

# EFFECTO DEL pH Y DEL LÍQUIDO RUMINAL CLARIFICADO EN LA ESTABILIDAD DE UN PRODUCTO ENZIMÁTICO FIBROLÍTICO

## EFFECT OF pH AND CLARIFIED RUMINAL FLUID ON THE STABILITY OF AN EXOGENOUS FIBROLYTIC ENZYME PRODUCT

Edgar Meraz-Romero<sup>1\*</sup>, Octavio Loera-Corral<sup>2</sup>, Germán D. Mendoza-Martínez<sup>3</sup>, Marcos Meneses-Mayo<sup>4</sup>, Mario A. Cobos-Peralta<sup>4</sup>, David Hernández-Sánchez<sup>4</sup>, Sergio C. Angeles-Campos<sup>1</sup>, Lucas G. Melgarejo-Velasquez<sup>1</sup>, J. Manuel Pinos-Rodríguez<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 04510. Ciudad Universitaria, D. F. México. (emerazr@yahoo.com.mx). <sup>2</sup>Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. 09340. D. F. México. <sup>3</sup>Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. 04960. D. F. México. <sup>4</sup>Ganadería, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. <sup>5</sup>Instituto de Investigación en Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 78377. San Luis Potosí, México.

### RESUMEN

Las enzimas fibrolíticas exógenas no son sintetizadas por los microorganismos ruminales, por lo cual se adicionan al alimento para aumentar la degradación de la fibra. El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* la actividad xilanas, celulosa y lacasa, así como la estabilidad enzimática de xilanasas y celulasas de un producto enzimático fibrolítico (Fibrozyme, Alltech, Inc.). El diseño experimental fue completamente al azar y los tratamientos fueron: amortiguador pH 6.0, amortiguador pH 7.0 y líquido ruminal clarificado pH 6.5. Los datos se analizaron con mediciones repetidas en el tiempo, mediante el procedimiento Mixto de SAS y la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). El producto enzimático exógeno contenía xilanasas 292 UI  $g^{-1}$  y celulasas 36 UI  $g^{-1}$ , sin actividad de lacasas. En amortiguador con pH 6 las celulasas fueron más estables que las xilanasas, y ambas enzimas mostraron actividad hasta las 46 h. Las constantes de velocidad de inactivación enzimática ( $k$ ) fueron  $-0.054 h^{-1}$  en xilanasas y  $-0.008 h^{-1}$  en celulasas, y los tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) 12.8 y 87.7 h. En amortiguador pH 7 las celulasas se mantuvieron más estables y las xilanasas perdieron su actividad a las 32 h; los valores de  $k$  fueron  $-0.07 h^{-1}$  y  $-0.009 h^{-1}$ , y de  $t_{1/2}$  9.9 y 77 h para xilanasas y celulasas. En el medio con líquido ruminal clarificado, las celulasas mantuvieron más estable su actividad y las xilanasas la perdieron en 4 h ( $k = -1.815 h^{-1}$  y  $-0.026 h^{-1}$ ;  $t_{1/2} = 0.38$  y 26.87 h para xilanasas y celulasas). Se concluye que *in vitro*, el pH y las enzimas contenidas en el líquido ruminal

### ABSTRACT

Exogenous fibrolytic enzymes are not synthesized by the ruminal microorganisms, so they are added to feed in order to increase fiber degradation. The objective of this study was to evaluate *in vitro* xylanase, cellulase and laccase activity, as well as xylanase and cellulase enzymatic stability of an enzymatic fibrolytic product (Fibrozyme Alltech, Inc.). The experimental design was completely randomized and treatments were: buffer pH 6.0, buffer pH 7.0 and clarified ruminal fluid pH 6.5. Data were analyzed using the SAS Mixed procedure and the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). The exogenous enzyme product contained 292 IU xylanase  $g^{-1}$  and 36 IU cellulase  $g^{-1}$ , without laccase activity. In buffer with pH 6 cellulases were more stable than the xylanases, and both enzymes showed activity until 46 h. The speed constants of enzymatic inactivation ( $k$ ) were  $-0.054 h^{-1}$  in xylanases and  $-0.008 h^{-1}$  in cellulases, and half life time ( $t_{1/2}$ ) of 12.8 and 87.7 h. In buffer pH 7 cellulases remained more stable and the xylanases lost their activity at 32 h; values of  $k$  were  $-0.07 h^{-1}$  and  $-0.009 h^{-1}$ , and  $t_{1/2}$  of 9.9 and 77 h for xylanases and cellulases. In the medium with clarified ruminal fluid, cellulases maintained more stable their activity and xylanases lost it in 4 h ( $k = -1.815 h^{-1}$  and  $-0.026 h^{-1}$ ;  $t_{1/2} = 0.38$  and 26.87 h for xylanases and cellulases). It is concluded that *in vitro* pH and enzymes contained in the clarified ruminal fluid affect the stability of the exogenous fibrolytic enzyme product.

\*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: octubre, 2011. Aprobado: marzo, 2012.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 46: 347-358. 2012.

**Key words:** cellulases, fibrolytic enzymes, enzymatic stability, xylanases.

## clarificado afectan la estabilidad del producto enzimático fibrolítico exógeno.

**Palabras clave:** celulasas, enzimas fibrolíticas, estabilidad enzimática, xilanasas.

### INTRODUCCIÓN

En estudios *in vitro* e *in sacco* las enzimas fibrolíticas mejoran la degradación de la materia seca (MS; Almaraz *et al.*, 2010; Gallardo *et al.*, 2010) y según Pinos *et al.* (2002) una mezcla de enzimas hidrolíticas fue más efectiva para aumentar la digestión *in vivo*. El modo de acción de estas enzimas en los rumiantes es una combinación de efectos antes (tiempo de interacción enzima-sustrato) y después de la alimentación (pH ruminal; Colombatto *et al.*, 2007). Al respecto, Kung *et al.* (2000) afirman que la adición de enzimas al alimento puede crear un complejo enzima-alimento estable el cual protege a las enzimas de la proteólisis ruminal. Las enzimas fibrolíticas, aisladas de cultivos de hongos y bacterias, aumentan la degradación durante el proceso de ensilaje de algunos forrajes (Stokes, 1992); además, mejoran la digestibilidad *in vitro* de la MS y la fibra detergente neutra (FDN; Feng *et al.*, 1996), y una mezcla de enzimas con varias actividades puede ser más efectiva (Yang *et al.*, 1999).

Fibrozyme es un producto comercial (Alltech Inc., Nicholasville, KY, USA) a base de celulasas, hemicelulasas y proteasas, tiene grado alto de glucosilación que puede contribuir a su estabilidad en el rumen, y su actividad xilanásica es 100 UI g<sup>-1</sup> (Tricarico *et al.*, 1998). La actividad de las enzimas en productos enzimáticos comerciales para rumiantes se mide según las recomendaciones del fabricante (aproximadamente 60 °C y pH entre 4 y 5; Coughlan, 1985), pero esas condiciones no son representativas del ambiente ruminal (39 °C y pH 6.0 a 6.7) donde actúan las enzimas (Van Soest, 1994). Además, las condiciones y métodos usados en diversos estudios varían, y esto dificulta una comparación de los productos o la predicción de su eficacia en dietas para rumiantes (Beauchemin *et al.*, 2003).

El objetivo del presente estudio fue caracterizar *in vitro* la actividad de xilanasas, celulasas y lacasas de un producto enzimático fibrolítico exógeno, y evaluar la estabilidad enzimática con pH diferentes y en líquido ruminal clarificado.

### INTRODUCTION

In studies *in vitro* and *in sacco* fibrolytic enzymes improve the degradation of dry matter (DM; Almaraz *et al.*, 2010; Gallardo *et al.*, 2010) and according to Pinos *et al.* (2002) a mixture of hydrolytic enzymes was more effective to increase *in vivo* digestion. The action mode of these enzymes in ruminants is a combination of effects before (time of enzyme-substrate interaction) and after feeding (ruminal pH; Colombatto *et al.*, 2007). In this respect, Kung *et al.* (2000) argue that the addition of enzymes to feed may create a stable enzyme-feed complex which protects the enzymes from ruminal proteolysis. Fibrolytic enzymes, isolated from bacterial and fungal cultures increase the degradability during the process of ensilage of some forages (Stokes, 1992); besides, they improve *in vitro* digestibility of DM and neutral detergent fiber (NDF; Feng *et al.*, 1996), and a mixture of enzymes with various activities may be more effective (Yang *et al.*, 1999).

Fibrozyme is a commercial product (Alltech Inc., Nicholasville, KY, USA) based on cellulases, hemicellulases, and proteases, it has high degree of glycosylation that may contribute to its stability in the rumen, and its xylanase activity is 100 IU g<sup>-1</sup> (Tricarico *et al.*, 1998). The enzymes activity of commercial enzymatic products for ruminants is measured according to the manufacturer's recommendations (about 60 °C and pH between 4 and 5, Coughlan, 1985), but those conditions are not representative of the ruminal environment (39 °C and pH 6.0 to 6.7) where enzymes act (Van Soest, 1994). Furthermore, conditions and methods used in different studies vary, and this makes difficult a comparison of the products or prediction of their efficacy in ruminant diets (Beauchemin *et al.*, 2003).

The aim of this study was to characterize *in vitro* the activity of xylanases, cellulases and laccases of an exogenous fibrolytic enzymatic product and evaluate the enzymatic stability with different pH and in clarified ruminal fluid.

### MATERIALS AND METHODS

This study was conducted at the Laboratory of Enzymology and Molecular Biology of the Universidad

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Enzimología y Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México, D. F. Una muestra del producto enzimático fibrolítico Fibrozyme se utilizó en todas las pruebas.

### Contenido de proteína

Para analizar el contenido de proteína se disolvió 1 g (por duplicado) del producto enzimático en 50 mL de agua destilada por 1 h con un agitador magnético, se centrifugó a 12 100 x g por 20 min y se guardó el sobrenadante (extracto enzimático) en refrigeración a 4 °C, para análisis posteriores. A 800 mL de extracto enzimático diluido (1:20) en amortiguador de acetatos (0.1 M, pH 5), se añadieron 200 mL de reactivo de Bradford (Bio-RAD) y se agitó con un vórtex. La reacción duró 5 min y la absorbancia se leyó a 595 nm en una celdilla de acrílico en un espectrofotómetro (DU 640 Beckman, EE.UU.). La cantidad de proteína se determinó a dos pH con seroalbúmina bovina en solución de 0.15 M NaCl (Bradford, 1976). Se diluyeron 50 mL de amortiguador de citratos (50 mM y pH 5.3) en 450 mL de agua destilada; en 50 mL de esa solución se disolvió 1 g del producto por 1 h con un agitador magnético, se centrifugó a 12 100 x g por 20 min, y al sobrenadante (extracto enzimático) se agregaron 50 mL de amortiguador de citratos (50 mM y pH 6) o de fosfatos (50 mM y pH 7), según correspondiera. Se mantuvo a 4 °C y se midió el contenido de proteína.

### Actividad de xilanasas

Esta actividad se midió con el método del ácido dinitrosalicílico (DNS; Miller, 1959), para azúcares reductores, modificado por Loera y Córdova (2003) y Márquez-Araque *et al.* (2007), descritas a continuación. El sustrato fue xilano (Sigma-Aldrich X-0627) al 0.5 % (2.5 g de xilano en 0.5 L de amortiguador de citratos 50 mM y pH 5.3). La curva estándar se preparó con una solución de xilosa 10 mM (0.15 g en 100 mL<sup>-1</sup> de amortiguador de citratos 50 mM y pH 5.3). La mezcla de la reacción de la muestra contenía 0.9 mL de sustrato y 0.1 mL del extracto enzimático diluido (1:100), en tubos de ensayo por triplicado. La incubación duró 5 min a 50 °C, se aplicaron 1.5 mL DNS, se hirvieron 5 min, luego los tubos se metieron en un recipiente con hielo y se midió la absorbancia a 540 nm. Para cada muestra se preparó un blanco con 0.9 mL de sustrato incubado 5 min a 50 °C, luego se aplicó 1.5 mL DNS y 0.1 mL del extracto enzimático diluido (1:100), se hirvió 5 min, se depositó en un recipiente con hielo, y se midió la absorbancia a 540 nm. Se usó un blanco general con 0.9 mL sustrato y 0.1 mL amortiguador de citrato

Autónoma Metropolitana, Iztapalapa Unit, México City. A sample of the enzymatic fibrolytic product Fibrozyme was used in all tests.

### Protein content

To analyze the protein content 1 g (in duplicate) of the enzymatic product was dissolved in 50 mL of distilled water for 1 h with a magnetic stirrer, centrifuged at 12 100 x g for 20 min and the supernatant was stored (enzymatic extract) and cooled at 4 °C for later analysis. To 800 mL of diluted enzymatic extract (1:20) in acetate buffer (0.1 M, pH 5), 200 mL of Bradford reagent (Bio-RAD) was added and stirred with a vortex. The reaction lasted 5 min and absorbance was read at 595 nm in an acrylic cell in a spectrophotometer (Beckman DU 640, USA). The amount of protein was determined at two pH with bovine serum albumin in 0.15 M NaCl solution (Bradford, 1976). 50 mL of citrate buffer (50 mM, pH 5.3) were diluted in 450 mL of distilled water; in 50 mL of this solution 1 g of the product was dissolved for 1 h with a magnetic stirrer, it was centrifuged at 12 100 x g for 20 min and to the supernatant (enzymatic extract) 50 mL of citrate buffer (50 mM and pH 6) or phosphate (50 mM, pH 7) were added, as appropriate. It was maintained at 4 °C and protein content was measured.

### Xylanase activity

This activity was measured with the dinitrosalicyclic acid method (DNS; Miller, 1959), for reducing sugars, modified by Loera and Cordova (2003) and Márquez-Araque *et al.* (2007), as described below. The substrate was xylan (Sigma-Aldrich X-0627) at 0.5 % (2.5 g of xylan in 0.5 L of citrate buffer 50 mM and pH 5.3). The standard curve was prepared with a solution of 10 mM xylose (0.15 g in 100 mL<sup>-1</sup> of citrate buffer 50 mM and pH 5.3). The reaction mixture of the sample contained 0.9 mL of substrate and 0.1 mL of enzymatic extract diluted (1:100) in assay tubes in triplicate. The incubation lasted 5 min at 50 °C, 1.5 mL DNS were applied, boiled 5 min, then tubes were put in a container with ice and absorbance was measured at 540 nm. For each sample a blank with 0.9 mL of substrate incubated 5 min at 50 °C was prepared, then 1.5 mL DNS and 0.1 mL of enzymatic extract diluted (1:100) was applied, boiled 5 min, put in a container with ice and absorbance was measured at 540 nm. A general blank was used with 0.9 mL of substrate and 0.1 mL of citrate buffer pH 5.3, incubated 5 min at 50 °C, 1.5 mL DNS was applied, boiled 5 min, placed in a container with ice, and its absorbance was measured at 540 nm.

pH 5.3, se incubó 5 min a 50 °C, se aplicó 1.5 mL DNS, se hirvió 5 min, se depositó en un recipiente con hielo, y la absorbancia se midió a 540 nm.

#### Actividad de celulasas

Esta actividad se midió con la concentración de azúcares reductores con el método del DNS (Miller, 1959) modificado por Loera y Córdova (2003) y por Purkarthofer *et al.* (1993), descrito a continuación. El sustrato fue carboximetil celulosa (Sigma-Aldrich C4888) al 0.5 % (2.5 g de carboximetil celulosa en 0.5 L de amortiguador de citratos 50 mM y pH 4.8); además, se preparó una solución de glucosa 10 mM (0.18 g glucosa 100 mL<sup>-1</sup> de amortiguador de citratos 50 mM y pH 4.8) para la curva estándar. La mezcla de la reacción para cada muestra contenía 0.9 mL de sustrato y 0.1 mL del extracto enzimático diluido (1:100). Se usaron tubos de ensaye por triplicado, la incubación fue de 60 min a 50 °C, se agregó 1.5 mL de DNS y se hirvió 5 min; los tubos se metieron en un recipiente con hielo y se midió la absorbancia a 540 nm. Para cada muestra se preparó un blanco con 0.9 mL de sustrato, se incubó 60 min a 50 °C, se agregó 1.5 mL de DNS y 0.1 mL del extracto enzimático diluido (1:100), se hirvió por 5 min, se depositó en un recipiente con hielo, y la absorbancia se midió a 540 nm. El blanco general contenía 0.9 mL de sustrato y 0.1 mL de amortiguador de citrato pH 5.3, que se incubó 60 min a 50 °C, se agregó 1.5 mL de DNS y se hirvió 5 min; luego se depositó en un recipiente con hielo y se midió la absorbancia a 540 nm.

#### Actividad de lacasas

Esta actividad se determinó en un sistema de reacción de 1 mL el cual contenía 0.1 mL de amortiguador de acetatos (0.1 M y pH 5.0), 0.7 mL de agua destilada, 0.1 mL del extracto enzimático sin diluir y 0.1 mL de sustrato ABTS [(0.69 g de ABTS 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzeno-thiazolina-6-ácido sulfónico)] disuelto en 250 mL de amortiguador de acetatos (0.1 M y pH 5.0). El coeficiente de extinción molar para el ABTS fue 36 000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. El sistema de reacción sin sustrato se preincubó 1 min a 40 °C, se adicionó el sustrato y se midieron los incrementos de la absorbancia, a 420 nm, después de 0, 1, 2, 3 y 5 min. Una unidad de actividad (UI) se definió como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de sustrato oxidado por minuto en las condiciones de reacción. La determinación de la actividad de lacasas en todos los casos se hizo por duplicado (Bourbonnais *et al.*, 1997).

#### Estabilidad enzimática

Esta actividad se evaluó por duplicado con 50 mL de amortiguador de citratos 50 mM pH 5.3 diluidos en 450 mL de agua

#### Cellulase activity

This activity was measured with the concentration of reducing sugars by the method of dinitrosalicylic acid DNS (Miller, 1959) modified by Loera and Cordova (2003) and Purkarthofer *et al.* (1993), as described below. The substrate was carboxymethylcellulose (Sigma-Aldrich C4888) at 0.5 % (2.5 g of carboxymethylcellulose in 0.5 L of 50 mM citrate buffer and pH 4.8); also a glucose solution of 10 mM (0.18 g glucose 100 mL<sup>-1</sup> of 50 mM citrate buffer and pH 4.8) was prepared for the standard curve. The reaction mixture for each sample contained 0.9 mL of substrate and 0.1 mL of enzymatic extract diluted (1:100). Test tubes were used in triplicate and incubation was 60 min at 50 °C, 1.5 mL of DNS was added and boiled 5 min, the tubes were placed in a container with ice and absorbance was measured at 540 nm. For each sample a blank with 0.9 mL of substrate was prepared, incubated 60 min at 50 °C, 1.5 mL of DNS and 0.1 mL of enzymatic extract diluted (1:100) was added, boiled for 5 min, deposited in a container with ice, and absorbance was measured at 540 nm. The general blank contained 0.9 mL of substrate and 0.1 mL of citrate buffer pH 5.3, was incubated 60 min at 50 °C, 1.5 mL of DNS was added and boiled 5 min; then was placed in a container with ice and absorbance was measured at 540 nm.

#### Laccase activity

This activity was determined in a reaction system of 1 mL which contained 0.1 mL of acetate buffer (0.1 M, pH 5.0), 0.7 mL of distilled water, 0.1 mL of undiluted enzymatic extract and 0.1 mL of ABTS substrate [(0.69 g of ABTS 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzene-thiazolina-6-sulfonic acid)] dissolved in 250 mL of acetate buffer (0.1 M, pH 5.0). The molar extinction coefficient for ABTS was 36 000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. The reaction system without substrate was preincubated for 1 min at 40 °C, the substrate was added and absorbance increases measured at 420 nm after 0, 1, 2, 3 and 5 min. An activity unit (IU) was defined as the amount of enzyme that produces 1 μmol of oxidized substrate per minute under the reaction conditions. Determination of laccase activity in all cases was done in duplicate (Bourbonnais *et al.*, 1997).

#### Enzymatic stability

This activity was evaluated in duplicate with 50 mL of citrate buffer 50 mM pH 5.3 diluted in 450 mL of distilled water; 50 mL of this dilution were used to dissolve 1 g of the enzymatic product for 1 h with a magnetic stirrer and centrifuged 20 min at 12 100 x g. 50 mL of citrate buffer (0.05 M and pH 6) or

destilada; se usaron 50 mL de esa dilución para disolver 1 g del producto enzimático por 1 h con un agitador magnético, y se centrifugó 20 min a 12 100 x g. Al sobrenadante se agregaron 50 mL de amortiguador de citratos (0.05 M y pH 6) o amortiguador de fosfatos (0.05 M y pH 7), para un volumen de 100 mL, y se colocó 1 mL de esa solución en microtubos, incubando a 39 °C. La estabilidad enzimática de xilanasas y celulasas se midió en las mezclas de reacción indicadas para cada tipo de enzima después de 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 28, 32 y 46 h.

La estabilidad enzimática también se midió en medio de líquido ruminal clarificado pH 6.5, se usó líquido ruminal fresco de dos vacas Holstein con cánula ruminal y alimentadas con alfalfa fresca (60 %) y ensilado de maíz (40 %). Se recolectaron 250 mL de fluido ruminal filtrados con gasas para separar partículas grandes y se centrifugó a 15 300 x g por 10 min; el sobrenadante se esterilizó 15 min en una autoclave a 120 °C y 15 psi, se centrifugó 10 min a 15 300 x g y se esterilizó 15 min a 120 °C y 15 psi (Cobos y Yokoyama, 1995). Se disolvió 1 g del producto enzimático con un agitador magnético por 1 h, por duplicado en 50 mL de amortiguador de citratos (50 mM y pH 5.3). Luego se centrifugó 20 min a 12, 100 x g; 1 mL del sobrenadante se mezcló con 9 mL del medio con líquido ruminal clarificado, para tener una dilución 1:10. Se colocó 1 mL de esa solución en un microtubo y se incubó a 39 °C. El extracto enzimático también fue probado en el medio con líquido ruminal clarificado, pero en una dilución 1:100. Se midió la estabilidad enzimática de xilanasas y celulasas con las mezclas de reacción para cada tipo de enzima, a 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 28 y 32 h.

### Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar y los tratamientos fueron: amortiguador pH 6.0, amortiguador pH 7.0 y líquido ruminal clarificado pH 6.5, con seis tubos para cada tiempo. Los análisis se realizaron para 1, 12, 24 y 46 h de incubación para xilanasas y 1, 12, 24 y 32 h para celulasas. Los datos se analizaron con mediciones repetidas en el tiempo, mediante el procedimiento Mixto (SAS, 2004). El modelo estadístico fue:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + M_j + T^*M_{ij} + C(T)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

donde  $Y_{ijk}$  = variable respuesta (actividad residual de xilanasas y celulasas);  $\mu$  = media general;  $T_i$  = efecto fijo debido al  $i$ -ésimo tratamiento;  $M_j$  = efecto debido al  $j$ -ésimo tiempo;  $T^*M_{ij}$  = efecto de la interacción entre el  $i$ -ésimo tratamiento y el  $j$ -ésimo tiempo;  $C(T)_{ik}$  = efecto aleatorio de la  $k$ -ésima repetición (tubo) anidada en el  $i$ -ésimo tratamiento;  $\varepsilon_{ijk}$  = error experimental del  $i$ -ésimo tratamiento,  $j$ -ésimo tiempo y  $k$ -ésima repetición.

phosphate buffer (0.05 M, pH 7) were added to the supernatant, to a volume of 100 mL and 1 mL of that solution was placed into microtubes, incubating at 39 °C. The enzymatic stability of xylanases and cellulases was measured in the reaction mixtures indicated for each type of enzyme after 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 28, 32 and 46 h.

The enzymatic stability was also measured in a clarified ruminal fluid medium pH 6.5; fresh rumen fluid was used from two Holstein cows with ruminal cannula and fed fresh alfalfa (60 %) and corn silage (40 %). 250 mL were collected of rumen fluid filtered with gauze to remove large particles and centrifuged at 15 300 x g for 10 min; the supernatant was sterilized 15 min in an autoclave at 120 °C and 15 psi, centrifuged 10 min at 15 300 x g and sterilized 15 min at 120 °C and 15 psi (Cobos and Yokoyama, 1995). 1 g of the enzymatic product was dissolved with a magnetic stirrer for 1 h, in duplicate in 50 mL of citrate buffer (50 mM and pH 5.3). Then it was centrifuged 20 min at 12, 100 x g, 1 mL of supernatant was mixed with 9 mL of clarified rumen fluid medium, to have a 1:10 dilution. 1 mL of this solution was placed in a microtube and it was incubated at 39 °C. The enzymatic extract was also tested in the medium with clarified ruminal fluid, but in a 1:100 dilution. The enzymatic stability of xylanases and cellulases was measured with the reaction mixtures for each type of enzyme at 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 28 and 32 h.

### Statistical analysis

The experiment was a completely randomized design and treatments were: buffer pH 6.0, buffer pH 7.0 and clarified ruminal fluid pH 6.5, with six tubes for each time. Analyses were performed for 1, 12, 24, and 46 h of incubation for xylanases and 1, 12, 24 and 32 h for cellulases. The data were analyzed with repeated measurements over time, using the procedure Mixed (SAS, 2004). The statistical model was:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + M_j + T^*M_{ij} + C(T)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

where  $Y_{ijk}$  = response variable (residual activity of xylanases and cellulases);  $\mu$  = general mean;  $T_i$  = fixed effect due to the  $i^{\text{th}}$  treatment;  $M_j$  = effect due to the  $j^{\text{th}}$  time;  $T^*M_{ij}$  = effect of the interaction between the  $i^{\text{th}}$  treatment and the  $j^{\text{th}}$  time;  $C(T)_{ik}$  = random effect of the  $k^{\text{th}}$  replicate (tube) nested in the  $i^{\text{th}}$  treatment;  $\varepsilon_{ijk}$  = experimental error of the  $i^{\text{th}}$  treatment,  $j^{\text{th}}$  time and  $k^{\text{th}}$  replicate.

Means were compared with Tukey test ( $p \leq 0.05$ ); Steel *et al.*, 1997). Data were also fitted to a model of first order kinetics (Chang, 1986).

Las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ; Steel *et al.*, 1997). Los datos también se ajustaron a un modelo de cinética de primer orden (Chang, 1986).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Contenido de proteína y caracterización del producto enzimático fibrolítico exógeno

El producto enzimático conserva una gran cantidad del material fermentado y restos celulares y su contenido de proteína fue  $9.40 \text{ mg g}^{-1}$ . Este resultado fue menor al reportado (5.71 % de proteína en el producto enzimático) por Ramírez *et al.* (2005). Colombato *et al.* (2003) reportan un contenido de proteína más alto en 22 productos enzimáticos comerciales, en comparación al del presente estudio. Esta variación de los resultados puede deberse a los métodos usados para determinar proteína y al tipo de enzima (sólida o líquida).

Según Alltech, la actividad xilanásica del producto Fibrozyme es  $100 \text{ UI g}^{-1}$ , pero en el presente estudio la actividad fue mayor ( $292 \pm 0.20 \text{ UI g}^{-1}$ ) y aproximada a la reportada ( $222.16 \text{ UI g}^{-1}$ ) por Ramírez *et al.* (2005). En condiciones similares (pH 6.5 y  $39^\circ\text{C}$ ) se ha encontrado una gran variación de xilanasas ( $148$  a  $583 \text{ UI g}^{-1}$ ) y celulasas ( $163$  a  $791 \text{ UI g}^{-1}$ ) (Giraldo *et al.*, 2008; Hristov *et al.*, 2008; Ranilla *et al.*, 2008), la cual se puede atribuir a las diferencias de temperatura y pH estándares para medir la actividad.

El producto enzimático mostró actividad de celulasas ( $36 \pm 0.007 \text{ UI g}^{-1}$ ) menor a la reportada ( $56.87 \text{ UI g}^{-1}$ ) por Ramírez *et al.* (2005) con pH 6.5. Aunque en el producto enzimático predominan las xilanasas, también hay trazas de celulasas,  $\beta$ -glucanasas, amilasas y proteasas (Frumholtz y Beauchemin, 1999). No se detectaron lacasas, lo cual es consistente con el hecho de que los hongos usados para producir el producto enzimático son *Aspergillus niger* y *Trichoderma longibrachiatum* los cuales no son lignilíticos (Pendleton, 1998).

Al medir la estabilidad enzimática en amortiguador con pH 6, las xilanasas y las celulasas tuvieron actividad hasta las 46 h de incubación a  $39^\circ\text{C}$  (Figura 1 y Cuadro 1), y fue mayor en las celulasas (66 %) y menor en las xilanasas (18.5 %). El producto enzimático contiene una gran actividad de xilanasas al inicio y después de 30 min su actividad comienza a

## RESULTS AND DISCUSSION

### Protein content and characterization of the exogenous fibrolytic enzymatic product

The enzymatic product retains a large amount of fermented material and cellular debris and its protein content was  $9.40 \text{ mg g}^{-1}$ . This result was lower than that reported (5.71 % of protein in the enzymatic product) by Ramírez *et al.* (2005). Colombato *et al.* (2003) report a higher protein content in 22 commercial enzymatic products, compared to that of this study. This variation of results may be due to the methods used to determine protein and the type of enzyme (solid or liquid).

According to Alltech, xylanase activity of the Fibrozyme product is  $100 \text{ IU g}^{-1}$ , but in the present study the activity was higher ( $292 \pm 0.20 \text{ IU g}^{-1}$ ) and approximate to that reported ( $222.16 \text{ IU g}^{-1}$ ) by Ramírez *et al.* (2005). Under similar conditions (pH 6.5 and  $39^\circ\text{C}$ ) a wide variation of xylanases ( $148$  to  $583 \text{ IU g}^{-1}$ ) and cellulases ( $163$  to  $791 \text{ IU g}^{-1}$ ) has been found (Giraldo *et al.*, 2008; Hristov *et al.*, 2008; Ranilla *et al.*, 2008), which can be attributed to differences in temperature and pH standards to measure the activity.

The enzymatic product showed cellulase activity ( $36 \pm 0.007 \text{ UI g}^{-1}$ ) lower than that reported ( $56.87 \text{ UI g}^{-1}$ ) by Ramírez *et al.* (2005) with pH 6.5. Although in the enzymatic product predominate xylanases, there are also traces of cellulases,  $\beta$ -glucanases, amylases and proteases (Frumholtz and Beauchemin, 1999). Laccases were not detected, which is consistent with the fact that the fungi used to produce the enzymatic product are *Aspergillus niger* and *Trichoderma longibrachiatum* which are not ligninolytic (Pendleton, 1998).

By measuring the enzymatic stability in buffer at pH 6, xylanases and cellulases showed activity until 46 h of incubation at  $39^\circ\text{C}$  (Figure 1 and Table 1), and it was higher in the cellulases (66 %) and lower in the xylanases (18.5 %). The enzymatic product contains a high xylanase activity at the beginning and after 30 min their activity begins to decrease, while cellulases remain more stable, which can be associated to the own nature and structure of the enzyme.

Figure 1 shows the results fitted to a model of first-order decay, where the speed constant of enzyme inactivation ( $k$ ) for xylanases was  $-0.054 \text{ h}^{-1}$  and

**Cuadro 1. Actividad residual (%) de xilanasas y celulasas en pH diferentes, 39 °C, y líquido ruminal clarificado.****Table 1. Residual activity (%) of xylanases and cellulases in different pH, 39 °C, and clarified ruminal fluid.**

Enzima	Horas	Tratamientos			
		pH 6.0	pH 7.0	LRC <sup>†</sup>	EEM <sup>‡</sup>
Xilanasas	1	65.5 a A	75.0 a A	16.5 b	2.54
	12	31.0 a B	20.5 b B	N.D.	2.32
	24	27.0 a B	10.0 b C	N.D.	2.94
	46	18.5 a C	N.D.	N.D.	1.44
Celulasas	1	89.5 a A	94.0 a A	82.0 b A	1.32
	12	78.0 a B	80.5 a B	62.5 a B	3.08
	24	76.0 a B	75.5 a B	57.5 a B	5.01
	32	66.0 a B	67.5 a B	32.5 b C	1.87

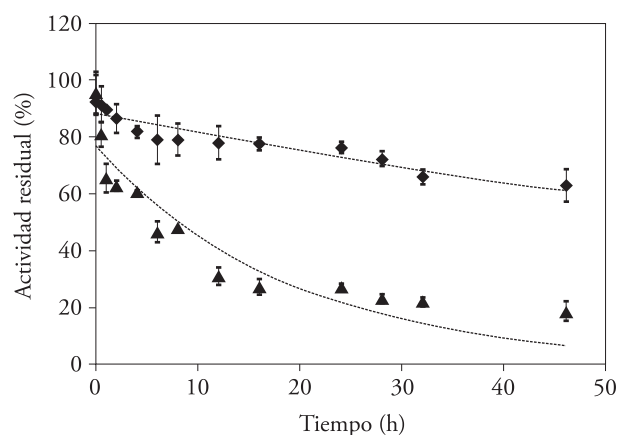
Literales minúsculas distintas entre hileras indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). Literales mayúsculas distintas entre columnas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). <sup>†</sup>LRC=líquido ruminal clarificado; N.D.=no se detectó actividad residual; <sup>‡</sup>EEM=error estándar de la media ❖ Different lower case letters among rows indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ). Different capital letters among columns indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ). <sup>†</sup>LRC=clarified ruminal fluid; N.D.=no residual activity was detected; <sup>‡</sup>EMM=standard error of the mean.

disminuir, mientras que las celulasas se mantienen más estables, lo cual puede estar asociado con la naturaleza y estructura propia de la enzima.

En la Figura 1 se observan los resultados ajustados a un modelo de decaimiento de primer orden, donde la constante de velocidad de inactivación enzimática ( $k$ ) para xilanasas fue  $-0.054 \text{ h}^{-1}$  y para celulasas  $-0.008 \text{ h}^{-1}$ , con un tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) 12.8 h y 87.7 h. Estos resultados son mayores a los reportados por Ramírez *et al.* (2005;  $4.02 \text{ h}^{-1}$ ), pero el tiempo de incubación (24 h) fue menor al del presente estudio (46 h).

Las enzimas fibrolíticas exógenas producidas por los hongos tienen un pH óptimo de actividad menor al de las secretadas por los microorganismos ruminales. Morgavi *et al.* (2001) señalan que la actividad xilanolítica de las enzimas ruminales fue óptima en pH de 6.0 a 6.5, mientras que para la xilanasa de *T. longibrachiatum* el efecto hidrolítico fue mayor en pH 5.0. En bovinos productores de carne y leche que consumen dietas con mayor proporción de granos se reduce la digestión de la fibra debido a que el pH ruminal a menudo es menor a 6.0 (Elam, 1976). En situaciones donde la degradación de la fibra no es completa, las enzimas exógenas pueden mejorar la degradación de los carbohidratos estructurales (Krause *et al.*, 1998).

to cellulases  $-0.008 \text{ h}^{-1}$ , with a half life time ( $t_{1/2}$ ) 12.8 h and 87.7 h. These results are higher than those reported by Ramírez *et al.* (2005;  $4.02 \text{ h}^{-1}$ ), but the incubation time (24 h) was lower than that of our study (46 h).

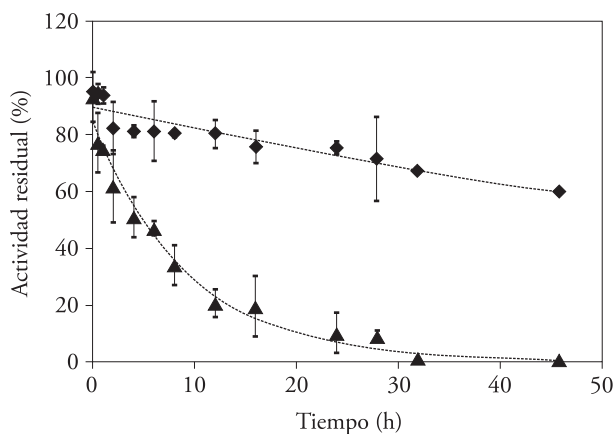


**Figura 1. Estabilidad enzimática de xilanasas (▲) y celulasas (◆) en pH 6, incubadas a 39 °C. Las líneas punteadas son el ajuste de los datos al modelo de decaimiento de primer orden.**

**Figure 1. Enzymatic stability of xylanases (▲) and cellulases (◆) in pH 6, incubated at 39 °C. The dotted lines are the adjustment of data to the first-order decay model.**

En el medio con pH 7, únicamente la actividad de las celulasas se mantuvo después de 46 h de incubación, mientras que casi la mitad de la actividad de las xilanasas se perdió después de 6 h y a las 32 h no hubo actividad residual (Figura 2). De manera similar a los estudios de estabilidad con pH 6, las celulasas aunque en menor cantidad en el producto enzimático, se mantienen más estables porque a las 46 h mostraban 60 % de actividad.

Con los resultados ajustados a un modelo de disminución de primer orden (Figura 2) se calculó que  $k$  de las xilanasas fue  $-0.07 \text{ h}^{-1}$  ( $t_{1/2}=9.9 \text{ h}$ ) y de las celulasas  $-0.009 \text{ h}^{-1}$  ( $t_{1/2}=77 \text{ h}$ ). Esto indica probablemente que las celulasas tienen mayor tiempo de vida que las xilanasas y el pH afecta la reducción de la actividad enzimática, porque el tiempo de vida media para xilanasas disminuye 30 % con el aumento de pH de 6 a 7. Estos resultados coinciden con los de Morgavi *et al.* (2001), quienes señalan que las enzimas fibrolíticas exógenas producidas por hongos tienen un pH óptimo de actividad menor que las secretadas por los microorganismos ruminales. Además, Ramírez *et al.* (2005) indican que Fibrozyme tuvo mayor actividad en una solución con pH 5.5 que en pH 6.5. Por tanto, la disminución de la actividad de xilanasas en pH 6 fue moderada en el presente estudio.



**Figura 2.** Estabilidad enzimática de xilanasas (▲) y celulasas (◆) en pH 7 y a 39 °C. Las líneas punteadas son el ajuste de los datos al modelo de decaimiento de primer orden.

**Figure 2.** Enzymatic stability of xylanases (▲) and cellulases (◆) in pH 7 and at 39 °C. The dotted lines are the adjustment of of data to the first-order decay model.

Exogenous fibrolytic enzymes produced by fungi have a pH of optimal activity lower than those secreted by ruminal microorganisms. Morgavi *et al.* (2001) indicate that the xylanolytic activity of the ruminal enzymes was optimal in pH of 6.0 to 6.5, while for the xylanase of *T. longibrachiatum* the hydrolytic effect was higher at pH 5.0. In beef and dairy cattle consuming diets with a higher proportion of grains fiber digestion is reduced because the ruminal pH is often lower than 6.0 (Elam, 1976). In situations where fiber degradation is not complete, exogenous enzymes can improve the degradation of structural carbohydrates (Krause *et al.*, 1998).

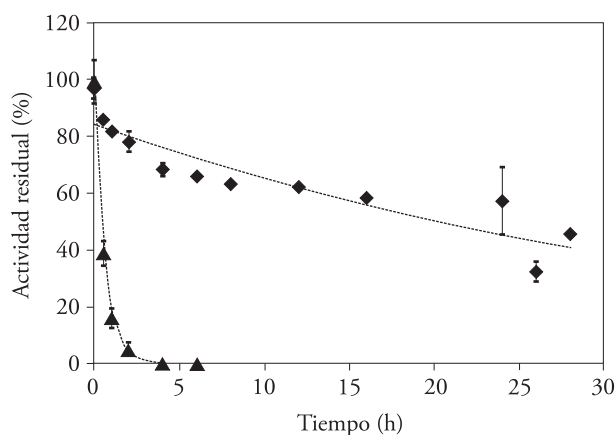
In the medium with pH 7, only the cellulase activity remained after 46 h of incubation, while almost half of the xylanase activity was lost after 6 h and at 32 h there was no residual activity (Figure 2). Similar to the stability studies with pH 6, cellulases though to a lesser amount in the enzymatic product, are more stable because at 46 h showed 60 % of activity.

With results fitted to a model of first-order decay (Figure 2) it was calculated that  $k$  of xylanases was  $-0.07 \text{ h}^{-1}$  ( $t_{1/2}=9.9 \text{ h}$ ) and of cellulases  $-0.009 \text{ h}^{-1}$  ( $t_{1/2}=77 \text{ h}$ ). This probably indicates that cellulases have a longer life than xylanases and that pH affects the reduction of enzymatic activity, since half-life time for xylanases decreases 30 % with the increase of pH from 6 to 7. These results agree with those of Morgavi *et al.* (2001), who indicate that exogenous fibrolytic enzymes produced by fungi have an optimal pH of activity lower than those secreted by ruminal microorganisms. In addition, Ramírez *et al.* (2005) point out that Fibrozyme had higher activity in a solution with pH 5.5 than at pH 6.5. Therefore, the decrease in xylanase activity at pH 6 was moderate in the present study.

The enzymatic activities in the clarified rumen fluid medium decreased to undetectable values after 30 min of incubation at 39 °C. Therefore, 1:10 dilutions were used, equivalent to the increase of doses of the enzymatic product in a pretreatment of the substrate or during administration in the diet for ruminants. The results of the enzymatic stability in a medium with clarified ruminal fluid (Figure 3) show that xylanase enzymatic activity decreases from 30 min and no activity was detected at 4 h, which contrasted with cellulases maintaining 50 % of their activity after 20 h. Morgavi *et al.* (2000) measured



Las actividades enzimáticas en el medio con líquido ruminal clarificado disminuyeron a valores indetectables después de 30 min de incubación a 39 °C. Por tanto, se usaron diluciones 1:10, equivalente al aumento de dosis del producto enzimático en un tratamiento previo del sustrato o durante la administración en la dieta para rumiantes. Los resultados de la estabilidad enzimática en medio con líquido ruminal clarificado (Figura 3) muestran que la actividad enzimática de xilanasas disminuye desde los 30 min y a las 4 h no se detectó actividad, lo cual contrastó con las celulasas que mantienen 50 % de su actividad después de 20 h. Morgavi *et al.* (2000) midieron la estabilidad de cuatro preparaciones comerciales de enzimas fibrolíticas exógenas, de los hongos *Irpex lacteus*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, y una mezcla similar a *I. lacteus* incubadas 6 h con líquido ruminal de borregos. Las xilanasas producidas por *A. niger* no fueron afectadas por la incubación y mantuvieron 100 % de su actividad 6 h, mientras que las provenientes de *T. viride* y de la mezcla retuvieron 75 %. Estos resultados son distintos a los del presente estudio donde no se detectó actividad de xilanasas después de 4 h de incubación, porque el producto enzimático proviene de la fermentación con *A. niger* y *T. viride*. Las variaciones en resultados



**Figura 3.** Estabilidad enzimática de xilanasas (▲) y celulasas (◆) a 39 °C en un medio de cultivo con líquido ruminal clarificado. Las líneas punteadas son el ajuste de los datos al modelo de decaimiento de primer orden.

**Figure 3.** Enzymatic stability of xylanases (▲) and cellulases (◆) at 39 °C in a culture medium with clarified ruminal fluid. The dotted lines are the adjustment of data to the first-order model of decay.

the stability of four commercial preparations of exogenous fibrolytic enzymes, from fungi *Irpex lacteus*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, and a mixture similar to *I. lacteus* incubated 6 h with rumen fluid of sheep. Xylanases produced by *A. niger* were not affected by incubation and maintained 100 % of their activity up to 6 h, while those from *T. viride* and of the mixture retained 75 %. These results are different from the present study where no xylanase activity was detected after 4 h of incubation, because the enzymatic product comes from the fermentation with *A. niger* and *T. viride*. Variations in results are possibly due to time of incubation of the samples to measure the activity; Morgavi *et al.* (2000) used 30 min and in this study were 5 min.

The added enzymes but not attached, to their substrate can be rapidly hydrolyzed by proteases of ruminal microorganisms; however, glycosylation of fibrolytic enzymes effectively reduces the proteolysis (Howes *et al.*, 1998). In this study the activity of the xylanases is rapidly reduced, thus undergo hydrolysis by not having the same degree of glycosylation than the cellulases. Furthermore, since in this study clarified rumen fluid was used the enzyme activity should be kept 100 % because this medium lacks living ruminal microorganisms. Possibly the clarified process eliminates bacteria, but not the proteases which could hydrolyze the xylanases present in the enzymatic product. The  $k$  value of xylanases ( $-1.815 \text{ h}^{-1}$ ) and cellulases ( $-0.026 \text{ h}^{-1}$ ) and the values of  $t_{1/2}$  (0.38 h for xylanases and 26.87 h for cellulases) indicate that cellulases have a lifetime 70 times higher than the xylanases.

The enzymatic stability results with clarified ruminal fluid are different from those reported by Morgavi *et al.* (2000), who evaluated the stability of exogenous fibrolytic enzymes and point out that the xylanases produced by *A. niger* maintained 100 % or more of their activity after 6 h of incubation with ruminal fluid. This increase of activity can be attributed to the fact that bacteria from ruminal fluid without clarification used in this study were producing xylanases, which increased the activity. The results of addition of exogenous fibrolytic enzymes in ruminant diets are not always positive or they are variables. The pH and ruminal bacteria can be a major factor for good performance of these enzymes when used in ruminant nutrition.

se deben posiblemente al tiempo de incubación de las muestras para medir la actividad; Morgavi *et al.* (2000) usaron 30 min y en el presente estudio fueron 5 min.

Las enzimas adicionadas pero no ligadas a su substrato pueden ser rápidamente hidrolizadas por las proteasas de los microorganismos ruminales; sin embargo, la glucosilación de las enzimas fibrolíticas reduce efectivamente esa proteólisis (Howes *et al.*, 1998). En el presente estudio la actividad de las xilanasas se redujo aceleradamente, por lo cual sufren hidrólisis por no tener el mismo grado de glucosilación que las celulasas. Además, en este estudio se usó líquido ruminal clarificado y la actividad de las enzimas debió mantenerse 100 % porque este medio carece de microorganismos ruminales vivos. Posiblemente el proceso de clarificado elimina las bacterias, pero no las proteasas las cuales podrían hidrolizar las xilanasas presentes en el producto enzimático. La  $k$  de las xilanasas ( $-1.815 \text{ h}^{-1}$ ) y celulasas ( $-0.026 \text{ h}^{-1}$ ) y los valores de  $t_{1/2}$  (0.38 h para xilanasas y 26.87 h para celulasas) indican que las celulasas tienen un tiempo de vida 70 veces mayor que las xilanasas.

Los resultados de estabilidad enzimática con líquido ruminal clarificado son diferentes a los reportados por Morgavi *et al.* (2000) quienes evaluaron la estabilidad de enzimas fibrolíticas exógenas y señalan que las xilanasas producidas por *A. niger* mantuvieron 100 % o más de su actividad después de 6 h de incubación con líquido ruminal. Este aumento de la actividad se puede atribuir a que las bacterias del líquido ruminal sin clarificar usado en el presente estudio estaban produciendo xilanasas, lo cual aumentó la actividad. Los resultados de adición de enzimas fibrolíticas exógenas en dietas para rumiantes, no siempre son positivos o son variables. El pH y las bacterias ruminales pueden ser un factor preponderante para un buen desempeño de esas enzimas cuando se usan en la nutrición de rumiantes.

Un aspecto no considerado en este estudio fue el efecto de la aplicación de enzimas al alimento, lo cual incrementa la unión de la enzima con el substrato y aumenta la resistencia de las enzimas a la proteólisis durante el tiempo que permanece en el rumen (Beauchemin *et al.*, 2003), lo cual podría explicar la degradación rápida en el líquido ruminal clarificado.

One aspect not considered in this study was the effect of the enzyme application to the feed, which increases the binding of the enzyme with the substrate and increases the resistance of enzymes to proteolysis during the time that remains in the rumen (Beauchemin *et al.*, 2003), which could explain the rapid degradation in the clarified ruminal fluid.

## CONCLUSIONS

The results of the enzymatic profile indicated variations in the concentrations of enzymes previously reported. Then, the activity of enzymes would depend on the method and temperature used to measure their activity, which directly impacts on the effect that will cause when added to a diet. The variation in results is related to the activity and amount of enzymes present in the product, without discarding the degree of glycosylation enzymes present.

The half-life of the enzyme and the percentage activity, as calculated in this study, can be used to design pretreatments to diets based on concentrates and forages.

—End of the English version—



## CONCLUSIONES

Los resultados del perfil enzimático indicaron variaciones en las concentraciones de enzimas reportadas previamente. Entonces, la actividad de enzimas estaría en función del método y temperatura empleados para medir su actividad, lo cual repercute directamente en el efecto que causará al adicionarse a una dieta. La variación en los resultados está relacionada con la actividad y cantidad de enzimas presentes en el producto, sin descartar el grado de glucosilación que presenten las enzimas.

Los tiempos de vida media de la enzima y el porcentaje de actividad, como los calculados en este estudio, pueden usarse para diseñar tratamientos previos a dietas a base de concentrados y forrajes.

## LITERATURA CITADA

- Almaraz, I., S. S. González, J. M. Pinos-Rodríguez, and L. A. Miranda. 2010. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in sacco* and *in vitro* degradation of diets and on growth performance of lambs. *Ital. J. Anim. Sci.* 9: 6-10.
- Bailey, M. J., P. Biely, and K. Poutanen. 1992. Interlaboratory testing methods for the assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* 23: 257-270.
- Beauchemin, K. A., D. Colombato, D. P. Morgavi, and W. Z. Yang. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81 (E. Suppl. 2): E37-E47.
- Bourbonnais, R., G. Paice M., B. Freiermuth, E. Bodie, and S. Borneman. 1997. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *App. Environ. Microbiol.* 63(12): 4627-4632.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Chang, R. 1986. *Fisicoquímica con Aplicaciones a Sistemas Biológicos*. Edit. Continental. Primera Edición. México, D. F. pp: 475-512.
- Cobos, M. A., and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paratrificum* var. *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. *In: Wallace, R. J., and Lahlou-Kassi (eds). Rumen Ecology Research Planning. Proceedings of a workshop held at the International Livestock Research Institute (ILRI), Addis Ababa, Ethiopia.* pp: 151-161.
- Colombato, D., D. P. Morgavi, A. F. Furtado, and K. A. Beauchemin. 2003. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: Relationship between biochemical characteristics and *in vitro* ruminal degradation. *J. Anim. Sci.* 81: 2628-2638.
- Colombato, D., F. L. Mould, M. K. Bhat, and E. Owen. 2007. Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and incubation pH on the *in vitro* ruminal fermentation of alfalfa stems. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137: 150-162.
- Coughlan, M. P. 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 3: 39-109.
- Elam, C. J. 1976. Acidosis in feedlot cattle: Practical observations. *J. Anim. Sci.* 43: 898-901.
- Frumholtz, P., y K. Beauchemin. 1999. El uso de enzimas en rumiantes. *In: Memorias del seminario de Biotecnología para la Alimentación Animal. AMENA. México, D. F.* pp: 85-94.
- Feng, P., C. W. Hunt, G. T. Pritchard, and W. E. Julien. 1996. Effect of enzyme preparations on *in situ* and *in vitro* degradation and *in vivo* digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. *J. Anim. Sci.* 74: 1349-1357.
- Gallardo, I., R. Bárcena, J. M. Pinos-Rodríguez, M. Cobos, L. Carreón, M. E. Ortega. 2010. Influence of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* and *in sacco* degradation of forages for ruminants. *Ital. J. Anim. Sci.* 9: 34-38.
- Giraldo, L. A., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, S. Ramos, and M. D. Carro. 2008. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay-based diet. *J. Anim. Sci.* 86: 1617-1623.
- Howes, D. J., J. M. Tricarico, K. Dawson, and P. Karnezos. 1998. Fibrozyme, the first protected enzyme for ruminants: improving fiber and animal performance. *In: Lyons T. P., and K. A. Jacques (eds). Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of the Fourteenth Annual Symposium Nottingham University Press, Loughborough, Leics, UK.* pp: 393-403.
- Hristov, A. N., C. E. Basel, A. Melgar, A. E. Foley, J. K. Ropp, C. W. Hunt, and J. M. Tricarico. 2008. Effect of exogenous polysaccharide-degrading enzyme preparations on ruminal fermentation and digestibility of nutrients in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 182-193.
- Krause, M., K. A. Beauchemin, L. M. Rode, B. I. Farr, and P. Norgaard. 1998. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. *J. Anim. Sci.* 76: 2912-2920.
- Kung, Jr., L., R. J. Treacher, G. A. Nauman, A. M. Smagala, K. M. Endres, and M. A. Cohen. 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83: 115-122.
- Loera, O., and J. Córdova. 2003. Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strain. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 46(2): 177-181.
- Márquez-Araque, A. T., G. D. Mendoza M., S. S. González M., S. E. Búntinx D., and O. Loera C. 2007. Fibrolytic activity of enzymes produced by *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 and *Aspergillus niger* AD96.4 in solid fermentation. *Interciencia* 32(11): 780-785.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Morgavi, D. P., K. A. Beauchemin, V. L. Nserenko, L. M. Rode, T. A. McAllister, A. D. Iwaasa, Y. Wang, and W. Z. Yang. 2001. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. *J. Anim. Sci.* 79: 1621-1630.
- Morgavi, D. P., C. J. Newbold, D. E. Beever, and R. J. Wallace. 2000. Stability and stabilization of potential feed additive enzymes in rumen fluid. *Enzyme Microbiol. Tech.* 26: 171-177.
- Pendleton, B. 1998. The regulatory environment. *In: Muirhead, S. (ed). Direct-Fed Microbial, Enzyme and Forage Additive Compendium. The Miller Publishing Company, Minnetonka, Minnesota. Vol. 4: 47-52.*
- Pinos, J. M., S. S. González, G. Mendoza, R. Barcena, M. A. Cobos, A. Hernández, and M. E. Ortega. 2002. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 80: 3016-3020.
- Purkharthofer, H., M. Sinner, and W. Steiner. 1993. Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization of production in submerged and solid state culture. *Enzyme Microbiol. Technol.* 15: 677-682.
- Ramírez, L., E. Aranda, G. D. Mendoza, L. Landois, L. A. Miranda, y M. M. Crosby. 2005. Caracterización de productos fibrolíticos comerciales utilizados en la alimentación de rumiantes. *Vet. Méx.* 36(1): 1-9.
- Ranilla, M. J., M. L. Tejido, L. A. Giraldo, J. M. Tricarico, and M. D. Carro. 2008. Effects of an exogenous fibrolytic

- enzyme preparation on *in vitro* ruminal fermentation of three forages and their isolated cell walls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 109-121.
- SAS. System for Windows. 2004. SAS User's Guide Statistics, SAS Inst. Inc. Cary North Carolina. USA.
- Steel, R. G. D., Torrie J. H., and Dickey D. A. 1997. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. 3rd edition. McGraw Hill Book Co. New York. 165 p.
- Stokes, M. R. 1992. Effect of an enzyme mixture, an inoculant, and their interaction on silage fermentation and dairy production. *J. Dairy Sci.* 75: 764-773.
- Tricarico, J. M., K. A. Dawson, and K. E. Newman. 1998. Effects of a microbial enzyme preparation (Fibrozyme) on ruminal digestion of fescue hay. *J. Anim. Sci.* 76 (Suppl. 1): 289.
- Van Soest, P. J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. 2nd. ed. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY. 375 p.
- Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, and L. M. Rode. 1999. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82: 391-403.