



Original

## Selección de cepas de *Bacillus* productoras de enzimas con potencialidades para la alimentación animal

### Selection of *Bacillus* Strains Producing Enzymes with a Potential for Animal Nutrition

Yasmery Rubio Fontanills \*, Madyu M. Matos Trujillo \*, Aymara L. Valdivia Avila \*, Yunel Pérez Hernández \*, Zoraya Rodríguez Alonso \*\*

\*Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas, Autopista a Varadero, Km 3 ½, Matanzas, Cuba.

\*\*Instituto de Ciencia Animal. Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

Correspondencia: [yasmeryrubio91@gmail.com](mailto:yasmeryrubio91@gmail.com)

Recibido: Octubre, 2023; Aceptado: Octubre, 2023; Publicado: Noviembre, 2023.

## RESUMEN

**Antecedentes:** El incremento de la conciencia sobre los problemas medioambientales ha conducido a la implementación de alternativas ecológicas en la producción industrial. Las celulasas y las hemicelulasas son las enzimas más empleadas a nivel industrial; su uso garantiza la eficacia de los procesos productivos con la disminución en el empleo de sustancias químicas que contaminan el medio ambiente. **Objetivo.** Seleccionar cepas de *Bacillus* spp. productoras de celulasas,  $\beta$ -mananasas y xilanasas para su utilización en la alimentación animal. **Materiales y métodos:** Se estudiaron diez cepas las cuales se inocularon en placas con medio mínimo suplementado con xilano de haya, goma de algarrobo y carboximetilcelulosa para la producción de xilanasas,  $\beta$ -mananasas y endocelulasas respectivamente. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se cubrieron con una disolución de rojo congo al 0,5%. Se determinó el diámetro de la zona de hidrólisis y el de la colonia para calcular el índice de potencia. **Resultados:** De las cepas evaluadas todas mostraron la capacidad de producir las enzimas en estudio. El 23,3% de las actividades enzimáticas estudiadas se consideró como buena. *Bacillus subtilis* E-44 resultó como la cepa que manifestó la mejor actividad enzimática en los tres sustratos evaluados con índices de potencia de  $3,01 \pm 1,18$ ;  $3,82 \pm 0,31$  y  $4,22 \pm 0,23$  para celulasas,  $\beta$ -mananasas y xilanasas respectivamente. **Conclusiones:** *Bacillus subtilis* E-44 se seleccionó como la mejor cepa en la producción de celulasas y hemicelulasas, lo que incrementa las potencialidades de su uso en la alimentación animal y en la industria de los alimentos.

**Palabras clave:**  $\beta$ -mananasas, bacteria, endocelulasas, hemicelulasas, xilanasas (Fuente: MeSH)

### Como citar (APA)

Rubio Fontanills, Y., Matos Trujillo, M. M., Valdivia Avila, A. L., Pérez Hernández, Y., & Rodríguez Alonso, Z. (2023). Selección de cepas de *Bacillus* productoras de enzimas con potencialidades para la alimentación animal. *Revista de Producción Animal*, 35(3). <https://rpa.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/e4566>



©El (los) autor (es), Revista de Producción Animal 2020. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Attribution-NonCommercial 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), asumida por las colecciones de revistas científicas de acceso abierto, según lo recomendado por la Declaración de Budapest, la que puede consultarse en: Budapest Open Access Initiative's definition of Open Access.

## ABSTRACT

**Background:** The ever-growing awareness of environmental problems has led to the implementing of ecological alternatives in industrial production. Cellulases and hemicellulases are the most widely used enzymes in industry, guaranteeing the efficiency of production, with a reduction in chemicals that pollute the environment. **Aim.** To select *Bacillus* spp. strains that produce cellulases,  $\beta$ -mannanases, and xylanases for use in animal feed. **Materials and methods:** Overall, ten strains were studied in plates with minimum medium supplemented with Beech Xylan, locust vean gum, and carboxymethylcellulose for the production of xylanases,  $\beta$ -mannanases, and endo cellulases, respectively. The plates were incubated at 37 °C for 24 hours and were coated with 0.5% Congo red solution. The diameter of the hydrolysis area, and that of the colony, were determined to calculate the potency index. **Results:** All the strains showed the capacity to produce the studied enzymes. As a result, 23.3% of enzymatic activity was considered good. *Bacillus subtilis* E-44 was the strain with the best enzymatic activity on the three evaluated substrates ( $3.01 \pm 1.18$ ;  $3.82 \pm 0.31$ , and  $4.22 \pm 0.23$ ) for cellulases,  $\beta$ -mannanases, and xylanases, respectively. **Conclusions:** *Bacillus subtilis* E-44 was selected as the best cellulase and hemicellulase-producing strain, increasing their possibilities in animal nutrition and the food industry.

**Keywords:**  $\beta$ -mannanases, bacterium, endocellulases, hemicellulase, xylanases (*Source: MeSH*)

## INTRODUCCIÓN

La concientización sobre los problemas medioambientales ha conducido a la implementación de estrategias ecológicas en la concepción de los procesos industriales (Angural *et al.*, 2020). Las tecnologías que conciben el uso de enzimas garantizan estos preceptos, ya que permiten la utilización eficiente de las materias primas con la generación mínima de residuos y la disminución en el uso de compuestos químicos contaminantes (Danilova y Sharipova, 2020).

La demanda de las enzimas y su aplicación en varias industrias crece continuamente. En el 2021 el mercado mundial de las enzimas representó ganancias de 6,4 mil millones de dólares. Se prevé que este valor aumentará a 8,7 mil millones para el 2026, con una tasa de crecimiento anual compuesta del 3,6% (Benatti y Polizeli, 2023). Las celulasas y las hemicelulasas (mananasas y xilanasas) son las enzimas más empleadas a nivel industrial, específicamente, el sector de la alimentación demanda notablemente su uso, donde representan más del 30% del mercado (Cann *et al.*, 2020).

Las celulasas, mananasas y xilanasas son hidrolasas que degradan los enlaces glicosídicos presentes entre los carbohidratos de conforman sus respectivos polímeros. Pertenecen a la familia glicosil hidrolasas según el sitio de las enzimas activas en carbohidratos (Carbohydrate- Active Enzymes Database CAZy: <http://www.cazy.org/>) (Gonzalez-Gonzalez y Miranda-Lopez, 2022). También suelen ser reconocidas como enzimas fibrolíticas o carbohidrasas (Gusakov *et al.*, 2011; Mousa *et al.*, 2022).

Las enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas se obtienen esencialmente a partir de microorganismos y una de las principales fuentes utilizadas por las empresas biotecnológicas son las cepas de *Bacillus* (Su *et al.*, 2020). Las bacterias de este género son bacilos Gram positivos

formadores de endosporas que no sintetizan endotoxinas, razón por la cual muchas especies se consideran como seguras. Estos microorganismos tienen un sistema de secreción enzimática eficiente, lo cual les permite degradar una variedad de sustratos, permitiéndoles la supervivencia en diversos ambientes. Esto los convierte en excelentes productores de enzimas de valor industrial. Es importante destacar además que estas bacterias crecen rápido y los tiempos de fermentación, por lo tanto, se hacen más cortos en comparación con otros microorganismos productores de hidrolasas (Blibech *et al.*, 2019). Aproximadamente, el 50% del total de enzimas del mercado se producen a partir de *Bacillus* (Sulistiyani *et al.*, 2021).

Sin embargo, la producción de estos catalizadores, depende de las condiciones ambientales donde se desarrollen estos microorganismos; por lo que es importante mencionar que todos los *Bacillus* no sintetizan siempre el mismo tipo de enzimas. Para ello es necesario realizar una selección adecuada de los microorganismos en función del sustrato. A partir de lo planteado anteriormente, esta investigación se propone seleccionar cepas de *Bacillus* productoras de celulasas,  $\beta$ -manananasas y xilanasas para su utilización en la alimentación animal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo bacteriano y preinóculo

El estudio se realizó con diez cepas pertenecientes al género *Bacillus*, las cuales se aislaron en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas. A partir de las muestras conservadas a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  en caldo nutriente y glicerol al 20%, se inocularon los matracos que contenían 50 mL de caldo nutriente y se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en zaranda orbital a 110 rpm durante 16 h hasta que la densidad óptica a 600 nm fue de 0,8 - 1.

### Medio de cultivo

El ensayo se realizó sobre placas Petri que contenían medio mínimo (MM) compuesto por NaCl (0,1%),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,3%),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,6%),  $\text{MgSO}_4$  (0,12%), peptona (0,5%), extracto de levadura (0,3%), agar (1,5%). Para evaluar cada enzima las placas se suplementaron con carboximetilcelulosa (1%), goma de algarrobo (0,5 %) o xilano de haya (1%). El pH del medio se ajustó a 7,5 con KOH ( $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y se esterilizó a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. Los reactivos químicos se adquirieron de la firma Sigma-Aldrich.

### Determinación *in vitro* de la producción enzimática de xilanasas, manananasas y celulasas

Las cepas se inocularon con un asa de siembra estéril sobre la superficie del medio de cultivo y las placas se incubaron durante 24 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El revelado de la síntesis de las celulasas y hemicelulasas por las bacterias se realizó al añadir la disolución de rojo congo al 0,5% a cada placa y se dejó a temperatura ambiente durante cinco minutos; posteriormente se realizaron tres lavados con NaCl  $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . El índice de potencia (IP) se calculó mediante la relación existente entre el diámetro de la zona de hidrólisis y el diámetro de la colonia medidos en milímetros. Según el IP los microorganismos evaluados se clasificaron en excelente ( $\text{IP} > 5,0$ ), bueno ( $2,0 >$

IP < 5,0) y pobre (IP < 2,0) (Latorre *et al.*, 2016). Se empleó un pie de rey Vernier (marca Suertek cap. Sensibilidad de  $\pm 0,02$  mm) para realizar las mediciones de los diámetros y se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cuatro réplicas para cada enzima.

### Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó con el software estadístico Statgraphics Plus 5.0. Se llevó a cabo el análisis de varianza simple para determinar la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre las cepas con respecto a los sustratos evaluados. Para el contraste de las medias se realizó la prueba de Student-Newman-Keuls. La significación se estableció para  $p < 0,05$ . Los datos se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar.

## RESULTADOS

Se estudiaron diez cepas de *Bacillus* para evaluar la capacidad de producir enzimas hidrolíticas de interés biotecnológico e industrial. Los resultados mostraron que el 100% de las bacterias evaluadas mostraron la capacidad de producir endocelulasas,  $\beta$ -mananasas y xilanasas. A partir del análisis de los resultados, las cepas E-44 y C-31 se clasifican como buenas productoras de las tres enzimas estudiadas. De igual forma, la cepa 45 BP se considera buena productora de  $\beta$ -mananasas. El resto de las bacterias estudiadas en la presente investigación mostró resultados inferiores en la actividad enzimática relativa de las enzimas evaluadas, los cuales se clasifican como pobres. La Tabla 1 muestra el perfil de la actividad enzimática de las cepas investigadas.

**Tabla 1: Valores de los índices de potencia de las cepas de *Bacillus* sp. evaluadas para la producción de xilanansas,  $\beta$ -mananasas y celulasas.**

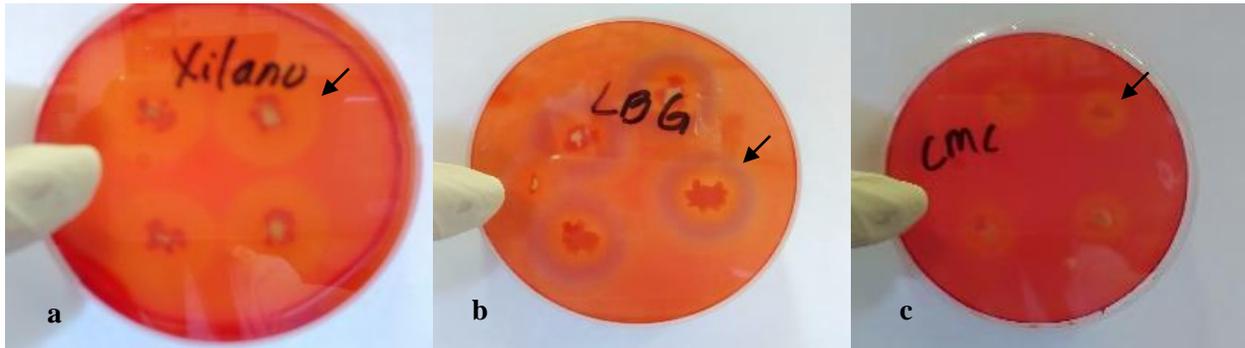
| Cepas de <i>Bacillus</i> | Celulasas                     | $\beta$ -Mananasas            | Xilanasas                     |
|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 5 BP 1                   | 1,31 $\pm$ 0,05 <sup>de</sup> | 1,48 $\pm$ 0,08 <sup>de</sup> | 1,44 $\pm$ 0,14 <sup>de</sup> |
| 23 BP4                   | 1,74 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>  | 1,51 $\pm$ 0,20 <sup>de</sup> | 1,63 $\pm$ 0,17 <sup>cd</sup> |
| 45 BP5                   | 1,49 $\pm$ 0,06 <sup>cd</sup> | 2,03 $\pm$ 0,09 <sup>c*</sup> | 1,90 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>  |
| 48 BP6                   | 1,48 $\pm$ 0,09 <sup>cd</sup> | 1,66 $\pm$ 0,04 <sup>de</sup> | 1,68 $\pm$ 0,09 <sup>cd</sup> |
| 54 BP7                   | 1,16 $\pm$ 0,11 <sup>e</sup>  | 1,63 $\pm$ 0,10 <sup>de</sup> | 1,41 $\pm$ 0,11 <sup>de</sup> |
| 55 BP8                   | 1,69 $\pm$ 0,21 <sup>c</sup>  | 1,57 $\pm$ 0,16 <sup>de</sup> | 1,68 $\pm$ 0,12 <sup>cd</sup> |
| E-44 9                   | 3,01 $\pm$ 0,18 <sup>a*</sup> | 3,82 $\pm$ 0,31 <sup>a*</sup> | 4,22 $\pm$ 0,23 <sup>a*</sup> |
| C-31 10                  | 2,41 $\pm$ 0,22 <sup>b*</sup> | 2,55 $\pm$ 0,25 <sup>b*</sup> | 2,55 $\pm$ 0,25 <sup>b*</sup> |
| 12 BCm11                 | 1,13 $\pm$ 0,07 <sup>e</sup>  | 1,34 $\pm$ 0,11 <sup>e</sup>  | 1,60 $\pm$ 0,15 <sup>cd</sup> |
| 6 BCm12                  | 1,12 $\pm$ 0,14 <sup>e</sup>  | 1,76 $\pm$ 0,14 <sup>d</sup>  | 1,22 $\pm$ 0,14 <sup>e</sup>  |

Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de cuatro réplicas. Letras diferentes en una columna indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Student-Newman-Keuls para  $p < 0,05$ . Las cepas marcadas con (\*) se consideran buenas productoras de la enzima.

El índice de potencia calculado de las enzimas producidas por *Bacillus* sp. E-44 es superior al de las otras cepas estudiadas. El análisis de varianzas que comparó este factor, encontró diferencias estadísticamente significativas para cada uno de ellos en función de las cepas

estudiadas; de manera que permite afirmar que esta cepa es la que mostró la mayor actividad de las tres enzimas frente a los sustratos evaluados y por lo tanto se selecciona como la mejor. En el revelado del ensayo para la determinación de la producción de enzimas por *Bacillus* sp. E-44 (

Figura 1) se pueden observar zonas claras alrededor del crecimiento del microorganismo en las placas que contienen xilano, goma de algarrobo y CMC como sustrato, lo cual indica que la bacteria expresó enzimas que despolimerizan el sustrato presente en el medio de cultivo.



**Figura 1: Halo de hidrólisis formado durante el crecimiento de *Bacillus* sp. E-44 sobre los medios con: (a) xilano de haya, (b) goma de algarrobo y (c) carboximetilcelulosa. Las flechas indican las zonas claras alrededor del crecimiento del microorganismo.**

## DISCUSIÓN

La bioprospección de microorganismos con capacidad para producir enzimas de interés biotecnológico e industrial es un tema de actividad científica constante. Para conseguir que esta búsqueda sea eficaz se requieren metodologías de trabajo que sean rápidas, sensibles, replicables y económicas. La técnica cualitativa más empleada es la propuesta por Teather y Wood (1982), la cual se basa en el crecimiento de los microorganismos sobre un medio mínimo de sales que contiene el sustrato de la enzima que se desea evaluar y la presencia de un colorante reportero de la despolimerización (Moreno y Vélez, 2011).

En este estudio se utilizaron el xilano de haya, la goma de algarrobo y la carboximetilcelulosa como única fuente de carbono en el medio selectivo empleado, el cual se combinó con el rojo congo. Este colorante interactúa con los polímeros correspondientes en el medio, y al excretarse las enzimas se producen disacáridos, monosacáridos y ácidos orgánicos como producto de la degradación. La formación de un halo transparente alrededor de la colonia es resultado de la disminución del pH (Li *et al.*, 2020).

Como previamente se mencionó, la capacidad que tienen varias especies de microorganismos de degradar sustratos complejos se debe a la producción de enzimas extracelulares y depende en gran medida de la fuente de carbono que se emplea (Rodríguez *et al.*, 2020). Las celulasas, xilanasas y  $\beta$ -mananasas son enzimas inducibles en condiciones naturales por los productos de su propia acción. Algunos autores plantean que las mismas se expresan constitutivamente a bajos niveles, de manera que permiten la producción de fragmentos de bajo peso molecular que actúan

como sus propios inductores. La regulación de estas enzimas está estrictamente controlada por los mecanismos de activación y de represión catabólica; solamente se secretarán en presencia de su sustrato específico y la disponibilidad de azúcares fácilmente asimilables reprimirá su producción (Behera *et al.*, 2017; Chauhan y Gupta, 2016).

El índice de potencia (IP) es un indicador que se utiliza por varios autores para evaluar la expresión de enzimas microbianas como celulasas (Li *et al.*, 2020), xilanasas (Latorre *et al.*, 2015) y mananasas (Riaz *et al.*, 2019). La actividad enzimática relativa es un indicador equivalente al índice de potencia según Latorre *et al.* (2015). Estos autores utilizaron la misma escala para la selección de cepas de *Bacillus* spp. que sintetizan celulasas y xilanasas. Los resultados obtenidos permitieron su clasificación como excelentes y buenas productoras de estas enzimas.

También, este indicador se utilizó para seleccionar la cepa de *Bacillus velezensis* que excretó la mayor cantidad de celulasas en un estudio realizado donde se evaluaron diez cepas (Li *et al.*, 2020). Los resultados estuvieron en correspondencia con los obtenidos en esta investigación; incluso, estos fueron superiores. El índice de potencia para la producción de celulasas de *Bacillus* sp. E-44 fue superior al obtenido por Ma *et al.* (2020). De igual manera la cepa seleccionada en la presente investigación mostró índices de potencia superiores a *Bacillus subtilis* US 191 para la producción de mananasas, la cual mostró un índice de potencia de 1,60. (Blibech *et al.*, 2019). Sin embargo, los valores registrados en este estudios fueron inferiores a los obtenidos por Zhang *et al.* (2018) para la producción de xilanasas en la cepa de *Bacillus velezensis* ZY-1-1. No obstante, estos datos concuerdan con los autores anteriores en el sentido de que la actividad de las xilanasas fue superior a la de las celulasas; lo que a decir de los mismos se debe a los mecanismos de regulación de los genes que codifican las enzimas lignocelulósicas, los cuales deben ser más investigados.

Las especies del género *Bacillus* se caracterizan por sintetizar enzimas extracelulares diversas, sin embargo, no siempre todas tienen la capacidad de expresarlas con igual magnitud. Esto sugiere que esta es una característica específica de la cepa en la que no influye la especie y depende en gran medida del origen del microorganismo (Latorre *et al.*, 2016). Por otra parte, se informa en la literatura que la fase de crecimiento, la temperatura y el pH afectan directamente la producción final de enzimas extracelulares. Por tal motivo se optimizan diferentes condiciones de cultivo para la secreción de estas biomoléculas, lo que confirma que la expresión de estos catalizadores está estrictamente asociada con la adaptación al crecimiento (Liu *et al.*, 2023).

La bacteria que mostró los mejores resultados en la síntesis de celulasas y hemicelulasas está identificada como *Bacillus subtilis* subespecie *subtilis* y se aisló a partir de jugo de tomate en descomposición (Milián *et al.*, 2014). Esta cepa resultó tener características potenciales para utilizarse como aditivo con efecto probiótico en animales de interés zootécnico (Milián *et al.*, 2017). Lo resultados aquí obtenidos aumentan las posibilidades de utilizar a *Bacillus subtilis* E-44; esta vez en la producción de enzimas que mejoren la calidad de los alimentos ricos en fibra, lo cual incrementa el efecto probiótico de la misma (Luise *et al.*, 2022). Las celulasas, mananasas

y xilanasas son hidrolasas que comúnmente se emplean en la producción animal (Sathitkowitzhai *et al.*, 2022).

Además de los posibles beneficios para la nutrición de animales de interés zootécnico de las enzimas producidas a partir de esta cepa, su uso podría extenderse a la obtención de las mismas para aplicarse en otros renglones de la alimentación que demanden su empleo. Esto incrementaría las posibilidades de su uso industrial, por ejemplo: para mejorar la calidad de los jugos de frutas y vegetales, aumentar los rendimientos en el proceso de producción de café instantáneo, suavizar la masa del pan e incrementar su volumen y reducir el deterioro de los alimentos (Behera *et al.*, 2017; Chauhan y Gupta, 2016; Kaur *et al.*, 2021; Marimuthu *et al.*, 2019).

Por otra parte, la hidrólisis completa de los carbohidratos complejos presentes en la biomasa lignocelulósica, requiere de mezclas con múltiples actividades enzimáticas. Con este propósito, el uso de cocteles enzimáticos es más apropiado que las enzimas purificadas, ya que disminuye los costos y los procesos son más eficientes. Desde el punto de vista de la alimentación animal, los cocteles enzimáticos tienen efectos positivos en la mejora del valor nutricional de los alimentos al afectar los porcentajes de fibra detergente neutra (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) e incrementar los de nutrientes digestibles totales (Weschenfelder *et al.*, 2023). Una de las estrategias más acertadas para la producción de cocteles enzimáticos es el empleo de microorganismos que posean la capacidad de secretar dos o más enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas (Angural *et al.*, 2020). En este sentido, sería conveniente evaluar las potencialidades de *B. subtilis* E-44 en la producción de cocteles enzimáticos frente a sustratos lignocelulósicos complejos. Por otra parte, deben realizarse otros estudios relacionados con la cuantificación de las actividades enzimáticas y la determinación de la estabilidad de las enzimas a diferentes pH y temperaturas, ya que los resultados que aquí se muestran constituyen un estudio preliminar y el primer paso para seleccionar una cepa con potencialidades para producir enzimas de interés biotecnológico e industrial.

## CONCLUSIONES

La evaluación de la capacidad para producir celulasas y hemicelulasas permitió seleccionar a dos cepas como buenas productoras. Sin embargo, *Bacillus subtilis* E-44 mostró la mayor actividad en la secreción de celulasas,  $\beta$ -mananasas y xilanasas. Esto incrementa las potencialidades de su uso en la alimentación animal y las perspectivas de su empleo en el sector de la alimentación.

## REFERENCIAS

Angural, S., Kumar, A., Kumar, D., Warmoota, R., Sondhi, S., y Gupta, N. (2020). Lignolytic and hemicellulolytic enzyme cocktail production from *Bacillus tequilensis* LXM 55 and its application in pulp biobleaching. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(12), 2219–2229. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02407-4>

- Behera, B. C., Sethi, B. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., and Thatoi, H. N. (2017). Microbial cellulases – Diversity and biotechnology with reference to mangrove environment : A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 197–210. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.001>
- Benatti, A. L. T., and Polizeli, M. de L. T. de M. (2023). Lignocellulolytic Biocatalysts: The Main Players Involved in Multiple Biotechnological Processes for Biomass Valorization. *Microorganisms*, 11(162). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microorganisms11010162>
- Blibech, M., Mouelhi, S., Farhat-Khemakhem, A., Boukhris, I., Ayeb, A. El, and Chouayekh, H. (2019). Selection of *Bacillus subtilis* US191 as a mannanase-producing probiotic candidate. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 66(5), 858–869. <https://doi.org/10.1002/bab.1798>
- Cann, I., Pereira, G. V., Abdel-Hamid, A. M., Kim, H., Wefers, D., Kayang, B. B., Kanai, T., Sato, T., Bernardi, R. C., Atomi, H., and Mackie, R. I. (2020). Thermophilic Degradation of Hemicellulose , a Critical Feedstock in the Production of Bioenergy and Other Value-Added Products. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(7), e02296--19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02296-19>
- Chauhan, P. S., and Gupta, N. (2016). Insight into microbial mannosidases : a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 8, 1–12. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128878>
- Danilova, I., and Sharipova, M. (2020). The Practical Potential of Bacilli and Their Enzymes for Industrial Production. *Frontiers in Microbiology*, 11(1782). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01782>
- Gonzalez-Gonzalez, M. del R., and Miranda-Lopez, R. (2022). Cellulases, hemicellulases and ligninolytic enzymes: mechanism of action, optimal processing conditions and obtaining value-added compounds in plant matrices. *MOJ Food Processing and Technology*, 10(1), 30–37. <https://doi.org/10.15406/mojfpt.2022.10.00270>
- Gusakov, A. V, Kondratyeva, E. G., and Sinitsyn, A. P. (2011). Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2011(283658), 1–4. <https://doi.org/10.1155/2011/283658>
- Kaur, A., Soni, S. K., Vij, S., and Rishi, P. (2021). Cocktail of carbohydrases from *Aspergillus niger*: an economical and eco-friendly option for biofilm clearance from biopolymer surfaces. *AMB Express*, 11(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01183-y>
- Latorre, J. D., Hernandez-Velasco, X., Kuttappan, V. A., Wolfenden, R. E., Vicente, J. L., Wolfenden, A. D., Bielke, L. R., Prado-Rebolledo, O. F., Morales, E., Hargis, B. M., and Tellez, G. (2015). Selection of *Bacillus* spp. for cellulase and xylanase production as direct-fed microbials to reduce digesta viscosity and *Clostridium perfringens* proliferation

- using an in vitro digestive model in different poultry diets. *Frontiers in Veterinary Science*, 2(25). <https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00025>
- Latorre, J. D., Hernandez-Velasco, X., Wolfenden, R. E., Vicente, J. L., Wolfenden, A. D., Menconi, A., Bielke, L. R., Hargis, B. M., and Tellez, G. (2016). Evaluation and Selection of Bacillus Species Based on Enzyme Production, Antimicrobial Activity, and Biofilm Synthesis as Direct-Fed Microbial Candidates for Poultry. *Frontiers in Veterinary Science*, 3(95). <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00095>
- Li, F., Xie, Y., Gao, X., Shan, M., Sun, C., Niu, Y. D., and Shan, A. (2020). Screening of cellulose degradation bacteria from Min pigs and optimization of its cellulase production. *Electronic Journal of Biotechnology*, 48, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.09.001>
- Liu, G., Zhang, K., Gong, H., Yang, K., Wang, X., Zhou, G., Cui, W., Chen, Y., and Yang, Y. (2023). Whole genome sequencing and the lignocellulose degradation potential of Bacillus subtilis RLI2019 isolated from the intestine of termites. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 16(130), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02375-3>
- Luise, D., Bosi, P., Raff, L., Amatucci, L., Viridis, S., and Trevisi, P. (2022). Bacillus spp . Probiotic Strains as a Potential Tool for Limiting the Use of Antibiotics, and Improving the Growth and Health of Pigs and Chickens. *Frontiers in Microbiology*, 13(801827), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.801827>
- Ma, L., Lu, Y., Yan, H., Wang, X., Yi, Y., Shan, Y., Liu, B., Zhou, Y., and Lü, X. (2020). Screening of cellulolytic bacteria from rotten wood of Qinling (China) for biomass degradation and cloning of cellulases from Bacillus methylophilus. *BMC Biotechnology*, 20(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0593-8>
- Marimuthu, M., Sorimuthu, A., and Muruganatham, S. (2019). Production and Optimization of Xylanase Enzyme from Bacillus subtilis using Agricultural Wastes by Solid State Fermentation. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 9(4), 169–173. <https://doi.org/10.5530/ijpi.2019.4.32>
- Milián, G., Rondón, A. J., Pérez, M., Boucourt, R., Rodríguez, M., Portilla, Y., Pérez, Y., Beruvides, A., and Laurencio, M. (2017). Characterization of Bacillus subtilis strains as candidates for the preparation of animal additives. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51(2), 1–8. <https://www.cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/728/752>
- Milián, G., Rondón, A. J., Pérez, M., Samaniego, L. M., Riaño, J., Boucourt, R., Ranilla, M. J., Carro, M. D., Rodríguez, M., and Laurencio, M. (2014). Isolation and identification of strains of Bacillus spp. in different ecosystems, with probiotic purposes, and their use in animals. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 48(4), 347–351. <https://www.cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/562/526>
- Moreno, M. L. O., and Vélez, D. U. (2011). Nuevo método para la cuantificación de la actividad

- endoglucanasa basado en el complejo celulosa-rojo congo. *Orinoquia*, 15(1), 7–15. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89621344002>
- Mousa, G. A., Allak, M. A., Shehata, M. G., Hashem, N. M., and Hassan, O. G. A. (2022). Dietary Supplementation with a Combination of Fibrolytic Enzymes and Probiotics Improves Digestibility , Growth Performance, Blood Metabolites, and Economics of Fattening Lambs. *Animals*, 12(476), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ani12040476>
- Riaz, T., Khan, F. S.-U., and Shakoori, F. R. (2019). Screening and optimization of cultural conditions for production of thermophilic mannanase from *Bacillus megaterium*. *Punjab University Journal of Zoology*, 34(2), 175–183. <https://doi.org/10.17582/journal.pujz/2019.34.2.175.183>
- Rodrigues, I. da S. V., Barreto, J. T., Moutinho, B. L., Oliveira, M. M. G., da Silva, R. S., Fernandes, M. F., and Fernandes, R. P. M. (2020). Production of xylanases by *Bacillus* sp. TC-DT13 in solid state fermentation using bran wheat. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 50(1), 91–97. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1663536>
- Sathitkowitchai, W., Sathapondecha, P., Angthong, P., Srimarut, Y., Malila, Y., Nakkongkam, W., Chaiyapechara, S., Karoonuthaisiri, N., Keawsompong, S., and Rungrassamee, W. (2022). Isolation and Characterization of Mannanase-Producing Bacteria for Potential Synbiotic Application in Shrimp Farming. *Animals*, 12(2583), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ani12192583>
- Su, Y., Liu, C., Fang, H., and Zhang, D. (2020). *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>
- Sulistiyan, T. R., Kusmiati, M., and Putri, G. A. (2021). The 16S rRNA Analysis and Enzyme Screening of *Bacillus* from Rhizosphere Soil of Lombok Island. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 26(4), 582–590. <https://doi.org/10.18343/jipi.26.4.582>
- Teather, R. M., and Wood, P. J. (1982). Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(4), 777–780. <https://doi.org/10.1128/aem.43.4.777-780.982>
- Weschenfelder, L. M., Elisa, C., Oro, D., Cansian, R. L., Teixeira, A. J., Dalponte Menegat, F., Menoncin Weschenfelder, L., Demaman Oro, C. E., Astolfi, V., Valduga, E., Zeni, J., Toniazzo Backes, G., Cansian, R. L., Weschenfelder, L. M., Elisa, C., Oro, D., and Cansian, R. L. (2023). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic residues and bromatological characterization for animal feed. *Ciência Rural*, 53(7), 1–11. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr2021072>
- Zhang, Z., Raza, M. F., Zheng, Z., Zhang, X., Dong, X., y Zhang, H. (2018). Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* ZY-1-1 reveals the genetic basis for its

hemicellulosic/cellulosic substrate-inducible xylanase and cellulase activities. *3 Biotech*, 8(465), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1490-x>

## **CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES**

Concepción y diseño de la investigación: YRF, MMTT, ALVA, YPH; análisis e interpretación de los datos: YRF, MMTT, ALVA, YPH, ZRA; redacción del artículo: YRF, ALVA, MMTT y ZRA.

## **CONFLICTO DE INTERESES**

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses.