



Nova Scientia

E-ISSN: 2007-0705

nova_scientia@delasalle.edu.mx

Universidad De La Salle Bajío

México

López O, José C.; Hernández C, Luz M.; Qi, Meng; McAllister, Tim
Evaluación de una esterasa de ácido ferúlico (Fae1A) aislada del hongo del rumen
Anaeromyces mucronatus sobre la degradación de la pared celular del heno de alfalfa y
paja de trigo: Ensayo In vitro
Nova Scientia, vol. 7, núm. 14, 2015, pp. 45-56
Universidad De La Salle Bajío
León, Guanajuato, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=203338783005>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Revista Electrónica Nova Scientia

Evaluación de una esterasa de ácido ferúlico
(Fae1A) aislada del hongo del rumen
Anaeromyces mucronatus sobre la degradación de
la pared celular del heno de alfalfa y paja de trigo:
Ensayo In vitro
Evaluation of a feluric acid esterase (Fae1A)
isolated from rumen fungus *Anaeromyces*
mucronatus on the degradation of the cell wall of
alfalfa hay and wheat straw: *In vitro* assay

**José C. López O¹, Luz M. Hernández C¹, Meng Qi² y Tim
McAllister²**

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Tlaxcala

²Lethbridge Research Centre, Alberta Canadá

México-Canadá

Luz M. Hernández-Calva. E-mail: marinahc@yahoo.com

Resumen

Las esterases de ácido ferúlico son capaces de liberar compuestos fenólicos de la pared celular vegetal, aumentando el acceso a los polisacáridos. Se realizaron determinaciones *In vitro* con la finalidad de determinar el potencial de una esterasa de ácido ferúlico (Fae1A) aislada del hongo del rumen *Anaeromyces mucronatus*. Esta esterasa se obtuvo de un trabajo previo realizado en el Centro de Investigación de Lethbridge, Alberta Canadá, a través de procesos de clonación y hetero-expresión del gen *Fae1aA* en una cepa de *E. coli* BL21. Tres niveles (0, 9 y 18 mg) de proteína contenida en la enzima se combinaron con líquido ruminal e incubaron en 2 diferentes fuentes de fibra (heno de alfalfa y paja de trigo) utilizando 15 repeticiones por tratamiento. La inclusión de la enzima incrementó ($P < 0.05$) la desaparición de la materia seca en el heno de alfalfa, liberándose más cantidad ($P < 0.01$) de azúcares reducidos (AR) a las 4 y 12 h. Fae1A liberó más compuestos fenólicos del heno de alfalfa vs. la paja de trigo. Los compuestos fenólicos totales e individuales liberados de la alfalfa se incrementaron con el nivel de enzima añadida. En la paja de trigo, el ácido ferúlico se duplicó en comparación con el ácido p-cumárico. En conclusión, la adición de la Fae1A mejoró la cantidad de azúcares reducidos y se liberaron compuestos fenólicos en el heno de alfalfa y la paja de trigo, lo que indica su potencial para ser usada como enzima fibrolítica y mejorar la digestibilidad de la fibra en los rumiantes.

Palabras clave: Enzimas fibrolíticas, fermentación *In vitro*, fenoles

Recepción: 06-08-2014

Aceptación: 30-01-2015

Abstract

Ferulic acid esterases are capable of releasing phenolic compounds of the plant cell wall, increasing access to polysaccharides. *In vitro* determinations were performed in order to estimate the potential for ferulic acid esterase (Fae1A) isolated from rumen fungus *Mucronatus Anaeromyces*. This esterase was obtained from a previous study conducted in the Lethbridge Research Center, Alberta Canada, through cloning processes and hetero-expression of *Fae1A* gene in a strain of *E. coli* BL21. Three levels (0, 9 and 18 mg) of protein contained in the enzyme

were combined with rumen fluid and incubated in 2 different fiber sources (alfalfa hay and wheat straw) using 15 replicates per treatment. The inclusion of the enzyme increased ($P < 0.05$) the disappearance of dry matter in alfalfa hay, releasing more quantity ($P < 0.01$) of reducing sugars (AR) at 4 and 12 h. Fae1A released more phenolic compounds vs. alfalfa hay wheat straw. Total and individual phenolic compounds released from alfalfa were increased according to the level of enzyme added. In the wheat straw, ferulic acid was double compared to the p-coumaric acid. In conclusion, the addition of Fae1A improved the amount of reduced sugars and phenolic compounds were released into the alfalfa hay and wheat straw, indicating its potential for use as a fibrinolytic enzyme and improve the digestibility of the fiber in the ruminant.

Keywords: fibrolytic enzymes, Fermentation *In vitro*, phenols

Introducción

Las paredes celulares de las plantas están formadas por un complejo de polisacáridos y compuestos fenólicos (CF) (Jung et al., 1991). Principalmente la lignina y su asociación con los carbohidratos limitan el acceso de las enzimas degradantes de polisacáridos (EDP) y en consecuencia obstaculizan la hidrólisis enzimática de la celulosa y la hemicelulosa en las paredes celulares de la planta (Cheng et al., 2009). La EDP tales como celulasas, beta-glucanasa y xilanasas se han utilizado como aditivos en las dietas de los rumiantes con el objetivo de mejorar la digestibilidad, pero los resultados han sido muy variables (Beauchemin et al. 2004; Mendoza et al. 2014). Wang et al. (2004) mencionan a la esterasa como una de las EDP con mejor eficiencia en la digestión microbiana y la degradación de las paredes celulares.

Los hongos del rumen ocupan del 8 al 20% de la biomasa microbiana en dietas con forraje (Rezaeian et al., 2004). Específicamente *Anaeromyces*, *Orpinomyces*, *Caecomycetes*, *Piromycetes*, y *Neocallimastix spp.* tienen actividades enzimáticas hidrolíticas en la degradación de la fibra (Nagpal et al., 2011). Qi et al. (2011) han identificado una esterasa ferúlica (Fae1A del hongo rumen *Anaeromyces mucronatus*) que desdobla ácido ferúlico (AF) y el ácido p-cumárico (APC), en dietas experimentales con paja de cebada. El AF está ligado a diversos polisacáridos y lignina, por enlaces éster, unidos a arabinoxilano; éste complejo ejerce un efecto negativo sobre el grado de digestión de la celulosa (McAllister y Wang, 2002). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de una nueva enzima esterasa de AF (Fae1A) sobre la hidrólisis en heno de alfalfa y paja de trigo.

Material y Métodos:

Producción de la enzima

Se utilizó una cepa Fae1A esterasa, proporcionada por el Laboratorio de Ciencia Animal del Centro de Investigación Lethbridge, Alberta Canadá. Dicha cepa proviene del aislamiento del hongo *A. mucronatus*, clonada y hetero-expresada en una cepa de *E. coli* (BL21-DE3). Los detalles del aislamiento, caracterización y clonación están descritos en un trabajo previo publicado por Qi et al (2011).

El estudio se realizó en el centro de investigación canadiense ya citado. Como rutina del presente trabajo experimental, la cepa de *E. coli* BL21-DE3 se cultivó en 1L de caldo de Luria-Bertani más 100 g/mL de kanamicina incubada a 37°C a una densidad óptica de 600 nm, en

aproximadamente 3 h. Se agregó isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido, hasta alcanzar una concentración final de 1 mM. Posteriormente la temperatura de incubación se descendió a 22 °C durante 15 h, y las células se obtuvieron por centrifugación a 5000 G por 15 min. Los sedimentos celulares se re-suspendieron en 25 mL de solución buffer con 20 mM de fosfato de sodio (pH 8,0) que contenía 10 mM de imidazol, 300 mM de NaCl y un inhibidor de proteasa libre de etil-diaminotetraácetico. Las células se lisaron en un proceso de 3 pases con una prensa de origen francesa (SLM Instruments Inc, Urbana, IL) a una presión de 105 kPa. Los restos celulares, incluyendo cuerpos de inclusión, se eliminaron por centrifugación (15.000 x g, 30 min, 4 ° C). El sobrenadante del extracto celular se colocó en una columna de níquel NTA (Qiagen), lavándose dos veces con un buffer, preparado con 20 mM de imidazol, 20 mM fosfato de sodio, y 300 mM de NaCl. Ésta solución fue regulada a un pH de 8.0 en el medio de cultivo para *E. coli*, con el propósito de obtener aproximadamente la cantidad de 450 mg de la enzima Fae1A esterasa.

Identificación de la enzima

La proteína de la esterasa Fae1A se identificó en 10% de sulfato de sodio dodecil por electroforesis en un gel de poliacrilamida, técnica descrita por Laemmli (1970). La concentración de proteína, en el buffer con la enzima Fae1A, se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad® Lab. Inc.), utilizando *albúmina* de suero bovino como estándar para la calibración. La enzima Fae1A con valor promedio 9.0 mg/mL de proteína se almacenó a -20 °C antes de ser utilizada.

Degradación ruminal *In vitro*

Se prepararon 6 tratamientos, cada uno con 15 repeticiones. Estos fueron: **1)** heno de alfalfa (HA), **2)** HA + 1 mL de la enzima Fae1A (9 mg proteína/mL) (HAE1), **3)** HA + 2 mL de la enzima Fae1A (18 mg proteína/2 mL) (HAE2), **4)** paja de trigo (PT), **5)** PT + 1 mL de la enzima Fae1A (9 mg proteína/mL) (PTE1), **6)** PT + 2 mL de la enzima Fae1A (18 mg proteína/2 mL) (PTE2).

En el procedimiento se pesaron 100 mg de cada sustrato de HA y PT. Posteriormente a cada tubo de 20 mL con tapón de baquelita (Kimax®), se le agregó 2mL de líquido ruminal liofilizado, 5 mL (0.1M) de acético buffer (pH 4.5) con 0.01% (p/v) de sodio azida, como agente antimicrobiano y 1 o 2 mL de la enzima Fae1A según el tratamiento. A los tratamientos testigo y

con un mL de la enzima se les agregó agua deionizada estéril para aforar a 9 mL. Se agregaron 10 tubos más, solo con líquido ruminal y el buffer como referencia de corrección en las variables de respuesta de los tratamientos.

El líquido ruminal se obtuvo de 2 novillos alimentados con una dieta ensilaje y grano de cebada, directamente de la cánula ruminal, éste se filtró en 4 capas de gasa y se centrifugó (1000 xg, 4 °C, 10 min) para eliminar las partículas de alimento. El sobrenadante se sonificó con tres pulsos de 30 y 15 s, separados por intervalos, en un procesador de Vibra-Cell (Sonic & Materials, Inc. Newtown, CT USA).

Los tubos con las muestras se mezclaron, se taparon y se incubaron a 39 °C colocados sobre una plancha con agitación. Posteriormente alícuotas de 500 µL de la fracción líquida, se tomaron a las 4, 8, 12 y 24 h de incubación, e inmediatamente se hirvieron durante 10 min para desactivar las enzimas.

Determinación de reducción de azúcares y compuestos fenólicos

Las alícuotas se analizaron con la técnica de reducción de azúcares (RA) usando el método descrito por Wang et al. (2004). Posterior a 24 h de la incubación, las mezclas se centrifugaron a 5,000 x G por 20 min, y los sedimentos se secaron por liofilización durante 48 h para determinar la degradación de la materia seca (DMS) y CF. Los CF totales de la materia seca residual se expresó como equivalentes de AF, determinado por el método descrito por Lau y Van Soest (1981) y modificado por Wang et al (2004). El AF, APC y ácido sinapínico (AS) se calcularon con estándares de cada ácido fenólico y se expresaron en g/mg de MS residual; éstos se determinaron con un equipo HPLC de fase inversa utilizando una columna C18 HPLC-Ascentis (250 x 4,6 mm) (Sigma-Aldrich). Diez microlitros de muestra se inyectaron, utilizando un gradiente de acetonitrilo (20 a 50%) en una solución de ácido acético al 2%.

Análisis y modelo estadístico

El experimento se diseñó con un arreglo en bloques al azar, con el fin de identificar el sustrato y 3 niveles de proteína proporcionados por la enzima (0, 9 y 18). Se utilizó el procedimiento Mixed de SAS Institute (2007) con el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_i + \sigma_j + \beta_i \times \sigma_j + \varepsilon_{ijk}$$

Donde Y_{ijk} es el valor de cada observación individual para la variable dependiente, μ la media general, β_i e tipo de sustrato i ($i = 1, 2$), σ_j el efecto del nivel de proteína en j enzima ($= 0, 1, 2$), $\beta_i \times \sigma_j$ la interacción i sustrato y la j nivel de proteína en la enzima xj y ε_{ijk} el error residual. Las medias de los tratamientos se compararon en cada punto de tiempo de incubación. Las diferencias significativas entre los tratamientos se calcularon con el procedimiento LSMEANS con la opción PDIF.

Resultados y Discusión

Purificación de la esterasa recombinante Fae1A de E. Coli

La esterasa se purificó con un peso molecular aproximado de 40 kDa. Se determinó con SDS-PAGE a través de una banda principal que correspondió al tamaño esperado Fig. 1.

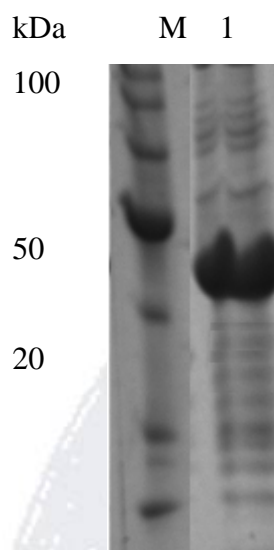


Fig. 1 SDS-PAGE: Análisis del sobrenadante de E coli BL21 (DE3) conteniendo células lisadas y purificadas. Línea M, estándar de proteína molecular como marcador, indicado a la derecha. Línea 1, indica la proteína BL21.

Otras esterases de AF se han reportado con diferentes pesos moleculares, por ejemplo, la expresión de proteínas en *E. coli* Xyn10D-Fae1A (identificado en *Prevotella ruminicola*) fue de aproximadamente 124 kDa y el peso molecular de un monómero de Su-Xyn10D-Fae1A fue ~ 84 kDa (Dodd et al., 2009). Las enzimas feruloyl esterases aisladas y purificadas de *Neocallimastix* MC-2 tienen pesos moleculares de 69 y 24 kDa para FAE-I y FAE-II respectivamente (Borneman et al., 1992).

Degradación de Materia Seca y reducción de azúcares

El heno de alfalfa y la paja de trigo, inoculadas con los dos niveles de proteína contenidos en la enzima, mostraron diferencias significativas en la DMS y RA, durante los diferentes tiempos de incubación. Tabla 1.

Tabla 1. Efecto de la esterasa ácido ferúlico (Fae1A) en heno de alfalfa y paja de trigo en la desaparición de materia seca (DMS) y reducción de azúcares (RA)

Tratamientos §	<i>In vitro</i> DMS	Reducción de azúcares ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		
	$\text{g } 100\text{g}^{-1}$			
	24h	4h	12h	24h
Heno de alfalfa (HA)	61.09b	787.98c	2345.47e	692.8c
HA + E1 (HAE1)	64.14c	1017.16d	3038.91f	118.67a
HA + E2 (HAE2)	62.90c	918.46b	1719.12d	108.2a
Paja de trigo (PT)	13.17a	133.07a	1508.87c	170.17b
PT + E1 (PTE1)	13.50a	495.09b	1129.95b	143.35a
PT + E2 (PTE2)	13.90a	115.15a	882.18a	92.31a
EEM	0.47	21.69	21.69	21.69

§Todos los tratamientos fueron incubados con líquido ruminal en buffer. E1 y E2: 9 y 18 mg de proteína proporcionado por la enzima Fae1A. EEM: Error estándar de la media.

^{a-f} Diferentes letras entre tratamiento y horas muestran diferencia significativa ($P < 0.05$)

La DMS en el tratamiento con HA mejoró en un 4 y 3% con la adición de 9 y 18 mg de proteína contenida en la enzima Fae-1A ($P<0.05$), en el caso de la PT la adición de ambas cantidades de enzima no tuvo efecto sobre la DMS ($P>0.05$). Los valores de RA en el HA entre los tiempos de incubación de 4 y 12h incrementaron en un 29% con la adición de ambos niveles de enzima ($P<0.05$). No hubo diferencias a las 24h de incubación, incluso el tratamiento con HA sin enzima presentó mayor contenido de RA, esta respuesta fue a la rápida acción que actuó la enzima, mientras que en el testigo tuvo un efecto más retardado debido a la acción de los microorganismos ruminales viables hasta este tiempo y a la presencia del sustrato. En la PT la respuesta a la RA fue diferente, los dos niveles de enzima utilizados no mejoraron la reducción de azúcares en los 3 tiempos de estudio, e incluso hubo una interacción significativa entre el sustrato y las concentraciones de RA ($P<0.05$). Esta respuesta se asocia a las diferencias de la estructura en la pared celular de ambos sustratos, la PT contiene más pared celular que el HA, resultando una mejor degradación en el sustrato de alfalfa que de trigo. Específicamente, la PT contiene más celulosa y la hemicelulosa (xilano principalmente) junto con compuestos aromáticos incluyendo la lignina. El xilano es una cadena lineal de (1-4), combinado con residuos de β -D-xilopiranosilo, que puede ser altamente sustituido por varios grupos, incluyendo uronyl, arabisosyl, y O-acetilo. La biodegradación de xilano esterasas actúa conjuntamente con la xilanasa para liberar los grupos sustituidos en la cadena de xilano (Borneman et al 1991).

Perfiles de compuestos fenólicos

El contenido de los ácidos fenólicos totales en alfalfa y paja de trigo se presenta en la Tabla 2. Los perfiles fenólicos difirieron significativamente entre los sustratos; el heno de alfalfa liberó más CF totales que la paja del trigo. Específicamente los CF totales e individuales en alfalfa se incrementaron de acuerdo con el nivel de la enzima adicionado ($P < 0,01$). Todos los ácidos fenólicos aumentaron ($P < 0.05$) proporcionalmente con el nivel de la enzima añadida. Pero por limitación en la purificación de la enzima, sólo se utilizó dos niveles de enzima y no se pudo calcular el porcentaje máximo de liberación de los compuestos fenólicos individuales.

En general, las paredes celulares de forraje se caracterizan por la presencia de una gran cantidad de ferulatos esterificados y los componentes aromáticos de la pared celular (Koike y Kobayashi, 2009). Estos son ácidos fenólicos unidos, con pequeñas cantidades de lignina y uniones de aldehídos fenólicos (Rabinovich et al., 2002). Como sucedió en la RA, la cantidad menor de CF

en la PT, comparado con el HA se debió a las diferencias en las estructuras de la pared celular, en consecuencia se reduce la accesibilidad de los polisacáridos (hemicelulosa y celulosa) y se limita la acción enzimática, debido a la heterogeneidad y complejidad de xilanos (Dodd et al., 2009). La hidrólisis enzimática requiere de la acción combinada de varias glucósido-hidrolasas, tales como β -1,4 endoxilasas, arabinofuranosidasas, glucuronidasas, β -1,4 xilosidasas y esterasas carbohidratos (Shallom y Shoham, 2003).

Tabla 2. Efecto de la enzima ácido ferúlico esterasa (Fae1A) en heno de alfalfa y paja de trigo sobre la secreción de compuestos fenólicos en la materia seca residual

Tratamientos §	Compuestos fenólicos totales $\mu\text{g}/\text{mg MS}^1$	Fenólicos individuales ($\mu\text{g}/\text{mg MS}$)			
		Acido p-Coumarico (APC) $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	Acido ferúlico (AF) $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	Acido Sinapínico $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$	Relación APC / AF
Heno de alfalfa (HA)	101.67b	4.23b	5.87c	3.85b	0.72abc
HA + E1 (HAE1)	159.22a	6.36b	7.41b	6.12a	0.85ab
HA + E2 (HAE2)	166.09a	9.85 ^a	10.48a	6.43a	0.94a
Paja de trigo (PT)	36.88c	1.43c	2.28d	2.09c	0.62bc
PT + E1 (PTE1)	39.95c	1.42c	2.58d	2.36cb	0.54c
PT + E2 (PTE2)	40.27cc	1.48c	2.81d	1.87c	0.52c
EEM	5.7	0.55	0.22	0.39	0.07

¹ Datos expresados como miligramo de ácido ferúlico equivalente a g^{-1} de material seco §Todos los tratamientos fueron incubados con líquido ruminal en solución buffer. E1 y E2: 9 y 18 mg de proteína proporcionado por la enzima Fae1A EEM: Error estándar de la media.

^{a-d} Diferentes letras en la misma columna muestran diferencia significativa ($P < 0.05$).

La extracción de los CF mediante el tratamiento enzimático, demostró que el AF, APC y AS integran la pared celular y existe una correlación entre la cantidad de compuestos fenólicos liberados y biodegradabilidad de la pared (Akin et al., 1992). Específicamente, el AF se liberó de

los ésteres metílicos y las paredes de las células, en cantidades mayores para el APC; éste ácido se asocia principalmente con la lignina, mientras que AF está ligado a componentes de la pared celular (Akin y Rigsby, 2008). En la PT, el AF incrementó el doble en comparación con el APC. Sin embargo, la mayor cantidad de AF se presentó en ambos sustratos y se asoció con la mayor dosis de la enzima. En las paredes celulares, la diferencia puede ser debido al modo de unión del AF, puede ser más accesible a una acción enzimática (Buanafina et al., 2006). Otro reporte menciona que la esterasa libera con facilidad el AF en la fibra de salvado de trigo, cultivado en *Streptomyces olivochomogenes* (Mackenzie et al. 1987), lo que indica que estas enzimas pueden tener mayor especificidad con xilo-oligómeros.

Conclusión

En conclusión, los resultados indican que las condiciones óptimas de tratamiento difieren entre el HA y la PT. La adición de la enzima Fae1A tuvo mejor resultado en el HA que en la PT. Sin embargo la esterasa Fae1A tuvo una actividad importante en la degradación de la pared celular de los forrajes estudiados.

Referencias

- Akin D.E., Hartley R.D., Rigsby L.L., and Morrison III W.H. (1992). Phenolic acids released from bermudagrass (*Cynodon dactylon*) by sequential sodium hydroxide treatment in relation to biodegradation of cell types. *J. Sci. Food Agric.* 58: 207-214.
- Akin D.E., and Rigsby L.L. (2008). Corn Fiber: Structure, Composition, and Response to Enzymes for Fermentable Sugars and Coproducts. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 144:59-68.
- Beauchemin K.A., Colombatto D., and Morgavi D.P. (2004). A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 84: 23-26.
- Borneman W.S., Liungdahl L.G., Hartley R.D., and Akin D.E. (1991). Isolation and characterization of p-coumaroyl esterase from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2337-2344.
- Borneman W.S., Liungdahl L.G., Hartley R.D., and Akin D.E. (1992). Purification and partial characterization of two feruloyl esterases from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3762-3766.
- Buanafina M.M., Langdon T., Hauk B., Dalton S.J., and Morris P. (2006). Manipulating the Phenolic Acid Content and Digestibility of Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) by vacuolar-Targeted Expression of a Fungal Ferulic Acid Esterase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129-132.

- Cheng K.J., Lee S.S., Bae H.D., and Ha J.K. (1999). Industrial applications of rumen microbes. *Asian-Australian J. Anim. Sci.* 12: 84-92.
- Dodd D., Kocherginskaya S.A., Ashley M.A., Beery K.E., Abbas C.A., Mackie R.I., and Can I.K.O. (2009). Biochemical analysis of a β -d-xylosidase and a bifunctional xylanase-ferulic acid esterase from a xylanolytic gene cluster in *Prevotella ruminicola* 23. *J. Bacteriol.* 191: 3328-3338.
- Jung H.G., Ralph J., and Hatfield R.D. (1991). Degradability of phenolic acid-hemicellulose esters: A model system. *J. Sci. Food Agric.* 56: 469-478.
- Koike S., Kobayashi Y. (2009). Fibrolytic rumen bacteria: Their ecology and function. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 22: 131-138.
- Lau M.M., and Van Soest P.J. (1981). Titratable groups and soluble phenolic compounds as indicators of the digestibility of chemically treated roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 6:123-131.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- MacKenzie C.R., Bilous D., Schneider H., and Johnson K.G. (1987). Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in *Streptomyces* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2835-2839.
- McAllister T.A. and Wang Y. (2002). Rumen microbes, enzyme and feed digestion-a review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 15: 1659-1676.
- Mendoza, G.D., Loera C.O., Plata P.F., Hernandez G.P., Ramirez M.M. (2014). Considerations on the Use of Exogenous Fibrolytic Enzymes to Improve Forage Utilization. *Sci. World J.* Article ID 247437.
- Nagpal R., Kumar P.A., Sehgal J.P., and Singh K. (2011). *In vitro* fibrolytic potential of anaerobic rumen fungi from ruminants and non-ruminant herbivores. *Mycoscience.* 52: 31-38.
- Qi M. Wang P., Selinger L.B., Yanke L.J., Forster R.J., and McAllister, T.A. (2011). Isolation and characterization of a ferulic acid esterase (Fae1A) from the rumen fungus *Anaeromyces mucronatus*. *J. Appl. Microbiol.* 110: 1341-1350.
- Rabinovich M.L., Melnick M.S., and Bolobova A.V. (2002). The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Review. Biochemistry (Moscow)*, 67: 1026-1050.
- Rezaeian M., Beakes G.W., and Parker D.S. (2004). Distribution and estimation of anaerobic zoosporic fungi along the digestive tracts of sheep. *Mycol. Res.* 108: 1227-1233.
- SAS Institute. (2007). User's Guide: Statistics, Version 9.6th Edition. SAS Inst., Inc., Cary, NC. USA.
- Shallom D., and Shoham Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current Opinion Microbiol.* 6: 219-228.
- Wang Y., Spratling B.M., ZoBell D. R., Wiedmeier R. D., and McAllister T. A. (2004). Effect of alkali pre-treatment of wheat straw on the efficacy of exogenous fibrolytic enzymes. *J. Anim. Sci.* 82: 198-208.