

## Veterinaria México

Volumen 36  
Volume

Número 1  
Number

Enero-Marzo 2005  
January-March

*Artículo:*

### Caracterización de productos fibrolíticos comerciales utilizados en la alimentación de rumiantes

Derechos reservados, Copyright © 200:  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**Otras secciones de  
este sitio:**

- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

***Others sections in  
this web site:***

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)

## Caracterización de productos fibrolíticos comerciales utilizados en la alimentación de rumiantes

### Characterization of commercial fibrolytic products for ruminant diets

Laura Ramírez Cancino\*   Emilio Aranda Ibáñez\*\*   Germán David Mendoza Martínez\*  
Luis Landois Palencia\*\*\*   Luis Alberto Miranda Romero†   María Magdalena Crosby Galván\*

---

#### Abstract

Enzymatic activity (IU, international units) was determined for three enzymatic complexes (A, B, and C), at pH 5.5 and 6.5, using pH 102 crystalline cellulose, carboxymethyl cellulose (CMC), and oat xylan as substrate. Activity was higher ( $P < 0.05$ ) at pH 6.5. Cellulolytic activity was higher ( $P < 0.05$ ) with crystalline cellulose and CMC with enzyme A (53.68<sup>a</sup> and 56.87<sup>a</sup>, IU). The activity was higher ( $P < 0.05$ ) with enzymes A and B (222.16<sup>a</sup> y 229.31<sup>a</sup>, UI) with xylan. The degradation half time (h) was similar ( $P > 0.05$ ) among enzymes (A 4.02 h, B 4.18 h and C 4.37 h). *In vitro* digestion of crystalline cellulose and CMC was higher ( $P < 0.05$ ), with enzyme C (75.69<sup>a</sup>%), and for CMC was higher with enzymes C and B (99.9<sup>a</sup>% and 87.04<sup>ab</sup> %) and different between enzymes C and A (99.9<sup>a</sup>% and 79.54<sup>b</sup>%). When exogenous enzymes were incubated with ruminal microbes, a high enzymatic activity with purified substrates was observed, which does not necessarily corresponds to a highest digestibility, presumably due to the differences on the degradation rate among them (A 17.22<sup>a</sup>%, B 16.57<sup>ab</sup>% and C 15.85<sup>b</sup>%).

**Key words: ENZYMES, ACTIVITY, CELLULOSE, HEMICELLULOSE, XYLAN.**

#### Resumen

Se determinó la actividad enzimática (unidades internacionales, UI) de tres complejos enzimáticos (A, B, y C), a pH 5.5 y 6.5, utilizando como sustrato celulosa cristalina pH 102, carboximetil celulosa (CMC) y xylan de avena. Se observó mayor actividad ( $P < 0.05$ ) a pH 6.5. La actividad celulolítica fue mayor ( $P < 0.05$ ) para celulosa cristalina y CMC con la enzima A (53.68<sup>a</sup> y 56.87<sup>a</sup>, UI). La actividad fue mayor ( $P < 0.05$ ) para las enzimas A y B (222.16<sup>a</sup> y 229.31<sup>a</sup>, UI) con xylan. El tiempo medio de degradación fue similar ( $P < 0.05$ ) entre enzimas (A, 4.02 h; B, 4.18 h; y C, 4.37 h). La digestibilidad *in vitro* de la celulosa cristalina fue mayor ( $P < 0.05$ ) para la enzima C (75.69<sup>a</sup>%), para CMC fue mayor con las enzimas C y B (99.9<sup>a</sup> y 87.04<sup>ab</sup>%) y diferente entre la enzima C y A (99.9<sup>a</sup> y 79.54<sup>b</sup>%). Al incubar las enzimas exógenas con microorganismos ruminales se observó que una mayor actividad enzimática en sustratos puros no necesariamente corresponde a una mayor digestibilidad, posiblemente por la diferencia en la tasa de degradación entre ellas (A, 17.22<sup>a</sup>; B, 16.57<sup>ab</sup>; y C, 15.85<sup>b</sup>%).

**Palabras clave: ENZIMAS, ACTIVIDAD, CELULOSA, HEMICELULOSA, XYLAN.**

---

Recibido el 4 de marzo de 2004 y aceptado el 7 de septiembre de 2004.

\*Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados, Carretera México-Texcoco, km 36.5, Montecillo, 56230, Estado de México, México. Tel. 01(995)95-2-02-00 ext. 1712, Fax 95-2-02-79, e-mail: gmendoza@colpos.mx y lramirez@colpos.mx o maria@colpos.mx

\*\*Área de Nutrición de Rumiantes, Colegio de Postgraduados, Campus-Tabasco, Castaños 303, Fraccionamiento Los Reyes, Loma Alta, 86570, H. Cárdenas Tabasco, Tel. 01 (937) 240 99, e-mail: earanda@colpos.mx

\*\*\*Programa de Estadística, Colegio de Postgraduados, correo electrónico llandois@colpos.mx

†Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chapingo, Km 38.5, Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México, México, Tel. 01-595-95-2-15-00 Ext. 5097, e-mail lmiranda@taurus1.chapingo.mx

## Introduction

Enzymes can be used as additives for ruminant feeds to increase diet digestibility and production;<sup>1-3</sup> however, it is necessary to evaluate and compare based on international units (IU) in order to make an efficient use of them, studying their activity under different conditions of pH which represent the probable dietary conditions. In the literature there are few reports of enzymatic activity in IU<sup>4,5</sup> from commercial products, which do not report international units to compare, and it has been described that activity varies among commercial products.<sup>6</sup>

It is also needed to know ruminal degradation of the enzymes to identify the products with more activity under ruminal conditions; besides, it is convenient to evaluate with purified substrates in doses equivalent in terms of IU to compare the effectiveness with ruminal microbes. Considering this, the objectives of this research were to determine the enzymatic activity in international units of three commercial products available in Mexico and to study the *in vitro* ruminal degradation of the enzyme proteins and its effect on *in vitro* digestion of purified substrates

## Material and methods

To determine the enzymatic activity, *in vitro* ruminal degradation of the enzymes and *in vitro* digestion of purified substrates, the following commercial complexes were used: enzyme A (Fibrozyme, Alltech), which contain enzymes from *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*, enzyme B with cellulases and glucanases, and the enzyme C, that contains hemicellulases and cellulases (industrial hemicellulase, Enmex).

### Enzymatic activity

The substrates used to evaluate enzymatic activity were crystalline cellulose pH 102,\* carboxymethyl cellulose (CMC)\*\* and oat xylan.\*\*\* In 2 ml of buffer solution pH 5.5 or in 2 ml of sodium phosphate buffer (pH 6.5, 0.1 M) were dissolved 2% crystalline cellulose, 2% CMC, or 1% oat xylan. The enzymes were dissolved in 2 ml of buffer solution pH 5.5 and 6.5 at 2% and 1%, to obtain a relation enzyme-substrate v/v or weight/v.

The preparation was incubated at 39°C for one hour. Enzymatic activity was determined by reducing sugars using dinitrosalicylic acid (RADSL);<sup>7,8</sup> one 1 ml of RADSL acid was added to 2 ml of the sample and incubated in water bath at 95°C by 15 m, a blank with RADSL was also included. Then tubes were cooled with tap water and centrifuged (800 g) for 20 m. Anhydrate glucose was used for the standard curve;

## Introducción

Las enzimas pueden ser empleadas como aditivos para la alimentación de rumiantes con el propósito de incrementar la digestibilidad de las dietas y la producción;<sup>1-3</sup> sin embargo, es necesario evaluarlas y compararlas con base en unidades internacionales (UI) para hacer un uso eficiente de ellas, estudiando su actividad bajo diferentes condiciones de pH que representen posibles condiciones dietarias. En la literatura hay pocos informes de actividad enzimática en UI<sup>4,5</sup> de productos comerciales, los cuales no notifican unidades internacionales para compararlas, y se ha descrito que la actividad varía entre productos comerciales.<sup>6</sup>

También es necesario conocer la degradación ruminal de las enzimas para identificar los productos con mayor actividad en el medio ruminal; además, es conveniente evaluarlas con sustratos purificados en dosis equivalentes en términos de UI para comparar la efectividad con microorganismos ruminales. Considerando lo anterior, los objetivos de esta investigación fueron determinar la actividad enzimática en unidades internacionales de tres productos comerciales disponibles en México, y conocer la degradación ruminal *in vitro* de la proteína de las enzimas y su efecto en la digestión *in vitro* de sustratos purificados.

## Material y métodos

Para determinar la actividad enzimática, la degradación ruminal *in vitro* de las enzimas y la digestión *in vitro* de sustratos puros, se utilizaron complejos enzimáticos comerciales: enzima A (Fibrozyme, Alltech), que contienen enzimas de *Aspergillus niger* y *Trichoderma viride*; enzima B, que contiene celulosas y glucanases; y enzima C, que contiene hemicelulasas y celulosas (hemicelulasa de uso industrial, Enmex).

### Actividad enzimática

Los sustratos utilizados para evaluar la actividad enzimática fueron celulosa cristalina pH 102,\* carboximetil celulosa\*\* y xylan de avena.\*\*\* En 2 ml de una solución amortiguadora pH 5.5 o en 2 ml amortiguados en pH 6.5 de sodio-fosfato al 0.1M, se disolvió 2% de celulosa cristalina, 2% de CMC o 1% para xylan. Las enzimas se disolvieron en 2 ml de solución amortiguadora pH 5.5 y 6.5 al 2% y 1% para obtener una relación enzima-sustrato v/v o peso/v.

La preparación se incubó a 39°C por una hora.

\*Padoquimia, S.A, México.

\*\*CMC Sigma, México.

\*\*\*Sigma, México.

measuring absorbance at 640 nm in a UV spectrophotometer.<sup>†</sup> Enzyme protein was determined by the Lowry method,<sup>9</sup> dissolving 1 g of enzyme in 10 ml of potassium phosphate buffer pH 7.4, 0.1M, then 1 ml of trichloroacetic acid (20%) was added to 1 ml of the solution to precipitate proteins, allowing one night in the refrigerator. Sample was centrifuged for 10 m (900 x g). The sediment was dissolved in 2 ml of 1N NaOH and mixed with vortex until sample was dissolved.

Then 0.2 ml of the dissolved sample were added with 2.5 ml of the solution (50 mg of CuSO<sub>4</sub>-100 ml water; 10 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-100 ml water; 100 mg Na and K tartrate-100 ml water and 2 g of 0.5N NaOH/100 ml), waiting 10 m then 0.2 ml of Folin reagent were added, mixed and allowing to rest for 30 m. Bovine serum albumin was used as standard at 750 nm absorbance. The enzymatic activity was defined as micromoles (μmol) of glucose equivalent formed for milligram of protein by minute. Results were analyzed as a Completely randomized design with factorial arrangement 3 × 2, where factors were the enzyme and pH (5.5 and 6.5),<sup>10</sup> the analyses were conducted for each substrate with the three enzymes with the GLM procedure.<sup>11</sup> Means were compared by the Tukey test.<sup>10</sup>

### **In vitro degradation of enzymes**

Degradation of enzymes was determined by ammonia N release (N-NH<sub>3</sub>), incubating with ruminal microbes *in vitro*. The ruminal fluid was obtained from two Holstein heifers (BW 400 kg), fed with alfalfa and with a ruminal canula. The inoculum was collected with a vacuum pump with filters, two hours before feeding and was kept in an isolated thermos previously gased with CO<sub>2</sub>, maintained at 39°C. The ratio ruminal fluid and McDougall's artificial saliva was 1:1 (15:15 ml), the incubation was carried out in 50 ml tubes of polypropylene which contained the same protein concentration for each enzyme product (25.8 μl), of the enzyme A (5.71% of protein, 452 μl of the commercial product), B (8.27% of protein, 312 μl of the commercial product) and C (6.7% of protein, 385 μl of commercial product).<sup>12</sup> The N-NH<sub>3</sub> values were corrected with a blank (ruminal fluid and artificial saliva of McDougall). Incubation hours were 0, 2, 4, 6, 12, and 24 hours. Fermentation was stopped with HCl (50%) and the N-NH<sub>3</sub> concentration was determined by the McCullough method.<sup>13</sup>

A completely randomized block design was used,<sup>10</sup> using days of incubation (3 days) as a criteria of blocking. The variance analysis was done with the GLM procedure<sup>11</sup> and mean differences were compared with the Tukey test.<sup>10</sup> A simple regression analyses

La actividad enzimática se determinó mediante azúcares reductores utilizando ácido dinitrosalicílico (RADSL);<sup>7,8</sup> se agregó 1 ml de ácido RADSL a 2 ml de la muestra y se incubó en baño María a 95°C durante 15 min, también se incubó RADSL, el cual se utilizó como blanco. Después los tubos fueron enfriados con agua corriente y posteriormente centrifugados (800 g) durante 20 min. Se utilizó glucosa anhidra para la curva estándar; midiendo la absorbancia a 640 nm en un espectrómetro de luz ultravioleta.\* La proteína de las enzimas se determinó por el método de Lowry,<sup>9</sup> para lo cual se disolvió 1 g de enzima, 10 ml de amortiguador, fosfato de potasio pH 7.4 0.1M, posteriormente a 1 ml de la mezcla se le agregó 1 ml de ácido tricloroacético al 20%, para precipitar la proteína y se dejó reposar durante una noche en el refrigerador. La muestra fue centrifugada por 10 min (900 g). El sedimento se disolvió en 2 ml de NaOH 1N y se agitó con el vortex hasta disolver la muestra.

Posteriormente se tomaron 0.2 ml de la muestra ya disuelta y se le agregó 2.5 ml de mezcla (50 mg de CuSO<sub>4</sub>-100ml de agua; 10 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-100 ml de agua; 100 mg tartrato de Na y K-100 ml de agua y 2 g de NaOH 0.5 N-100 ml), se esperó 10 min para agregarle 2 ml de reactivo de folin, se agitó y se dejó reposar por 30 min. Se utilizó suero de albúmina de bovino como estándar a una absorbancia de 750 nm. La actividad enzimática fue definida por micromoles (μmol) de glucosa equivalente formada por miligramo de proteína por min. Los resultados se analizaron como diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 × 2, donde los factores fueron enzima y pH (5.5 y 6.5),<sup>10</sup> los análisis se realizaron de manera independiente para cada sustrato con las tres enzimas con el procedimiento GLM.<sup>11</sup> Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey.<sup>10</sup>

### **Degradación in vitro de las enzimas**

La degradación de las enzimas se determinó mediante la liberación de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), al incubar con microorganismos ruminales *in vitro*. El líquido ruminal se obtuvo de dos vaquillas Holstein (PV 400 kg), con cánulas ruminales alimentadas con alfalfa. El inóculo se extrajo con una bomba de vacío equipada con filtros, dos horas antes de suministrar el alimento, y se depositó en un termo aislante previamente gaseado con CO<sub>2</sub>, que se mantuvo a 39°C. La relación líquido ruminal y saliva artificial de McDougall fue de 1:1 (15:15 ml), la incubación se realizó en tubos de 50 ml de polipropileno que contenían la misma concentración de proteína para cada producto enzimático (25.8 μl), de la enzima A (5.71% de proteína, 452 μl del producto comercial), B

\* Spectronic 20.

was carried to estimate degradation half time of the enzymatic products in ruminal fluid, assuming a first order kinetic, estimating the degradation half time ( $T1/20.693/\text{rate of degradation}$ ), were 0.693 is the mean value of the natural log of 2, assuming that this represents the half of the maximum degradation  $[(1/0.5) = 2]$  and the rate of degradation is the slope between time and natural log of  $N-NH_3$ . The slopes were compared with a confidence interval.<sup>10</sup>

### ***In vitro digestibility of purified substrates with addition of enzymes***

Using the enzymatic activity values (Table 1), *in vitro* digestibility was determined in crystalline cellulose (300 mg), CMC (500 mg) and xylan (500 mg); using the same enzymatic activity according to the substrate. Samples were incubated at 39°C by 12 and 24 hours in dacron bags (3.5 × 8 cm and 40 μ pore size diameter), which were placed into 50 ml propylene tubes containing ruminal fluid and McDougall's artificial saliva (pH 6.8), maintaining a 1:1 ratio (15:15 ml). The bags were washed and dried by 24 hours in an oven (60°C) and weighted. By differences in weight, substrate disappearance was determined.

Results were analyzed as a completely randomized block design, using as a blocking criteria the days of incubation (2 days). The GLM procedure was used for the variance analyses<sup>11</sup> and the Tukey test to compare means.<sup>10</sup>

## **Results**

### ***Enzymatic activity***

A higher enzymatic activity ( $P < 0.05$ ) was found at pH 6.5 than at pH 5.5 (Table 1), with the exception of the enzyme C when was incubated with crystalline cellulose and CMC. When crystalline cellulose was incubated, the major activity ( $P < 0.05$ ), was with the enzyme A, in comparison to the enzymes B and C. In incubations with CMC, the enzyme A showed greater activity ( $P < 0.05$ ), that the enzymes B and C (pH 6.5) and the enzyme C had the higher activity at pH 5.5 (Table 1). In the pH 6.5 solution, the enzymes A and C had higher activity ( $P < 0.05$ ) on xylan than with enzyme B; however, when xylan was incubated at pH 5.5, the activity ( $P < 0.05$ ) was higher with enzyme A, than enzymes B and C (Table 1).

### ***In vitro degradation of the enzymes***

There were no differences ( $P > 0.05$ ) on ammonia nitrogen concentration among enzymes; and its concentration ( $N-NH_3$ ) increased as incubation time was

(8.27% de proteína, 312 μl del producto comercial) y C (6.7 % de proteína, 385 μl del producto comercial).<sup>12</sup> Los valores de  $N-NH_3$  fueron corregidos con un blanco (líquido ruminal y saliva artificial de McDougall). Las horas de incubación fueron 0, 2, 4, 6, 12 y 24. La fermentación se detuvo con HCl al 50% y la concentración  $N-NH_3$  se determinó por el método de McCullough.<sup>13</sup>

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar,<sup>10</sup> tomando como criterio de bloqueo los días de incubación (tres días). El análisis de varianza se realizó con el procedimiento GLM<sup>11</sup> y las diferencias entre medias se compararon mediante la prueba de Tukey.<sup>10</sup> Se realizó un análisis de regresión simple para determinar el tiempo de vida media de los productos enzimáticos en el medio ruminal, considerando una cinética de primer orden, estimando el tiempo medio de degradación ( $T1/20.693/\text{tasa de degradación}$ ), donde 0.693 es el valor medio del logaritmo natural de 2, considerando que esto último equivale a la mitad de la degradación máxima  $[(1/0.5) = 2]$  y la tasa de degradación es la pendiente de la ecuación de regresión entre el tiempo y el Ln del  $N-NH_3$ . Las pendientes se compararon con intervalos de confianza.<sup>10</sup>

### ***Digestibilidad in vitro de sustratos puros con adición de enzimas***

Utilizando los valores de la actividad enzimática (Cuadro 1), se determinó la digestibilidad *in vitro* de la celulosa cristalina (300 mg), CMC (500 mg) y xylan (500 mg); usando la misma actividad enzimática de acuerdo con el sustrato. Las muestras fueron incubadas a 39°C por 12 y 24 horas en bolsas de poliseda (3.5 × 8 cm y 40 μ de diámetro de poro), que se colocaron tubos de 50 ml de polipropileno que contenían líquido ruminal y saliva artificial de McDougall (pH 6.8), manteniendo una relación 1:1 (15:15 ml). Las bolsas fueron lavadas y secadas por 24 horas en estufa (60°C) y pesadas. Por diferencia de peso se determinó la desaparición del sustrato.

Los resultados se analizaron con un diseño estadístico de bloques completamente al azar, usando como criterio de bloqueo los días de incubación (dos días). Se usó el procedimiento GLM para el análisis de varianza<sup>11</sup> y la prueba de Tukey para comparar las medias.<sup>10</sup>

## **Resultados**

### ***Actividad enzimática***

Se encontró mayor actividad enzimática ( $P < 0.05$ ) en pH 6.5 que a pH 5.5 (Cuadro 1), excepto con

| Cuadro 1                                                                                                                           |     |                                                            |                     |                     |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|------|
| ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (μmol DE EQUIVALENTE DE GLUCOSA FORMADA POR min POR mg DE PROTEÍNA) DE TRES PRODUCTOS ENZIMÁTICOS COMERCIALES |     |                                                            |                     |                     |      |
| ENZYMATIC ACTIVITY (μmol OF GLUCOSE EQUIVALENTS FORMED BY min PER mg OF PROTEIN), OF THREE ENZYMATIC COMERCIAL PRODUCTS            |     |                                                            |                     |                     |      |
|                                                                                                                                    |     | Enzyme                                                     |                     |                     | EE   |
|                                                                                                                                    |     | A                                                          | B                   | C                   |      |
| Protein, %                                                                                                                         |     | 5.71                                                       | 8.27                | 6.7                 |      |
| Substrate                                                                                                                          | pH  | μmol of glucose equivalent formed by min per mg of protein |                     |                     |      |
| Crystalline cellulose                                                                                                              |     |                                                            |                     |                     |      |
|                                                                                                                                    | 5.5 | 42.65 <sup>b</sup>                                         | 3.19 <sup>d</sup>   | 13.3 <sup>c</sup>   | 0.89 |
|                                                                                                                                    | 6.5 | 53.68 <sup>a</sup>                                         | 12.94 <sup>c</sup>  | 14.85 <sup>c</sup>  | 0.89 |
| Amorphous cellulose                                                                                                                |     |                                                            |                     |                     |      |
|                                                                                                                                    | 5.5 | 38.52 <sup>b</sup>                                         | 2.28 <sup>c</sup>   | 12.63 <sup>d</sup>  | 1.91 |
|                                                                                                                                    | 6.5 | 56.87 <sup>a</sup>                                         | 25.91 <sup>c</sup>  | 20.79 <sup>cd</sup> | 1.91 |
| Xylan                                                                                                                              |     |                                                            |                     |                     |      |
|                                                                                                                                    | 5.5 | 88.74 <sup>c</sup>                                         | 5.03 <sup>d</sup>   | 24.37 <sup>d</sup>  | 7.57 |
|                                                                                                                                    | 6.5 | 222.16 <sup>a</sup>                                        | 134.77 <sup>b</sup> | 229.31 <sup>a</sup> | 7.57 |
| (P < 0.05) Means with different literal within the two lines for each substrate are significant different.                         |     |                                                            |                     |                     |      |

| Cuadro 2                                                                                                 |       |                    |                     |                    |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|--------------------|---------------------|--------------------|------|
| DIGESTIBILIDAD <i>in vitro</i> (%) DE LAS ENZIMAS Y DE SUSTRATOS PUROS CON ADICIÓN DE ENZIMAS            |       |                    |                     |                    |      |
| <i>In vitro</i> DIGESTIBILITY (%) OF THE ENZYMES AND PRUFIED SUBSTRATES WITH THE ADDITION OF THE ENZYMES |       |                    |                     |                    |      |
| Substrate                                                                                                | Hours | Enzyme             |                     |                    | EE   |
|                                                                                                          |       | A                  | B                   | C                  |      |
| Crystalline cellulose                                                                                    |       |                    | %                   |                    |      |
|                                                                                                          | 12    | 18.02 <sup>b</sup> | *                   | 42.73 <sup>a</sup> | 1.99 |
|                                                                                                          | 24    | 47.94 <sup>b</sup> | *                   | 75.94 <sup>a</sup> | 1.74 |
| Amorphous cellulose                                                                                      |       |                    |                     |                    |      |
|                                                                                                          | 12    | 76.57 <sup>b</sup> | 78.33 <sup>b</sup>  | 95.67 <sup>a</sup> | 1.62 |
|                                                                                                          | 24    | 79.54 <sup>b</sup> | 87.04 <sup>ab</sup> | 99.9 <sup>a</sup>  | 4.51 |
| Xylan                                                                                                    |       |                    |                     |                    |      |
|                                                                                                          | 12    | 66.14 <sup>b</sup> | 26.08 <sup>c</sup>  | 96.34 <sup>a</sup> | 4.54 |
|                                                                                                          | 24    | 79.90 <sup>b</sup> | 78.21 <sup>b</sup>  | 99.51 <sup>a</sup> | 1.20 |
| Rate of enzyme degradation (%/h)                                                                         |       | 17.22 <sup>a</sup> | 16.57 <sup>ab</sup> | 15.85 <sup>b</sup> | 0.56 |
| T <sub>1/2</sub> <sup>†</sup>                                                                            |       | 4.02               | 4.18                | 4.37               | 0.14 |

(P < 0.05) Means with different literal within the same lines are significant different.

\*The percentage of degradation was zero.

<sup>†</sup>Half time of degradation of the enzymes .



augmented (Figure 1). The rate of degradation (%/h) was greater ( $P < 0.05$ ) for enzymes A and B, and similar for B and C (Table 2); however, there were no differences in the mean degradation time among them (Table 2).

### ***In vitro digestibility of pure substrates with addition of enzymes***

*In vitro* digestibility of crystalline cellulose was greater ( $P < 0.05$ ), with the enzyme C at 12 and 24 h incubation, than with enzyme A. The enzyme B had no effects on crystalline cellulose (Table 2). The enzyme C showed a higher ( $P < 0.05$ ) digestibility on CMC at 12 h incubation than the enzymes A and B. However, at 24 h incubation the major degradation was with the enzymes C and B; furthermore, enzymes A and B showed a similar performance, but the enzyme A had lower digestibility with respect to the enzyme C (Table 2). When xylan was incubated by 12 h, digestibility was major ( $P < 0.05$ ) for the enzyme C, followed by the enzyme A and finally the enzyme B, at 24 h incubation digestibility was higher ( $P < 0.05$ ) for the enzyme C than enzymes A and B (Table 2).

## **Discussion**

### ***Enzymatic activity***

Enzymatic activity varies among commercial products according to the type of enzyme that contain (xylanases, cellulases, hemicellulases, etc.),<sup>2,5</sup> the pH of the environment and the substrate used. The values found in the present research are similar to those described by Nsereko *et al.*<sup>5</sup> with other commercial enzymes (Depol 40, Liquicell 2500, Multifect xylanase and Sumizyme).

Results presented in Table 1 indicate that enzymes A and B had lower activity at pH 5.5 with the three substrates and the enzyme C only with xylan, which could be explained in the case of incubations with crystalline cellulose and CMC, to the fact that most of the fibrolytic enzymes had an optimum pH around neutrality; in that respect, Morgavi *et al.*<sup>14</sup> pointed out that the maximum activity with cellulases and xylanases was obtained at pH 6.0-6.5; furthermore an acid pH may affect enzymatic activity, this effect was notified by Krause *et al.*<sup>1</sup> measuring the activity of cellulases (31 IU) and xylanases (43.4 IU). In the present study, the enzymatic activity during the incubation of CMC and xylan was affected at pH 5.5; however, the enzyme A had the major activity regarding to the enzymes B and C with the three substrates. In relationship to this, Morgavi *et al.*<sup>2</sup> found that the cellulases and xylanases were not affected by acid pH; it

la enzima C, cuando se incubó celulosa cristalina y CMC. Cuando se incubó la celulosa cristalina, la mayor actividad ( $P < 0.05$ ) fue con la enzima A, en comparación con las enzimas B y C. Al incubar con CMC, la enzima A presentó mayor actividad ( $P < 0.05$ ) que la enzima B y C (pH 6.5) y la enzima C tuvo mayor actividad en pH 5.5 (Cuadro 1). En la solución en pH 6.5, las enzimas A y C tuvieron la mayor actividad ( $P < 0.05$ ) sobre xylan, que con la enzima B; sin embargo, cuando el xylan se incubó en pH 5.5, la actividad ( $P < 0.05$ ) fue mayor con la enzima A, respecto de las enzimas B y C (Cuadro 1).

### ***Degradación in vitro de las enzimas***

No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) en la concentración de N-NH<sub>3</sub> entre enzimas; asimismo, la concentración de N-NH<sub>3</sub> aumentó a medida que el tiempo de incubación se incrementó (Figura 1). La tasa de degradación (%/h) fue mayor ( $P < 0.05$ ) para las enzimas A y B, y similar para B y C (Cuadro 2); sin embargo, en el tiempo medio de degradación no hubo diferencias entre ellas (Cuadro 2).

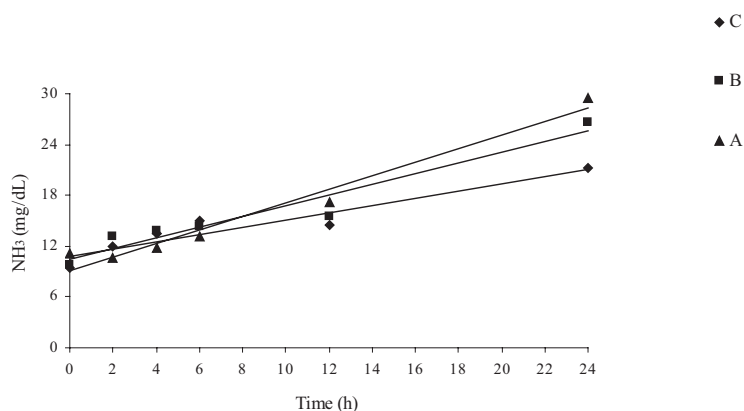
### ***Digestibilidad in vitro de sustratos puros con adición de enzimas***

La digestibilidad *in vitro* de la celulosa cristalina fue mayor ( $P < 0.05$ ) con la enzima C a las 12 y 24 h de incubación, que con la enzima A. La enzima B no tuvo efecto sobre la celulosa cristalina (Cuadro 2). La enzima C presentó mayor ( $P < 0.05$ ) digestibilidad sobre la CMC a las 12 h de incubación en comparación con las enzimas A y B. Sin embargo, a las 24 h de incubación la mayor degradación fue con las enzimas C y B; asimismo, las enzimas A y B se comportaron similares, pero la enzima A presentó menor digestibilidad con respecto a la enzima C (Cuadro 2). Cuando se incubó por 12 h el xylan, la digestibilidad fue mayor ( $P < 0.05$ ) para la enzima C, seguida por la enzima A y finalmente la enzima B, a las 24 h de incubación la digestibilidad fue mayor para la enzima C con respecto a las enzimas A y B ( $P < 0.05$ ) (Cuadro 2).

## **Discusión**

### ***Actividad enzimática***

La actividad enzimática entre productos comerciales varía de acuerdo con el tipo de enzima (xilanasas, celulasas, hemicelulasas, etc.) que contengan,<sup>2,5</sup> el pH del medio y el tipo de sustrato utilizado. Los valores encontrados en el presente trabajo son similares a los que describen Nsereko *et al.*<sup>5</sup> con otras enzimas



**Figura 1.** Dinámica de degradación ruminal *in vitro* de tres complejos enzimáticos.

Dynamic of *in vitro* ruminal degradation of three enzymatic complexes.

has been reported that enzymes from fungal origin have optimal conditions in low pH and elevated temperatures (Rode *et al.*),<sup>15</sup> which may explain why the enzyme C was not affected at pH 5.5 when it was incubated with crystalline cellulose and CMC, because the optimum pH for cellulolytic bacteria is 6.5.<sup>15</sup>

Nereseke *et al.*<sup>5</sup> observed that the enzymatic activity has a high variation among enzymatic products, even though they were originated from the same microorganism, which may be explained by the enzymes that contains the product and its ability to adjust to the active site of each substrate. When the enzyme A was incubated with crystalline cellulose and CMC at pH 6.5, it had a high activity in relation to the enzymes B and C.

On the other hand, results in incubations with xylan indicated that enzymes A and C contain more quantity of xylosidase and xylanase than the enzyme B. Minor values have been reported in the enzymatic activity of pure xylanase (90.5 to 198 UI),<sup>5</sup> which can explain why the enzymes used in this study contained several xylanases and xylosidases, which may be from different organisms. There are differences in the enzymes produced by the organisms, it has been reported that during purification of xylanase from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*), three types of xylanases were obtained, from which two did not hydrolyze xylan.<sup>4</sup>

Cellulolytic enzymes from enzyme A had a greater activity than enzymes B and C when were incubated at acid or neutral pH.

### In vitro degradation of the enzymes

The N-NH<sub>3</sub> concentration was constant up to 12 h incubation, increasing at 24 h of incubation. Similar results reported Pinos *et al.*<sup>16</sup> in an *in vitro* study, when incubated Fibrozyme by 12 h; however, at 24 h incubation, the N-NH<sub>3</sub> concentration remained constant. This difference can be related to different factors like

comerciales (Depol 40, Liquicell 2500, Multifect xylanase y Sumizyme).

Los resultados presentados en el Cuadro 1 indican que las enzimas A y B tuvieron menor actividad a pH 5.5 con los tres sustratos y la enzima C sólo con xylan, estos resultados pudieron deberse en el caso de la incubación con celulosa cristalina y CMC a que la mayoría de las enzimas fibrolíticas tienen un pH óptimo alrededor de la neutralidad; al respecto, Morgavi *et al.*<sup>14</sup> señalan que la máxima actividad con celulasas y xilanasas se obtuvo con pH 6.0 a 6.5; asimismo, pH bajos pueden afectar la actividad enzimática, este efecto fue notificado por Krause *et al.*<sup>1</sup> al determinar la actividad de celulasas (31 UI) y xilanasas (43.4 UI). En el presente trabajo, la actividad enzimática al incubar de CMC y xylan a pH 5.5 fue afectada; sin embargo, la enzima A tuvo mayor actividad con respecto a las enzimas B y C con los tres sustratos; en relación con lo anterior, Morgavi *et al.*<sup>2</sup> encontraron que las celulasas y xilanasas no fueron afectadas por pH ácidos; se ha encontrado que enzimas de origen fungal tienen condiciones óptimas en pH bajos y altas temperaturas (Rode *et al.*),<sup>15</sup> lo anterior pudiera explicar por qué la enzima C no fue afectada en pH 5.5 cuando se incubó celulosa cristalina y CMC, ya que el pH óptimo para bacterias celulolíticas es de 6.5.<sup>15</sup>

Nsereke *et al.*<sup>5</sup> observaron que la actividad enzimática varía mucho entre productos enzimáticos, aunque se originen de un mismo microorganismo, lo cual puede deberse a las enzimas que contenga el producto y su habilidad para ajustarse al sitio activo de cada sustrato; los resultados cuando se incubó celulosa cristalina y CMC en pH 6.5, fueron que la enzima A tuvo mayor actividad con respecto a las enzimas B y C.

Por otra parte, los resultados de la incubación del xylan indican que las enzimas A y C contienen mayor cantidad de xilosidasa y xilanasas que la enzima B. Se han descrito valores menores en la actividad



time of collection of ruminal fluid, level of enzyme and variation among inoculum donors.<sup>2</sup> The rate of degradation of the enzymes C and B was similar, but greater for the enzyme C with respect to the enzyme A; regarding that, it has been observed that the stability of exogenous enzymes in ruminal environment depends on its origin and type of activity.<sup>17,18</sup> It has been found that when ruminal fluid is collected after feeding the animal, the half time of degradation of the enzymes may be increased;<sup>2</sup> however, in the present study the inoculum was obtained before feeding, but the incubation time in which enzymes remained with the substrates was enough to observe high digestibility values, with the exception of the enzyme B when it was incubated with crystalline cellulose.

### **In vitro digestibility of pure substrates with addition of enzymes**

Morgavi *et al.*<sup>2</sup> observed a fall in the activity of commercial fibrolytic enzymes, obtained from *Trichoderma longibrachiatum*, at 6 h incubation with ruminal fluid. The enzymes A and C increased digestibility of crystalline cellulose from 12 to 24 h of incubation, which can be attributed to a major cellulolytic activity and stability of the enzymes. In reference to that, Pinos *et al.*<sup>16</sup> found that exogenous glucosylated fibrolytic-enzymes have positive effects on *in vitro* degradation of cell wall components, but in case of enzyme B did not show cellulolytic activity on crystalline cellulose, which may be due to its low cellulolytic activity (Table 1). The enzyme C showed the higher digestibility at 12 h regarding to the enzymes A and B. However, at 24 h incubation the digestibility of the enzyme C and B was similar and greater than that of the enzyme A regarding to the enzyme A. The differences in digestibility (Table 2) can be due to a major cellulolytic activity by synergism with ruminal microbes.

It has been reported that *in vitro* incubations of CMC with ruminal fluid and purified cellulose, the digestion of CMC is increased.<sup>19</sup> Xylan digestibility was major for the enzyme C at 12 and 24 h incubation, even when both have the same xylanase activity than the enzyme A, in presence of ruminal microbes their performance results different.

On the basis of the evaluation of exogenous fibrolytic enzymes in the present study, stand out that the results of the enzymatic activity using purified substrates do not necessarily corresponds to a major *in vitro* digestibility in presence of ruminal microbes, which can be explained by the differences on degradation rate between the enzymes and by the synergism with ruminal microbes among them.

enzimática de la xilanasa pura (90.5 a 198 UI),<sup>5</sup> lo cual se puede explicar porque las enzimas utilizadas en el presente trabajo contenían varias xilanasas y xilosidasas, y pueden provenir de organismos distintos. Existen diferencias en las enzimas producidas por los organismos, se ha informado que al purificar xilanasas de *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*) se obtuvieron tres tipos de xilanasas, de las cuales dos no hidrolizaban xylan.<sup>4</sup>

Las enzimas celulolíticas de la enzima A tienen mayor actividad que las enzimas B y C cuando se incuban a pH neutro y ácido.

### **Degradación in vitro de las enzimas**

La concentración de N-NH<sub>3</sub> se mantuvo constante hasta las 12 h de incubación, incrementándose a las 24 h de incubación; resultados similares encontraron Pinos *et al.*<sup>16</sup> en un estudio *in vitro*, cuando incubaron Fibrozyme por 12 h; sin embargo, a las 24 h de incubación la concentración de N-NH<sub>3</sub> se mantuvo constante. Esta diferencia se puede deber a factores como la hora de muestreo del líquido ruminal, nivel de enzima, y la variación entre los animales donadores.<sup>2</sup> La tasa de degradación de las enzimas C y B fue similar y mayor para la enzima C con respecto a la enzima A; al respecto, se ha observado que la estabilidad de las enzimas exógenas en ambiente ruminal va a depender de su origen y tipo de actividad.<sup>17,18</sup> Se ha encontrado que cuando el inóculo es extraído después de alimentar al animal, el tiempo medio de degradación de las enzimas puede incrementarse;<sup>2</sup> sin embargo, en el presente estudio el inóculo se obtuvo antes de la alimentación, pero el tiempo que permanecieron las enzimas con los sustratos fue suficiente para observar altas digestibilidades a excepción de la enzima B cuando se incubó celulosa cristalina.

### **Digestibilidad in vitro de sustratos puros con adición de enzimas**

Morgavi *et al.*<sup>2</sup> observaron disminución en la actividad de enzimas fibrolíticas comerciales, obtenidas de *Trichoderma longibrachiatum*, a las 6 h de incubación con líquido ruminal. Las enzimas A y C incrementaron la digestibilidad de la celulosa cristalina de 12 a 24 h incubación, lo cual puede atribuirse a mayor actividad celulolítica y estabilidad de las enzimas. Al respecto, Pinos *et al.*<sup>16</sup> encontraron que enzimas fibrolíticas exógenas glucosiladas tienen efectos positivos en la degradación *in vitro* de componentes de la pared celular, pero en el caso de la enzima B no presentó actividad celulolítica sobre la celulosa cristalina, que

## Referencias

1. Krause M, Beauchemin KA, Rode LM, Farr BI, Norgaard P. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. *J Anim Sci* 1998;76:2912-2920.
2. Morgavi PD, Beauchemin AK, Nsereko LV, Rode ML, McAllister AT, Iwaasa DA, *et al.* Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. *J Anim Sci* 2001 ;79:1621-1630.
3. Wallace JR, Wallace AJS, McKain N, Nsereko LV, Hartnell FG. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *J Anim Sci* 2001;79:1905-1916.
4. Kanda T, Amano Y, Nisizawa K. Purification and properties of two endo-1-4-  $\beta$ - xylanases from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*). *J Biochem* 1985;98:1545-1554.
5. Nsereko LV, Morgavi PD, Rode ML, Beauchemin AK, McAllister AT, Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Anim Feed Sci Techn* 2000;88:153-170.
6. Officer DI. Feed Enzymes, In: Farm Animal Metabolism and Nutrition. (Editores D' Mello, J. P. F.) The Scottis Agricultural College, Edinburgh, U.K. Disponible en: [www.cabi.org/book\\_shop/ReadingRoom/0851993788/3788ch19.pdf](http://www.cabi.org/book_shop/ReadingRoom/0851993788/3788ch19.pdf) 2000:448.
7. Summer JB. Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *J Biol Chem* 1921;47:7-18.
8. Miller GL, Blum R, Glennon WE, Burton AL. Measurements of carboxymethylcellulase activity. *Anal Biochem* 1960;2:127.
9. Lowry OH, Rosebroug NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
10. Steel RGD, Torrie JJ. Bioestadística, Principios y Procedimientos. 2da. Edición. México: Mcgraw-Hill, 1992:622.
11. SAS Institute Inc. AS/Stat User's Guide version 6.0 Fourth Edition, Vol 1 Cary, North Caroline, USA. Institute Inc. 1994 :943.
12. Tilley JMA, Terry RA. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J Br Grassld Soc* 1963;18:104-109.
13. McCullough H. The determination of ammonia in whole blood: a direct colorimetric method. *Clin Chem Act* 1967;17:297-304.
14. Morgavi PD, Beauchemin AK, Nsereko LV, Rode ML, Iwaasa DA, Yang ZW, *et al.* Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma Longibrachiatum*. *J Dairy Sci* 2000;83:1310-1321
15. Rode LM, Yang WZ, Beauchemin KA. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. *J Dairy Sci* 1999;82:2121-2126.
16. Pinos RJM, Mendoza GD, Bárcena G, Cobos P. Efecto de enzimas exógenas en la digestibilidad *in vitro* de la pared celular de heno de alfalfa (*Medicago sativa*) o de Ballico (*Lolium perenne*). *Interiencia* 2002;27:28-32.
17. Hrisvot NA, McAllister AT, Cheng JK. Stability of exogenous polysaccharide-degrading enzymes in the rumen. *Anim Feed Sci Technol* 1998;48:161-168
18. Hrisvot NA, McAllister AT, Cheng JK. Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharide-degrading enzymes on rumen fermentation and nutrient digestibility. *J Anim Sci* 1998;76:3146-3156.

puede deberse a su baja actividad celulolítica (Cuadro 1). La enzima C presentó la mayor a digestibilidad a las 12 h con respecto a las enzimas A y B. Sin embargo, a las 24 h de incubación la digestibilidad de las enzimas C y B fue similar y mayor a la de la enzima C con respecto a la enzima A. Las diferencias en las digestibilidades (Cuadro 2) pueden deberse a una mayor actividad celulolítica por sinergismo con los microorganismos ruminales.

Se ha notificado que al incubar *in vitro* CMC con líquido ruminal y celulosa pura se incrementa la digestibilidad de la CMC.<sup>14</sup> La digestibilidad del xylan fue mayor para la enzima C a las 12 y 24 h de incubación, que aunque tienen la misma actividad xilanásica que la enzima A, en presencia de microorganismos ruminales su comportamiento resulta diferente.

Con base en la evaluación de las enzimas fibrolíticas exógenas en el presente estudio, se destaca que los resultados de la actividad enzimática utilizando sustratos puros no necesariamente corresponden a mayor digestibilidad *in vitro* en presencia de microorganismos ruminales, lo cual puede deberse a la diferencia en la tasa de degradación entre las enzimas y por el sinergismo con los microorganismos ruminales para ellas.