

¿Qué enzima es la mejor para mí?

Métodos *in vitro* en la evaluación de productos enzimáticos

Hay muchos factores a tener en cuenta a la hora de evaluar un producto enzimático. Este artículo destaca algunas de las consideraciones más importantes en relación a las pruebas *in vitro* con enzimas destinadas al pienso.

CHARLOTTE HORSMANS POULSEN.

Grindsted Products, Dinamarca.

ELINOR McCARTNEY.

Andersen, S. A., España.

Las enzimas constituyen una nueva categoría de aditivos para piensos que provienen de campos tecnológicamente relacionados tales como la industria cervecera, la de panadería o la de zumos de fruta. La aplicación de enzimas en los piensos para animales es muy reciente en muchos países de la UE. Consecuentemente, las industrias elaboradoras de piensos y las integraciones de aves y cerdos que desean utilizar tecnología de enzimas, tienen que afrontar una difícil elección a la hora de seleccionar el producto enzimático más adecuado y más rentable.

La mejor manera de elegir el producto idóneo son las pruebas seriadas de nutrición en animales, usando las enzimas candidatas. Sin embargo, las pruebas de campo consumen mucho tiempo y resultan muy caras. Los métodos de análisis *in vitro* pueden ayudar durante el proceso de toma de la decisión, ya que permiten la comparación de la calidad del producto antes del inicio de pruebas de campo, con lo cual se pueden excluir los productos inadecuados. Los ensayos *in vitro* también pueden utilizarse en programas de control de calidad para evaluar los lotes comerciales de las preparaciones enzimáticas e incluso para medir la

anderson s.a. GRINDSTED

CONTENIDO EN POLISACARIDOS (%) DE DIVERSOS INGREDIENTES DEL PIENSO

	β -GLUCANO	HEMICELULOSA (Incluyendo pentosanos)	PECTINA
HARINA SOJA	—	4.7	4.8
HARINA GIRASOL	—	11.3	6.2
HARINA COLZA	—	9.0	6.3
GUISANTES	—	10.0	3.4
CEBADA	4.7	9.1	0.6
AVENA	3.3	10.6	1.0
TRIGO	—	9.5	0.4
MAÍZ	—	6.9	0.7
CENTENO	2.2	10.5	0.4
SORGO	0.1	10.5	0.4
TRITICALE	3.0	7.6	0.6
	2.9	7.3	0.3
ALTRAMUZ	—	23	4

Fuente: Knudsen, National Institute of Animal Science, Denmark, Petterson & Aman, 1987, Acta Agric. Scand. 37: 20-26, Palmer, 1992, Progress Biochemistry, n° 27: 145-153

Tab. 1

Cuadro I.

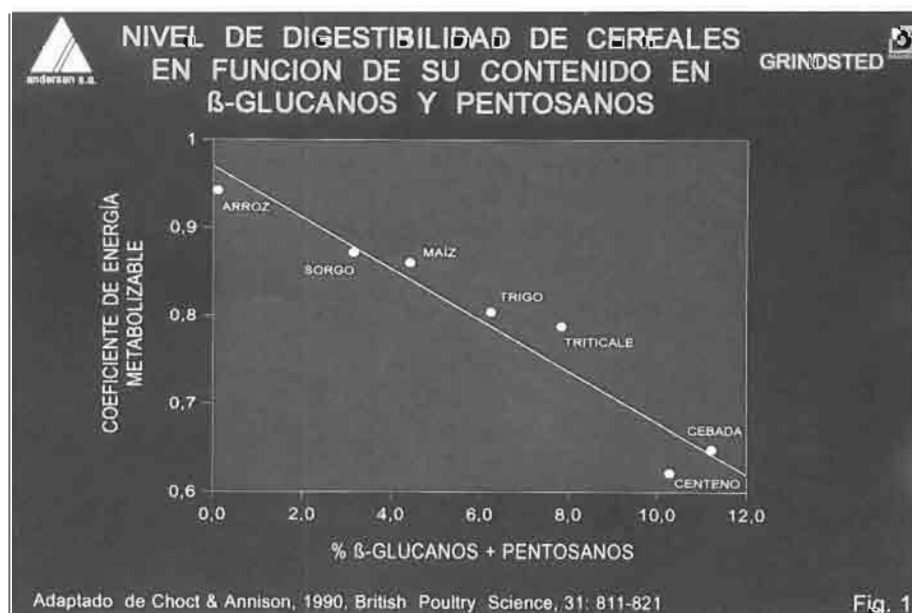


Fig. 1.

actividad de las enzimas en el pienso acabado.

Los polisacáridos de cadena larga, como los β -glucanos, hemicelulosas y pectinas, están presentes en muchas materias primas de los piensos (cuadro I). En el caso de la cebada y el trigo, el elevado contenido en β -glucanos y/o pentosanos (hemicelulosas)

reduce la digestibilidad de estos cereales, especialmente en el caso de broilers jóvenes y lechones (fig. 1). Los β -glucanos y los pentosanos causan también problemas de heces viscosas («sticky droppings») y de escasos rendimientos en el crecimiento, por lo que los piensos tradicionales para monogástricos jóvenes se formulan con



Fig. 2. Células de endospermo de cebada. Las células de las paredes celulares contienen β -glucanos que no pueden ser digeridos por los animales monogástricos. Consecuentemente, los lechones y broilers jóvenes tienen una capacidad limitada para degradar las paredes de las células del germen de la cebada y para acceder al almidón y las proteínas contenidas en el interior de las mismas.

Fig. 3. Células de endospermo de cebada después del tratamiento con β -glucanasas de cebada. Las β -glucanasas han degradado los β -glucanos de las paredes celulares, liberando de este modo el almidón, las proteínas y las grasas contenidos en la célula, los cuales están ahora disponibles para ser digeridos por las amilasas, las proteasas y las lipasas endógenas del propio lechón o broiler.

concentraciones limitadas de cereales como cebada, trigo, triticale, etc.

De forma similar, el contenido combinado de hemicelulosa y pectina

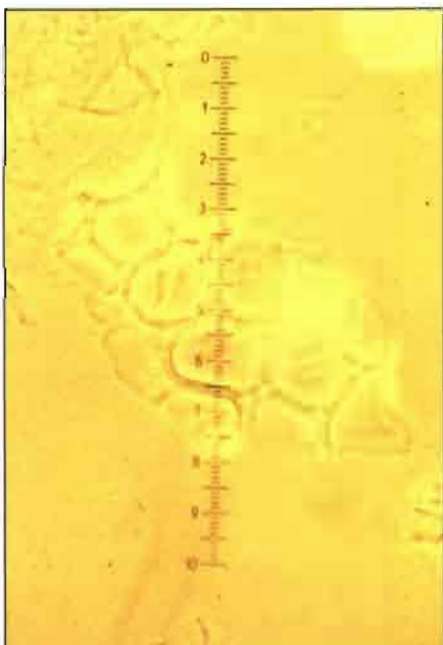


Fig. 4. Células de endospermo de trigo. Las paredes celulares contienen pentosanos (hemicelulosas) que los animales monogástricos no pueden digerir.

que se da en varias fuentes de proteína, como el girasol, la colza y los guisantes, también causa problemas tales como huevos sucios en ponedoras o rendimientos sub-óptimos en broilers y lechones.

Sin embargo, cuando la cebada, el trigo y/o el girasol son baratos y abundantes y el maíz y/o la soja son caros, resulta muy atractivo, desde el punto de vista comercial, el poder ser capaz de formular dietas con niveles superiores de cebada, trigo, girasol u otra materia prima económicamente asequible.

De hecho, la utilización de complejos enzimáticos conteniendo β -glucanasas, hemicelulasas y pectinasas puede permitir una mayor flexibilidad en la formulación del pienso, al ser posible la incorporación de niveles superiores de cereales y legumbres «problemáticos» en las dietas destinadas a monogástricos jóvenes (figs. 2-5).

SELECCIONAR EL PRODUCTO ENZIMATICO MAS ADECUADO

En el mercado existen multitud de

productos enzimáticos y cada uno de ellos declara una determinada activi-

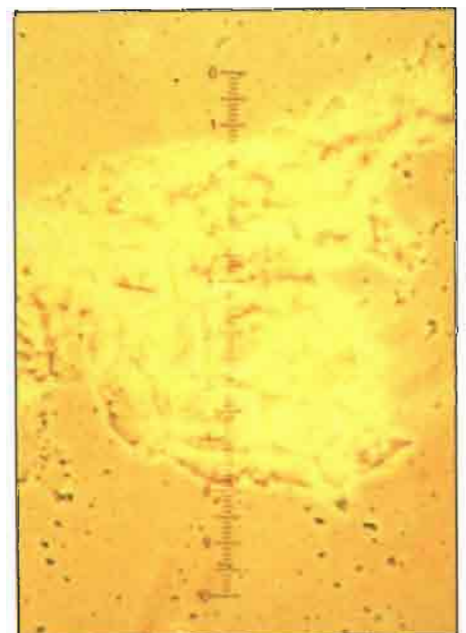


Fig. 5. Células de endospermo de trigo después del tratamiento con un complejo enzimático conteniendo hemicelulasas. Las rígidas estructuras celulares han desaparecido, permitiendo el acceso de los enzimas digestivos endógenos del lechón o el broiler a los nutrientes contenidos en las células del trigo.

UN NUEVO SISTEMA DE RECUBRIMIENTO QUE GARANTIZA UNA
EXCELENTE ESTABILIDAD EN PREMEZCLAS Y EN PIENSOS GRANULADOS

GRINDAZYM

Grindsted Products

*- con base en Dinamarca
pero operando a nivel
internacional - es una
de las empresas líder
a nivel mundial en
ingredientes para
alimentación.*

*Hemos venido
elaborando enzimas para
alimentación humana
durante más de 50 años
y enzimas para piensos,
durante más de 10.*

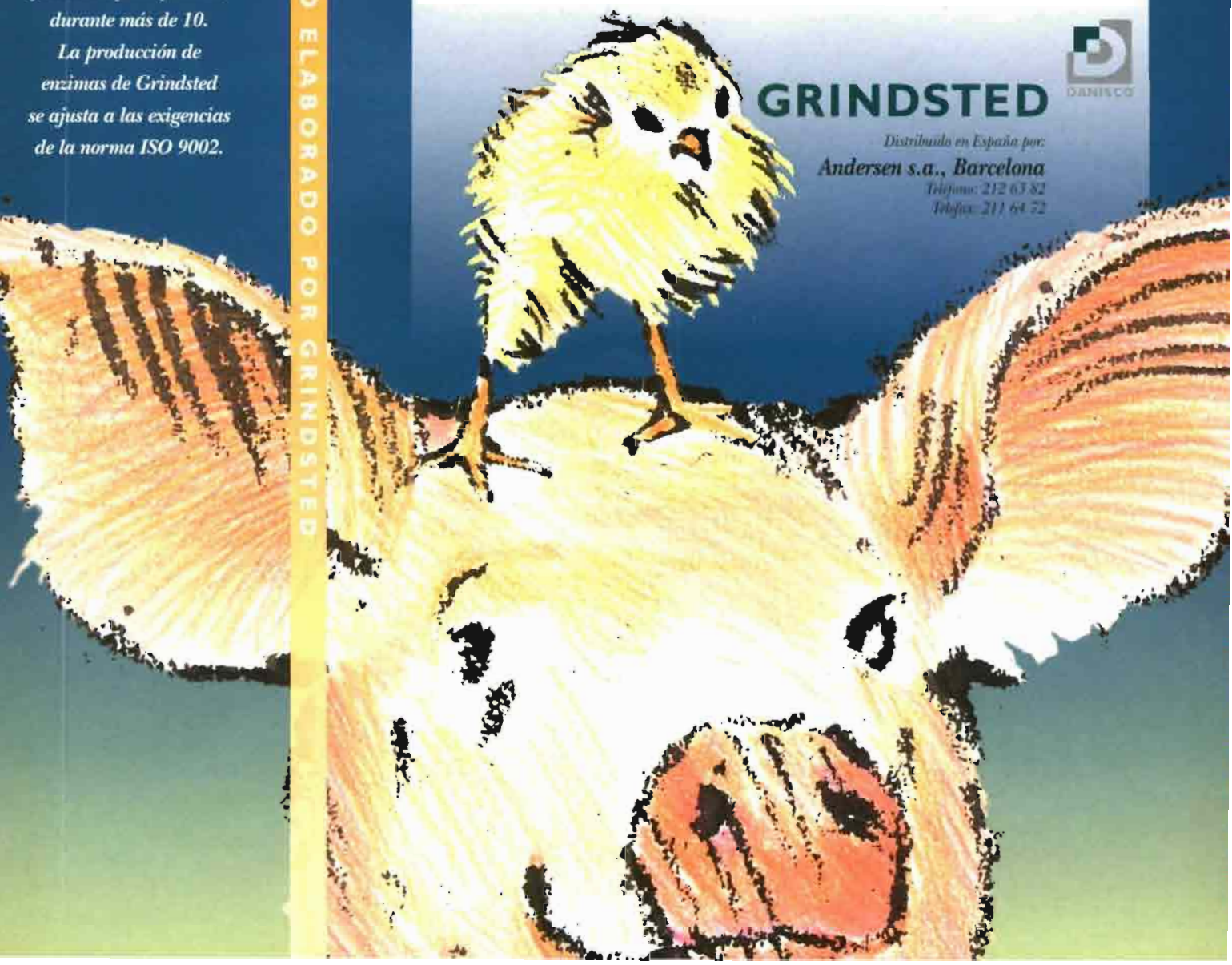
*La producción de
enzimas de Grindsted
se ajusta a las exigencias
de la norma ISO 9002.*

COMPLEJO ENZIMÁTICO ELABORADO POR GRINDSTED

LAS ENZIMAS GRINDAZYM PARA CERDOS Y AVES:

- Permiten la máxima flexibilidad en la formulación de los piensos
- Mejoran la digestibilidad de la proteína, la grasa y los carbohidratos de la dieta
- Aumentan el valor energético del trigo, la cebada y otros cereales que contengan polisacáridos complejos
- Mejoran la homogeneidad y la calidad de la carcasa
- Incrementan las tasas de crecimiento gracias a los mejores índices de conversión y a la superior ingesta de pienso
- Reducen los problemas de heces viscosas y camas húmedas
- Reducen la incidencia y la severidad de los trastornos digestivos
- Reducen los costes de producción

¡Todo lo cual representa unos costes de producción rentables!



GRINDSTED



Distribuido en España por:

Andersen s.a., Barcelona

Teléfono: 212 63 82

Teléfono: 211 64 72

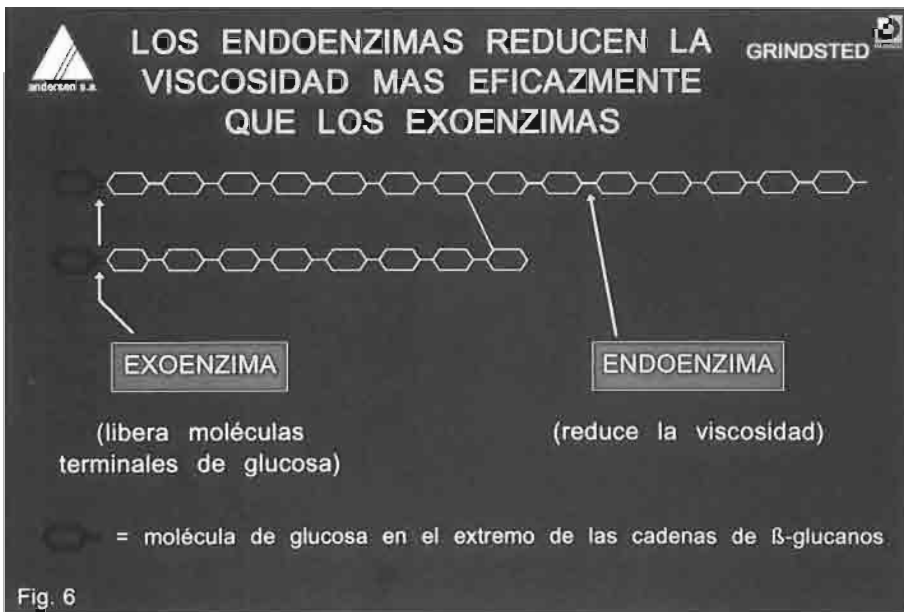


Fig. 6. Diferentes modos de acción de «endo» y «exo» enzimas. Las «endo» β-glucanas cortan los enlaces interiores de la molécula de β-glucano y reducen rápidamente la viscosidad. Las «exo» β-glucanas producen una hidrólisis sistemática del extremo de la cadena del polisacárido, sistema que contribuye escasamente a la reducción de la viscosidad.

dad enzimática. Sin embargo, invariablemente, los métodos de análisis utilizados son diferentes, por lo que no resulta fácil la comparación de su calidad a través del simple estudio de la literatura de los mismos. Además, las autoridades de la UE encargadas del registro apenas están empezando a evaluar a los enzimas como aditivos para piensos, por lo que no se dispone de una evaluación independiente de la calidad de los preparados enzimáticos.

CONTROL DE CALIDAD Y MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN EL PIENSO ACABADO

Incluso cuando ya se ha realizado la elección del producto, existe el problema de tener la seguridad de que las sucesivas compras del mismo producto cumplan con los estándares de calidad originales. Además, los fabricantes de pienso y las integraciones de cerdos y aves van a querer ser capaces de medir por sí mismos la actividad enzimática en el pienso final para poder garantizar un correcto mezclado y un nivel de actividad suficiente en el pienso después de la granulación.

ELEGIR EL METODO DE ENSAYO

Reducción de la viscosidad

A la hora de seleccionar un método de ensayo para un producto enzimático en particular, es importante tener en cuenta la aplicación a la que va a destinarse. Un ensayo que mida una

propiedad funcional similar al efecto deseado *in vivo*, es siempre preferible a otro que no sea capaz de medirla.

Las β-glucanasas, por ejemplo, se utilizan en dietas con altos contenidos en cebada para poder reducir la viscosidad intestinal, mejorando así la digestión y la absorción de los nutrientes y previniendo la aparición de heces viscosas. Por lo tanto, un ensayo que mida la reducción de la viscosidad de una solución de β-glucanos de la cebada reflejará muy bien la acción que se desea obtener *in vivo*.

Por otra parte, un ensayo que mida la cantidad de azúcares reductores terminales liberados en una solución de β-glucanos no va a medir la capacidad del producto enzimático para reducir la viscosidad intestinal (fig. 6).

La fig. 7 muestra los resultados del análisis de 5 preparaciones enzimáticas al utilizar dos métodos de ensayo distintos. Uno de estos métodos mide la reducción de la viscosidad de una solución de β-glucanos de cebada, mientras que el otro mide la liberación de moléculas de glucosa que ocupan una posición terminal en la cadena. La actividad enzimática medida por el primero de ellos (reducción de viscosidad) correlaciona bien con pruebas de campo llevadas a cabo con éxito en

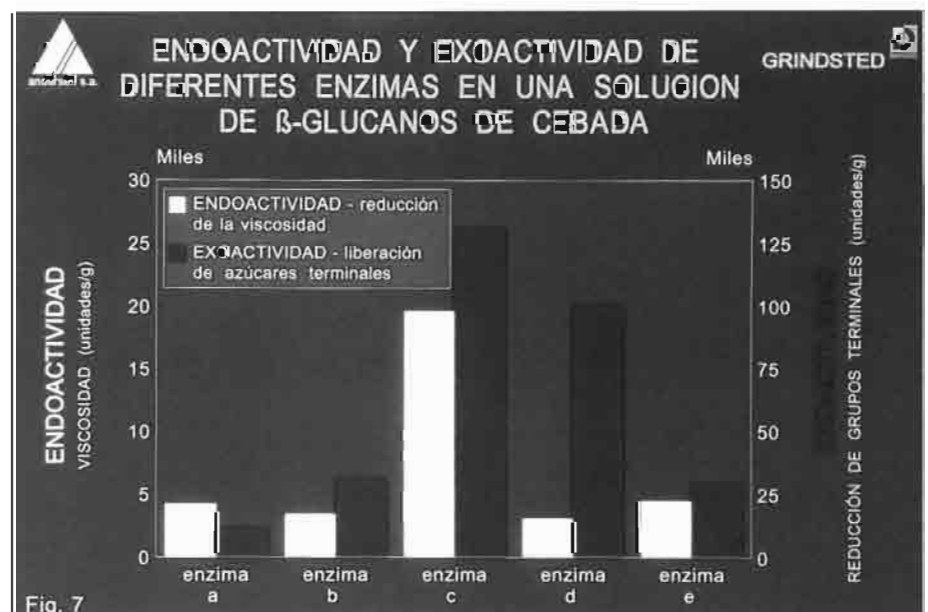


Fig. 7. Medida de la «endo» y la «exo» actividad de 5 enzimas a base de β-glucanasas. La evaluación de estos enzimas por «endoactividad» indica que el Enzima C va a ser el mejor para reducir la viscosidad intestinal. El Enzima D sería el de acción más débil sobre la reducción de la viscosidad intestinal, a pesar de su buena «exoactividad».

broilers y representa una actividad de tipo *endo-β-glucanásica*.

El segundo método de análisis refleja principalmente una actividad de tipo *exo-β-glucanásica*, la cual no contribuye mucho a la reducción de la viscosidad. Por lo tanto, el primer método es más útil si se compara la eficacia de diferentes productos enzimáticos que van a ser usados en piensos ricos en cebada destinados a broilers.

En la fig. 7 puede verse que el Enzima C posee el mayor poder reductor de la viscosidad, seguido por los Enzimas E, A, B y finalmente por el Enzima D. El Enzima D tiene la menor capacidad para reducir la viscosidad, a pesar de tener una elevada exoactividad. De modo que si todos estos enzimas se miden de acuerdo con el segundo método de análisis (exo), el Enzima D parece ser una β-glucanasa, mucho mejor de lo que es en realidad. El primer tipo de ensayo (endo) resulta mejor para ser utilizado e identifica al Enzima C como el de mayor capacidad para reducir la viscosidad.

De este modo, ya puede tomarse la decisión de comprar o elegir uno de estos productos en base a criterios de actividad/dosis/precio por tonelada de pienso.



Las integraciones de cerdos que desean utilizar enzimas tienen que afrontar una difícil elección a la hora de seleccionar el producto más adecuado y rentable.

CONDICIONES DE ENSAYO (PH Y TEMPERATURA)

En el caso de los enzimas para piensos, las condiciones de ensayo deberían tener en cuenta las condiciones de temperatura, pH y duración del tránsito del pienso que se dan en el intestino de los broilers jóvenes y de los lechones. Los buenos enzimas despliegan una buena actividad alrededor de 40 °C y a pH de entre 4 y 6. Los enzimas para piensos deben actuar con rapidez bajo estas condiciones de temperatura y pH para poder realizar su función dentro del período de duración del tránsito intestinal que, en el caso de los broilers es relativamente corto (3-5 h).

Una acción rápida también puede ser necesaria para evitar una posible inactivación del enzima por parte de proteasas intestinales endógenas. Sin

embargo, van a ser necesarios nuevos estudios para clarificar la acción de las proteasas endógenas sobre los enzimas del pienso.

El punto óptimo es aquél en el que un enzima exhibe su mayor velocidad de acción. En la fig. 8 se muestran los puntos óptimos de temperatura y en la fig. 9 los niveles óptimos de pH, para dos preparados enzimáticos a base de xilanas (pentosanasa).

Aunque ambos enzimas despliegan una actividad óptima dentro del rango deseado de pH (4-6), el Enzima G alcanza su nivel óptimo a una temperatura de 40 °C resultando, por lo tanto, más adecuado que el Enzima X para ser utilizado en piensos para broilers debido a su mayor actividad a la temperatura corporal del broiler.

CONDICIONES DE ENSAYO (SUSTRATO)

Un parámetro muy importante al

analizar cualquier enzima es el sustrato. Un sustrato similar o idéntico a los ingredientes del pienso sobre los que va a actuar el enzima, tiene más probabilidades de reflejar la actividad que se desea obtener *in vivo*. Es por esto que los análisis de las β-glucanasas se llevan a cabo más idóneamente con β-glucanos de cebada, como en el caso de la fig. 7.

En el caso de las xilanas, los resultados del ensayo dependen particularmente del sustrato utilizado. Los xilanos, una de las hemicelulosas que pueden encontrarse frecuentemente en el trigo, están formados por largas cadenas del azúcar xilosa. Las moléculas individuales de xilosa pueden encontrarse no sustituidas, monosustituidas o disustituidas con arabinosa. Los xilanos de diferentes orígenes (trigo, madera de alerce o de abedul,...) no sólo varían en grado y distribución de la sustitución, sino que además pueden tener diversos sustituyentes extra.

Cada diferente xilanasas tiene preferencia por una estructura particular de xilano. Consecuentemente, un análisis de xilanasas utilizando madera de alerce proporcionará un resultado completamente diferente al que se obtendría con el mismo análisis en el caso de usar xilano de salvado de trigo como sustrato.

Concentración

Independientemente del sustrato que sea elegido, también resulta importante la concentración del mismo. Un mismo tipo de enzima (β -glucanasas, por ejemplo) procedente de distintos fabricantes pueden tener afinidades por el sustrato bastante dispares. Por lo tanto, es aconsejable llevar a cabo experimentos utilizando distintas concentraciones de sustrato, a la hora de optimizar las condiciones de ensayo.

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN PIENSOS GRANULADOS

Básicamente, pueden hacerse las mismas consideraciones que en el caso del análisis de la actividad en los piensos acabados. Sin embargo, el análisis de dicha actividad se complica

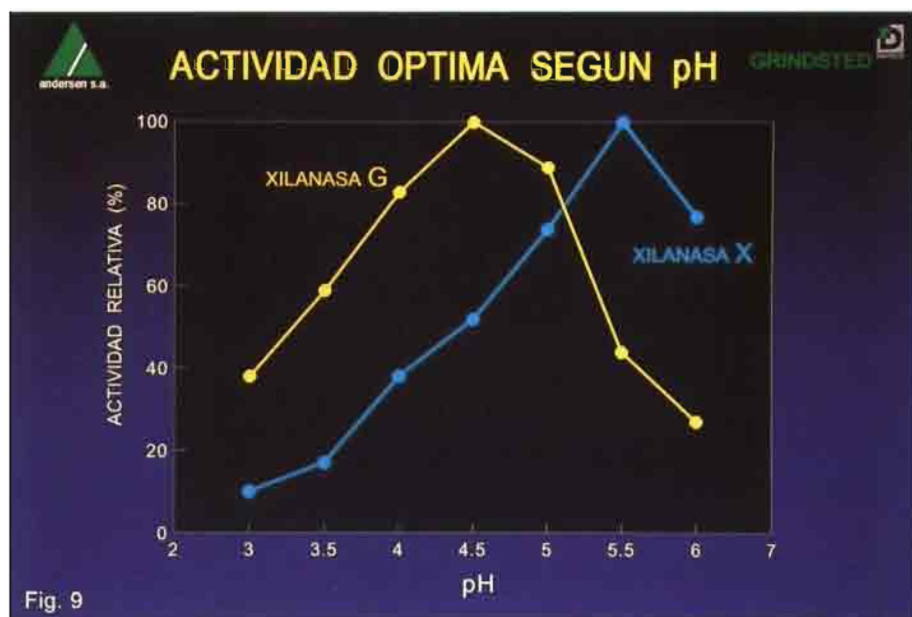


Fig. 9

Fig. 9. Valores óptimos de pH para la actividad de 2 xilanasas (G y X).

por la necesidad de extraer los enzimas del pienso antes del ensayo y por el hecho de que los enzimas están mucho más diluidos en el pienso que en el preparado enzimático original (del orden de 1.000-2.000 veces más diluido).

Resulta muy útil el desalar las muestras de pienso antes del análisis (extracción de fracciones de bajo peso molecular) para eliminar los componentes que pudieran interferir durante el mismo.

Muchas xilanasas y la mayoría de β -glucanasas poseen una región espe-

cífica en la que se liga la celulosa. Durante el calentamiento, estas regiones se unen muy fuertemente a la celulosa. En otras palabras, durante la granulación del pienso, el calor que se produce hace que los enzimas se unan a fracciones de celulosa presentes en el pienso.

Análisis

La parte activa de la molécula de enzima no se altera, pero los enzimas ligados se quedan en el tubo de centrifugado junto con el pienso después de la extracción. Esto se manifiesta como una pérdida aparente de actividad del enzima en el momento de analizar el pienso granulado que contiene el preparado enzimático.

Esto queda ilustrado en la fig. 10 en el caso de un complejo de β -glucanasas añadidas a la celulosa y, posteriormente, sometidas a calentamiento. Aparentemente, hay una pérdida de actividad de un 80% después de 4 min. a 80 °C. Esto se debe al enlace con la celulosa y a la consiguiente pérdida durante la extracción de la muestra. Sin embargo, la pérdida real debida al calor es de un 10% a 80 °C, como se aprecia en las muestras control de β -glucanasas calentadas sin celulosa (fig. 10)*.

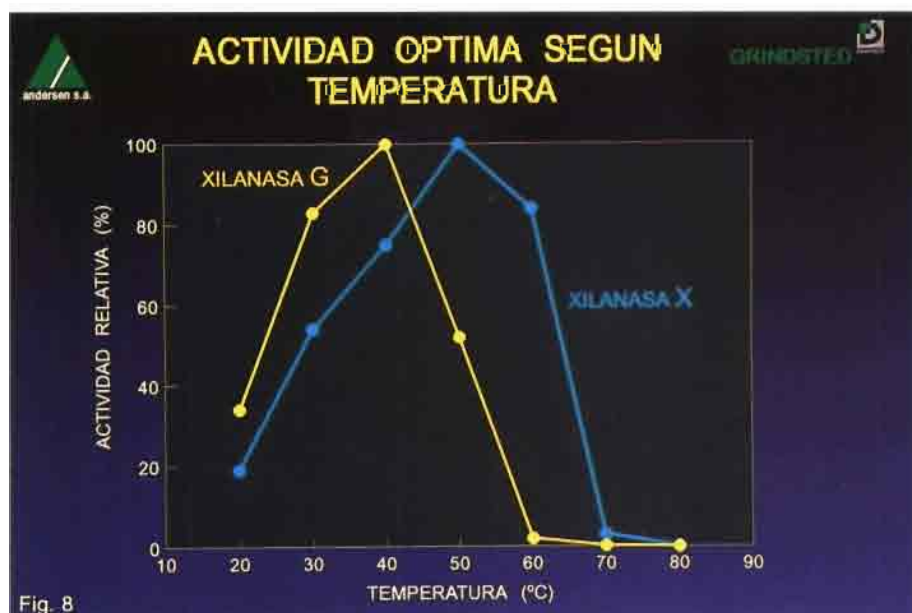


Fig. 8

Fig. 8. Temperatura óptima para la actividad de 2 xilanasas (G y X).

Se sigue trabajando en el desarrollo de métodos más sensibles, más rápidos, más fáciles y más baratos para la determinación de la actividad en los complejos enzimáticos y en los piensos acabados. Por ejemplo, el uso como sustrato de xilano de madera de abedul, aunque no resulta ideal desde el punto de vista de su aplicación, aumenta la sensibilidad del análisis, contribuyendo así a superar los problemas asociados con la dilución de los enzimas en el pienso.

CONCLUSIONES

La tecnología de los enzimas para piensos es un tema nuevo y complejo. Es importante estar atento a las trampas derivadas de un exceso de confianza en los ensayos *in vitro* sin prestar atención al rendimiento del producto en condiciones comerciales de producción de cerdos y broilers.

También es aconsejable adquirir preparaciones enzimáticas a un fabricante de confianza, preferiblemente que ofrezca garantías independientes sobre la calidad del producto, sus rendimientos y su consistencia.

Resumimos algunos puntos importantes a tener en cuenta cuando se utilicen métodos de ensayo *in vitro* para

ayudar en la elección del producto más adecuado:

– **Función/Aplicación:** Los métodos de análisis deben idealmente reflejar la función del enzima en el tracto digestivo (por ejemplo, reducción de la viscosidad).

– **Temperatura/pH:** La temperatura y el pH del ensayo deben ser comparables a las condiciones del intestino de cerdos y broilers (por ejemplo, pH 4-6 y temperatura 40 °C).

– **Sustrato:** Preferiblemente, el sustrato debe estar relacionado con las materias primas del pienso en el que el enzima deberá ejercer su acción (por ejemplo, β-glucanos de cebada como sustrato para β-glucanasas y xilanos de trigo como sustrato para xilanasas). La concentración del sustrato y la afinidad del enzima por el mismo también pueden influir sobre los resultados.

– **Preparación/Extracción de la muestra:** El análisis de enzimas en el pienso acabado resulta complicado debido a factores de dilución y a la tendencia de los enzimas a combinarse con los sustratos del pienso durante el calentamiento. Los enzimas ligados permanecen activos pero no pueden ser extraídos de la muestra de pienso. ■

* Los principales fabricantes han desarrollado técnicas para proteger los enzimas durante la granulación, bien por medio de sistemas de recubrimiento, bien por medio de la adsorción en excipientes especiales. Estos productos enzimáticos pueden ser usados en forma microgranulada, a temperaturas de granulación de hasta 85 °C, con pérdidas insignificantes de actividad. Para temperaturas de granulación superiores a los 90 °C y para piensos extrusionados, se recomienda la utilización de enzimas en forma líquida. Los enzimas líquidos se rocían sobre el pienso acabado cuando éste se ha enfriado hasta 50 °C o menos.

BIBLIOGRAFIA

AI, BUSTANY Y ELWINGER. 1988. Whole grains, unprocessed rapeseed and β-glucanase in diets for laying hens. *Swedish J. Agric. Res.* 18: 31-40.

BAIRD *et al.* 1976. Effects of enzyme supplementation and presoaking of diet on performance and nutrient digestibility in early-weaned pigs.

BEDFORD *et al.* 1992. The effect of dietary enzyme supplementation of rye and barley-based diets on digestion and subsequent performance of weaning pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 72: 97-105.

CHESSON. 1987. Supplementary enzymes to improve the utilisation of pig and poultry diets. *Recent Advances in Animal Nutrition*. Butterworths, London, 71-89.

CHOCT Y ANNISON. 1990. Anti-nutritive activity of wheat pentosans in broiler diets. *British Poultry Science* 31: 811-821.

COUGHLAZN Y HAZLEWOOD. 1993. «β-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17: 259-289.

FRANCESCH, M. *et al.* IRTA, España. 1994. Effects of enzyme supplementation of a barley and sunflower based diet on laying hen performance. *J. Appl. Poultry Res.* 1994 (en preparación).

GOLOVCHENKO *et al.* 1992. Elucidation of the role of hydrophobic interactions in the adsorption of endo-1,4-β-glucanases on polysaccharides. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 327-331.

HELSELMAN. 1983. Effects of β-glucanase supplementation to barley based diets for broiler chickens. Dissertation. Report 112, *Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Animal Husbandry, Uppsala.*

MEINKE *et al.* 1991. Multiple domains in endoglucanase B (CenB) from *Celomonas fimi*: functions and relatedness to domains in other polypeptides. *J. Bacteriol.* 173: 7126-7135.

PETTERSSON Y AMAN, 1989. Enzyme supplementation of a poultry diet containing rye and wheat. *Brit. J. Nutr.* 62: 139-149.

ROSE *et al.* 1972. Sunflower seed meal as a replacement for soybean meal protein in laying hen rations. *Poultry Sci.* 51: 960-967.

WYATT Y GOODMAN. 1993. Utilisation of feed enzymes in laying hen rations. *J. Appl. Poultry Res.* 2: 68-74.

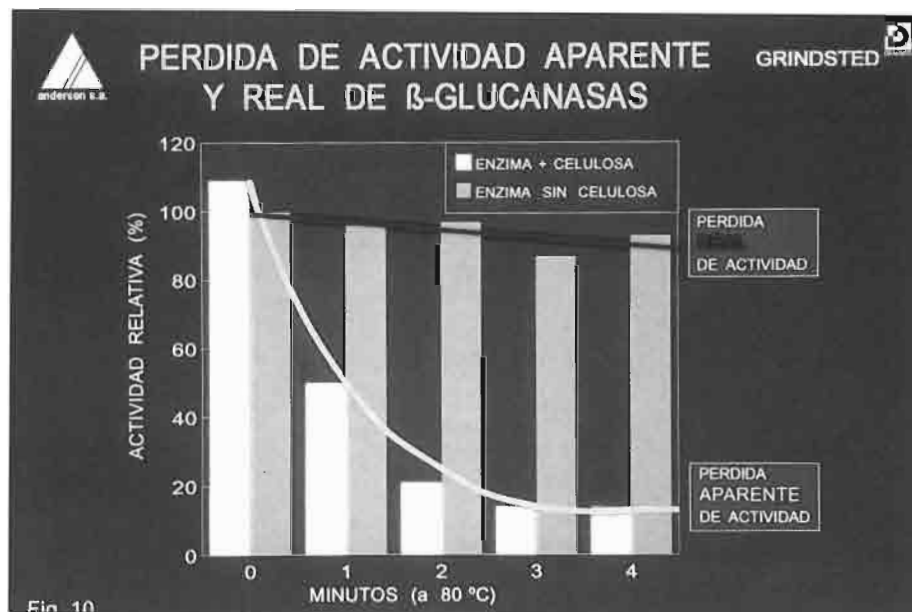


Fig. 10. Los enzimas se ligan a los sustratos del pienso durante la granulación.