

# Predicción de la digestibilidad *in vivo* de forrajes conservados de alfalfa (*Medicago sativa*) mediante técnicas de solubilidad enzimática

EDMUNDO RIVEROS VEAS y ALEJANDRO ARGAMENTERÍA GUTIÉRREZ

Departamento de Nutrición Animal. E.T.S.I.A. Universidad Politécnica. 28040-Madrid.

## RESUMEN

*Se estudiaron 3 métodos de predicción de la digestibilidad in vivo de 17 muestras de forrajes conservados de alfalfa, utilizando solubilidad en celulasas con pepsina, fibra neutro detergente y ácido clorhídrico, respectivamente.*

*La mejor predicción, medida a través de los coeficientes de correlación, la presentó el método ácido clorhídrico celulasa, seguido del pepsina celulasa. El método fibra neutro detergente celulasa, que presentó los valores más bajos de coeficiente de correlación cuando se calculó la regresión simple, al incluir los valores de fibra neutro detergente y digestibilidad en celulasa en una regresión lineal múltiple, mejoró su valor predictivo.*

*Los mayores valores del coeficiente de correlación se obtuvieron cuando se homogeneizó el análisis incluyendo solamente forrajes de alfalfa como planta entera y como único componente botánico, dando valores de coeficiente de correlación de 0,81; 0,69; 0,79 y 0,72 para los métodos pepsina celulasa, fibra neutro detergente celulasa, ácido clorhídrico celulasa y fibra neutro detergente celulasa con inclusión del porcentaje sobre materia seca de la fibra neutro detergente en la regresión lineal múltiple, respectivamente.*

## INTRODUCCIÓN

La alfalfa juega un importante papel como alimento para el ganado en muchas explotaciones españolas. Al igual que todos los forrajes, su valor nutritivo depende principalmente de su ingestibilidad y digestibilidad. En esta última incluye, sobre todo, el estado de desarrollo al momento de la recolección; (REID et al., 12) y, si es sometida a un proceso de conservación, también dependerá de todas las variables que intervienen en el mismo. El conocer la digestibilidad de la alfalfa conservada tendrá utilidad práctica al diseñar un racionamiento más preciso y utilidad científica en el caso de experiencias en las cuales es imposible una determinación de la digestibilidad *in vivo* (DEMARQUILLY & WEISS, 4).

La estimación de ésta puede realizarse mediante:

- Predicciones a través de componentes químico-bromatológicos (MINSON, 11).
- Producción de gas *in vitro* (MENCKE, 10).
- Digestibilidad *in vitro* (TILLEY & TERRY, 13).
- Técnica de las bolsas de nylon (MEHREZ & ORSKOV, 9).
- Solubilidad enzimática (AUFRERE, 1; KELLNER & KIRCHGESNER, 7; DOWMAN & COLLINS, 5).
- Reflectancia de infrarrojos (BINSTON & DARDENNE, 3).

De entre ellos hemos considerado de gran interés en cuanto a rapidez, repetibilidad, sencillez de manejo y precisión aquellos métodos basados en la solubilidad enzimática mediante celulasas. El objetivo del presente trabajo es comparar los resultados obtenidos con tres métodos diferentes sobre una colección de 17 forrajes conservados de alfalfa cuyo coeficiente de digestibilidad de la M. O. era conocido.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 17 muestras de forrajes de alfalfa (*Medicago sativa*) provenientes de diversos ecosistemas europeos, entre los que se cuentan Alemania, España, Francia y Holanda. A las 17 muestras se les determinó su digestibilidad *in vivo* de la materia orgánica en los mismos lugares de origen.

De las 17 muestras, 14 correspondían a henos en diferentes estados de desarrollo del vegetal, incluyendo uno que además de

alfalfa contenía una mezcla de gramíneas diversas, y 3 correspondían a ensilajes.

Todas las muestras fueron secadas a estufa y molidas a 0,8-0,1 mm. y se las determinó su contenido en materia seca (M.S.) y cenizas.

Para determinar la solubilidad o digestibilidad en celulosa (Dc) se empleó celulosa «Onozuka R 10» y se procedió empleando las siguientes tres metodologías, utilizando en todas las incubaciones un forraje verde desecado compuesto por alfalfa, festuca (*Festuca pratensis*), raygrass (*Lolium perenne*) y trébol (*Trifolium repens*), y papel filtro Whatman núm. 4, como testigos.

Método Pepsina celulosa. Se basó en el método descrito por AUFRERE (1). Consistió en tratar por duplicado, 0,3 g. de muestra con 25 ml. de una solución de 2 g. de pepsina/l de ClH 0,1 N durante 24 h., a 40° C, agitando a las 1, 5 y 21 h. Las muestras fueron tratadas directamente en crisoles de vidrio de porosidad 2, tapados en ambos extremos. Luego fueron sumergidos en un baño termostático a 80° C durante 30 min. Se procedió a filtrar y lavar con agua caliente y en los mismos crisoles nuevamente se aplicó 25 ml. de una solución de 1 g. de celulosa + 0,1 g. de cloramfenicol/l de solución tampón ácido acético - acetato sódico trihidratado a pH 4,6 - 4,7. Se incubaron las muestras a 40° C durante 24 h., agitando a las 1, 5 y 21 h.

Terminada la incubación se filtraron las muestras y lavaron con agua caliente, se secaron a 103° C, determinándose el residuo seco, y las cenizas por incineración a 550° C, durante 1,5 h. en en los mismos crisoles originales.

Método Fibra neutro detergente celulosa. Se basó en la determinación de fibra neutro detergente originalmente propuesta por VAN SOEST (14), lo cual se realizó en crisoles de vidrio de porosidad 2. Se les aplicó 30 ml. de solución neutro detergente y se sometió a ebullición suave durante 60 min. Se filtró, lavando con agua caliente y con acetona, y se secaron a 103° C determinándose la fibra neutro detergente.

A los crisoles con el residuo de fibra neutro detergente se les añadió 25 ml. de la solución de celulosa, y se procedió de manera análoga a la descrita en el método pepsina celulosa.

Método Acido clorhídrico celulosa. Se basó en un método propuesto por KELLNER y KIRCHGESSNER (6) y habiéndose realizado una serie de pruebas previas y modificaciones con el fin de simplificarle y adecuarlo a sistemas de trabajo en serie, se llegó a plantearlo de la siguiente manera: A 0,3 g. de muestras, en cri-

soles de vidrio de porosidad 2, se les aplicó 60 ml. de CIH 1 N en un extractor en caliente. Se sometieron las muestras a ebullición suave durante 10 min., se filtró y se lavaron con agua caliente. En seguida se aplicó sobre los mismos crisoles 25 ml. de solución de celulasa siguiendo el procedimiento señalado en el método pepsina celulasa. Luego se lavaron aquéllos con agua caliente y se aplicó pepsina siguiendo el procedimiento indicado en el método pepsina celulasa. Después se secaron a 103° determinándose el residuo seco, y las cenizas por incineración a 550° C 1,5 h. en los mismos crisoles originales.

Obtenidos los valores de digestibilidad con celulasa, se efectuaron análisis de regresión con respecto a los valores de digestibilidad *in vivo*.

#### PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los valores de digestibilidad con celulasa obtenidos mediante los métodos estudiados se presentan en el cuadro 1. En el método de Dc con fibra neutro detergente (F.N.D.) se presenta además este valor ya que se obtiene conjuntamente con el de digestibilidad.

Las ecuaciones de regresión lineal obtenidas, que permiten predecir la digestibilidad *in vivo* (Do) se presentan en el cuadro 2. En el caso del método F.N.D. celulasa, como se contaba con el dato de contenido F.N.D., se calculó la regresión múltiple tanto para F.N.D. y Dc como para digestibilidad de la F.N.D. y contenido celular y se presentan en el cuadro 3.

En algunos casos, ecuaciones distintas de las lineales dieron ajustes levemente superiores pero no significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ).

En los resultados puede observarse que los valores en los tres métodos son relativamente cercanos a los de digestibilidad *in vivo*. Sin embargo el método que da una mayor correlación es el de CIH celulasa y el único en el cual se mantiene un valor próximo a la Do cuando se agregan forrajes distintos a la alfalfa sola, como lo es el heno de gramíneas y alfalfa, no permitiendo, no obstante, la correcta evaluación del ensilaje de bagazo de alfalfa.

El método F.N.D. celulasa, permitió obtener un valor muy próximo al *in vivo* en el caso del ensilaje de bagazo, pero fue el método que presentó la peor correlación de todos los métodos probados.

## CUADRO 1

DIGESTIBILIDAD *IN VIVO* Y CON DIVERSOS METODOS UTILIZANDO CELULASAS DE DIVERSOS FORRAJES DE ALFALFA

Tipo de forraje	Dig. in vivo	Dig. pepsina celulasa	Contenido FND (1)	Dig. FND celulasa	Dig. CIH celulasa
Heno gramíneas + alfalfa	68,80	54,6	57,30	55,9	67,5
Heno	64,98	60,1	46,09	62,9	64,2
Heno 3.º ciclo	64,70	63,4	43,39	65,9	65,4
Heno 2.º ciclo	62,50	61,1	49,93	60,7	61,3
Heno 1.º ciclo	62,40	59,0	48,32	61,2	62,1
Heno 1.º ciclo	62,20	61,0	41,77	68,8	62,5
Heno 1.º ciclo	59,00	58,8	55,77	58,2	59,9
Heno 1.º ciclo	57,80	57,9	51,15	59,7	64,9
Heno	56,30	60,0	49,93	62,1	61,5
Heno	55,86	55,5	49,41	59,6	55,5
Heno 3.º ciclo	55,20	52,7	57,88	56,1	58,2
Heno 1.º ciclo	54,60	44,3	61,73	49,8	54,5
Heno 2.º ciclo	54,50	54,3	47,25	63,3	57,9
Heno 1.º ciclo	54,00	50,2	56,12	53,4	56,5
Ensilaje + melaza	64,10	66,1	33,78	71,7	67,1
Ensilaje bagazo	62,30	49,6	52,38	61,7	54,0
Ensilaje	61,60	57,3	44,77	61,7	59,8

(1) % sobre materia seca.

En general se puede observar en el cuadro 2 que los valores de  $r$  son muy bajos determinando que a pesar de que los valores de digestibilidad mediante los métodos con celulasa, fueron cercanos a los valores *in vivo*, el valor predictivo de los métodos no es satisfactorio, con excepción del método CIH celulasa cuyos valores de  $r$  son comparables a los dados por KELLNER y KIRCHGESNER (7) para forrajes de gramíneas y trébol, especialmente al eliminar forrajes distintos a los henos o ensilajes de alfalfa propiamente tales como el ensilaje de bagazo y el heno de gramíneas y alfalfa.

## CUADRO 2

### ECUACIONES DE REGRESION PARA PREDECIR LA DIGESTIBILIDAD *IN VIVO* (Do) EN FORRAJES DE ALFALFA A PARTIR DE VALORES DE DIGESTIBILIDAD EN CELULASA (Dc) OBTENIDOS MEDIANTE VARIOS METODOS

Forrajes considerados	Educación de regresión	$r$
Método pepsina celulasa		
Todos	Do = 0,435 Dc + 35,31	0,53*
Excl. ensilaje bagazo	Do = 0,533 Dc + 29,38	0,62*
Excl. ens. bag. y h. gram. + alfalfa	Do = 0,604 Dc + 24,63	0,81**
Método F.N.D. celulasa (Regresiones respecto a contenido en F.N.D.)		
Todos	Do = 73,60 — 0,272 FND	0,42**
Excl. ensilaje bagazo	Do = 73,94 — 0,283 FND	0,44*
Excl. ens. bag. y h. gram. + alfalfa	Do = 79,63 — 0,413 FND	0,71**
(Regresión respecto a Dig. FND celulasa)		
Todos	Do = 0,387 Dc + 36,56	0,46*
Excl. ensilaje bagazo	Do = 0,383 Dc + 36,69	0,46*
Excl. ens. bag. y h. gram. + alfalfa	Do = 0,510 Dc + 28,19	0,69**
Método CIH celulasa		
Todos	Do = 0,755 Dc + 14,02	0,68**
Excl. ensilaje bagazo	Do = 1,017 Dc — 2,50	0,83**
Excl. ens. bag. y h. gram. + alfalfa	Do = 0,915 Dc + 3,50	0,79**

\* : ( $p < 0,05$ )  
 \*\* : ( $p < 0,01$ )

Los valores obtenidos con el método pepsina celulasa mantienen una correlación de  $r = 0,81$  con respecto a la digestibilidad de la M.O. determinada *in vivo* solamente en el caso que los forrajes considerados sean de alfalfa, planta entera y como única especie componente, ya que al incorporar cualquier forraje distinto  $r$  disminuye considerablemente dejando de tener validez predictiva. AUFRERE (1) utilizando el mismo tipo de metodología obtuvo con una colección de forrajes más heterogéneo valores de  $r$  de 0,97 y tratándose de forrajes verdes y con diferencias de digestibilidad *in vivo* de 19,5 unidades porcentuales.

La máxima diferencia observada entre la  $D_o$  y la predicha fue de 4,1 unidades porcentuales. Aunque dicho valor es elevado frente a la diferencia de 10,98 unidades porcentuales entre la  $D_o$  máxima y mínima cuando sólo se trata de alfalfa, se estima que puede ser empleado en la práctica.

Los bajos valores de  $r$  que se observan para el método de F.N.D. celulasa en las regresiones simples (cuadro 2), que concuerdan con valores relativos dados por autores como BARTIAUX-THILL et al. (1980) y KIRCHGESSNER et al. (8), es probable que se deba a la posible mayor complejidad de las paredes celulares de algunos vegetales, en este caso de las leguminosas o incluso a ciertas imprecisiones en la solubilidad del contenido celular, según la técnica de VAN SOEST (14).

No obstante lo indicado anteriormente estos valores de  $r$  aumentaron considerablemente cuando se consideró la regresión lineal múltiple tomando en cuenta el contenido en FND y el contenido celular (cuadro 3). Esto estaría indicando que el tomar mayor cantidad de parámetros tiende a eliminar las imprecisiones señaladas antes, especialmente al considerar sólo la alfalfa como planta entera y como único componente botánico del forraje.

El método CIH celulasa presentó una diferencia máxima de 5,6 unidades porcentuales entre el valor real y el predecible. Aunque éste es un valor relativamente alto presentó los más altos valores de predicción (cuadro 2) con  $r$  que alcanzaron hasta 0,83 y se pudo observar que solamente el valor fue afectado cuando se incluyó ensilaje de bagazo, el que presumiblemente se comporta más bien como un subproducto fibroso, habiendo dado valores de  $D_c$  inferiores a los de  $D_o$ , lo que ocurre por ejemplo en el caso de pajas (RIVEROS y ARGAMENTERÍA, trabajo no publicado).

El único inconveniente que presentó en términos prácticos este método fue el hecho de que, con el equipo de trabajo en serie utilizado, es relativamente difícil ajustar un tiempo tan corto

CUADRO 3.

ECUACIONES DE REGRESION MULTIPLE PARA PREDECIR LA DIGESTIBILIDAD *IN VIVO* (Do) DE FORRAJES DE ALFALFA A PARTIR DE VALORES DE CONTENIDO DE FIBRA DETERGENTE (FND) Y DIGESTIBILIDAD DE LA F.N.D. EN CELULASAS (Dc) O DE LA DIGESTIBILIDAD DE F.N.D. Y CONTENIDO CELULAR (C.C.).

Forrajes considerados	Ecuación regresión Do vs. FND + + Dc FND	r
Todos los datos	Do = 21,99 + 0,53 FND + 0,11 Dc	0,46
Excluyendo ensilaje de bagazo	Do = 32,54 + 0,42 FND + 0,33 Dc	0,46
Excluyendo heno gram. + alfalfa	Do = 43,44 + 0,36 FND — 0,12 Dc	0,69**
Excluyendo ens. bag. y h. gram. + alfalfa	Do = 70,15 + 0,10 FND — 0,33 Dc	0,72**
	Ecuación regresión Do vs. Dig FND + C.C.	
Todos los datos	Do = 38,19 + 0,27 D FND + 0,28 C.C.	0,46
Excluyendo ensilaje de bagazo	Do = 39,65 + 0,28 D FND + 0,21 C.C.	0,46
Excluyendo heno gram. + alfalfa	Do = 32,90 + 0,39 D FND + 0,23 C.C.	0,70**
Excluyendo ens. bag. y h. gram. + alfalfa	Do = 35,18 + 0,41 D FND + 0,11 C.C.	0,21**

\* : (p < 0,05)

\*\* : (p < 0,01)

de ebullición como lo es 10 min. en cada submuestra, lo que se traduce en valores más altos de varianza entre submuestras, pero no significativamente mayores que en los otros métodos (P < 0,05).

De acuerdo a los resultados analizados se puede concluir que los métodos de digestibilidad en celulasa de los forrajes pueden tener un valor predictivo de la digestibilidad *in vivo* de la M.O. en la medida que los forrajes analizados sean de una composición más homogénea y que cuando se incorporan muestras más diferentes, este valor se va perdiendo, aunque el método CIH celulasa presentó la más alta seguridad.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) AUFRERE, J. 1982. Etude de la prévision de la digestibilité des fourrages par une méthode enzymatique. Ann. Zootech. 31: 111-130.
- (2) BARTIAUX-THILL, N., FABRY, J., RIBSTON, R & BOUKHARTA, M. 1980. Estimation *in vitro* de la digestibilité de l'herbe de prairie permanente par la cellulase. 2. Corrélations avec la digestibilité mesurée *in vivo* ou estimée *in vitro* selon Tilley et Terry. Bull. Rech. Agron. Gembloux 15: 297-308.
- (3) BISTON, R., DARDENNE, P. 1984. Prediction of forage digestibility with near infrared reflectance spectroscopy (N.I.R.S.) European In Vitro Ring Test 1982-1984. Preliminary report on the meeting in Brussels, Septber 4-5, 1984. 22 pp.
- (4) DEMARQUILLY, C., WEISS, Ph. 1970. Tableaux de la valeur alimentaire des fourrages. INRA. Etude SEI, n.º 42. 46 pp.
- (5) DOWMAN, M. G., COLLINS, F. C. 1982. The use of enzymes to predict the digestibility of animal feeds. J. Sci. Food Agric. 33: 689-696.
- (6) KELLNER, R. J. & KIRCHGESSNER, M. 1976. Zur methodik der *in vitro* Verdaulichkeitsbestimmung von Grün-und Rauhfutter cellulase. Landwirtsch. Forsch. 29: 204-210.
- (7) KELLNER, R. J. & KIRCHGESSNER, M. 1977. Estimation of forage digestibility by a cellulase method. Z. Tierphysiol., Tierernährg. Futtermittelkde. 39: 9-16.
- (8) KIRCHGESSNER, M. KELLNER, R. ROTH, F. & RANFFT, K. 1977 Zur Schätzung des futterwertes mittels Rohfaser und der Zellwandfraktionan der Detergentien-Analyse. Landwirtsch. Forsch. 30: 245-250.
- (9) MEHREZ & ORSKOV. 1977. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. J. Agric. Sci. Camb. 88: 645-650.
- (10) MENKE, K. H. 1979. Gas production production in rumen liquor *in vitro* as a measure for digestibility and content of metabolizable energy in feedingstuffs for ruminants. J. Agr. Sci. Camb. 93: 217-222.
- (11) MINSON, D. J. 1982. Effect of chemical composition on feed digestibility and metabolizable energy. N. A. R. (B) 52: 591-615.
- (12) REID, J. T., KENNEDY, W. K., TURK, K. L., SLACK, S. T., TRIMBERGER, G. W. & MURPHY, R. P. 1959. Effect of growth stage, chemical composition and physical properties upon the nutritive value of forages. J. Dairy Sci. 42: 567-571.
- (13) TILLEY, J. M. A. & TERRY, R. A. 1963. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. J. Br. Grassld. Soc. 18: 104.111.
- (14) VAN SOEST. 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. J. Ass. Off. Anal. Chem. 46: 825-829.

## SUMMARY

### *IN VIVO* DIGESTIBILITY PREDICTION OF LUCERNE (*Medicago sativa*) FORAGES USING ENZYMATIC SOLUBILITY TECHNIQUES.

In 17 samples of lucerne forages, 3 methods to predict *in vivo* digestibility using cellulases plus pepsine, neutro detergent fibre or CIH solubility, were studied.

The best prediction, estimated by correlation coefficients ( $r$ ) was obtained with CIH cellulase technique, followed by pepsine cellulase. N.D.F. cellulase method presented the worst  $r$  values, improving its predictive value when a multiple lineal regression including N.D.F. content and cellulase digestibility were included.

Higher  $r$  values were obtained when samples only included lucerne whole plant as the only botanical component, recording values of 0.81; 0.69; 0.79 and 0.72 for pepsine cellulase, N.D.F. cellulase, CIH cellulase and N.D.F. cellulase including N.D.F. content in the multiple regression methods, respectively.