

Veterinaria México

Volumen 37
Volume

Número 1
Number

Enero-Marzo 2006
January-March

Artículo:

Producción de enzimas emicelulolíticas
por fermentación sólida y su aplicación
en alimento balanceado para pollo de
engorda

Derechos reservados, Copyright © 2006:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Otras secciones de
este sitio:

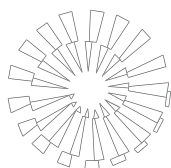
- 📖 Índice de este número
- 📖 Más revistas
- 🔍 Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- 📖 *Contents of this number*
- 📖 *More journals*
- 🔍 *Search*



medigraphic.com



Producción de enzimas hemicelulolíticas por fermentación sólida y su aplicación en alimento balanceado para pollo de engorda

Production of hemicellulolytic enzymes through solid substrate fermentation and their application in the production of balanced feed for broilers

Ignacio Lagunas Bernabé* Blanca E García Almendárez* Eduardo Castaño Tostado*
Carlos Regalado González* Ernesto Ávila González**

Abstract

Agroindustrial by-products may be recycled to reduce environmental pollution, by incorporating them into solid substrate fermentation (SSF) processes, where higher value-added products can be obtained. SSF can be carried out using coffee wastes from the soluble coffee industry and corn cobs as substrates, and the filamentous fungi *Aspergillus niger* GS1, in order to produce enzymatic complexes with hemicellulolytic activity. Two enzymatic extracts were obtained, one showing high mannanase (M) activity while the other showed high xylanase (X) activity. These extracts were concentrated and mixed in a 1:1 (v/v) ratio (MX). MX contained 143.6 U/mL of mannanase, and 268.7 U/mL of xylanase (1 U = μ g of mannose and xylose released per min at 50°C, from locust bean gum and oat spelt xylan as substrates, respectively). MX was added to soybean-sorghum-based diets containing a metabolizable energy (ME) and crude protein 3% lower than the one employed for broiler chicks kept in metabolic chambers, over a period of 21 days. MX induced a significant increase ($P < 0.05$) in ME (2%) that was attributed to partial hydrolysis of the hemicellulose available in the feed. Under commercial production conditions of broiler chicks (52 days), the addition of the enzymatic extracts M and MX to the feed significantly improved ($p < 0.05$) body weight gain (BWG) and feed conversion index (FCI), when compared to the use of a commercial enzymatic additive. The M extract gave the best results, with 3132 g of average BWG and a FCI of 1.55, while the control feed produced 2931 g of BWG and a FCI of 1.70.

Key words: SOLID SUBSTRATE FERMENTATION, HEMICELLULOLYTIC ENZYMES, BROILERS.

Resumen

El aprovechamiento de los residuos agroindustriales puede contribuir a reducir la contaminación ambiental mediante su incorporación a procesos como la fermentación en estado sólido (FES), donde puedan obtenerse productos de mayor valor agregado. La FES puede efectuarse con el uso de residuos del procesamiento de café soluble y olote de maíz, y el hongo filamentoso *Aspergillus niger* GS1, para obtener complejos enzimáticos con actividad hemicelulolítica. Los extractos con actividad principal de mananasa (M) y de xilanasa (X) se concentraron y mezclaron en proporción 1:1 (v/v; MX). MX contenía 143.6 U/mL de mananasa y 268.7 U/mL de xilanasa (1 U = μ g de manosa y xilosa liberada por min, a 50°C, con harina de algarrobo y xilano de avena como sustratos, respectivamente). Se aplicó MX en dietas a base de sorgo y soya, con energía metabolizable (EM) y proteína cruda 3% menor a la empleada, para pollos de engorda mantenidos en jaulas metabólicas durante 21 días. La mezcla MX indujo un incremento significativo ($P < 0.05$) de EM (2%), que se atribuyó a la hidrólisis parcial de la hemicelulosa del alimento. Bajo condiciones de crianza comercial (52 días), los extractos MX y M mejoraron significativamente ($P < 0.05$) la ganancia de peso (GP) y el índice de conversión (IC), con respecto a un aditivo enzimático comercial. El aditivo enzimático M proporcionó mejor resultado con 3 132 g de GP promedio y un IC alimento/carne de 1.55, mientras que el alimento testigo produjo 2 931 g de GP y un IC de 1.70.

Palabras clave: FERMENTACIÓN SÓLIDA, ENZIMAS HEMICELULOLÍTICAS, POLLOS DE ENGORDA.

Recibido el 30 de mayo de 2005 y aceptado el 28 de noviembre de 2005.

*Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, PROPAC, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Ciudad Universitaria, Cerro de las Campanas s/n, Querétaro, 76010, Querétaro, México.

**Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPA), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Autor responsable de correspondencia y sobretiros: Carlos Regalado González, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, PROPAC, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Ciudad Universitaria, Cerro de las Campanas s/n, Querétaro, 76010, Querétaro, México, Correo electrónico: carlosr@uaq.mx Telefax: (442) 1921304, 1921307.

Introduction

An important source of environmental pollution comes from by-products that result from agro-industrial activities. The added value of these residues can be increased by using them as a source of energy for the growth of microorganisms that bio-transform them in order to obtain metabolites that can be incorporated in the processing of feed destined for human or animal consumption.

Solid substrate fermentation (SSF) consists of growing microorganisms (mainly fungi) in humid solid materials in the absence of free water, taking care that all water present is adsorbed into the matrix of the substrate.^{1,2} SSF can be used for the production of feed additives, animal feed, pharmaceutical and agricultural products.³⁻⁵

Coffee bagasse is derived from the production of soluble coffee and contains approximately 45% (d.b.) hemicellulose,⁶ mainly as galacto-gluco-mannan in a 1:2:2.6 molar ratio.⁷ When used as substrate in SSF it can induce the production of a hemicellulases complex, mainly β -mannanase (mannan endo-1,4- β -mannosidase; EC 3.2.1.78) that randomly hydrolyses the 1,4- β -D-mannosidic linkages within the main mannan and heteromannan chain producing manno-oligosaccharides. The degree of hydrolysis depends on the degree of substitution and distribution of the substitutes.⁸

Corn cobs are an agricultural residue that has high xylan content (34%, d.b.).⁹ The SSF is useful as a support and substrate for inducing the secretion of xylanases (endo-1,4- β -xylanase), that randomly hydrolyze the 1,4- β -D-xylosidic linkages within the xylan chain. The degree of hydrolysis depends on the number and type of substitutes in the main chain.¹⁰ β -mannanase and xylanase have been used for reducing the viscosity in coffee extracts in the manufacturing of soluble coffee,¹¹ in the bio-bleaching of wood pulp for paper production,¹² and in the clarification of fruit juice and wines.¹³

They have also been applied for reducing the non-amylaceous fiber (NAF) of high protein value meals such as soy and copra, used as balanced feed for poultry, which favors greater digestibility of the feed,^{14,15} as well as greater energy bioavailability.¹⁶ Hemicelluloses interfere with the bioavailability of nutrients; therefore, affecting productivity.^{17,18} This is due to several factors, among others the reduction in energy density; encapsulation that prevents, in part, the endogenous enzymatic action of poultry; increase in viscosity of the chyme due to accumulation of water from the soluble NAF (xylans, galacto-gluco-mannans, etc.), that could decrease the intestinal transit and alter the

Introducción

Una fuente importante de contaminación ambiental proviene de los subproductos resultantes de la actividad agroindustrial. El valor agregado de estos residuos puede incrementarse al utilizarlos como fuente de energía en el crecimiento de microorganismos que los biotransformen, para obtener metabolitos con posibilidad de incorporarse en el procesamiento de alimentos destinados al consumo humano o animal.

La fermentación en estado sólido (FES) consiste en el crecimiento de microorganismos (principalmente hongos) en materiales sólidos húmedos con ausencia de agua libre, procurando que toda el agua presente esté adsorbida en la matriz del sustrato.^{1,2} La FES puede utilizarse para la producción de aditivos alimentarios, alimento animal, productos farmacéuticos y agrícolas.³⁻⁵

El bagazo de café se deriva de la producción de café soluble y contiene cerca de 45% (b. s.) de hemicelulosa,⁶ principalmente galacto-gluco-mannano en relación molar 1:2:2.6.⁷ Al utilizarse como sustrato en la FES, puede inducir la producción de un complejo de hemicelulasas, principalmente β -mananasa (β -1,4-D-mannan mananohidrolasa; EC 3.2.1.78), que hidroliza aleatoriamente los enlaces 1,4 β -D-manosídicos dentro de la cadena principal de mananos y heteromananos, produciendo manno-oligosacáridos. El grado de hidrólisis depende del de sustitución y de la distribución de los sustitutos.⁸

El olote constituye un residuo de origen agrícola que tiene alto contenido de xilano (34%, b. s.).⁹ La FES es útil como soporte y sustrato para inducir secreción de xilanasas (β -1,4-D-xilano xilanohidrolasa; E.C. 3.2.1.8), que hidrolizan aleatoriamente los enlaces 1,4 β -D-xilosídicos dentro de la cadena de xilano; el grado de hidrólisis depende del número y tipo de sustitutos de la cadena principal.¹⁰ Las β -mananasas y xilanasas se han usado para reducir la viscosidad de extractos de café en la manufactura del café soluble,¹¹ en el bioblanqueo de pulpas de madera para la fabricación de papel¹² y en la clarificación de jugos de frutas y vinos.¹³

Además se han aplicado para reducir la fibra no amilácea (FNA) de harinas de alto valor proteínico, como soya y copra, usados en alimentos balanceados para pollo, que favorece mayor digestibilidad de la dieta,^{14,15} y mayor biodisponibilidad energética.¹⁶ Las hemicelulosas interfieren con la biodisponibilidad de nutrientes afectando la productividad.^{17,18} Ello se debe a varios factores, entre otros la reducción de densidad de energía; encapsulación que impide, en parte, la acción enzimática endógena del pollo;

microflora present, or reduce the absorption of nutrients and affect the assimilation of fatty acids and amino acids.^{19,20}

The world production of poultry meat between 1994 and 2001 increased on average of 5.3% annually, while the production in Mexico during the last five years has increased at an annual rate of 5.8%.²¹ In Mexico, poultry production represents the main vegetal to animal protein transforming industry. In 2003 an annual *per capita* consumption was estimated at 22.4 kg of chicken, representing a 3.5% increase in relation to the previous year.

This study was aimed to obtain hemicellulolytic complexes with mannanase and xylanase activities from SSF by using agro-industrial residues. It also intended to assess the capacity of these enzymatic extracts to increase the metabolizable energy and improve the feed/meat conversion index, through partial hydrolysis of the fiber in balanced feed for broilers.

Material and methods

Fermentation conditions

We used the strain *Aspergillus niger* GS1 isolated from copra, from the culture collection of the Biotechnology Department of the Metropolitan Autonomous University, Iztapalapa Unit, propagated in tubes with potato dextrose agar (Bioxon, Cuautitlan, Mexico) that were incubated at 30°C for four days and kept refrigerated at 4°C. The strain was re-spread every month in the same medium. We used low fat coffee bagasse (5% d.b.) provided by the Aceites Especiales, S.A. company in Toluca, Estado de Mexico, Mexico. The corn cobs were obtained from agricultural land in Jilotepec, Estado de Mexico, and ground in a Cemotec 1090 mill,* until 75% of the particles had a diameter between 0.84 and 1.39 mm (they went through a Tyler 12 screen, but were retained in a Tyler 20). The fermentations were carried out in a stainless steel, type 304, packed column bioreactor with a capacity for 12.1 L or 6.6 kg of humid substrate, constructed by the Biotechnology Laboratory (Faculty of Chemistry, Autonomous University of Queretaro). For the SSF of the coffee bagasse and corn cobs a complementary liquid nutritional medium was added to the substrate (g/L): glucose, 6; yeast extract, 15.8; (NH₄)₂SO₄, 2.5; KH₂PO₄, 2.4; MgSO₄•7H₂O, 0.3; FeSO₄•7H₂O, 0.1; CuSO₄•5H₂O, 0.08; packing density, 0.45 g/cm³; inoculum 1 × 10⁷ spores/g of dry substrate; air flow, 950 cm³/min; humidity, 55% (w/w); pH, 5.5; temperature, 30°C; and fermentation time, 48h.²²

aumento en la viscosidad del quimo por acumulación de agua de la FNA soluble (xilanos, galactoglucomananos, etc.), que disminuyen el tránsito intestinal y alteran la microflora presente; o bien, reducir la absorción de nutrientes y afectar la asimilación de ácidos grasos y aminoácidos.^{19,20}

La producción mundial de carne de pollo entre 1994 y 2001 creció 5.3% en promedio anual, mientras que la producción en México durante los últimos cinco años ha crecido a un ritmo anual de 5.8%.²¹ En México, la avicultura representa la principal industria transformadora de proteína vegetal a animal; en 2003 se estimó un consumo anual *per capita* de 22.4 kg de pollo, que representó un aumento de 3.5% respecto del año anterior.

Este estudio pretendió obtener complejos hemicelulolíticos con actividad principal de mananasa y xilanasas a partir de FES, usando residuos agroindustriales, y evaluar la capacidad de estos extractos enzimáticos para aumentar la energía metabolizable y mejorar el índice de conversión alimento/carne, por hidrólisis parcial de la fibra del alimento balanceado para pollo de engorda.

Material y métodos

Condiciones de fermentación

Se empleó la cepa *Aspergillus niger* GS1 aislada de copra, de la colección de cultivos del Departamento de Biotecnología, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, propagado en tubos de agar papa dextrosa (Bioxon, Cuautitlán, México), incubado a 30°C durante cuatro días y mantenido en refrigeración a 4°C. La cepa fue sembrada cada mes en el mismo medio. Se empleó bagazo de café bajo en grasa (5% b. s.), proporcionado por la compañía Aceites Especiales, S. A., Toluca, Estado de México, México. El olote de maíz se obtuvo de los campos agrícolas de Jilotepec, Estado de México, se molió en un molino Cemotec 1090,* hasta que 75% de las partículas mostró un diámetro entre 0.84 y 1.39 mm (pasó la malla Tyler 12, pero se retuvo en la 20). Las fermentaciones se hicieron en biorreactor de columna empacada de acero inoxidable tipo 304 con capacidad de 12.1 L o 6.6 kg de sustrato húmedo, hecho en el Laboratorio de Biotecnología (Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro). Para la FES del bagazo de café y olote de maíz, se adicionó un medio líquido nutritivo complementario al sustrato (g/L): glucosa 6, extracto de levadura 15.8, (NH₄)₂SO₄, 2.5, KH₂PO₄, 2.4, MgSO₄•7H₂O 0.3, FeSO₄•7H₂O 0.1, CuSO₄•5H₂O

*Tecator, Hoganas, Suecia.

Enzymatic extract

A 50 mM acetate buffer solution, pH 5.5, was added to the fermented product, at a 1:1.5 (v/v) ratio, and after mixing homogeneously, the crude extract was obtained from a hydraulic press at 13.8 MPa.* The filtrate was centrifuged at 15 000 g in a Beckman** centrifuge during 10 min at 4°C. The supernatant was concentrated by evaporation in a vacuum rotary evaporator,*** at 50°C. The hemicellulase complex was purified by precipitating with cold acetone (4°C) at a 1:3 ratio (extract:acetone) and re-suspending in a 20 mM acetate buffer solution, pH 5.5. Finally, the semi-purified extracts were filter-sterilized through a 0.22 µm membrane,† aseptically packaged and stored at 4°C. The extracts having mainly xylanase and mannanase activity were mixed (1:1, v/v) and 5% propylene glycol (w/v) was added to the mixture as a stabilizer.

The enzymatic activity was determined by quantifying reducing sugars,²³ released from a 0.5% solution of locust bean gum (galactomannan from *Ceratonia siliqua* seeds) and xylan (oat arabinoglucoxyran).‡

In vitro stability of the mannanase: xylanase mixture (MX) simulating the conditions of the digestive tract of the chicken

Two conditions of the digestive tract of the chicken were simulated in order to assess the stability and activity of the mannanase:xylanase (MX) activity. The first condition was in the presence of HCl-pepsin (pH 2.5), because the gastric protein digestion is carried out in the proventriculus and gizzard. A total of 15 mL of the MX mixture diluted with 20 mM HCl, pH 2.5 in a 1:10 (v/v) ratio, and 20 µL of porcine pepsin° (1 mg/mL) was used. The mixture was incubated at 35°C for 1 h, taking 50 µL samples every 10 min, to which 10 µL of a protease inhibitor cocktail* was added, plus 2 mL of a 20 mM acetate buffer solution, pH 5.0. The residual mannanase and xylanase activities were measured.

Trypsin pH 7.6 was used in the second condition in order to simulate the conditions of the small intestine, where the digestion is completed as well as where the digested nutrients are absorbed. A total of 15 mL of MX mixture diluted with 20 mM, pH 7.6 phosphate buffer solution at a 1:10 (v/v) ratio, were incubated at 35°C for 1 h with 20 µL of bovine trypsin** solution (1 mg/mL). Every 10 min 50 µL samples were taken and 10 µL of a protease inhibitor cocktail was added, plus 2 mL of a 20 mM, pH 5.0 acetate buffer solution. Finally, the residual mannanase and xylanase activities were measured.

0.08; densidad de empaque 0.45 g/cm³, inóculo 1 × 10⁷ esporas/g de sustrato seco, flujo de aire 950 cm³/min, humedad 55% (w/w), pH 5.5, temperatura 30°C, tiempo de fermentación 48h.²²

Extracto enzimático

Al producto fermentado se le agregó una solución amortiguadora de acetatos 50 mM, pH 5.5, en relación 1:1.5 (v/v) y después de mezclar homogéneamente, el extracto crudo se obtuvo mediante una prensa hidráulica a 13.8 MPa.* El filtrado se centrifugó a 15 000 g en centrífuga Beckman** durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se concentró por evaporación al vacío en un rotavapor,*** a 50°C. El complejo de hemicelulasas se purificó parcialmente por medio de precipitación con acetona en frío (4°C) en relación 1:3 (extracto:acetona), resuspendiendo el precipitado en solución amortiguadora de acetatos 20 mM, pH 5.5. Finalmente, los extractos semipurificados se esterilizaron por filtración con membrana de 0.22 µm de poro,† se envasaron asépticamente y se almacenaron a 4°C. Los extractos con actividad principal de xilanasa y mananasa se mezclaron (1:1, v/v), y a la mezcla se le adicionó propilenglicol a 5% (w/v) como estabilizante.

La actividad enzimática se determinó con la cuantificación de azúcares reductores,²³ liberados de una solución al 0.5% de algarrobo (galactomano de semillas de *Ceratonia siliqua*) y xilano (arabinoglucoxilano de avena).‡

Estabilidad de la mezcla mananasa: xilanasa (MX) in vitro, simulando condiciones del tracto digestivo de pollo

Se simularon dos condiciones del tracto digestivo de pollo para evaluar la estabilidad y la actividad de la mezcla mananasa:xilanasa (MX). La primera condición fue en presencia de HCl-pepsina (pH 2.5) ya que en proventrículo y molleja se efectúa la digestión gástrica de proteína. Se colocaron 15 mL de la mezcla MX diluida con solución de HCl 20 mM, pH 2.5 en relación 1:10 (v/v) y 20 µL de solución de pepsina porcina° (1 mg/mL). La mezcla se incubó a 35°C durante 1 h, tomando muestras de 50 µL cada 10 min, a las cuales se agregaron 10 µL de un cóctel

*Ercko mod. PH-51T, Aeroquip, Toluca, México.

**Mod. J2-MC, Wilmington, EUA.

***Büchi Mod. R-124, Flawil, Suiza.

†Millipore, Bedford, EUA.

‡Sigma, St. Louis, EUA.

°Sigma, Cat. No. P7000.

Digestibility in metabolic chambers

The MX mixture (437 mL) was diluted with distilled water up to 2.25 L, which was applied by sprinkling to a metric ton of feed. The feed was produced in the CEIEPA-UNAM from sorghum and soy (Table 1). The increase in humidity of the feed was not significant ($< 0.4\%$ w/w). a 2×2 factorial statistical design was used; one factor was the type of diet with two levels of raw protein (RP) and metabolizable energy (ME); the other was the addition or not of the enzyme. The treatments were identified as: normal diet (22% protein, 3 000 kcal ME/kg); normal diet + MX; diet with 3% less of RP and ME (21.34% protein, 2 910 kcal ME/kg); diet + MX with 3% less RP and ME.

A total of 120 one day old Hubbard $\times$ Ross strain male chicks were used,^{***} which were kept in Petersime metabolic chambers with controlled temperature. We carried out four replicates per treatment and each experimental unit consisted of ten chicks. Feed was provided freely from the day 1 to 21 of age. The response variables were: weight gain, feed intake, conversion index and mortality. The apparent ME was determined. Chromium oxide[†] was added to the feed at 0.2% (w/w) to serve as intake indicator. Feces were collected between 19 and 21 days of age, and chromium was quantified in the diet as well as the feces with atomic absorption spectroscopy.[‡] Crude energy was measured in the diets and the feces using an isoperibolic calorimeter.[°] The apparent ME was calculated by using the method proposed by Ravindran *et al.*,²⁴ and Lesson and Summers.²⁵

Effect of the enzymatic extract under commercial production conditions

The mannanase (M) and mannanase-xylanase mixture (MX) were evaluated, as well as the commercial product Avizyme® 1502* [A; a mixture of xylanase (600 U/g), protease (8 000 U/g) and amylase (800 U/g)], together with a commercial feed based on sorghum and soy paste.** We used a poultry house located in the town of San Juanico, Jilotepec municipality, Estado de Mexico, Mexico. An area of 100 m² was divided into 16 sections of 2.5 $\times$ 2.5 m each for rearing the chicks. The house and the handling instruments were washed and disinfected using a 1% sodium hypochlorite solution.

The M and MX enzymatic products (437 mL of each) were diluted with distilled water to 3.25 L and were applied by aspersion to a metric ton of feed. A total of 500 g of the dry product. A per metric ton of feed were mixed as recommended by the manufacturer.

A random statistical design was employed with four

inhibidor de proteasas,* más 2 mL de amortiguador de acetatos 20 mM, pH 5.0. Se midieron las actividades residuales de mananasa y xilanasa.

En la segunda condición se usó tripsina a pH 7.6, simulando las condiciones del intestino delgado, donde se completa la digestión, además de absorberse los nutrimentos digeridos. Se mezclaron 15 mL de la mezcla MX diluida con amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7.6 en relación 1:10 (v/v) con 20 μ L de solución de tripsina bovina** (1 mg/mL) y se incubaron a 35°C por 1 h. Cada 10 min se tomaron muestras de 50 μ L y se agregaron 10 μ L del coctel inhibidor de proteasas, más 2 mL de amortiguador de acetatos 20 mM, pH 5.0; finalmente, se midieron las actividades residuales de mananasa y xilanasa.

Digestibilidad en jaulas metabólicas

La mezcla MX (437 mL) se diluyó con agua destilada a 2.25 L, este volumen se aplicó mediante aspersion a una tonelada de alimento. Las dietas se elaboraron en el CEIEPA-UNAM a base de sorgo y soya (Cuadro 1). El aumento de humedad del alimento fue insignificante ($< 0.4\%$ w/w). Se usó un diseño estadístico factorial 2×2 ; un factor fue el tipo de dieta con dos niveles de proteína cruda (PC) y energía metabolizable (EM); otro fue la adición o no de enzima. Los tratamientos se identificaron como dieta normal (22% proteína, 3 000 kcal de EM/kg); dieta normal + MX; dieta con 3% menos de PC y EM (21.34% proteína, 2 910 kcal de EM/kg); dieta + MX, con 3% menos de PC y EM.

Se emplearon 120 pollitos machos de un día de edad de la estirpe Hubbard $\times$ Ross,^{***} alojados en jaulas metabólicas Petersime con temperatura controlada, usando cuatro réplicas por tratamiento, cada unidad experimental consistió de diez pollos. El alimento se proporcionó a libre acceso desde el primero hasta los 21 días de edad. Las variables de respuesta fueron: ganancia de peso, consumo de alimento, índice de conversión y mortalidad, respectivamente. Se determinó la EM aparente. Se adicionó óxido de cromo,[†] al 0.2% (w/w) al alimento, como indicador de su consumo. Se recolectaron excretas entre los 19 y 21 días de edad y se cuantificó el cromo en dietas y excretas por espectroscopia de absorción atómica.[‡] La energía bruta tanto en dietas como en excretas se midió con un calorímetro isoperibólico.[°] Para el cálculo de la EM aparente se

*Sigma, Cat. No. P2714.

**Sigma, Cat. No. T4665.

***Incubadora Atongo 2, Qro., Pilgrim's Pride®.

†Sigma, St. Louis, EUA.

‡Perkin Elmer Mod. AAnalyst 400, Shelton, EUA.

°Parr Mod. 1266, Graz, Austria.

Cuadro 1

FORMULACIÓN POR TONELADA DE LAS DIETAS NORMAL Y SUBNORMAL PARA POLLO
DE ENGORDA ETAPA “INICIADOR”

FORMULA PER METRIC TON OF NORMAL AND SUBNORMAL DIETS FOR BROILERS
IN “INITIATION” STAGE

Ingredient	Normal diet*	Subnormal diet**
	Quantity (kg)	Quantity (kg)
Sorghum, 9% PC	573.411	612.600
Soy paste, 48% PC	356.443	335.255
Orthophosphate	18.569	18.594
Calcium carbonate	14.425	14.482
Vegetal oil	27.830	8.835
Salt	4.393	4.394
DL-methionine	2.225	2.382
Mineral pre-mixture	1.000	1.000
Choline chlorate, 60%	1.000	1.000
L-lysine HCl	0.204	0.915
Vitamin pre-mixture	0.250	0.250
Antioxidant	0.150	0.150
Bacitracin zinc	0.100	0.100
L-threonine	0.044	0.044

*Estimated metabolizable energy, 3 000 kcal/kg; crude protein, 22%; lysine, 1.2%; methionine, 0.58%; threonine, 0.8 %.

**Estimated metabolizable energy, 2 910 kcal/kg; crude protein, 21.34%; lysine, 1.2%; methionine, 0.58%; threonine, 0.8 %.

treatments and four replicates: control (feed without enzyme); commercial diet + A; commercial diet + M and commercial diet + MX. Sixteen groups with 63 chicks each were created to balance the four treatments under assessment. All the enzymatic extracts were applied to the lots of balanced feed, which the supplier provided for each of the three different growth stages: initiation, development and finishing. A total of 1 008 one day-old male Ross HY-USA 3 strain chicks were used that came from the Atongo 2 incubation plant.* The experiment was conducted until the chicks reached 52 days of age. The feed was provided at free access during weeks one to three as well as week seven, while during weeks four to six access was only allowed from 7 am to 4 pm. The response variables were: weight gain, feed intake, conversion index and mortality.

Statistical analysis

In all *in vivo* experiments the JMP software version 3.0 (1995)²⁶ was used for the analysis of the results. To compare the means of the different treatments we used the Tukey-Kramer test ($\alpha = 0.05$).

empleó la metodología señalada por Ravindran *et al.*,²⁴ y Lesson y Summers.²⁵

Efecto del extracto enzimático bajo condiciones de crianza comercial

Se evaluaron los extractos enzimáticos de mananasa (M) y la mezcla mananasa-xilanasa (MX), así como el producto comercial Avizyme® 1 502* [A; que contiene una mezcla de xilanasa (600 U/g), proteasa (8 000 U/g) y amilasa (800 U/g)], con alimento comercial a base de sorgo y pasta de soya.** Se utilizó una caseta avícola ubicada en el poblado de San Juanico, municipio de Jilotepec, Estado de México, México. En un espacio de 100 m² de la caseta se efectuaron 16 divisiones de 2.5 × 2.5 m para la crianza. El local y los instrumentos de manejo se lavaron y se desinfectaron usando una solución de hipoclorito de sodio al 1%.

Los productos enzimáticos M y MX (437 mL cada uno) se diluyeron con agua destilada a 3.25 L y se aplicaron por aspersión a una ton de alimento. Se

*Finfeeds, Marlborough, UK.

**Pilgrim's Pride®, planta Colón, Querétaro, México.

Results

Stability of the MX extract under in vitro conditions within the digestive tract of broilers

When subjecting the MX mixture to acid conditions and in the presence of pepsin (secreted by the proventricle), throughout 60 min the mannanase activity had a loss rate of 480 UA/(L min), while the xylanase had a loss rate of 367 UA/(L min) (Figure 1). This corresponded to a loss of activity in 60 min of 8.2% and 20% for xylanase and mannanase, respectively. When using alkaline conditions for one h and in the presence of trypsin, the xylanase activity had a loss of 903 UA/(L min) (20%), while the mannanase lost only 223 UA/(L min) (9.3%) (Figure 2). Mannanase was stable at a wider pH range than xylanase, according to the partial characterization of both enzymes present in the MX mixture (results not shown).

Effect of the enzymatic extracts in the feed of poultry kept in metabolic chambers

The results accumulated at 21 days of age showed that the type of diet and the addition of enzymes did not significantly affect weight gain or feed intake (Table 2). On the other hand, the addition of MX enzymatic mixture caused a significant improvement in feed conversion, both in normal diets as well as in subnormal ones (Table 2). The results also showed that the interactions between the type of diet and the enzymatic mixture were not significant, i.e. the addition of MX to a normal or subnormal (3% less energy and crude protein) diet had similar results in terms of conversion index and ME.

The addition of the MX mixture significantly improved the ME with increases of 52 and 59 kcal/kg when added to the normal and subnormal diets, respectively. This represented a 2% increase in ME in the subnormal diet (2 969 kcal/kg to 3 028 kcal/kg) (Table 2).

Effect of the enzymatic extracts in the rearing of broilers in a chicken house

The addition of enzymatic extracts to the feed of broilers in a commercial chicken house allowed the comparison of the individual effect of the MX mixture, M, and the commercial additive (A) to determine which enzymatic additive would gain the best results. The accumulated results obtained at 52 days of age, in terms of weight gain, feed intake, feed con-

mezclaron 500 g del producto en polvo A por ton de alimento, según lo recomienda el fabricante.

Se empleó un diseño estadístico aleatorio, con cuatro tratamientos y cuatro réplicas: testigo (alimento sin enzima); dieta comercial + A; dieta comercial + M y dieta comercial + MX. Se formaron 16 grupos de 63 aves cada uno para balancear los cuatro tratamientos a evaluar. Todos los extractos enzimáticos se aplicaron a los lotes de alimento balanceado, que el proveedor suministró para las tres diferentes etapas de crecimiento del pollo: iniciador, desarrollo y terminador. Se emplearon 1 008 pollitos macho de un día de edad de la estirpe Ross HY-USA 3 provenientes de la incubadora Atongo 2.* El experimento se efectuó hasta que las aves alcanzaron 52 días de edad; el alimento se proporcionó a libre acceso en las semanas uno a tres y siete, mientras que de las semanas cuatro a seis fue con acceso restringido, de las 7:00 am a las 4:00 pm. Las variables de respuesta fueron: ganancia en peso, consumo de alimento, conversión alimentaria y mortalidad.

Análisis estadístico

En los experimentos *in vivo* se utilizó el software JMP versión 3.0 (1995)²⁶ para el análisis de los resultados. En la comparación de medias de los tratamientos se usó la prueba de Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$).

Resultados

Estabilidad del extracto MX bajo condiciones in vitro del tracto digestivo del pollo de engorda

Al someter la mezcla MX a condiciones ácidas y en presencia de pepsina (que se secreta en el proventrículo), a lo largo de 60 min la actividad mananasa registró una razón de pérdida de 480 UA/(L min), mientras que la de xilanasa registró una de 367 UA/(L min) (Figura 1). Esto correspondió en 60 min a una pérdida de actividad de 8.2% y 20% para xilanasa y mananasa, respectivamente. Al usar condiciones alcalinas durante una hora y en presencia de tripsina, la actividad de xilanasa se afectó al presentar pérdida de 903 UA/(L min) (20%), mientras que la mananasa perdió 223 UA/(L min) (9.3%) de actividad (Figura 2). La mananasa fue estable en un rango de pH más amplio que la xilanasa, según la caracterización parcial de ambas enzimas en la mezcla MX (resultados no mostrados).

*Pilgrim's Pride®, Querétaro, México.

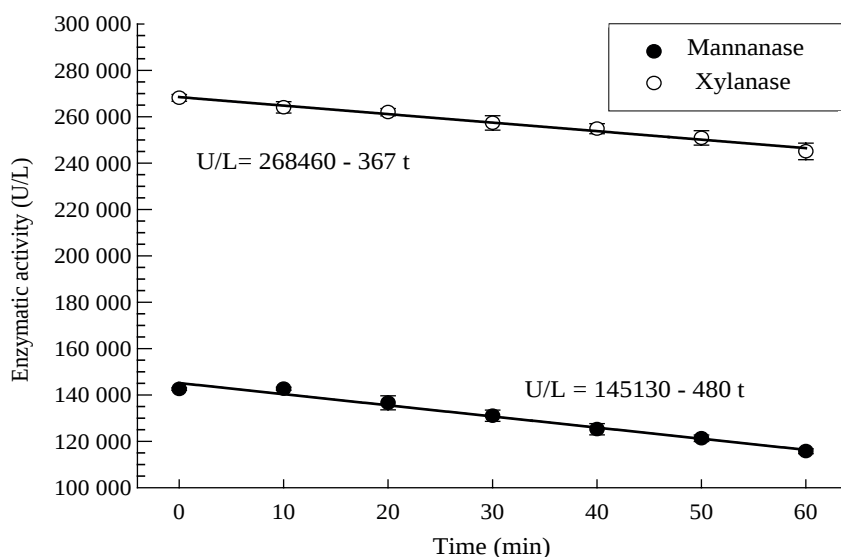


Figura 1. Comportamiento enzimático de la mezcla concentrada MX en presencia de HCl 20 mM, pH = 2.5 y pepsina (1 mg/mL).

Figure 1. Enzymatic behavior of the concentrated mixture MX in the presence of 20 mM HCl, pH = 2.5 and pepsin (1 mg/mL).

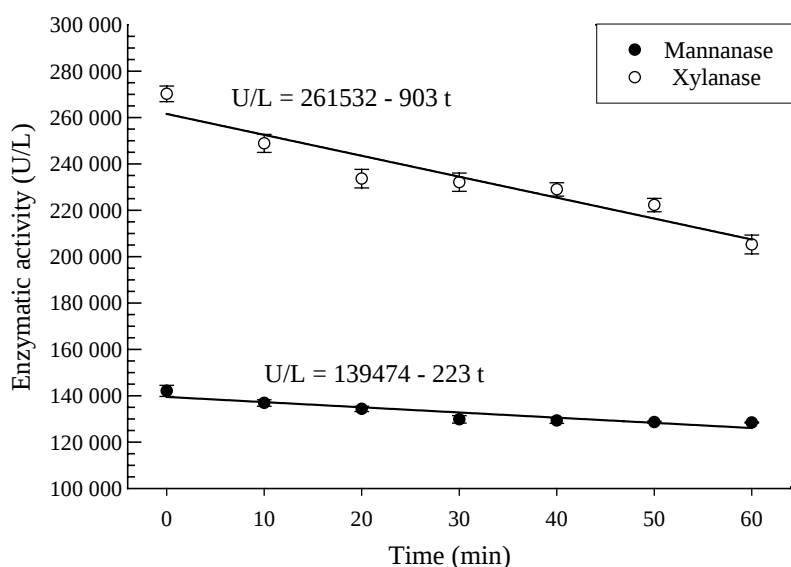


Figura 2. Comportamiento enzimático de la mezcla MX en presencia de amortiguador de fosfatos 20 mM, pH = 7.6 y tripsina (1 mg/mL)

Figure 2. Enzymatic behavior of the mixture MX in the presence of 20 mM pH = 7.6 phosphate buffering solution and trypsin (1 mg/mL)

version and accumulated mortality are shown in Table 3.

The M and MX extracts produced a significantly greater weight gain than the control groups, while the weight gain produced by A was similar to that of the control groups. Extract M produced a 6.9% weight gain while the addition of MX led to a 5.3% extra weight in relation to those broilers that received feed without enzymes (Table 3). When the means were compared, the enzymatic complex M produced a weight gain significantly greater than A, but similar to that produced by the addition of MX. Furthermore, the increase of weight due to the addition of A or MX did not show a significant difference (Table 3).

The addition of any of the enzymatic products (A, M or MX) did not significantly affect the consump-

Efecto de los extractos enzimáticos en la alimentación de pollos mantenidos en jaulas metabólicas

Los resultados acumulados a los 21 días de edad mostraron que el tipo de dieta y la adición de enzimas a la dieta no afectaron significativamente la ganancia de peso ni el consumo de alimento (Cuadro 2). Por otro lado, la adición de la mezcla enzimática MX ocasionó una mejora significativa en la conversión alimentaria, tanto en las dietas normales como en las subnormales (Cuadro 2). Los resultados mostraron, además, que las interacciones entre el tipo de dieta y la mezcla enzimática no fueron significativas; es decir, que la adición de MX a una dieta normal o subnormal (3% menos energía y proteína cruda)

tion of feed when compared to the controls. On the other hand, the M and MX extracts produced a better conversion index when compared to the controls and even when compared to the enzymatic additive A. This indicated a reduced intake of feed per kg of broiler meat obtained. There was no significant difference in the conversion index when extract M or MX were administered. From these results it can be concluded that the two enzymatic extracts produced through SSF in this research achieved better feed conversion to meat than the commercial product (A) that was assessed.

Discussion

Stability of the MX extract when simulating the digestive tract of broilers

The results observed in terms of the activity loss of xylanase and mannanase under acid and alkaline conditions indicated that the mannanase is an enzyme that better tolerates alkaline conditions, or that the pepsin could have hydrolyzed the Trp-360 residue which in the β -mannanase of *Pseudomonas cellulose* is important for linking to the substrate.²⁷ Furthermore, the xylanase lost its activity faster under alkaline conditions than under acidic solutions. This activity loss was difficult to assign to the effect of trypsin because it mainly attacks Lys and Arg residues, while Glu residues have been found to be the most important for the xylanase catalysis.^{28,29}

Effect of the enzymatic extracts in the diets of broilers kept in metabolic chambers

The experiment in metabolic chambers allowed us to determine that the use of enzymatic extracts

produjo resultados similares en cuanto al índice de conversión y la EM.

La adición de la mezcla MX mejoró significativamente la EM, al observarse un aumento de 52 y 59 kcal/kg, cuando se agregó a la dieta normal y subnormal, respectivamente, ello representó un incremento de 2% en la EM de la dieta subnormal (2 969 kcal/kg a 3 028 kcal/kg, Cuadro 2).

Efecto de los extractos enzimáticos en la crianza de pollo de engorda en caseta avícola

La adición de los extractos enzimáticos en la alimentación de pollos en caseta comercial permitió comparar el efecto individual de la mezcla enzimática MX, del extracto de mananasa (M), y del aditivo enzimático comercial (A), con el fin de determinar el tipo de aditivo enzimático que condujera a mejores resultados en una explotación comercial de pollo. Los resultados acumulados obtenidos a los 52 días de edad, en cuanto a ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimentaria y mortalidad acumulada, se muestran en el Cuadro 3.

Los extractos M y MX produjeron una ganancia de peso significativamente mayor que los grupos testigo, mientras que la de peso producida por A fue similar a la de los grupos testigo. El extracto M produjo 6.9% de ganancia de peso, mientras que cuando se administró MX se obtuvo 5.3% de peso extra, respecto de las aves que recibieron alimento sin enzimas (Cuadro 3). Al comparar los promedios, el complejo enzimático M produjo ganancia en peso mayor que A, pero similar a la producida por la adición de MX. Asimismo, el aumento de peso por la adición de A o de MX no mostró diferencia significativa (Cuadro 3).

La adición de cualesquiera de los tres productos

Cuadro 2

EFFECTOS DE LA MEZCLA ENZIMÁTICA MX EN DIETAS NORMALES Y SUBNORMALES
EN POLLOS DE ENGORDA A LOS 21 DÍAS DE EDAD
EFFECTS OF THE ENZYMATIC MIXTURE MX IN NORMAL AND SUBNORMAL DIETS
FOR BROILERS AT 21 DAYS OF AGE

Treatment	Weight gain (g)	Feed intake (g)	Feed conversion	Metabolizable energy
				(kcal/kg)
Normal diet	609.2 $\pm$ 25.6 ^a	832.0 $\pm$ 33.3 ^a	1.37 $\pm$ 0.01 ^a	3036 $\pm$ 7.8 ^a
Normal diet/ MX	621.2 $\pm$ 16.1 ^a	819.7 $\pm$ 17.3 ^a	1.32 $\pm$ 0.02 ^b	3088 $\pm$ 9.2 ^b
Subnormal diet	611.7 $\pm$ 17.5 ^a	872.3 $\pm$ 16.9 ^a	1.38 $\pm$ 0.05 ^a	2969 $\pm$ 4.2 ^c
Subnormal diet/MX	629.4 $\pm$ 8.4 ^a	846.4 $\pm$ 6.0 ^a	1.33 $\pm$ 0.02 ^b	3028 $\pm$ 4.3 ^a

The means are shown $\pm$ standard deviation.

Values with different letter indicate a significant difference ($P < 0.05$) according to the Tukey-Kramer test.

improved the feed conversion indexes. Although the feed intake was not reduced, the digestibility of energy was improved, which may favor a higher weight gain. The improvement in digestibility of hemicellulose associated with better digestibility of nutrients encapsulated within it, caused an increase in ME.

The interest caused by the use of hemicellulolytic enzymes as a digestive complement for monogastric animals is due to the improvement in digestion and absorption of nutrients.^{18,30} The partial hydrolysis of indigestible fiber (mannans, arabinoxylans, galactomannans and cellulose) present in corn, sorghum and soy paste would improve the interaction of the enzymes in the digestive tract (lipases and proteases) with their respective substrates (lipids and proteins). This would improve the assimilation of nutrients from the feed.^{31,32} Also, the absorption of some minerals such as iron and zinc could be improved because they would associate to a lesser degree with the fiber.³³

Soy paste contains 1.3% mannans,¹⁹ which when included in the subnormal diet (33.5% w/w) would provide approximately 0.38% of this polysaccharide. The content of glucuroarabinoxylan from sorghum is 2.1%, and when used in the diet at a proportion of 61.3% (w/w) would provide 0.34% of this heteropolysaccharide in the subnormal diet.²⁰ Therefore, the energy that can be provided by the full digestion of these polysaccharides is low, even by considering that the MX extract contained a slight cellulase and amylase activity (3.15 U/mL with carboxymethylcellulose as substrate, and 2.95 U/mL with potato starch as substrate, respectively). It was decided to apply mixture

enzimáticos (A, M y MX) no afectó significativamente el consumo de alimento comparado con el testigo. Por otro lado, los extractos M y MX produjeron mejor índice de conversión alimentaria comparados con el testigo e incluso respecto del aditivo enzimático A; ello indica un menor consumo de alimento por kg de carne de pollo obtenida. No hubo diferencia significativa en el índice de conversión producida cuando se administraron el extracto M o el extracto MX. De estos resultados se concluye que ambos extractos enzimáticos producidos por FES en la investigación, lograron mejor conversión de alimento a carne que el producto comercial evaluado (A).

Discusión

Estabilidad del extracto MX simulando el tracto digestivo del pollo de engorda

Los resultados observados para la pérdida de la actividad de xilanasa y mananasa bajo condiciones ácidas y alcalinas, indican que la mananasa es una enzima que tolera más las condiciones alcalinas, o bien que la pepsina pudiera haber hidrolizado el residuo de Trp-360, que al menos en la β -mananasa de *seuromonas cellulose* es importante en su enlazamiento al sustrato.²⁷ Por último, la xilanasa pierde más rápidamente actividad en condiciones alcalinas que en soluciones ácidas y la pérdida de actividad difícilmente pudiera atribuirse al efecto de la tripsina, ya que ésta ataca principalmente residuos de Lys y Arg, mientras que se ha encontrado que dos residuos de

Cuadro 3

COMPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS EN POLLO DE ENGORDA, BAJO CRIANZA EN CASETA A LOS 52 DÍAS DE EDAD

COMPARISON OF ENZYMATIC EXTRACTS IN BROILERS REARED IN CHICKEN HOUSES AT 52 DAYS OF AGE

<i>Treatment</i>	<i>Weight gain (g)</i>	<i>Feed intake (g)</i>	<i>Feed conversion*</i>
Normal diet	2930.6 $\pm$ 24.7 ^a	4986.5 $\pm$ 37.6 ^a	1.70 $\pm$ 0.02 ^a
Normal diet/additive A [†]	2989.2 $\pm$ 64.0 ^{a,c}	4954.3 $\pm$ 88.9 ^a	1.66 $\pm$ 0.02 ^a
Normal diet/extract M [‡]	3131.7 $\pm$ 41.6 ^b	4843.7 $\pm$ 34.7 ^a	1.55 $\pm$ 0.03 ^b
Normal diet/extract MX [§]	3085.5 $\pm$ 52.7 ^{b,c}	4883.5 $\pm$ 59.0 ^a	1.58 $\pm$ 0.01 ^b

*g feed/g weight.

[†]Avizyme® 1502.

[‡]Enzyme extract with a main activity of mannanase (144 U/mL).

[§]Enzyme extract with xylanase (299.0 U/mL) and mannanase (126.5 U/mL) activity.

The means are shown $\pm$ standard deviation.

Values with different letter indicate a significant difference (P < 0.05) according to the Tukey-Kramer test.

MX in this experiment due to its high enzymatic activity (299 U/mL xylanase and 126.5 U/mL mannanase), while extract M showed only mannanase activity (144 U/mL).

It is possible that the effectiveness of the enzymatic extract MX, in terms of productivity indexes, could be due to favoring partial digestion of the hemicellulose fraction, allowing a better digestibility of some other nutrients, including lipids and proteins. This could be attributed to the ease of obtaining better enzyme-substrate interactions. When part of the hemicellulose is hydrolyzed, it can no longer enhance a partial encapsulation of some nutrients, favoring the action of other digestive enzymes such as lipases, proteases and amylases. The overall result of these events would be a better digestion and assimilation of nutrients in the intestine of the chicken. When the hemicellulose fraction was partially hydrolyzed the action of bile was favored due to a reduction in the encapsulating effect of this fraction; therefore, there was an increase in the digestibility of lipids in the diet.^{34,35} The increase in metabolizable energy that was observed when feeding broilers with normal and subnormal diets in metabolic chambers during 21 days was attributed to the aforementioned reason.

Effectiveness of the enzymatic extracts in broilers finished in a commercial chicken house

According to the results obtained in commercial rearing with sorghum and soy paste based diets we conclude that the enzymatic complex, which showed mainly mannanase activity (M), was the most appropriate for use in a commercial broiler production setting. The production of the enzymatic extract M would be more economical and feasible compared to the mannanase:xylanase mixture (MX extract). This is because the production of each ingredient of the mixture MX would require two fermentations, while for the production of extract M only the fermentation of partially fat reduced coffee bagasse as substrate and culture medium is needed. It is possible that the mannanase:xylanase mixture could show better results when applied to another type of diet based on barley or wheat because these cereals have a greater content of arabinoxylans.

Acknowledgements

We thank funding from SIHGO-Conacyt (Project 20000201002), as well as the Conacyt scholarship to ILB.

Glu son los más importantes para la catálisis de varias xilanasas.^{28,29}

Efecto de los extractos enzimáticos en dietas de pollos mantenidos en jaula metabólica

El experimento en jaulas metabólicas permitió determinar que, como consecuencia del uso de los extractos enzimáticos, se mejoraran los índices de conversión alimentaria; esto es, a pesar de no haberse disminuido el consumo de alimento, se mejoró la digestibilidad de la energía, lo cual puede favorecer mayor ganancia de peso. La mejora en la digestibilidad de la hemicelulosa, asociada a mejor digestibilidad de nutrimentos encapsulados por ésta, propició un incremento en la EM.

El interés suscitado por el uso de enzimas hemicelulolíticas como complemento digestivo de animales monogástricos, se debe a que se mejora la digestión y absorción de nutrimentos.^{18,30} El incremento en la digestibilidad de la fibra indigerible (mananos, arabinoxilanos, galactomananos, celulosa) presente en maíz, sorgo y pasta de soya, mejoraría la interacción de las enzimas naturales del tracto digestivo (lipasas y proteasas) con sus respectivos sustratos (lípidos y proteínas), mejorando la asimilación de los nutrimentos del alimento.^{31,32} Además, pudiera también mejorarse la absorción de algunos minerales, como hierro y zinc, ya que se asociarían en menor proporción con la fibra.³³

La pasta de soya contiene 1.3% de mananos,¹⁹ que incluido en la dieta subnormal (33.5%, w/w), aportaría aproximadamente 0.38% de este polisacárido. El contenido de glucuroarabinoxilano del sorgo es de 2.1% y su uso en la dieta es 61.3% (w/w), por lo cual aportaría a la dieta subnormal 0.34% de este heteropolisacárido.²⁰ Con estos dos valores, la energía que puede aportar la digestión completa de estos polisacáridos es baja, aun cuando el extracto enzimático MX contenía ligera actividad de celulasa y amilasa (3.15 U/mL con carboximetilcelulosa y 2.95 U/mL al usar almidón de papa como sustratos, respectivamente). Se decidió aplicar en este experimento la mezcla MX debido a su elevada actividad enzimática (299 U/mL xilanasa y 126.5 U/mL de mananasa), comparada con el extracto M con sólo actividad de mananasa (144 U/mL).

Es probable que la efectividad del extracto enzimático MX, en cuanto a índices de productividad, se deba a que se favorece la digestión de la fracción hemicelulósica, lo que permite una mejor digestibilidad de algunos otros nutrimentos, incluidos lípidos y proteínas. Esto último pudiera atribuirse a la facilidad de obtener mejor interacción sustrato-enzima. Al degradarse parte de la hemicelulosa que

Referencias

1. Moo-Young M, Moreira AR. Principles of solid-substrate fermentation. In: Smith JE, Berry DR, editors. The filamentous fungi. London:Edward Arnold, 1983: 117-144.
2. Rimbault M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. J Biotechnol 1998;1:4-28.
3. Mitchell D, Krieger N, Stuart D, Pandey A. New developments in solid-state fermentation, II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. Process Biochem 2000;35:1211-1225.
4. Pandey A, Soccol C, Mitchell D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. Process Biochem 2000;35:1153-1169.
5. Perez-Guerra A, Torrado-Agrasar C, Pastrana L. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. Electron J Environ Agric Food Chem [serial online] 2003 May-Jun; 2 (3): [8 screens]. Available from: URL: <http://ejeafche.uvigo.es/about.htm>
6. Regalado C, Garcia-Almendarez BE, Venegas-Barrera LM, Téllez-Jurado A, Rodríguez-Serrano G, Huerta-Ochoa S, *et al.* Production, partial purification and properties of β -mannanases obtained by solid substrate fermentation of spent soluble coffee wastes and copra paste using *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. J Sci Food Agric 2000;80: 1343-1350.
7. Clifford MN. Green and toasted coffee beans. Process Biochem 1975;15:13-19.
8. Stålbrand H. Enzymology of endo-1,4- β -mannanase. In: Whitaker JR, Voragen AGJ, Wong DWS, editors. Handbook of food enzymology. New York:Marcel Dekker, 2003:879-961.
9. Pellerin P, Gosselin M, Lepoutre JP, Samain E, Debeire P. Enzymic production of oligosaccharides from corn cob xylan. Enzyme Microb Technol 1991;13:617-623.
10. Biely P. Xylanolytic enzymes. In: Whitaker JR, Voragen AGJ, Wong DWS, editors. Handbook of Food Enzymology. New York: Marcel Dekker, 2003:879-961.
11. Brand D, Pandey A, Rodriguez-Leon JA, Roussos S, Brand I, Soccol CR. Packed bed column fermenter and kinetic modeling for upgrading the nutritional quality of coffee husk in solid-state fermentation. Biotechnol Prog 2001;17:1065-1070.
12. Gübitz GM, Haltrich D, Latal B, Steiner W. Mode of depolymerization of hemicellulose by various mannanase and xylanases in relation to their ability to bleach softwood pulp. Appl Microbiol Biotech 1997;47:658-662.
13. Wong KKY, Saddler JN. Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries. In: Coughlan MP, Hazlewood GP, editors. Hemicellulose and hemicellulases. London:Portland Press, 1993:127-143.
14. McNaughton J, Hsiao H, Anderson D, Fodge D. Corn/Soy/Fat diets for broilers, beta-mannanase, and improved feed conversion. South Poult Sci 1998;78:119-121.
15. Fodge DW, Hsiao H, inventors. Chemgen Corporation, proprietary. Hemicellulase use in feeds with low caloric content. United States Patent 6,162,473. 2000 December 19.
16. Apajalahti J, Rautonen N, Bedford MR, inventors. Finfeeds International, proprietary. An additive for an animal feed. Gran Bretaña, EP 1237569 B1. 2003 August 27.
17. Elsenhans B, Süfke U, Blume R, Caspary WF. The influence of carbohydrate gelling agents on rat intestinal transport of monosaccharides and neutral amino acids *in vitro*. Clin Sci 1980;59:373-380.
18. Cortés CA, Águila SR, Avila GE. La utilización de enzimas como aditivos en dietas para pollos de engorda. Vet Méx. 2002;33:1-9.

Efectividad de los extractos enzimáticos en pollos engordados en caseta comercial

De acuerdo con los resultados obtenidos en la crianza comercial con dietas a base de sorgo y pasta de soya, se concluye que el complejo enzimático, cuya principal actividad fue de mananasa (M), resultó el más apropiado para usarse en una explotación avícola comercial. La producción de este extracto enzimático sería más económica y factible comparada con la mezcla mananasa:xilanasa (extracto MX), pues para obtener cada ingrediente de esta mezcla se requieren dos fermentaciones, mientras que para el extracto M sólo se necesita la fermentación obtenida del bagazo de café parcialmente desgrasado utilizado como sustrato y medio de cultivo. Quizá la mezcla mananasa:xilanasa muestre mejores resultados al aplicarse en algún otro tipo de dieta basada en cebada o trigo, ya que estos cereales presentan un mayor contenido de arabinoxilanos.

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento de SIHGO-Conacyt (Proyecto 20000201002) y la beca otorgada por el Conacyt a Ignacio Lagunas Bernabé.

19. Bühler M, Limper J, Müller A, Schwarz G, Simon O, Sommer M, *et al.* Las enzimas en la nutrición animal. Bonn: Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernährung (AWT), 1998.
20. Fodge DW, Anderson DM, inventors. Chemgen Corporation, proprietary. Hemicellulase supplement to improve the energy efficiency of hemicellulose-containing animal feed. United States Patent 5,429,828. 1995 julio 4.
21. UNA, Avicultura mexicana: monografía. Unión Nacional de Avicultores de México. 1999 [cited 2004 May 10; 1(2): [6 screens]. Available from: URL: <http://www.una.com.mx/content/avicultura/avi01.htm>, 10/05/2004.
22. Lagunas BI. Producción de extractos enzimáticos por fermentación sólida y su aplicación en alimento balanceado para pollo de engorda (tesis de maestría). Querétaro (Querétaro) México: Univ Aut de Querétaro, 2004.
23. Sinner M, Puls J. Non-corrosive dye reagent for detection for reducing sugars in borate complex-ion-exchange chromatography. *J Chromatogr* 1978;156: 197-204.
24. Ravindran V, Selle PH, Ravindran G, Morel PCH, Kies AK, Bryden WL. Microbial phytase improves performance, apparent metabolizable energy, and ileal amino acid digestibility of broilers fed a lysine-deficient diet. *Poult Sci* 2001;80:338-344.
25. Lesson S, Summers JD. Scott's Nutrition of the chicken. 4th ed. Guelph, Ontario Canada University Books, 2001.
26. JMP (statistical software) version 3.0. Cary (NC): SAS Institute, 1995.
27. Hogg D, Woo EJ, Bolam DN, McKie VA, Gilbert HJ, Pickersgill W. Crystal structure of mannanase 26A from *Pseudomonas cellulose* and analysis of residues involved in substrate binding, *J Biol Chem* 2001;276:31186-31192.
28. Coughlan MP. Towards an understanding of the mechanism of action of main chain-hydrolyzing xylanases. In: Visser J, Beldman G, Kusters-van Someren MA, Voragen AGJ, editors. *Xylans and xylanases. Progress in Biotechnology.* Amsterdam: Elsevier, 1992:111-139.
29. Yaguchi M, Roy C, Ujie M, Watson DC, Wakarchuk W. Amino acid sequence of the low-molecular-weight xylanase from *Trichoderma viride*. In: Visser J, Beldman G, Kusters-van Someren MA, Voragen AGJ, editors. *Xylans and xylanases. Progress in Biotechnology.* Amsterdam: Elsevier, 1992;7:149-154.
30. Han Z. Effect of enzyme supplementation of diets on the physiological function and performance of poultry. Marquardt RR, Han Z, editors. *Enzymes in poultry and swine nutrition.* Toronto: IDRC, 1997:65-78.
31. Bedford MR, Morgan AJ, Clarkson K, Schulze HK, inventors. Genencor International and Finfeeds International, proprietaries. Enzyme feed additive and animal feed. United States Patent 5,612,055. 1997 March 18.
32. Zanella I, Sakomura NK, Silversides FG, Figueirido A, Pack M. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. *Poult Sci* 1999;78:561-568
33. Walsh GA, Power RF, Headon DR. Enzymes in the animal-feed industry. *Trends Biotechnol* 1993;11:424-429.
34. Leeson S, Caston L, Summers JD. Broiler response to energy or energy and protein dilution in the finisher diet. *Poult Sci* 1996;75:522-528.
35. Leeson S, Summers JD. Commercial poultry nutrition. 2nd ed. Guelph: University Books, 1997.