 15: 583-620. <http://www.ingentaconnect.com/content/els/07349750/1997/00000015/00000003/art00006;jsessionid=1x1lk-xh54p8kk>
- BOWMAN, G. R.; K. A. BEAUCHEMIN & J.A. SHELFORD.** 2002. The proportion of the diet to which fibrolytic enzymes are added affects nutrient digestion by lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 85: 3420-3429.
- BROWN, R. F.; AGBOGBO, F. K. & HOLTZ-APPLE, M.T.** 2010. Comparison of mechanistic models in the initial rate enzymatic hydrolysis of AFEX-treated wheat Straw. <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/6>
- CLAEYSSENS, M.; W. NERINCK, & K. PIENS.** 1998. Carbohydrates from *Trichoderma reesei* and other microorganisms-structure, biochemistry, genetics and applications. The royal Society of Chemistry, Cambridge, UK., pp:351.
- COLINA, A.; A. FERRER & L. URRIBARRI,** 2009. Producción de celulasas por *Trichoderma reesei* Rut C-30 en diferentes substratos celulósicos. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*, 32 : 152-159
- COLOMBATTO, D.; F. L. MOULD; M. K. BHAT & E. OWEN.** 2007. Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and incubation pH on the *in Vitro* ruminal fermentation of alfalfa items. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 137: 150-162.
- COLOMBATTO, D.; D. P. MORGAVI; A. F. FURTADO & K. A. BEAUCHEMIN.** 2003. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: relationship between biochemical characteristics and *in vitro* ruminal degradation. *J. Anim. Sci.* 81: 2628-2638. <http://jas.fass.org/content/81/4/1040>
- COSTA, M.; M. TORRES; H. MAGARIÑOS & A. REYES.** 2010. Producción y purificación parcial de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* en fermentación sólida sobre residuos agroindustriales. *Revista Colombiana de Biotecnología*. <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=77617808013>.
- DAS, H. & S. K. SINGH.** 2004. Useful byproducts from cellulosic wastes of agriculture and food industry- a critical appraisal. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 44: 77-89.
- DONG, Y.; H. D. BAE; T. A. MCALLISTER; G. W. MATHISON & K. J. CHENG.** 1999. Effects of exogenous fibrolytic enzymes, ábromoethanesulfonate and monensin on fermentation in a rumen simulation (RUSITEC) system. *Can. J. Anim. Sci.*, 79: 491-498. <http://pubs.aic.ca/doi/pdf/10.4141/A99-024>
- EL-ADAWY, M. M.; A. Z. M. SALEM; B.E. BORHAMI; H. M. GADO; M. S. KHALIL & A. ABO-ZEID,** 2008. *In Vitro* cecal gas production and dry matter degradability of some anaerobic bacterium in NZW rabbit. Proceedings of the 9th WRSA World Rabbit Congress, June10-13, Verona, Italy, pp: 643-647.
- FENG, P.; C.W. HUNT; G. T. PRITCHARD & W. E. JULIÁN.** 1996. Effect of enzyme preparations on *in situ* and *in vitro* degradation and *in vivo* digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. *J. Anim. Sci.*, 74: 1349-1357. <http://jas.fass.org/content/74/6/1349.full.pdf+html>
- GADO, H. M.; A. Z. M. SALEM; PO. H. ROBINSON & M. HASSAN.** 2009. Influence of exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk production and composition in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 154:36-46.
- GILBERT, H. J. & G. P. HAZLEWOOD.** 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen.*

- Microbiol., 139: 187-194. <http://mic.sgm-journals.org/content/139/2/187.full.pdf+html>
- GIRALDO, L.A.; M. L. TEJIDO; M. J. RANILLA & M. D. CARRO.** 2007. Effects of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in Rusitec fermenters. *J. Anim. Sci.* 2007, 85:1962-1970. <http://jas.fass.org/content/85/8/1962.full.pdf>
- GIRALDO, L.A.; M. L. TEJIDO; M. J. RANILLA & M. D. CARRO.** 2008. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in Vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage: Concentrate ratios. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 141: 306-325.
- GRAMINHA, E. B. N.; A. Z. L. GONÇALVES; R. D. P. B. PIROTA; M. A. A. BALSALOBRE & R. DA SILVA.** 2008. Enzyme production by solidstate fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 144: 1-22. http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/10521/294/1/Sanchez_Santillan_P_MC_Ganaderia_2010.pdf
- GRIGELMO-MIGEUL, N. & O. MARTINBELLOSO.** 1998. Characterization of dietary fiber from orange juice extraction. *Food Res. Int.*, 31: 355-361. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996998000878>
- HAIGHT, M.** 2005. Assessing the environmental burdens of anaerobic digestion in comparison to alternative options for managing the biodegradable fraction of municipal solid wastes. *Water. Sci. Technol.*, 52: 553-559.
- HAMER, G.** 2003. Solid waste treatment and disposal: Effects on public health and environmental safety. *Biotechnol. Adv.*, 22: 71-79.
- HRISTOV, A. N.; T. A. MCALLISTER & K. J. CHENG.** 1998. Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharide-degrading enzymes on rumen fermentation and nutrient digestibility. *J. Anim. Sci.*, 76: 3146-3156. <http://jas.fass.org/content/76/12/3146.full.pdf+html>
- IMMANUEL, G.; R. DHANUSA; P. PREMA & A. PALAVESAM.** 2006. Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 3: 25-34. <http://www.ceers.org/ijest/issues/full/v3/n1/301004.pdf>
- IZARRA, M. L.; M. L. SANTAYANA; G. K. VILLENA & M. GUTIÉRREZ-CORREA.** 2010. Influencia de la concentración de inóculo en la producción de celulasa y xilanasa por *Aspergillus niger*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=77617808011>.
- JARVIS, M.** 2003. Chemistry: Cellulose stacks up, *Nature*, 426: 611-612
- KNOWLTON, K. F.; M. S. TAYLOR; S. R. HILL; C. COBB & K. F. WILSON.** 2007. Manure nutrient excretion by lactating cows fed exogenous phytase and cellulase. *J. Dairy Sci.*, 90: 4356-4360. <http://www.journal-of-dairyscience.org/article/S0022-0302%2807%2971897-0/fulltext>
- KRUEGER, N. A. & A. T. ADESOGAN.** 2008a. Effect of different mixtures of fibrolytic enzymes on the digestion and fermentation of bahiagrass hay. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 145: 84-94.
- KRUEGER, N. A.; A. T. ADESOGAN; C. R. STAPLES; W. K. KRUEGER; S. C. KIM; R. C. LITTELL & L. E. SOLLENBERG.** 2008b. Effect of method of applying fibrolytic enzymes or ammonia to Bermuda grass hay on feed intake, digestion and growth of beef steers. *J. Anim. Sci.*, 86: 882-889. <http://jas.fass.org/content/86/4/882.full.pdf>

- KUNG, J. R. L.; R. J. TREACHER; G. A. NAUMAN; A. M. SMAGALA; K. M. ENDRES & M. A. COHEN.** 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 83: 115-122.
- KUNG, J. R. L.** 2009. Potential factors that may limit the effectiveness of silage additives. Pages 37-45 in Proc. XV International Silage Conference, Madison, WI. July 27-29, 2009. G. A. Broderick, A. T. Adesogan, L. W. Bocker, K. K. Bolsen, F. E. Contreras-Govea, J. H. Harrison, and R. E. Muck, eds., U.S. Dairy. Forage Research Center, Madison, WI. <http://ag.udel.edu/anfs/faculty/kung/documents/09Potentialfactorsthatmaylimittheeffectivenessofsilageadditives.pdf>
- LADISCH, M. R.; K. W. LIN; M. VOLOCH & G. T. TSAO.** 1990. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme Tech.* 15: 90-99
- LEWIS, G. E.; W.K. SANCHEZ; R.C. TREACHER; W. HUNT & G. T. PRITCHARD** 1995. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on lactational performance of midlactation Holstein cows. *Proc. West. Sect. Am. Soc. Anim. Sci. Can. Soc. Anim. Sci.*, 46: 310-313.
- LEWIS, G. E.; C.W. HUNT; W.K. SANCHEZ; R. TREACHER; G. T. PRITCHARD & P. FENG.** 1996. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. *J. Anim. Sci.*, 74: 3020-3028. <http://jas.fass.org/content/74/12/3020.full.pdf+html>
- LYND, L. R.; P. J. WEIMER; W. H. VAN ZYL & I. S. PRETORIUS.** 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66: 506-577. <http://mmbbr.highwire.org/cgi/content/full/66/3/506>
- MCALLISTER, T.A.; A. N. HRISTOV; K. A. BEAUCHEMIN; L.M. RODE & K. J. CHENG.** 2001. Enzymes in Ruminant Diets. In: *Enzymes in Farm animal Nutrition*, Bedford, M.R and G.G. Partridge (Eds.). CABI Publishing, Marlborough, UK, pp: 273:298.
- MCALLISTER, T.A.; S. J. OOSTING; J. D. POPP; Z. MIR & L.J. YANKE *et al.*** 1999. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.*, 79: 353-360.
- MORGAVI, D. P.; V. L. NSEREKO; L. M. RODE; K. A. BEAUCHEMIN; T. A. MCALLISTER & Y. WANG.** 2000b. Trichoderma feed enzyme preparation enhances adhesion of *Fibrobacter succinogenes* to complex substrates but not to pure cellulose. *Proceedings of the XXV Conference on Rumen Function*, Chicago, IL. p. 33 (Abstr.).
- MORGAVI, D.P.; K. A. BEAUCHEMIN; V. L. NSEREKO; L. M. RODE & T. A. MCALLISTER.,** 2001. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. *J. Anim. Sci.* 79: 1621-1630.
- MORGAVI, D. P.; K. A. BEAUCHEMIN; V. L. NSEREKO; L. M. RODE & A. D. IWAASA *et al.*** 2000a. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Dairy Sci.*, 83: 1310-1321.
- MÜHLBACH, P. R. F.** 1999. Estudio 9.0 - Uso de aditivos para mejorar el ensilaje de los forrajes Tropicales. <http://www.fao.org/docrep/005/X8486S/x8486s0b.htm>
- MURAD, H. H.; HANFY, M.A.; KHOLIF, A.M.; ABDEL GAWAD, M.H. & MURAD, H.A.** 2009. Effect of cellulases supplementation to some low quality ruohages on digestion and milk production by lactating goats. *J. Biol. Chem. Environ. Sci.*, 4:791-809.

- MURAD, H.A. & H. H. AZZAZ.** 2010. Cellulase and Dairy Animal Feeding. *Biotechnology*, 9: 238-256. <http://www.scialert.net/fulltext/?doi=biotech.2010.238.256&org=11>
- NSEREKO, V. L.; K. A. BEAUCHEMIN; D. P. MORGAVI; L. M. RODE; A. F. FURTADO; T. A. MCALLISTER; A. D. IWAASA; W. Z. YANG & Y. WANG.** 2002. Effect of fibrolytic enzyme preparations from *Trichoderma longibrachitatum* on the rumen microbial population of dairy cows. *Can. J. Microbiol.* 48, 14-20.
- NSEREKO, V. L.; D.P. MORGAVI; L.M. RODE; K. A. BEAUCHEMIN & T.A. MCALLISTER,** 2000. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 88: 153-170.
- RODRIGUES, M.A.M.; P. PINTO; R.M.F. BECERRA; A.A. DIAS & C.V.M GUEDES et al.** 2008. Effect of enzyme extracts isolated from whiterot fungi on chemical composition and in vitro digestibility of wheat straw. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 141: 326-338.
- STELLA, A. V.; R. PARATTE; L. VALNEGRI; G. CIGALINO & G. SONCINI et al.** 2007. Effect of administration of live *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, milk composition, blood metabolites and faecal flora in early lactating dairy goats. *Small Rumin. Res.*, 67: 7-13.
- TITI, H. H. & M. J. TABA.** 2004. Efficacy of exogenous cellulase on digestibility in lambs and growth of dairy calves. *Liv. Prod. Sci.*, 87: 207-214.
- TRICARICO, J. M.; J. D. JOHNSTON; K. A. DAWSON; K. C. HANSON; K.R. MCLEOD & D. L. HARMON.** 2005. The effects of an *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on ruminal fermentation and milk production in lactating Holstein cows. *Anim. Sci.*, 81: 365-374.
- WANG, Y.; T.A. MCALLISTER; L. M. RODE, K.A. BEAUCHEMI & D. P. MORGAVI et al.** 2001. Effects of an exogenous enzyme preparation on microbial protein synthesis, enzyme activity and attachment to feed in rumen simulation technique. *Br. J. Nutr.*, 85: 325-332.
- YANG, W. Z.; K. A. BEAUCHEMIN & L.M. RODE.** 1999. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 82: 391-403. <http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS0022030299752458.pdf>
- YANG, X.; H. CHEN; H. GAO & Z. LI.** 2001. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and SSF. *Biores. Technol.*, 78: 277-280.
- ZHANG, Y. H. P. & L. R. LYND.** 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 88: 797-824.