



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INFLUENCIA DE LA XILANASA Y *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, EN
EL BIOMETANO RUMINAL Y LAS EMISIONES DEL DIÓXIDO DE
CARBONO EN OVINOS, IN VITRO.

INFLUENCE OF XYLANASE AND *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ON
RUMINAL BIOMETHANE AND CARBON DIOXIDE EMISSIONS IN SHEEP,
IN VITRO.

**ARTICULO ESPECIALIZADO PARA PUBLICAR EN
REVISTA INDIZADA**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:
EDGAR NOÉ CHACÓN RAMÍREZ

Asesores

DR. ABDEFATTAH ZEIDAN MOHAMED SALEM
DRA. MONA MOHAMED MOHAMED YASSEEN ELGHANDOUR



Toluca, Estado de México, marzo de 2018

INDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 4 |
| 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 6 |
| 2.1 ANATOMÍA Y FISIOLÒGIA DIGESTIVA DEL RUMIANTE | 6 |
| 2.2 ECOSISTEMA RUMINAL | 8 |
| 2.3 MICROBIOTA RUMINAL | 8 |
| 2.4 PROCESO FERMENTATIVO | 9 |
| Eructación:..... | 10 |
| 2.5 LEVADURAS COMO ADITIVOS EN LA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES | 10 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 12 |
| 4. HIPÒTESIS | 13 |
| 5. OBJETIVO..... | 14 |
| 6. METODOLOGÍA..... | 15 |
| 6.1. MATERIALES Y MÉTODOS | 15 |
| 6.1.1 Tratamientos y sustratos..... | 15 |
| 6.3.1 Bacteria total y el conteo protozoario..... | 18 |
| 7. Resultados | 19 |
| Abstract..... | 19 |
| 7.1. Introduction | 20 |
| 7.2. Materials and methods..... | 22 |
| 7.2.1. Substrate and treatments..... | 22 |
| 7.2.2. In vitro fermentation and biodegradation..... | 22 |
| 7.2.3. Total bacteria and protozoa count..... | 25 |
| 7.2.4. Chemical analyses..... | 26 |
| 7.3. Results | 27 |
| 7.3.1. Gas production..... | 29 |
| 7.3.2. Microbial population | 29 |
| 7.4. Discussion..... | 30 |
| 7.4.1. Gas production..... | 30 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 7.4.2. Greenhouse gases..... | 32 |
| 7.4.4. Fermentation kinetics..... | 35 |
| 7.5. Conclusion | 35 |
| 8. LÍMITE DE ESPACIO Y TIEMPO | 37 |
| CARTA DE ACEPTACIÓN..... | 38 |
| 9. REFERENCIA..... | 39 |

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha reportado que la tierra ha mostrado un incremento considerable de la temperatura, esto debido al efecto invernadero. La producción ganadera es responsable aproximadamente del 18% de la emisión de metano (CH₄), y 9% de la producción de dióxido de carbono (CO₂) (FAO, 2006). El metano y CO₂ son el resultado de la fermentación ruminal de los alimentos (Hristov et al., 2015). En términos tentativos, incluyendo la inclusión de *Saccharomyces cerevisiae* (Elghandour et al., 2017), sal de ácidos orgánicos (Elghandour et al., 2016), enzimas de exógenos (Kholif et al., 2017), y gases esenciales (Hernández et al., 2017), han sido usados para la mitigación de CH₄ y las emisiones de CO₂. Basados en los balances energéticos, de acuerdo a Bruinenberg et al. (2002) y Nkrumah et al. (2006), son aditivos que reducen las emisiones de gases y ayudan a incrementar potencialmente el beneficio de la ganancia de peso corporal en el ganado.

La Unión Europea ha prohibido la inclusión de antibióticos e ionoforos como aditivos en la alimentación animal, la exploración de alimentos como aditivos naturales son una alternativa para modificar la fermentación ruminal, la mejora en la utilización de alimentos (Salem et al., 2014), y sobre todo reducir gases del efecto invernadero (GHG) se ha hecho más atractivo (Elghandour et al., 2017; Kholif et al., 2017). Los estudios han mostrado que la inclusión de enzimas exógenas en la alimentación de los rumiantes ha mejorado al funcionamiento productivo del animal, beneficiando la digestibilidad nutritiva y la fermentación ruminal (Valdes et al., 2015). McAllister et al. (2001) ha propuesto varias acciones en la utilización de alimentos como la solubilización de la fibra dietética, la complementación de microorganismos ruminales con sustrato fácilmente fermentable, la mejora de la actividad de enzima microbiana en el rumen, la mejora de la relación y la colonización de microorganismos ruminales a la pared celular de la planta (Chung et al., 2012). Sin embargo, Lewis et al. (1999) han observado los efectos débiles de la alimentación de enzimas exógenas para mejorar la calidad del forraje y la utilización por los rumiantes. La inconsistencia puede ser relacionada a las diferentes fuentes de enzimas (Khattab et al., 2011), a las diferentes dosis y actividades de las enzimas (Morsy et al., 2016), a diferentes propiedades físicas dietéticas (Elghandour et al., 2015), al método de aplicación

(Elghandour et al., 2016) y el nivel de productividad animal (Beauchemin et al., 2003).

La inclusión de *Saccharomyces cerevisiae* ofrece una gran potencialidad para manipular la fermentación ruminal in vitro (Elghandour et al., 2014) y en vivo (Ahmed et al., 2015). La inclusión de *S. cerevisiae* en la dieta de los animales mejora el valor nutricional en forrajes de baja calidad (Ahmed et al., 2015), la digestibilidad de los nutrientes (Hassan et al., 2016), y las características de las canales de dichos animales (Velázquez et al., 2015). Rodríguez et al. (2015) observaron una mayor degradabilidad de los alimentos dentro del rumen in vitro y de la producción de gas de alimentos (GP) con la adición de la levadura. Por lo contrario, muy pocos estudios han analizado el empleo de alimentos con aditivos naturales como la levadura *S. cerevisiae* y la xilanasa en la producción de gases de efecto invernadero (GHG). Este estudio por lo tanto apunta a determinar el efecto de la levadura *S. cerevisiae*, la xilanasa y su mezcla como aditivos en los alimentos, respecto a la mitigación de CH₄ y emisiones CO₂, la población ruminal microbiana y la fermentación de rumen usando el inóculo de ovinos. El objetivo del presente estudio es medir las diferencias de CH₄ CO₂ con respecto a la prueba control, en el alimento adicionados con aditivos que modificará la microflora, causando la mejora del valor dietético nutritivo y reduciendo la producción GHG.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANATOMÍA Y FISIOLÓGIA DIGESTIVA DEL RUMIANTE

Los rumiantes se caracterizan por su capacidad para alimentarse de pastos o forrajes; ya que degradan los hidratos de carbono estructurales del forraje, como celulosa, hemicelulosa y pectina (Gutiérrez. 2015). Pues bien, la fisiología digestiva del rumiante adquiere características particulares. La degradación del alimento se realiza principalmente por digestión fermentativa y no por acción de enzimas digestivas como en algunos otros animales (monogástricos); los procesos fermentativos los realizan diferentes tipos de microorganismos a los que el rumiante aloja en sus divertículos estomacales. Por esta razón debemos tener presente que al alimentar a los rumiantes, primero estamos alimentando a los microorganismos ruminales, y que para su buen desarrollo tiene que haber un medio ruminal favorable para ello; de esta forma hay una simbiosis entre las bacterias y el animal (Gutiérrez, 2015). Esta digestión fermentativa, si bien favorece al rumiante al permitirle degradar hidratos de carbono estructurales, también afecta la digestión de todos los demás componentes de la dieta, expuestos a los mismos procesos fermentativos, sin que esto represente siempre una ventaja desde el punto de vista del mejor aprovechamiento del alimento (McDonald et al., 1995 y Gutiérrez, 2015).

Anatómicamente, el aparato digestivo de los rumiantes presenta 4 compartimentos gástricos: rumen, retículo, omaso y abomaso.

El órgano más importante en la digestión es el rumen, de él depende que los alimentos sean digeridos. El retículo y el omaso ejercen funciones mecánicas, mientras que el abomaso o estómago glandular, realiza una parte importante de la digestión enzimática (McDonald et al., 1995).

Desde el punto de vista anatómico, el rumen y el retículo se consideran como órganos diferentes, pero dado que solo están separados por el pliegue retículo-ruminal y que existe libre paso de la ingesta entre los dos compartimentos,

permitiendo que las condiciones tanto químicas como microbiológicas sean iguales, se les considera como una unidad denominada rumen-retículo (Elías. et al., 1967).

La mucosa ruminal tiene como principal función, la absorción de agua y ácidos grasos volátiles; desde el punto de vista fisiológico, el rumen es un órgano hueco que constituye una cámara de fermentación cuyas funciones son:

Mezcla y humidificación de la ingesta permitiendo el contacto entre la microflora con los sustratos. Facilita el eructo y la regurgitación. Se encarga de proveer del medio adecuado para el desarrollo de la microflora ruminal, responsable de la digestión de compuestos como celulosa y hemicelulosa, además de la síntesis de proteína microbiana y ácidos grasos volátiles que constituyen la fuente más importante de energía para el rumiante (McDonald et al., 1995 y Elías et al., 1967)

Para que se efectúen las funciones ruminales de manera adecuada, se requiere de ciertas condiciones que deben mantenerse en forma constante, como la presencia de sustrato alimenticio para la diversidad microbiana, además de líquidos, agua de bebida y saliva secretada. Asimismo de un ambiente adecuado: pH constante, temperatura, funcionalidad óptima de la mucosa ruminal, para la absorción de los productos finales de la fermentación microbiana ruminal (Fraga 2010).

Movimientos del rumen-retículo:

- Los movimientos sincronizados del rumen-retículo, ayudan a mezclar el alimento regurgitación y la eructación, así como el paso de la ingesta al omaso.
- Los movimientos ruminales se dan con una frecuencia de 3 cada 2 minutos y son de dos tipos:
- Contracciones primarias: son movimientos que facilitan el mezclado de la ingesta, así como su movimiento entre ambos compartimentos.
- Contracciones secundarias: son movimientos coordinados del rumen-retículo y sincronizados con el diafragma y el cardias, permitiendo la ruminación y la eructación (Gutiérrez. 2015).

Omaso

Es el tercer compartimento, se caracteriza por la presencia de un gran número de pliegues que semejan un libro; esta superficie absorbe agua (entre el 30 y 60% del agua ingerida) al igual que minerales como el potasio y el sodio.

Abomaso

El estómago verdadero del rumiante. Este secreta enzimas y ácido clorhídrico, realiza las mismas funciones que un estómago de un animal Monogástrico de esto es que se le conoce como estómago verdadero. El interior del abomaso está formado por muchos pliegues que incrementan el área secretoria. El abomaso tiene dos secciones distintas. El fondo se encarga de la secreción el ácido clorhídrico (HCl) y las enzimas que operan en un medio ácido. La región pilórica donde se acumula la ingesta antes de ser propulsada hacia el duodeno (Gutiérrez. 2015).

2.2 ECOSISTEMA RUMINAL

El contenido ruminal constituye el medio en el cual habita una población importante de bacterias y protozoarios. Estos organismos, sus metabolitos, la saliva, agua y el sustrato alimenticio, determinan la naturaleza de la ecología del rumen (Fraga M, 2010). El contenido de materia seca es del 10-15% y varía de acuerdo al consumo de alimento y al agua de bebida. La temperatura ruminal es de 39,40°C y está determinada por el proceso de fermentación bacteriana y la actividad metabólica propia del animal (McDonald et al., 1995).

2.3 MICROBIOTA RUMINAL

La microflora ruminal es una población muy compleja debido al gran número y variedad de microorganismos presentes (más comunes en el rumen son bacterias y protozoarios ciliados, aunque se observan con cierta frecuencia levaduras y protozoarios flagelados.), cambiando debido a los cambios en las dietas. La motilidad, las condiciones de humedad, el pH y la temperatura que son favorables

para el desarrollo de los microorganismos y el funcionamiento de muchos sistemas enzimáticos (Fraga. 2010).

El ambiente ruminal es muy inestable, no obstante existe una diversidad considerable en la población microbiana y esta es debida a dos razones:

- a) Existe selección natural sobre los microbios facultados para realizar un trabajo bioquímico, el cual le permite crecimiento y desarrollo; debido a las condiciones del rumen, todos los microorganismos presentes son anaerobios o anaerobios facultativos.
- b) El proceso de alimentación no sería posible sin la existencia de esos organismos. McDonald et al. (1995) dice que de bacterias hay entre 10⁹-10¹⁰ por ml y más de 60 especies, añadiendo que la población de hongos puede variar entre un 8 a un 10 % del total de la población del rumen, mientras que los protozoarios; indican que pueden encontrarse de 10⁵ a 10⁶ células/gramo de líquido ruminal.

2.4 PROCESO FERMENTATIVO

Los microorganismos llevan a cabo la fermentación, estos se encargan de producir ácidos grasos volátiles (AGV): acético, butírico, propiónico y láctico; mismos que serán la fuente nutricional para la actividad metabólica del rumiante; La clave de una buena producción de AGV es el cuidado del pH, ya que mientras mayor sea la cantidad de bacterias fibrolíticas estos estarán siempre disponibles para el desarrollo del rumiante (Dirkensen, 1969 citado por Calsamiglia, 1997), lo que significa que el rendimiento de producción del animal está directamente relacionado a la actividad y calidad de la microbiota ruminal; además de la formación de otros compuestos como gases en su mayoría metano y dióxido de carbono (Roderick y White, 1990). La composición de los gases según (Calsamiglia y Ferret, 2002); es de 65% de CO₂, 27% de CH₄, 7% de N₂, 0.6% de O₂, 0.2% de H₂ y 0.01% de H₂S que se expulsan mediante el eructo.

Eructación:

La eructación es el proceso donde el animal expulsa grandes cantidades de gas producido por la fermentación en el rumen-retículo. Mediante esto es capaz de eliminar gas, que está compuesto por bióxido de carbono, metano, nitrógeno y oxígeno. La eructación está precedido del inicio de la rumiación, y se da principalmente por contracciones secundarias del rumen, asociadas a una dilatación del cardias. El gas sale libremente hacia la faringe de donde puede ser inspirado hacia los pulmones o expulsado hacia el exterior (Calsamiglia y Ferret, 2002).

2.5 LEVADURAS COMO ADITIVOS EN LA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES

Fuller (1989), define los prebióticos como microorganismos vivos, que incluidos en la alimentación de los animales afectan positivamente al huésped y mejoran su sistema digestivo.

La actividad de la levadura es consumir el oxígeno del rumen, de esta forma reducir el efecto negativo sobre la población de microorganismos estrictamente anaerobios. Rose (1987) y Newbold et al. (1996), demostraron que al agregar levadura viva al fluido ruminal (in vitro), la presencia de oxígeno se reduce entre 46 y 89%; esto genera un aumento en la población de microorganismos totales del rumen; lo que conlleva a una mejor utilización de los alimentos, provocando un aumento en la producción de energía (Newbold et al. 1996) y proteína microbiana que oscila entre 10 % y 20 % (Williams et al. 1990; Erasmus 1992); la consecuencia directa de esta mejora es un incremento en la producción de leche y/o carne entre 5 y 8 %. Este tipo de probióticos se clasifican como organismos eucariotes, a diferencia de las bacterias cuya medida oscila entre (0.5 x 5 µm), son resistentes a antibióticos, además de tener un mayor tamaño alrededor de 5 x 10 µm (Williams et al. 1990). Se puede considerar que las más utilizadas son las de *Saccharomyces*, observando repuestas más favorables en ganado aumentando la capacidad de degradación de la fibra y la producción (Newbold, 2006).

Sus efectos benéficos radican en la regulación del pH, aportan vitaminas a las bacterias ruminales haciéndolas más viables. Cuando la dieta está constituida por una proporción elevada de concentrado es cuando más se recomienda el uso de levaduras, por ejemplo al comienzo de la lactación (Van Vuuren; 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, se ha reportado que la tierra ha mostrado un incremento considerable de la temperatura debido a la gran producción de gases con efecto invernadero. La producción ganadera es responsable de aproximadamente 18% de la emisión de metano (CH_4) y 9% de la producción de dióxido de carbono (CO_2) (FAO, 2006). El metano y CO_2 son el resultado de la fermentación ruminal de los alimentos, causando la pérdida del 2 al 12% de la grave energía alimentaria (Hristov et al., 2015).

Debido a esto, se han realizado diversos estudios mostrando que la inclusión de enzimas exógenas en la alimentación de los rumiantes ha mejorado al funcionamiento productivo del animal, beneficiando la digestibilidad nutritiva y la fermentación ruminal (Valdes et al., 2015), y con ello disminuir la emisión de gases.

4. HIPÒTESIS

El uso de la enzima xilanasa como aditivo combinado con la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) mejora la utilización de los nutrientes, a través del aumento de la digestibilidad, del mejor aprovechamiento nutritivo como una estrategia sustentable para reducir el efecto invernadero de la ganadería (reducir la producción del CH₄ y CO₂), siendo muy importante desde un punto de vista ambiental.

5. OBJETIVO

5.1. **Objetivo general**

Reducir la producción de metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂), en una ración de concentrado con la adición de enzimas y levaduras, así como la cinética de la fermentación ruminal, in vitro.

5.2. **Objetivo específico**

Analizar la mitigación sustentable del metano (CH₄) y las emisiones del dióxido de carbono (CO₂) así como la cinética de la fermentación ruminal de una ración de concentrado (ración básica) usando inóculo (líquido ruminal de ovinos) con la presencia de *Saccharomyces cerevisiae*, xilanasa y su mezcla como el medio ambiente de los alimentos añadidos.

6. METODOLOGÍA

6.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los métodos y procedimientos utilizados en este estudio cumplieron con las directrices de la ley mexicana, Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999 "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio". Sobre la protección de animales utilizados para fines científicos, los cuales fueron aprobados por el Comité de Ética Animal para el cuidado y uso de Animales, de la Universidad Autónoma del Estado de México, México.

6.1.1 Tratamientos y sustratos

La ración total de la mezcla (TMR) será preparada como un sustrato y contendrá: 520 gramos de grano de sorgo, 300 gramos de rastrojo de maíz, 60 gramos de harina de soya, 80 gramos de melaza y 40 gramos de urea, en un kg de mezcla. La composición química del TMR contará por kg DM: 963 gramos de sustancia orgánica (OM), 183 gramos de proteína cruda (CP), 304 gramos de fibra neutral detergente (NDF) y 261 gramos de fibra ácida detergente (ADF). El TMR sin aditivo será considerado como un tratamiento de control. El básico de TMR será suplementado (por g sustrato DM) con xilosa a 2 ml, levadura de cerveza a 4mg, o su mezcla a 2ml de xilosa + 4 mg de levadura de cerveza por per g de sustrato DM.

6.2 La fermentación in vitro y la biodegradación

El inóculo de rumen se recolectará de dos rúmenes canulados de ovinos de raza Rambouillet (60 ± 2 kg BW), encerrados en corrales individuales y alimentados con una dieta que consiste en heno de avena y concentrado (PURINA®) a 60:40 *ad libitum*, con acceso libre al agua. Los animales se alimentarán dos veces al día: (8:00 y 16:00 horas), y atendidos en condiciones estipuladas bajo la Norma Oficial Mexicana de especificaciones técnica para la producción, cuidado y uso animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Los contenidos de rumen serán colocados en un termo de plástico precalentado a 39 grados centígrados y llevados al laboratorio

donde se mezclaran y filtraran por capas de estopilla dentro de un matraz con libre oxígeno al vacío. El rumen será mantenido a una temperatura constante de 39 grados centígrados con una corriente continua de CO₂.

Antes del proceso de incubación, se realizarán las distintas soluciones que fungirán como medio ambiente para los microorganismos ruminales tales como solución búfer, soluciones de resazurina, macromineral y micromineral, y agua destilada, serán preparadas de acuerdo a Goering y Van Soest (1970) mezclado en un matraz volumétrico, usando un agitador plateado y magnético a 39 grados centígrados para mantener la temperatura y homogenizar la solución. Consecuentemente, el inóculo ruminal y la solución reducida, ambos serán mezclados a un radio de 1:4 vol/vol, respectivamente. Las muestras de sustrato (0.5 g) serán pesadas dentro de botellas de 120 ml adicionada con los aditivos (i.e. xilosa o *Saccharomyces cerevisiae* o su mezcla). Consecutivamente y previamente se administrara 50 ml de líquido de ruminal. Las botellas serán mantenidas a corriente constante de CO₂ por 30 segundos y después cubierto con tapas neopreno y luego selladas con anillos de aluminio. Los frascos fueron colocados en una incubadora (Riossa®, F-51 D) a 39 grados centígrados durante 48 horas. Asimismo, tres botellas vacías que fungirán como nuestra prueba control (con únicamente líquido ruminal), incubadas durante 48 horas.

Las lecturas de producción de gas se mostraran a 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 horas de incubación usando un aparato de desplazamiento de agua según Fedorak y Hruday (1983). Los aparatos fueron diseñados con un soporte universal, con un embudo cónico, una bureta de 100 ml y dos mangueras de látex de 0.5 y 1 m de largo y un diámetro de ancho de 3/8. Los frascos fueron perforados con una aguja de calibre 16, puesta al final de la manguera. La producción de gas será medida en (ml) por el desplazamiento del agua en la bureta.

Después de la incubación de 48 horas, los 5 ml de gas serán tomados y almacenados en los frascos solución saturada salina, preparada con 40 gramos de NaCl en 1 litro de agua destilada y el pH acordadamente ajustado. 2 y 5 ml de naranja de metilo al 20% serán agregados como un indicador para el CH₄ y CO₂ de

esta forma determinar las concentraciones. La solución saturada salina se almacenara en frascos serológicos de 60 ml sin espacio al vacío; y las tapas neopreno serán colocadas y selladas con anillos de aluminio y almacenadas lejos de la luz. Para la determinación del CH₄ y CO₂, una muestra de 10 ml de gas base fue tomado de los frascos con salina saturada e inyectada dentro de un cromatógrafo PerkinElmer, Claurus de 500 gas (Ciudad de México, México) con la detección de una flama de ionización y helio como gas portador. Un detector de conductividad térmica (TCD) fue utilizado en el horno, una columna y un conjunto de temperaturas TCD a 80 grados centígrados, 170°centígrados y 130° centígrados, respectivamente.

Al término de la incubación de 48 horas, el proceso de fermentación será detenido por botellas giradas en hielo durante 5 minutos, después las botellas se destapan y el pH será medido inmediatamente usando un medidor de pH (Thermo Scientific, Orion Star™ A121, Beverly, MA, USA). Los contenidos de las botellas se filtraran dentro de bolsas Ankom® Technologies F57 bags (en un peso constante), con la ayuda de un sistema de filtración a una bomba de vacío. Las botellas serán enjuagadas tres veces con agua caliente para garantizar la recuperación de todos los residuos de la fermentación, Las bolsas serán secadas bajo un aire forzado del horno puesto a 55° centígrados por 48 horas. La degradación de la sustancia seca se calculara por la diferencia entre el peso inicial del sustrato secado y el peso del residuo secado.

Después de la medición y la filtración del pH, los 4 ml serán medidos utilizando una jeringa y mezclador con 1 ml del 25% de ácido meta fosfórico, una ligera agitación y puesto en un congelador hasta el análisis de la concentración de amonio. Los otros 4 ml fueron mezclados con 1 ml de 10% de formaldehído y con una ligera agitación, luego colocado en un refrigerador a 4° centígrados hasta el análisis bacteriano y el conteo protozoario.

6.3.1 Bacteria total y el conteo protozoario

La concentración de la bacteria total determinara después de 48 horas de incubación utilizando una cámara de conteo de bacterias Petroff-Hausser (Hausser Scientific®, 3900, Horsham, PA) y un microscopio de contraste de fase (Olympus®, BX51) a una amplificación de 100X. Exactamente 0.5 ml del 10% de la muestra de formaldehído será tomada y diluida en 4.5 ml de agua destilada. La concentración de la bacteria por ml será determinada como el promedio de la bacteria observada en cada rejilla, multiplicada por el factor de disolución y el factor de la cámara (2×10^7), estableciendo la siguiente formula: $\text{Número de bacteria/mL} = \mu \times \text{FD1} \times \text{FD2} \times 2^7$.

Dónde: μ es el promedio de la bacteria en cada cuadrilla por tratamiento, FD es el primer factor de disolución (1.25) y FD2 es el segundo factor de disolución (10).

Para el conteo protozoario, 1 ml del 10% de la muestra de formaldehído será obtenido y diluido en un 1 ml de agua destilada. Después, 0.5 ml de la mezcla se tomara con una pipeta Pasteur (BRAND, 7712, Wertheim, Alemania) y depositado dentro de una cámara de recuento Neubauer (BRAND, 7178-10, Wertheim, Germany), posteriormente se observara en un microscopio de contraste (Carl Zeiss®, Axiostar,) a 400X de amplificación. El conteo protozoario será echo en cuatro cuadrantes (4 de cada cuadrícula), tomando como protozoo aquellos que mantengan su integridad morfológica. La concentración del protozoo por ml de media se estimara como el promedio de protozoo observado en cada cuadrícula, multiplicado por el factor de disolución y el factor de la cámara (1×10^4), estableciendo la fórmula: $\text{Número protozoario} = \mu \times \text{FD1} \times \text{FD2} \times 10^4$.

Dónde: μ es el número de promedio de protozoo en cada cuadrícula por tratamiento, FD es el (5), y FD2 es el segundo factor de disolución (3).

7. Resultados

Influence of xylanase and *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal biomethane and carbon dioxide emissions in sheep, in vitro

Influencia de la xilanasa y *Saccharomyces cerevisiae*, en el biometano ruminal y las emisiones del dióxido de carbono en ovinos, in vitro.

Short title: [Yeast and xylanase affects ruminal fermentation](#)

Abstract

The aim of this work was to study the sustainable mitigation of methane (CH₄) and carbon dioxide (CO₂) emissions as well as ruminal fermentation kinetics of a high-concentrate ration (basal ration) using inoculum from different sources in the presence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast, xylanase, and their mixture as environmentally friendly feed additives. Rumen liquor was obtained from rumen cannulated Rambouillet sheep. The basal ration was supplemented (per g dry matter (DM)) with xylanase at two mL, *S. cerevisiae* at four mg, or their mixture at two mL xylanase and four mg *S. cerevisiae*. No inoculum source × additive type interactions were observed in this study ($P > 0.05$). Most of the measured parameters were affected by the inoculum source and additive type. Additives had higher ($P = 0.045$) asymptotic weight gain (WG) ($P < 0.05$). *S. cerevisiae* or/and xylanase decreased the proportional CH₄ with all inoculum sources and higher CO₂ production. Higher ($P < 0.05$) bacterial counts were observed with the inclusion of the additives ($P < 0.05$). Short chain fatty acids and metabolizable energy concentrations were higher with the additives ($P < 0.05$). Moreover, additives had higher ($P < 0.05$) DM degradability

with sheep DM ($P=0.037$) organic matter degradability ($P=0.048$). It is concluded that *S. cerevisiae*, xylanase and their mixture did not affect total WG but altered the proportions of the resulting gases. Additives decreased CH₄ production, thus, can be used as an environmental friend and sustainable strategy to reduce greenhouse gas emissions from livestock and improve the environmental conditions.

Keywords: greenhouse gases, CH₄, CO₂, in vitro fermentation, xylanase.

7.1. Introduction

In recent years, the earth has become warmer due to the large production of greenhouse gases. Livestock production is responsible for about 18% of methane (CH₄) emission, and 9% of carbon dioxide (CO₂) production (FAO, 2006). Methane and CO₂ are the result of ruminal fermentation of feeds, causing losing of 2 to 12% of gross dietary energy (Hristov et al., 2015). Attempts, including the inclusion of *S. cerevisiae* (Elghandour et al., 2017), organic acids salt (Elghandour et al., 2016), exogenous enzymes (Kholif et al., 2017), and essential oils (Hernandez et al., 2017), have been used to mitigate ruminal CH₄ and CO₂ emissions from ruminant feeds. Based on the energy balances reported by Bruinenberg et al. (2002) and Nkrumah et al. (2006), reducing CH₄ emission could potentially increase body weight gain of growing cattle by 75 g/d.

Because the European Union has banned the inclusion of antibiotics and ionophores as feed additive in animal feeding, exploring alternative natural feed additives to modify ruminal fermentation and enhance feed utilization (Salem et al.,

2014), and reduce the emission of greenhouse gases (GHG; Elghandour et al., 2017; Kholif et al., 2017) had become desirable. Studies have shown that the inclusion of exogenous enzymes in ruminants' feeding improved productive performance of animal by improving nutrient digestibility and ruminal fermentation (Valdes et al., 2015). Researcher has proposed several modes of actions of the improved feed utilization including solubilization of dietary fiber, supplementation of ruminal microorganisms with readily fermentable substrate, enhancement of microbial enzyme activity in the rumen (McAllister et al., 2001), and enhancement of the attachment and colonization of ruminal microorganisms to the plant cell wall (Chung et al., 2012). However, Lewis et al. (1999) observed weak effects of feeding exogenous enzymes to enhance forage quality and utilization by ruminants. The inconsistency may be attributed to the different sources of the enzyme (Khattab et al., 2011), different doses and activities of the enzyme (Morsy et al., 2016), different physical properties of diets (Elghandour et al., 2015), and enzyme application method (Elghandour et al., 2016) and level of animal productivity (Beauchemin et al., 2003).

The inclusion of *S. cerevisiae* yeast offers a great potential for manipulating ruminal fermentation *in vitro* (Elghandour et al., 2014) and *in vivo* (Ahmed et al., 2015). *S. cerevisiae* inclusion in the diet of animals enhanced nutritional value of poor quality forages (Ahmed et al., 2015), nutrient digestibility (Hassan et al., 2016), and animal carcass characteristics (Velázquez-Garduño et al., 2015). Rodriguez et al. (2015) observed a higher *in vitro* rumen degradability and gas production (GP) of feed with *S. cerevisiae* addition. However, very few studies have investigated the

use of natural feed additives such as *S. cerevisiae* and xylanase on GHG productions. This study therefore aims to determine the effect of *S. cerevisiae*, xylanase and their mixture, as environmentally friend feed additives, on the sustainable mitigation of CH₄ and CO₂ emissions, ruminal microbial population, and rumen fermentation of a high-concentrate ration using rumen inoculum from goats, sheep and steers. The hypothesis was to measure the differences of CH₄ CO₂ with the different foods added with additives that will modify the ruminal microflora, causing the improvement of the nutritional dietary value and reducing the GHG production.

7.2. Materials and methods

7.2.1. Substrate and treatments

A total mixed ration (TMR) was prepared as a substrate and contained (per kg DM): 520 g ground sorghum grain, 300 g corn stover, 60 g soybean meal, 80 g molasses and 40 g urea. The chemical composition of the TMR was (per kg DM): 963 g organic matter (OM), 183 g crude protein (CP), 304 g neutral detergent fiber (NDF) and 261 g acid detergent fiber (ADF). The TMR without additive was considered as a control treatment. The basal TMR was supplemented (per g DM substrate) with xylanase at 2 mL, *S. cerevisiae* at 4 mg, or their mixture at 2 mL xylanase an 4 mg *S. cerevisiae* per g DM substrate.

7.2.2. In vitro fermentation and biodegradation

Rumen inoculum was collected 2 rumen cannulated Rambouillet sheep (50 ± 2 kg BW), and 2 rumen cannulated Creole goats (50 ± 2 kg BW), housed in individual

pens and fed on a diet consisting of oat hay and concentrate (PURINA®, Toluca, Mexico) at 60:40 ratio *ad libitum*, with free access to water. Animals were fed twice daily at 08:00 and 16:00 h, and managed as per the conditions stipulated in the Official Mexican Standard of technical specifications for the production, care and use of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999). Rumen contents were placed in a plastic thermos preheated at 39°C and transport to the laboratory where it was flushed with CO₂, mixed and strained through 4 layers of cheesecloth into a flask with oxygen-free headspace. The rumen content was maintained at a constant temperature of 39°C with a continuous flow of CO₂.

Before the incubation process, the incubation medium containing buffer, macromineral, micromineral and resazurin solutions and distilled water were prepared according to Goering and Van Soest (1970) and mixed in a volumetric flask using a plate and magnetic stirrer set at 39°C to maintain the temperature and homogenize the solution. Consequently, the ruminal inoculum and the reducing solution were mixed at the ratio of 1:4 vol/vol, respectively.

Samples of the substrate (0.5 g) were weighed into 120 mL serum bottles with appropriate addition of the additives (i.e., xylanase or *S. cerevisiae* or their mixture). Consequently, 50 mL of previously prepared rumen liquor and the buffer were added. Bottles were maintained at constant CO₂ flow for 30 sec, and then capped with neoprene plugs and then sealed with aluminum rings. The vials were placed in an incubator (Riossa®, F-51 D, Mexico State, Mexico) at 39°C for 48 h. Additionally, three bottles as blanks (rumen fluid only) were incubated for 48 h. Three incubation runs were performed in three weeks.

Gas production readings were performed at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 and 48 h of incubation using a water displacement apparatus according to Fedorak and Hrudehy (1983). The apparatus was designed with a universal support, with a conical funnel, a 100 mL burette and 2 latex hoses of 0.5 and 1 m in length and 3/8 inch diameter. The vials were punctured with a 16-gauge needle placed at the end of the hose. Gas production (mL) was measured by the displacement of water in the burette.

After 48 h of incubation, 5 ml of gas were taken and stored in the vials with saturated saline solution prepared with 400 g of NaCl in 1 L of distilled water and the pH adjusted. 2 and 5 mL of 20% methyl orange was added as indicator for CH₄ and CO₂ concentrations determination. The previously prepared saturated saline solution was and stored in 60 mL serological vials without headspace; and neoprene plugs were placed and sealed with aluminum rings, and stored away from light. For the determination of CH₄ and CO₂, a sample of 10 µL of the gas phase was taken from the vials with saturated saline and injected into a PerkinElmer, Claurus 500 gas chromatograph (Mexico City, Mexico) with a flame ionization detection and helium as the carrier gas. A thermal conductivity detector was used with the oven, at 80° C, 170° C and 130° C, respectively. Retention times were 0.73 min and 1.05 min for CH₄ and CO₂, respectively.

At the end of incubation at 48 h, the fermentation process was stopped by swirling the bottles in ice for 5 minutes, then the bottles were uncapped and the pH was measured immediately using a pH meter (Thermo Scientific, Orion Star™ A121, Beverly, MA, USA). The contents of the bottles were filtered in to Ankom® Technologies F57 bags (at constant weight), with the aid of a filtration system

connected to a vacuum pump. The bottles were rinsed with hot water three times to ensure recovery of all the residue of fermentation. The bags were then dried in a forced air oven set at 55° C for 48 h. Dry matter degradation was calculated by difference between the initial weight of the dried substrate and the weight of the dried residue.

After the pH measurement and filtration, 1 mL of the medium was obtained using a syringe and mixed with 1 mL of 25% metaphosphoric acid, shaken slightly and placed in a freezer until analysis of ammonia-N concentration. Another 4 mL of the medium was mixed with 1 mL of 10% formaldehyde and shaken slightly then placed in a refrigerator at 4° C until analysis of bacterial and protozoal count.

7.2.3. Total bacteria and protozoa count

The concentration of total bacteria was determined after 48 h of incubation using a count chamber bacterium Petroff-Hausser (Hausser Scientific®, 3900, Horsham, PA) and a phase contrast microscope (Olympus®, BX51, Mexico City, Mexico) at a magnification of 100x. Exactly 0.5 mL of the 10% formaldehyde fixed medium sample was taken and diluted in 4.5 mL of distilled water. The concentration of bacteria per mL was determined as the average of bacteria observed in each grid, multiplied by the dilution factor and the chamber factor (2×10^7), according to the following formula: $\text{Bacterial number/mL} = \mu \times \text{FD1} \times \text{FD2} \times 2^7$

Where: μ is the average of bacteria in each grid per treatment, FD1 is the first dilution factor (1.25) and FD2 is the second dilution factor (10)

For the protozoal count, 1 mL of the 10% formaldehyde fixed sample was obtained and diluted in 1 mL of distilled water, then 0.5 mL of the mixture was taken with a Pasteur pipette (BRAND, 7712, Wertheim, Germany) and deposited into a Neubauer chamber (BRAND, 7178-10, Wertheim, Germany), subsequently observed on a contrast microscope (Carl Zeiss®, Axiostar, Mexico City, Mexico) at 400× magnification. The protozoa count was made in eight quadrants (4 of each grid), taking as viable protozoa those that maintained their morphological integrity. The concentration of protozoa per mL of culture medium was estimated as the average of protozoa observed in each grid, multiplied by the dilution factor and the chamber factor (1×10^4), according to the formula: Protozoal number = $\mu \times \text{FD1} \times \text{FD2} \times 10^4$.

Where: = μ is the average number of protozoa in each grid per treatment, FD1 is the first dilution factor (5), and FD2 is the second dilution factor (3).

7.2.4. Chemical analyses

Samples of the TMR were analyzed for DM (#934.01), ash (#942.05), N (#954.01) and ether extract (EE; #920.39) according to AOAC (1997). The TMR were analyzed for NDF content (Van Soest et al., 1991), ADF and lignin (AOAC, 1997; #973.18) using an ANKOM²⁰⁰ Fiber Analyzer Unit (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY, USA) with the use of an alpha amylase and sodium sulfite.

The concentration of ruminal ammonia-N was determined according to Broderick and Kang (1980) method. Sample of the incubation medium were centrifuged at 3000×g for 10 min, and 20 μ l of the supernatant was mixed with 1 mL of phenol and 1 mL of hypochlorite and the mixture incubated at 39 °C for 30 min

and thereafter diluted with 1 mL of distilled water. Samples were read on a visible ultraviolet light spectrophotometer (Varian, model Cary 1E, California, USA) at 630 nm. The resulting mg/dL concentration was divided by the factor 0.8, which is the 25% metaphosphoric acid dilution factor.

7.3. Results

Table 1

Biogas production (mL/g DM) of a total mixed ration as affected by the addition of xylanase, *S. cerevisiae* yeast and their mixture using rumen liquor from sheep

| Additive | CH ₄ production at 48 h of incubation | | | CO ₂ production at 48 h of incubation | | |
|-----------------|--|---|-----------------------------------|---|---|-----------------------------------|
| | mL CH ₄ /g incubated DM | Proportional CH ₄ production | mL CH ₄ /g degraded DM | CO ₂ production (mL/g DM) ² | Proportional CO ₂ production | mL CO ₂ /g degraded DM |
| Control | 222.9 | 87.1 | 311.2 | 33.1 | 12.9 | 46.2 |
| Xylanase | 219.9 | 82.3 | 303.7 | 47.3 | 17.7 | 65.4 |
| Yeast | 213.9 | 81.3 | 297.6 | 49.3 | 18.7 | 68.5 |
| Xylanase+yeast | 214.2 | 83.1 | 292.5 | 43.4 | 16.9 | 59.3 |
| SEM | 1.4 | 0.52 | 1.9 | 0.33 | 0.62 | 1.19 |
| <i>P</i> -value | 0.760 | 0.040 | 0.024 | 0.048 | 0.047 | 0.019 |

²*b* is the asymptotic gas production (mL/g DM); *c* is the rate of gas production (/h); *Lag* is the initial delay before gas production begins (h).

Table 2

Fermentation kinetics of a total mixed ration as affected by the addition of xylanase, *S. cerevisiae* yeast and their mixture using rumen liquor from goat, sheep and steer

| Additive | pH | SCF A | NH ₃ -N | DM D | OM D | ME | MC P | Total bacter ia x 10 ⁸ | Total protoz oa x 10 ⁵ |
|--------------------|-----------|-----------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|--|--|
| Control | 6.50 | 4.59 | 55.0 | 706 | 603 | 8.89 | 664 | 8.4 | 2.77 |
| Xylanase | 6.52 | 4.86 | 55.2 | 728 | 625 | 9.23 | 687 | 10.9 | 2.30 |
| Yeast | 6.48 | 4.84 | 54.4 | 719 | 623 | 9.20 | 685 | 11.4 | 2.32 |
| Xylanase+ye ast | 6.49 | 4.83 | 59.7 | 729 | 622 | 9.19 | 685 | 11.9 | 2.29 |
| SEM | 0.01 3 | 0.13 0 | 1.29 | 3.7 | 10.5 | 0.16 0 | 11.0 | 0.42 | 0.289 |
| <i>P</i> -value | 0.27 9 | 0.04 5 | 0.06 8 | 0.00 9 | 0.04 3 | 0.04 6 | 0.45 7 | 0.045 | 0.446 |

¹DMD is dry matter degradability (mg/g DM), MCP is microbial protein production (mg/g DM), ME is metabolizable energy (MJ/kg DM), NH₃-N is ammonia-N, OMD is in vitro organic matter digestibility (g/kg DM), PF₂₄ is partitioning factor at 24 h of incubation (mg DMD/mL gas), pH is ruminal, SCFA is short-chain fatty acids (mmol/g DM).

7.3.1. Gas production

No inoculum source × additive type interactions were observed for all parameters of GP, CH₄ and CO₂ productions (Table 1). Gas, CH₄, and CO₂ production were different ($P < 0.05$). The type of feed additive affected GP and CH₄ production ($P < 0.05$).

Fig 1 shows WG at different incubation hours and the effect of different inoculum sources and feed additives. The inclusion of *S. cerevisiae*, enzyme or their mixture did not affect ($P > 0.05$) the asymptotic GP with ($P = 0.045$) (Table 1). The additives decreased ($P = 0.029$) but had no effect on the lag time of WG with inoculum ($P > 0.05$).

The additives had no effect on CH₄ production (mL/g DM). However, the additives decreased the proportional CH₄ ($P = 0.04$) inoculum and lowered CH₄ production (mL/g DM) at 48 h of incubation with inoculum ($P = 0.024$) (Table 1). Inclusion of *S. cerevisiae* and xylanase resulted in higher CO₂ production (mL/g DM) and proportional CO₂ production at 48 h of incubation ($P < 0.05$).

7.3.2. Microbial population

An interaction between inoculum source and additive type was observed ($P < 0.001$) for total protozoal count but there was no interaction for total bacterial count (Table 2) ($P > 0.05$). Additive type did not affect ($P > 0.05$) both of total bacterial and protozoal counts ($P > 0.05$). However, protozoal count differed among inoculum sources ($P = 0.002$). For all inoculum sources, total bacterial counts were higher

($P < 0.05$), while total protozoal counts were not affected ($P > 0.05$) by the addition of *S. cerevisiae*, xylanase or their mixture.

7.3.3. Fermentation kinetics

No interactions were observed ($P > 0.05$) between inoculum source and additive type for all measured parameters of fermentation kinetics (Table 2). Most of the measured fermentation parameters differed ($P < 0.05$). No effect was observed with the addition of *S. cerevisiae* or xylanase on ruminal pH ($P > 0.05$), $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration, PF_{24} , and GY_{24} . Higher SCFA concentrations were observed with the inclusion of the additives with sheep inoculum ($P = 0.45$). The additives resulted in higher DMD with sheep ($P = 0.009$) inoculum OMD inoculum. *S. cerevisiae* and xylanase resulted in higher ME concentration with ($P = 0.046$).

7.4. Discussion

7.4.1. Gas production

The absence of inoculum source and feed additive type interaction reveals that the effects of additive are not inoculum dependent. Aderinboye et al. (2016) observed different fermentation parameters inocula due to different bacterial and protozoal populations and microbial activity among (Aderinboye et al., 2016).

Because ruminal microbial population depends mainly on the type of diet fed, (Mould et al., 2005). Furthermore, Mould et al. (2005) reported that other factors including host animal effects, sample preparation and inoculation might cause some variations in microbial species. Ammar et al. (2004) also reported other factors which might cause some variations between inoculum from different animal species and influence gut microflora, including chewing/eating behavior, gut physiology, compartment dimensions and retention time.

Gas production differed among the tested feed additives. This was expected because each of the additives has a different mode of action to affect ruminal fermentation (Hernandez et al., 2017). However, many reports observed that inclusion of *S. cerevisiae* (Elghandour et al., 2014) and enzymes (Vallejo et al., 2016) resulted in higher GP. *S. cerevisiae* and xylanase had a weak effect on GP. In agreement with the current results, Hernandez et al. (2017) observed negligible effects with exogenous xylanase and *S. cerevisiae* on GP kinetics. The different response among rumen liquor donors can be explained based on different ruminal microflora.

The additives higher rate of WG and decreased the lag time of WG revealing better nutrients utilization. Recent studies have shown that exogenous enzymes inclusion in diets of ruminants improved feed utilization, digestion of DM and animal performance by improving DM degradation (Morsy et al., 2016). Rodriguez et al. (2015) observed that *S. cerevisiae* addition decreased rate of GP. This inconsistency may be due to the composition of the substrates (Elghandour et al., 2014). The lower

lag time of GP may be due to higher degradation of feed nutrients especially fibers (Kholif et al., 2016; Elghandour et al., 2017).

Exogenous enzymes have the ability to stimulate the initial phases of microbial colonization in the rumen and facilitate the bacterial attachment to feed particles (Giraldo et al., 2007). *S. cerevisiae* was reported to effectively consume O₂ molecules from the rumen making the ruminal environment more commensurate for optimum activity of various microorganisms (Newbold et al., 1996). In addition, Callaway and Martin (1997) reported that *S. cerevisiae* contains small peptides and many important nutrients required for the growth and activity of ruminal microorganisms especially ruminal cellulolytic bacteria to initiate the fermentation process (Paya et al. 2007). Williams et al. (1991) reported a stimulation effect of *S. cerevisiae* on cellulose degradation, which was associated with a lower lag time and higher initial rates of digestion, without affecting the extent of ruminal digestion. Lowering the lag time of WG with xylanase and *S. cerevisiae* reveals the ability of these additives to overcome the problem of low intakes and slow digestion of low quality forages (Salem et al., 2015).

7.4.2. Greenhouse gases

Boeckaert et al. (2007) reported that ruminal protozoal population varied from animal-to-animal, despite the feeding of the same diets. The different CH₄ production among ruminal species indicates that one species could not be used to predict CH₄ production (Bueno et al., 2005) for another species. As previously shown, enteric CH₄ emission contributes to a loss of net feed energy (Hristov et al., 2015). Therefore, intensive research efforts have recently been directed towards mitigation

of CH₄ production from ruminants (Elghandour et al., 2016b). During the ruminal fermentation process within the rumen, gases consisting of mainly CH₄, CO₂ and H₂ are produced. Therefore, the unaffected WG and lower proportional CH₄ production reveals that the additives were effective to reduce CH₄ production, and may serve as efficient methods to reduce CH₄ emission from ruminants. Polyorach et al. (2014) observed that *S. cerevisiae* supplementation decreased *in vitro* CH₄ production, which supports the current findings. Moreover, Salem et al. (2015) and Kholif et al. (2016) also observed that the addition of enzymes lowered CH₄ production in equine diets. In ruminant nutrition, xylanase was not expected to reduce CH₄ production because it has been shown that xylanase increases the availability of hemicellulose and therefore CH₄ production (Elghandour et al., 2016b). However, the reasons for this are unclear. The lowered CH₄ production can be explained based on the ability of xylanase to stimulate the reductive acetogens in the rumen that alters H₂ metabolism and its utilization by methanogens to reduce CH₄ formation and emissions (Stewart et al., 1997).

S. cerevisiae lowered CH₄ production because of the ability of *S. cerevisiae* to stimulate the acetogens through its competition and co-metabolization of H₂ with methanogens (Hristov et al., 2013). Moreover, the inclusion of *S. cerevisiae* in the diets of ruminants has been shown to enhance nutrient digestibility (Hassan et al., 2016) and altering SCFA production in the rumen by elevating populations of cellulolytic and amylolytic bacteria in the rumen (Kumar et al., 1997). The full mode of action for reduction of CH₄ production is not clear, because some studies reported increased CH₄ production with *S. cerevisiae* supplementation (Elghandour et al.,

2017). Newbold and Rode (2006) reported a decreased CH₄ production with feeding live *S. cerevisiae* products.

The discussion above, suggests that both of *S. cerevisiae* and xylanase act on the metabolization of H₂ in the rumen because a copious quantity of H₂ is produced and together with CO₂ from the ruminal degradation of organic matter are used to synthesize CH₄ by methanogenic Archaea (Hernandez et al., 2017).

7.4.3. Microbial population

Additives did not affect total protozoal counts. Corona et al. (1999) and Chung et al. (2012) reported that protozoa population were not affected by *S. cerevisiae* and fibrolytic enzyme supplementation administration in rams and cows. *S. cerevisiae* and xylanase resulted in higher total bacterial numbers. Newbold et al. (1996) observed that *S. cerevisiae* supplementation increased the total anaerobic and cellulolytic bacteria count. The higher bacterial number with *S. cerevisiae* is a result of providing the incubation medium with important nutrients, nutritional cofactors and vitamins such as biotin and thiamine, which are required for enhancing microbial growth and activity (Callaway and Martin, 1997). Besides, *S. cerevisiae* provides conducive anaerobic conditions to microbial growth (Mosoni et al. 2007), making the ruminal environment more suitable for microbial growth. On the other hand, exogenous enzyme, like xylanase, can stimulate ruminal fibrolytic and non-fibrolytic bacteria through releasing of carbohydrates that are readily utilized by the bacteria (Nsereko et al. 2002). Higher bacterial numbers with the inclusion of

cellulase and xylanase in the incubation medium in vitro was observed by Mao et al. (2013).

7.4.4. Fermentation kinetics

Greater SCFA concentrations were observed with the inclusion of the additives to goat and sheep inocula. Mao et al. (2013) reported that the inclusion of *S. cerevisiae* in the diet of ruminant increased total SCFA and propionic acid production. Greater SCFA production and ME concentrations are associated with enhanced activities of ruminal microflora. As previously shown, the higher ruminal bacterial number with the additives is the reason for enhanced ruminal fermentation. At the same time, the improved DMD with sheep and steer inoculum and higher OMD with goat inoculum might be a result of enhanced fungal colonization of plant cell walls resulting in enhanced DM and fiber digestion (Patra, 2012). The greater degradability is related to the ability of xylanase to enhance the attachment and colonization of ruminal microbes to plant cell wall particles (Nsereko et al. 2002). Moreover, the inclusion of exogenous enzyme enhances the synergism interaction between endogenous ruminal enzymes and the exogenous enzyme resulting in enhanced nutrient degradability. The enhanced degradability with the inclusion of *S. cerevisiae* may be a result of enhanced ruminal environment with *S. cerevisiae* supplementation (Newbold et al., 1996; Callaway and Martin, 1997). Hernandez et al. (2017) reported that the inclusion of *S. cerevisiae* and xylanase did not affect DMD but decreased fermentation kinetics.

7.5. Conclusion

S. cerevisiae and fibrolytic enzyme xylanase did not affect gas production of the tested ration; however, they made qualitative changes in produced gases and improved the environmental conditions. *S. cerevisiae* and xylanase decreased CH₄ production, which is very important from an environmental standpoint, and therefore, these feed additives can be used as a sustainable strategy to reduce greenhouse gases from livestock. Further research is needed to test more doses of the additives in both in vitro and in vivo studies to validate or negate the present results and to determine whether these additives could be used as feed additives for improving the environmental conditions, and affect feed utilization and CH₄ production.

8. LÍMITE DE ESPACIO Y TIEMPO

Límite de espacio

El proyecto se llevara a cabo, en el laboratorio de bromatología del colegio de postgraduado, Texcoco, México; apoyado en el Laboratorio de Bromatología, perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, ubicada en el Campus el Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México.

Límite de tiempo

El proyecto se realizará en el segundo semestre del año 2017.

CARTA DE ACEPTACIÓN

From: "veterinary@tubitak.gov.tr" <veterinary@tubitak.gov.tr>
To: asalem70@yahoo.com
Sent: Monday, 29 January 2018, 13:46
Subject: TURKISH JOURNAL OF VETERINARY AND ANIMAL SCIENCES, VET-1801-105

Dear ABDELFATTAH ZEIDAN MOHAMED SALEM,

Your manuscript has been received and is currently being processed.
We thank you for your interest in our journal.
Yours sincerely,

Manuscript Title: Influence of xylanase and *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal biomethane and carbon dioxide emissions in sheep, in vitro
Manuscript Code Number: VET-1801-105

MUHAMMET NURİ KATKAT
Journal Administrator

Note: For the manuscripts submitted via our online manuscript submission system, please use the following link:

1. <http://online.journals.tubitak.gov.tr>

9. REFERENCIA

- Aderinboye, R.Y., Akinlolu, A.O., Adeleke, M.A., Najeem, G.O., Ojo, V.O.A., Isah, O.A., Babayemi, O.J., 2016. In vitro gas production and dry matter degradation of four browse leaves using cattle, sheep and goat inocula. *Slovak J. Anim. Sci.* 49, 32-43.
- Ahmed, M.H., Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Zeweil, H.S., Kholif, A.E., Klieve, A.V., Abdelrassol, A.M.A., 2015. Influence of *Trichoderma reesei* or *Saccharomyces cerevisiae* on performance, ruminal fermentation, carcass characteristics and blood biochemistry of lambs fed *Atriplex nummularia* and *Acacia saligna* mixture. *Livest. Sci.* 180, 90-97.
- Ammar, H., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Ovejero, F.J., Gonzalez, J.S. Lopez, S. 2004. Effect of inoculum source (sheep or goat rumen fluid) on in vitro digestibility and gas production kinetics of the foliage of some Spanish browse plants. *Options Mediterraneennes. Serie A, Seminaires Mediterraneenes. Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Mediterraneenes, Montpellier, France.* 59, pp. 121–126.
- AOAC, 1997. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*, 16th ed. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P., Yang, W.Z., 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81, E37-E47.

- Blümmel, M., Steingss, H., Becker, K., 1997. The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and ¹⁵N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *Br. J. Nutr.* 77, 911–921.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Mestdagh, J., Fievez, V., 2007. In vitro examination of DHA-edible micro algae: 1. Effect on rumen lipolysis and biohydrogenation of linoleic and linolenic acids. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 136(1), 63-79.
- Bruinenberg, M.H., Van der Honing, Y., Agnew, R.E., Yan, T., Van Vuuren, A.M., Valk, H., 2002. Energy metabolism of dairy cows fed on grass. *Livest. Prod. Sci.* 75, 117-128.
- Bueno, I., Abdalla, A., Cabral Filho, S.L.S., Vitti, D., Owen, E., Mauricio, R., Givens, I., Sutton, J., Mould, F., 1999. Comparison of inoculo from sheep and cattle for the in vitro gas production under tropical conditions. In: Annual Meeting of the British Society of Animal Science (Vol. 13, pp. 151-156).
- Callaway, E.S., Martin, S.A., 1997. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* 80, 2035-2044.
- Calsamiglia, S. 1997. Nuevas bases para la utilización de la fibra en dietas de rumiantes. XIII Curso de especialización FEDNA, Madrid, 6 y 7 de noviembre 1997.
- Chung, Y.H., Zhou, M., Holtshausen, L., Alexander, T.W., McAllister, T.A., Guan, L.L., Oba, M., Beauchemin, K.A., 2012. A fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets: ruminal fermentation, rumen microbial populations, and enteric methane emissions. *J. Dairy Sci.* 95, 1419–1427.

- Corona, L., Mendoza, G.D., Castrejón, F.A., Crosby, M.M., Cobos, M.A., 1999. Evaluation of two yeast cultures (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal fermentation and digestion in sheep fed a corn stover diet. *Small Rumin. Res.* 31(3), 209-214.
- Elías, A., Preston, T. R. & Willis, M. B. 1967. Intensive beef production from sugar cane. 3. Characteristics of rumen contents from bulls given normal or invert molasses as a supplement to forage or concentrates. *Cuban J. Agric. Sci.* 1:49
- Elghandour M.M.Y., Kholif, A.E., Hernández, J., Mariezcurrena, M.D., López, S., Camacho, L.M., Márquez, O., Salem, A.Z.M., 2016b. Influence of the addition of exogenous xylanase with or without pre-incubation on the in vitro ruminal fermentation of three fibrous feeds. *Czech J. Anim. Sci.* 61 (6), 262–272.
- Elghandour, M.M., Chagoyán, J.C.V., Salem, A.Z., Kholif, A.E., Castañeda, J.S.M., Camacho, L.M., Cerrillo-Soto, M.A., 2014. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* at direct addition or pre-incubation on in vitro gas production kinetics and degradability of four fibrous feeds. *Ital. J. Anim. Sci.* 13(2), 295-301.
- Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Marquez-Molina, O., Vazquez-Armijo, J.F., Puniya, A.K., Salem, A.Z.M., 2015. Influence of individual or mixed cellulase and xylanase mixture on in vitro rumen gas production kinetics of total mixed rations with different maize silage and concentrate ratios. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 39(4), 435-442.
- Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Salem, A.Z.M., de Oca, R.M., Barbabosa, A., Mariezcurrena, M., Olafadehan, O.A., 2016a. Addressing sustainable ruminal methane and carbon dioxide emissions of soybean hulls by organic acid salts. *J. Clean. Prod.* 135, 194–200.

Elghandour, M.M.Y., Vázquez, J.C., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Cipriano, M.M., Camacho, L.M., Márquez, O., 2017. In vitro gas and methane production of two mixed rations influenced by three different cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Appl. Anim. Res., 45, 389-395,

Erausmus, L J 1992. La Importancia de los Perfiles Duodenales de aminoácidos en Vacas Lecheras y los Cambios significativos de estos perfiles al uso del Yea-Sacc. In Biotecnología en la Industria de la alimentación Animal. México, Alpligén. V. 3, p 13, 33.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2006. Livestock a Major Threat to the Environment: Remedies Urgently Needed. [accessed 26 December 2017]. Available:<http://www.fao.org/newsroom/en/news/2006/1000448/index.html>.

Fedorak, P.M., Hrudey, S.E., 1983. A simple apparatus for measuring gas-production by methanogenic cultures in serum bottles. Environ. Technol. Lett. 4, 425–432.

Fraga M.C (2010), Microbiota ruminal: estrategias de modulación con microorganismos fibrolíticos Tesis de Maestría en Biotecnología, Facultad de Ciencias. Universidad de la República Uruguay.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal op Applied bacteriology (USA) 66:365-387. In Biotecnology in animal feeds and animal feeding. S.f. Ed. by R. Jhon Wallace and Andreu Chesson. New Cork, VCH p. 202.

Getachew, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2002. Tropical browses: contents of phenolic compounds, in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. J. Agr. Sci., Cambridge., 139, 341–352.

- Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Carro, M.D., 2007. Effects of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in Rusitec fermenters. *J. Anim. Sci.* 85, 1962–1970.
- Goering, M.K., Van Soest, P.J., 1970. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications). Agriculture Handbook, No 379. Agricultural Research Service, USDA, Washington, DC.
- Gutiérrez O.B., (2015). La fisiología digestiva del rumiante, objeto de investigación en el Instituto de Ciencia Animal durante cincuenta años, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba 49, 2, 2015: 179-188
- Hassan, A.A., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Samir, M., Yacout, M.H., Hafsa, S.A., Mendoza, G.D., Elghandour, M.M.Y., Ayala, M., Lopez, S., 2016. Performance of crossbred dairy Friesian calves fed two levels of *Saccharomyces cerevisiae*: intake, digestion, ruminal fermentation, blood parameters and faecal pathogenic bacteria. *J. Agr. Sci.* 154, 1488-1498.
- Hernandez, A., Kholif, A.E., Lugo-Coyote, R., Elghandour, M.M.Y., Cipriano, M., Rodríguez, G.B., Odongo, N.E., Salem, A.Z.M., 2017. The effect of garlic oil, xylanase enzyme and yeast on biomethane and carbon dioxide production from 60-d old Holstein dairy calves fed a high concentrate diet. *J. Clean. Prod.* 142, 2384–2392.
- Hook, S.E., Wright, A.D.G., McBride, B.W., 2010. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*, 2010. Article ID 945785, 11 pages; doi:10.1155/2010/945785.
- Hristov, A. N., Oh, J., Giallongo, F., Frederick, T. W., Harper, M. T., Weeks, H. L., Branco, A.F., Moate, P.J., Deighton, M. H., Williams, S.R.O., Kindermann, M., Duval, S., 2015.

An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 112(34), 10663–10668.

Hristov, A.N., Oh, J., Firkins, J.L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H.P., Adesogan, A.T., Yang, W., Lee, C., Gerber, P.J., Henderson, B., Tricarico, J.M., 2013. Special topics: mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *J. Anim. Sci.* 91, 5045–5069.

Khattab, H.M., Gado, H.M., Kholif, A.E., Mansour, A.M., Kholif, A.M., 2011. The potential of feeding goats sun dried rumen contents with or without bacterial inocula as replacement for berseem clover and the effects on milk production and animal health. *Int. J. Dairy Sci.* 6, 267-277.

Kholif, A.E., Baza-García, L.A., Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Barbabosa, A., Dominguez-Vara, I.A., Sanchez-Torres, J.E., 2016. In vitro assessment of fecal inocula from horses fed on high-fiber diets with fibrolytic enzymes addition on gas, methane, and carbon dioxide productions as indicators of hindgut activity. *J. Equine Vet. Sci.*, 39, 44-50.

Kholif, A.E., Elghandour, M.M.Y., Rodríguez, G.B., Olafadehan, O.A., Salem, A.Z.M., 2017. Anaerobic ensiling of raw agricultural waste with a fibrolytic enzyme cocktail as a cleaner and sustainable biological product. *J. Clean. Prod.* 142, 2649–2655.

Kumar, U., Sareen, V.K., Singh, S., 1997. Effect of yeast culture supplement on ruminal microbial populations and metabolism in buffalo calves fed a high roughage diet. *J. Sci. Food Agric.* 73, 231e236.

- Lewis, G.E., Sanchez, W.K., Hunt, C.W., Guy, M.A., Pritchard, G.T., Swanson, B.I., Treacher R.J., 1999. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 611-617.
- Mao H.L., Wu C.H., Wang J.K., Liu J.X., 2013. Synergistic effect of cellulase and xylanase on in vitro rumen fermentation and microbial population with rice straw as substrate. *Anim. Nutr. Feed Technol.* 13, 477–487.
- McAllister, T.A., Hristov, A.N., Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Cheng, K.-J., 2001. Enzymes in ruminant diets. In: Bedford M., Partridge G. (eds.): *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 273–298.
- McDonald, P. Edwards, R. Greenhalgh, J y Morgan, C. 1995. *Nutrición animal* 5ª Ed. cribia S.A. Zaragoza, España. 145-147 p.
- Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., Schneider, W., 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J. Agr. Sci., Cambridge.*, 93, 217–222
- Morsy, T.A., Kholif, A.E., Kholif, S.M., Kholif, A.M., Sun, X., Salem, A.Z.M., 2016. Effects of two enzyme feed additives on digestion and milk production in lactating Egyptian buffaloes. *Ann. Anim. Sci.* 16, 209–222.
- Mosoni, P., Chaucheyras-Durand, F., Berat- Maillet, C., Forano, E., 2007. Quantification by real time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheeps after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates. Effect of a yeast additive. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2676-2685.

- Mould, F.L., Kliem, K.E., Morgan, R., Mauricio, R.M., 2005. In vitro microbial inoculum: a review of its function and properties. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123, 31-50.
- Newbold, C.J., Rode, L.M., 2006. Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. *Int. Congr. Ser.* 1293, 138-147.
- Newbold, C.J., Wallace, R.J., McIntosh, F.M., 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *Br. J. Nutr.* 76, 249e261.
- Nkrumah, J.D., Okine, E.K., Mathison, G.W., Schmid, K., Li, C., Basarab, J.A., Price, M.A., Wang, Z., Moore, S.S., 2006. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 84(1), 145-153.
- Nsereko, V.L., Beauchemin, K.A., Morgavi, D.P., Rode, L.M., Furtado, A.F., McAllister, T.A., Iwaasa, A.D., Yang, W.Z., Wang, Y., 2002. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. *Can. J. Microbiol.* 48, 14–20.
- Patra, A.K., 2012. The use of live yeast products as microbial feed additives in ruminant nutrition. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 7, 366- 375.
- Paya, H., Taghizadeh, A., Janmohammadi, H., Moghadam, G.A., 2007. Nutrient digestibility and gas production of some tropical feeds used in ruminant diets estimated by the in vivo and in vitro gas production techniques. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 2, 108- 113.
- Polyorach, S., Wanapat, M., Cherdthong, A., 2014. Influence of yeast fermented cassava chip protein (YEFECAP) and roughage to concentrate ratio on ruminal fermentation and microorganisms using in vitro gas production technique. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 27, 36–45.

- Roderick, M. y White, B. 1990. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: Potential impact on nutrient output. *Journal Dairy Science* 73(10): 2971-2995.
- Rodriguez, M.P., Mariezcurrena, M.D., Mariezcurrena, M.A., Lagunas, B.C., Elghandour, M.M.Y, Kholif, A.M., Kholif, A.E., Almaráz, E.M., Salem, A.Z.M., 2015. Influence of live cells or cells extract of *Saccharomyces cerevisiae* on in vitro gas production of a total mixed ration. *Ital. J. Anim. Sci.* 14(4), 590-595.
- Rose, A. H., 1987. Yeast culture. A microorganism for all species: a theoretical look at its mode of action. In *Biotechnology in the feed industry*. P. 113 -118.
- Salem, A.Z.M., Alsersy, H., Camacho, L.M., El-Adawy, M.M., Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Rivero, N., Alonso, M.U., Zaragoza, A., 2015. Feed intake, nutrient digestibility, nitrogen utilization, and ruminal fermentation activities in sheep fed *Atriplex halimus* ensiled with three developed enzyme cocktails. *Czech J. Anim. Sci.* 60(4), 185-194.
- Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Elghandour, M.M.Y., Buendía, G., Mariezcurrena, M.D., Hernandez, S.R., Camacho, L.M., 2014. Influence of oral administration of *Salix babylonica* extract on milk production and composition in dairy cows. *Ital. J. Anim. Sci.*, 13(1), 10-14.
- SAS, 2002. *Statistical Analysis System. User's Guide: Statistics. Ver 9.0.* SAS Institute, Cary, NC.
- Stewart, C.S., Flint, H.J., Bryant, M.P., 1997. The rumen bacteria. In: *The Rumen Microbial Ecosystem* (Eds. P.N. Hobson and C.S. Stewart), Chapman and Hall, London, UK, pp. 10-72.

- Valdes, K.I., Salem, A.Z.M., López, S., Alonso, M.U., Rivero, N., Elghandour, M.M.Y., Domínguez, I.A., Ronquillo, M.G., Kholif, A.E., 2015. Influence of exogenous enzymes in presence of *Salix babylonica* extract on digestibility, microbial protein synthesis and performance of lambs fed maize silage. *J. Agr. Sci.* 153(04), 732-742.
- Van Vuuren, A.M. (2003) En: International One-Day Seminar: Role of Probiotics in Animal Nutrition and their Link to the Demands of European Consumers. Lelystad.
- Vallejo, L.H., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Elghangour, M.M.Y., Fajardo, R.C., Rivero, N., Bastida, A.Z., Mariezcurrena, M.D., 2016. Influence of cellulase or xylanase on the in vitro rumen gas production and fermentation of corn stover. *Indian J. Anim. Sci.* 86(1), 70-74.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and non-starch carbohydrates in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.
- Velázquez-Garduño, G., Mariezcurrena-Berasain, M.A., Salem, A.Z., Gutiérrez-Ibañez, A.T., Bernal-Martínez, L.R., Pinzón-Martínez, D.L., Kholif, A.E., Odongo, N.E., Mariezcurrena-Berasain, M.D., 2015. Effect of organic selenium-enriched yeast supplementation in finishing sheep diet on carcasses microbiological contamination and meat physical characteristics. *Ital. J. Anim. Sci.* 14(3), p.3836.
- Williams, P E V; New Blod, C J 1990. Rumen Probiosis: The Effects of novel microorgams on rumen fermentation and ruminant productivity. In:Recent Advances in Animal nutrition 1990. W. Haresing and D. J. A. Cole, eds. Butterworths, London. P. 211-227.
- Williams, P.E.V., Tait, C.A.G., Innes, G.M., Newbold, C.J., 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of cows on

milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of sheep and steers. *J. Anim. Sci.* 69:3016- 3026.