

Efecto de la liofilización sobre los resultados del análisis de forrajes

MAESTRO, M.; AMELLA, A.; BROCA, A.

Instituto de Economía y Producciones Ganaderas del Ebro (CSIC). Miguel Servet, 177 - 50013-Zaragoza.

RESUMEN

Este trabajo pone de manifiesto que pueden encontrarse resultados dispares en el análisis químico de forrajes, según la muestra esté desecada en estufa (80° C) o liofilizada.

Se han comparado resultados del análisis de diversos forrajes frescos preparados por ambos métodos: ensilado de hierba, hierba de pradera natural, esparceta y alfalfa. En los tres primeros aparecen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados del análisis de Proteína Digestible y de Fibra Van Soest, lo que lleva a notables diferencias al calcular índices de valor nutritivo. En el caso de la alfalfa no se encuentra diferencia significativa alguna.

El análisis de digestibilidad «in vitro» de algunas de estas muestras revela las mismas diferencias que el análisis químico.

INTRODUCCIÓN

Con motivo de distintos trabajos, se han realizado en nuestro laboratorio, en los últimos años, análisis de numerosas muestras de forrajes en fresco y de sus henos y/o ensilados correspondientes, con objeto de comparar el valor forrajero en esas distintas formas. Al

calcular índices de valor nutritivo mediante los resultados analíticos, hemos encontrado muy frecuentemente que las magnitudes de aquellos índices son superiores en el heno o silo que en el forraje fresco original.

Para encontrar explicación a esta anomalía se pensó que sólo podía proceder o de un muestreo incorrecto o del efecto del secado de la muestra en estufa para su preparación para análisis.

Descartada la primera hipótesis después de proceder a cuidadosos muestreos, nos planteamos estudiar el efecto del secado en estufa de aire forzado, a 80° C, comparando los resultados del análisis de muestras así preparadas con las mismas muestras de forraje, pero liofilizadas.

Aunque hoy día es norma generalmente aceptada secar los forrajes frescos en estufa de aire forzado a 80° C, la forma de preparar (secar) las muestras para análisis ha sido discutida. Así, hasta hace pocos años se aceptaba secar a 100° C. Sin embargo, se han preconizado métodos de secado diferentes en función de lo que quería luego analizarse, sobre todo de cara al análisis de hidratos de carbono.

SALO (1965 y 1970) recomienda no superar los 40° C para evitar pérdidas de azúcares. BOWDEN (1968 y 1972), JONES (1968) y RAGUSE (1965), recomiendan la liofilización para el análisis de carbohidratos en forrajes. MACRAE (1974), para el análisis de almidón, seca las muestras a 70° C. EDWARDS (1973) realiza el secado a 50° C para evitar el desarrollo de «lignin-artifacts» de que habla VAN SOEST (1965 y 1964). ALEXANDER (1969) describe un procedimiento para analizar en fresco los ensilados, pues evidencian mayor fiabilidad, afirmando que de no optarse por ese sistema debe recurrirse a la liofilización. WOLF (1974) desarrolla un dispositivo para evitar sobrecalentamientos al secar las muestras. SMITH (1973), advierte que la liofilización evita termodegradación de carbohidratos no estructurales. DENIUM (1969) señala el efecto del calor sobre las medidas químicas de digestibilidad. TILLEY (1969) advierte igualmente que el análisis seriado, en rutina, de forrajes frescos, requiere un compromiso en cuanto al secado y preparación previos de la muestra sobre la que realizar los análisis posteriores. Ahora bien, es preciso tener en cuenta que los tipos de análisis que actualmente se realizan para determinar el valor nutritivo (digestibilidad) pueden exigir métodos de preparación distintos que los que requiere el método Weende tradicional por ejemplo.

No obstante, tanto el método Van Soest para determinar fibra y calcular con sus resultados la digestibilidad, como el método Tilley-Terry de digestibilidad «in vitro» son hoy ampliamente utilizados

sobre muestras secadas a 80 ó 100° C como advierte McLEOD (1971). Y, con frecuencia, se encuentran trabajos acerca de la fiabilidad intrínseca de estos métodos prescindiendo de ese factor de variación que es la temperatura de secado.

Esta breve comunicación tiene por objeto poner en evidencia que los resultados del análisis Van Soest en muestras secas a 80° C pueden conducir a valores de «digestibilidad de las paredes celulares» muy distintos de los encontrados en las mismas muestras, liofilizadas, y que los valores de «digestibilidad de la proteína» (solubilidad en pepsina-clorhídrico) pueden ser igualmente dispares en uno y otro caso. Tales diferencias llevan a errores, en la determinación del valor forrajero, muy superiores a los propios del método analítico en sí mismo, así como superiores a los errores derivados del tipo de material analizado.

METODOLOGÍA

Se han estudiado un total de 62 muestras de forrajes: 25 de ensilado de pradera natural de Guipúzcoa; 13 de ese mismo tipo de pradera natural, pero en fresco (al segar); 17 de alfalfa fresca y 7 de esparceta fresca (ambas de la zona prepirenaica oscense).

El muestreo y preparación para análisis se realizó según se describe en una publicación anterior (AMELLA, 1982b - Cuadro 1), obteniendo dos muestras del mismo forraje: una seca en estufa a 80° C y otra liofilizada.

Se realizaron los mismos análisis en ambas muestras por los procedimientos que se describen en otras publicaciones (FERRER, 1980 y AMELLA, 1928b).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra los resultados del análisis repetido (5 veces) de la misma muestra (seca en estufa y liofilizada), lo que nos permite establecer nuestro error analítico (reproducibilidad). Puede comprobarse que los resultados son reproducibles, con errores relativos bajos (entre el 1 y el 5 %, con un caso de 7 %). Pero, simultáneamente, se observa que los resultados del análisis de la muestra secada a 80° C son significativamente distintos de los encontrados para la misma muestra liofilizada. Estas diferencias no pueden ser, pues, atribuidas a la reproducibilidad de los métodos analíticos.

TABLA 1

Estudio estadístico de los resultados
del análisis repetido de una misma muestra

| | | n | \bar{x} | σ | Sm | Er* | P** |
|------------|----|---|-----------|----------|------|-----|-------|
| PB | 80 | 5 | 10,15 | 0,30 | 0,15 | 4 | NS |
| | L | 5 | 9,78 | 0,19 | 0,10 | 3 | |
| PD | 80 | 5 | 5,06 | 0,25 | 0,13 | 7 | 0.001 |
| | L | 5 | 6,58 | 0,22 | 0,11 | 5 | |
| FBW | 80 | 5 | 24,65 | 0,19 | 0,09 | 1 | NS |
| | L | 5 | 24,50 | 0,18 | 0,09 | 1 | |
| NDF | 80 | 5 | 59,09 | 0,57 | 0,29 | 1 | 0.001 |
| | L | 5 | 51,01 | 0,61 | 0,31 | 2 | |
| ADF | 80 | 5 | 35,68 | 0,45 | 0,22 | 2 | 0.001 |
| | L | 5 | 31,63 | 0,30 | 0,15 | 1 | |
| ADL | 80 | 5 | 5,83 | 0,20 | 0,10 | 5 | 0.001 |
| | L | 5 | 3,31 | 0,11 | 0,06 | 5 | |
| CEN | 80 | 5 | 11,57 | 0,12 | 0,06 | 2 | NS |
| | L | 5 | 11,69 | 0,03 | 0,02 | 1 | |
| Dig. Prot. | 80 | 5 | 49,68 | 0,94 | 0,47 | 3 | 0.001 |
| | L | 5 | 67,29 | 2,29 | 1,15 | 5 | |
| DPC | 80 | 5 | 51,76 | 0,96 | 0,48 | 3 | 0.001 |
| | L | 5 | 66,84 | 0,97 | 0,49 | 2 | |

* Er=Error relativo: $100 T_{0,95} S_m/\bar{x}$

** P=nivel de significación estadística entre las medias

PB:Proteína Bruta%; PD:Proteína Digestible%; FBW:Fibra Bruta Weende;
NDF, ADF y ADL:componentes Van Soest%; CEN:Cenizas totales%;
Dig.Prot.:100PD/PB; DPC:Digestibilidad de las Paredes Celulares=
(147,3 - 78,9 log(100ADL/ADF))

80: secado en estufa a 80°C; L: Liofilizado

En la Tabla 2 se muestran los resultados referentes a 4 tipos de forrajes frescos, correspondientes al análisis de la misma muestra seca en estufa y liofilizada.

De la observación de dicha Tabla se depende claramente que pueden producirse resultados analíticos muy dispares según el procedimiento de secado. En efecto, son notorias las diferencias que se presentan en *ensilajes de hierba*, donde los valores de PD, NDF y ADL son significativamente distintos, llevando a diferencias en los índices de digestibilidad de 8 % (proteína) y 11 % (paredes celulares), inferiores en la muestra seca en estufa, lo que conduciría a un valor energético sobre 15 % inferior respecto a la liofilizada.

Lo mismo sucede con el forraje de *prado natural* en fresco (recién segado), que presenta diferencias significativas en NDF y ADL, y en la digestibilidad de la proteína y de las paredes celulares, llevando a que se calcule un valor energético sobre 20 % inferior si la muestra se ha secado en estufa.

En el caso de la *esparceta en fresco*, sólo aparece diferencia significativa entre las magnitudes de ADL, lo cual es suficiente para que el valor de la digestibilidad de las paredes celulares sea significativamente distinto entre la muestra seca en estufa y liofilizada. Esta diferencia conduciría a un valor energético 14 % inferior en la primera respecto a la segunda. Igualmente, la digestibilidad de la proteína es significativamente distinta, aunque no lo sean los valores medios absolutos de PB y PD.

Sin embargo, los análisis realizados en muestras de *alfalfa fresca*, no revelan diferencia alguna entre los valores encontrados en las mismas muestras secadas en estufa o liofilizadas. El proceso de secado en estufa no afecta pues a los resultados analíticos en este caso.

En ningún caso aparecen diferencias significativas entre los valores de Proteína Bruta y Fibra Bruta Weende encontrados en forrajes secos en estufa y liofilizados. Esto concuerda con lo descrito por autores antes citados, y avala nuestra afirmación de que, si bien el método Weende no precisa liofilizar la muestra, sí lo pueden requerir otros tipos de análisis.

Queda, por tanto, patente, que el cálculo de índices de valor forrajero a partir del análisis Van Soest, y de análisis de proteína soluble en pepsina-HCl, pueden conducir a infravaloraciones muy notables. Estas infravaloraciones debidas al método de secado de la muestra, previo al análisis, nos han explicado satisfactoriamente las diferencias que veníamos encontrando entre el valor nutritivo de un forraje fresco respecto al mismo forraje henificado o ensilado.

TABLA 2

Estudio estadístico de los resultados del análisis de las mismas muestras secas en estufa y liofilizadas (*)

| | | ENSILADOS DE HIERBA | | | | HIERBA DE PRADO NATURAL | | | | ALFALFA FRESCA | | | | ESPARCETA FRESCA | | | |
|-----------|----|---------------------|-----------|----------|------|-------------------------|-----------|----------|------|----------------|-----------|----------|------|------------------|-----------|----------|------|
| | | n | \bar{x} | σ | Sm | n | \bar{x} | σ | Sm | n | \bar{x} | σ | Sm | n | \bar{x} | σ | Sm |
| PB | 80 | 25 | 10,25 | 0,99 | 0,20 | 13 | 15,88 | 2,45 | 0,71 | 17 | 20,26 | 2,05 | 0,51 | 7 | 15,00 | 4,60 | 1,88 |
| | L | 25 | 10,24 | 1,06 | 0,22 | 13 | 15,81 | 2,14 | 0,62 | 17 | 20,29 | 1,86 | 0,47 | 7 | 14,28 | 3,88 | 1,59 |
| PD | 80 | 25 | 5,29 | 1,10 | 0,23 | 13 | 11,21 | 2,59 | 0,75 | 17 | 16,39 | 1,83 | 0,46 | 7 | 9,94 | 3,86 | 1,58 |
| | L | 25 | 5,90 | 1,29 | 0,26 | 13 | 11,85 | 2,34 | 0,68 | 17 | 16,37 | 1,54 | 0,38 | 7 | 10,26 | 3,15 | 1,29 |
| Dig.Prot. | 80 | 25 | 51,84 | 9,35 | 1,91 | 13 | 69,77 | 7,14 | 2,06 | 17 | 80,76 | 2,24 | 0,56 | 7 | 65,43 | 5,18 | 2,11 |
| | L | 25 | 56,26 | 8,91 | 1,82 | 13 | 74,54 | 5,18 | 1,50 | 17 | 81,12 | 1,97 | 0,49 | 7 | 70,86 | 4,67 | 1,91 |
| FBW | 80 | 25 | 31,23 | 3,24 | 0,66 | 13 | 22,31 | 3,40 | 0,98 | 17 | 21,11 | 2,43 | 0,61 | 7 | 25,14 | 6,40 | 2,61 |
| | L | 25 | 31,22 | 3,25 | 0,66 | 13 | 21,72 | 2,95 | 0,85 | 17 | 20,81 | 2,39 | 0,60 | 7 | 24,69 | 5,45 | 2,23 |
| NDF | 80 | 25 | 60,47 | 5,10 | 1,04 | 13 | 52,44 | 6,75 | 1,95 | 17 | 32,70 | 3,30 | 0,83 | 7 | 39,65 | 7,56 | 3,09 |
| | L | 25 | 56,00 | 5,56 | 1,13 | 13 | 43,59 | 8,47 | 2,45 | 17 | 31,09 | 3,40 | 0,85 | 7 | 34,95 | 6,65 | 2,72 |
| ADF | 80 | 25 | 41,27 | 5,14 | 1,05 | 13 | 31,98 | 3,88 | 1,12 | 17 | 28,61 | 2,89 | 0,72 | 7 | 38,69 | 6,75 | 2,76 |
| | L | 25 | 39,26 | 4,21 | 0,86 | 13 | 28,82 | 4,95 | 1,43 | 17 | 28,42 | 2,86 | 0,72 | 7 | 34,13 | 5,56 | 2,27 |
| ADL | 80 | 25 | 7,87 | 2,80 | 0,57 | 13 | 5,97 | 1,13 | 0,33 | 17 | 6,31 | 0,77 | 0,19 | 7 | 10,65 | 2,52 | 1,03 |
| | L | 25 | 6,37 | 2,28 | 0,46 | 13 | 3,96 | 1,06 | 0,31 | 17 | 6,15 | 0,76 | 0,19 | 7 | 7,49 | 0,90 | 0,37 |
| DPC | 80 | 25 | 47,99 | 8,92 | 1,82 | 13 | 47,28 | 5,81 | 1,68 | 17 | 41,29 | 2,84 | 0,71 | 7 | 33,86 | 6,47 | 2,64 |
| | L | 25 | 53,63 | 9,47 | 1,93 | 13 | 58,28 | 10,01 | 2,89 | 17 | 42,12 | 1,91 | 0,46 | 7 | 41,14 | 6,58 | 2,69 |

80=muestra seca en estufa de aire forzado a 80°C; L=muestra liofilizada

PB=% Proteína Bruta s.m.s.; PD=% Proteína Digestible s.m.s.; Dig.Prot.= 100PD/PD; FBW=% Fibra Bruta Weende s.m.s.; NDF, ADF y ADL=componentes Van Soest % s.m.s.; DPC=Digestibilidad Paredes Celulares (147,3 - 78,9 log(100ADL/ADF))

(*) Una letra entre dos cifras indica diferencia estadísticamente significativa (niveles de P 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 y 0.001 para a, b, c, d y e, respectivamente)

Consecuentemente, se ha adoptado en nuestro laboratorio el sistema de liofilización como paso previo al análisis de los forrajes frescos.

A efectos de ampliar y confirmar este estudio, se ha iniciado el análisis de digestibilidad «in vitro» (TILLEY, 1963) de las mismas muestras a que se refiere la Tabla 2. Por el momento, se presentan algunos resultados en la Tabla 3 que, por constituir un número muy reducido de muestras, no son susceptibles de tratamiento estadístico. No obstante, los resultados obtenidos son elocuentes, en el sentido de que, efectivamente, se dan diferencias notables entre la digestibilidad «in vitro» de la muestra seca en estufa y la liofilizada. Y es de destacar que esas diferencias se advierten en el caso de ensilajes y hierba fresca, pero no en la alfalfa, lo que coincide con lo encontrado mediante análisis químico.

TABLA 3

RESULTADOS DEL ANALISIS DE DIGESTIBILIDAD DE LA MATERIA SECA «IN VITRO»

| | Muestra N.º | 80° C | Liof. |
|----------------------------|----------------|-------|-------|
| Ensilados de hierba | 1466 | 59,57 | 62,92 |
| | 1468 | 62,60 | 63,43 |
| | 1628 | 38,55 | 43,72 |
| | 1630 | 50,71 | 51,57 |
| Hierba de prado natural | 1380 | 71,76 | 80,47 |
| | 1422 | 72,82 | 76,30 |
| | 1471 | 55,07 | 61,16 |
| | 1702 | 73,32 | 74,65 |
| Alfalfa | 1803 | 68,28 | 68,89 |
| | 1816 | 65,33 | 64,61 |
| | 1843 | 69,62 | 68,38 |
| | 1844 | 67,13 | 67,61 |

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Laboratorio de Digestibilidad del Servicio de Investigación y Mejora Agraria de la Diputación General de Aragón, los análisis de digestibilidad «in vitro».

BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER, R. H.; MCGOWAN, M., 1969. «The assessment of the nutritive value of silage by determination of «in vitro» digestibility on homogenates prepared from fresh and dried silage». *J. Br. Grassland Soc.*, 24 (3): 195.
- AMELLA, A.; FERRER, C.; MAESTRO, M.; OCAÑA, M., 1982 a. «Explotación de pastos en caseríos guipuzcoanos. II. Posibilidades de su utilización por pastoreo». *Trabajos del IEPGE (Facultad de Veterinaria-Zaragoza)*, n.º 55.
- AMELLA, A.; FERRER, C.; MAESTRO, M. y BROCA, A., 1982 b. «Explotación de pastos en caseríos guipuzcoanos. IV: Posibilidades de mejora del ensilaje de hierba». *Trabajos del IEPGE (Facultad de Veterinaria-Zaragoza)*, n.º 57.
- BOWDEN, D. M.; TAYLOR, D. K. and W. E. DAVIS, 1968. «Water-soluble carbohydrates in orchardgrass and mixed forages». *Can. J. Plant. Sci.* Vol. 48: 9-15.
- BOWDEN, D. M., 1972. «Influence of water-soluble carbohydrates and crude protein content on in vitro digestion of drymatter in highly digestible forages». *Canad. J. Plant. Sci.* 52, n.º 2, 151-56.
- DEINUM, B. and P. J. VAN SOEST, 1969. «Prediction of forage digestibility from some laboratory procedures». *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 17: 119-127.
- EDWARDS, Colin, S., 1973. «Determination of Lignin and Cellulose in Forages by Extraction with Triethylene Glycol». *J. Sci. Fd. Agric.*, 24 (4): 381.
- FERRER, C.; AMELLA, A.; MAESTRO, M. y OCAÑA, M., 1980. «Explotación de pastos en caseríos guipuzcoanos. I. La producción de hierba». *Trabajos del IEPGE (Facultad de Veterinaria-Zaragoza)*, n.º 46.
- GOERING, H. K.; C. H. GORDON; R. W. HEMKEN; D. R. WALDO; P. J. VAN SOEST and L. W. SMITH, 1972. «Analytical Estimates of Nitrogen Digestibility in Heat Damaged Forages». *Journal of Dairy Science*, 55 (9): 1275.
- JONES, D. I. H. and A. P. GRIFFITH, G., 1968. «Microwave drying of herbage». *J. Brit. Grassl. Soc.*, 23: 202-205.
- MACRAE, J. M.; Dale SMITH and R. M. MCCREADI, 1974. «Starch Estimation in Leaf Tissue. A Comparison of Results using Six Methods». *J. Sci. Fd. Agric.*, 25: 1465-1469.
- MCLEOD, M. N.; MINSON, D. J., 1971. «The error in predicting pasture dry-matter digestibility from four different methods of analysis for lignin». *J. Br. Grassland Soc.*, 26 (1): 251-256.
- SALO, MAIJA LUISA, 1965. «On the breakdown of sugars during the drying of plant samples and their subsequent dry storage». *The Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland*, 37: 186-194.
- SALO, M. L.; KOTILAINEN, K., 1970. «Drying of herbage samples for analyses». *J. Sci. Agric. Soc. Finl., Finl.*, 42 (3): 173-9.
- RAGUSE, C. A. and SMITH, D., 1965. «Carbohydrate content in alfalfa herbage as influenced by methods of drying». *J. Agr. Food Chem.*, 13: 306-309.

- SMITH, D., 1973. «Influence of drying and storage conditions on monstructural carbohydrate analysis of herbage tissue-A review». *J. Brit. Grassl Soc.*, 28: 129.
- TILLEY, J. M. A. and TERRY, R. A., 1963. «A two stage technique for «in vitro» digestion of forage crops». *J. Br. Grassld. Sci.*, 18 (2): 104-11.
- TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A., 1969. «The relationship between the soluble constituents of herbage and their dry-matter digestibility». *J. Br. Grassld. Sci.*, 24 (4): 290.
- VAN SOEST, P. J., 1964. «New chemical procedures for evaluating pastures». *J. Animal Sc.*, 23: 838-845.
- VAN SOEST, P. J., 1965. «Use of detergents in analysis of fibrous feeds. III. Study of effects of heating and drying on yield of fiber and lignin in forages». *J. Assoc. Off Agr. Chem.*, 48: 785-790.
- VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H., 1968. «Determination of Lignin and Cellulose in Acid-Detergent Fiber with Permanganate». *J. Ass. off Agric. Chem.*, 51: 780.
- WOLF, D. D., 1974. «A temperature indicator for use during oven-drying of herbage». *J. Brit. Grassld. Soc.*, 29 (4): 299-230.

EFFECTS OF THE FREEZE DRYING ON THE RESULTS OF THE ANALYSIS OF FORAGES

SUMMARY

Fresh samples of grass silages, permanent pastures, sainfoin and lucerne, were prepared both by oven drying (80° C) and freeze-drying, in order to compare results of the analyses of protein and cell wall digestibility (Van Soest).

Significant differences have been found in the 3 first mentioned forages, but not in lucerne. Then, calculation of indexes of nutritive value can lead to important differences if samples have been freeze-dried or oven-dried. «In vitro» digestibility analyses show the same differences than chemical analysis.