

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA DIGESTIBILIDAD DE FORRAJES MEDIANTE DOS MÉTODOS DE LABORATORIO

Carla Arce P.¹, Teresa Arbaiza F.², Fernando Carcelén C.² y Orlando Lucas A.²

ABSTRACT

The objective of this study was to standardize the enzymatic procedure for estimating the digestibility of forages using the fungal cellulase *Penicillium funiculosum*, and its comparison with the Tilley and Terry (1963) *in vitro* digestibility method. The well-known *in vitro* digestibility of alfalfa and oat straw were used for the standardization of the technique. Different quality forages from various locations of Peru were used for the comparison between methods. The best enzyme-substrate concentrations were 200 and 250 mg respectively. Both methods were statistically different, being the enzymatic digestibility values lower than the *in vitro* method ones. The correlation coefficient between methods was 0.987 ($p < 0.001$). The enzymatic digestibility method proved to be a simple and rapid laboratory analysis for the evaluation of forages.

Key words: digestibility, forage, cellulase

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue estandarizar un método enzimático para medir la digestibilidad de forrajes empleando la enzima celulasa proveniente del hongo *Penicillium funiculosum* y compararlo con el método de digestibilidad *in vitro* de Tilley y Terry (1963). Para la estandarización de la técnica se utilizó como sustrato forrajes de digestibilidad *in vitro* conocida: alfalfa y paja de avena; y para la comparación entre métodos se utilizó forrajes de diferente calidad provenientes de varias zonas del Perú. La concentración óptima enzima-sustrato hallada fue de 200 y 250 mg, respectivamente. Los valores de digestibilidad del método enzimático fueron estadísticamente menores que los del método *in vitro*, y el coeficiente de correlación fue de 0.987 ($p < 0.001$). El método de digestibilidad enzimática demostró ser un procedimiento de laboratorio simple y rápido para la evaluación de los forrajes.

Palabras clave: digestibilidad, forraje, celulasa

INTRODUCCIÓN

El valor nutritivo de los alimentos está determinado por la biodisponibilidad de nutrientes y la dinámica de los procesos de

solubilización e hidrólisis en el tracto gastrointestinal. Los parámetros de la cinética de fermentación describen la digestión y caracterizan propiedades intrínsecas del alimento que limitan su disponibilidad para el rumiante, de-

¹ Práctica privada

² Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación Animal, FMV-UNMSM

terminan la proporción de nutrientes consumidos que pueden ser absorbidos y utilizados por el animal, y dependen de un activo crecimiento y desarrollo de la población microbiana del rumen (Bruni y Chilibroste, 2001).

La mayoría de los métodos de evaluación de forrajes tienen como objetivo la determinación del valor nutricional de los forrajes, mediante la técnica de digestibilidad *in vitro* descrita por Tilley y Terry (1963). La fermentación *in vitro* de los forrajes mediante un inóculo de microorganismos ruminales presenta probablemente el mejor cálculo hecho en laboratorio sobre la digestibilidad *in vivo*. Sin embargo, los ensayos *in vitro* requieren una fuente uniforme y confiable de inóculo ruminal que a menudo es difícil de obtener. Los problemas que mayormente se presentan son: la variación en la actividad del fluido ruminal, variaciones incontrolables que se dan dentro del laboratorio y entre laboratorios, y la disponibilidad de animales ruminalmente castrados.

En atención a estas limitaciones se han desarrollado diversos trabajos de investigación para establecer la correlación existente entre la digestibilidad *in vivo* y la digestibilidad *in vitro* empleando diferentes digestores; entre ellos, una solución preparada de celulasa, una enzima extraída de un hongo (Jones y Hayward, 1975; Mc Queen y Van Soest, 1975; Casler y Sleper, 1991). Experiencias en la utilización de celulasas para estimar la digestibilidad de los forrajes indican que este método es tan efectivo y en ciertos casos hasta superior al método de digestibilidad *in vitro*, debido a su mayor precisión, repetibilidad y menor tiempo de digestión. Sin embargo, ésta es una área que requiere mayor investigación, por lo que se recomienda la realización de estudios comparativos entre estos métodos y los *in vitro*, así como la estandarización de procedimientos y la definición de condiciones mínimas necesarias para la aplicación de estos métodos a nivel de análisis rutinarios (Ruiz y Ruiz, 1990).

El presente estudio tuvo por objetivo la estandarización de una técnica enzimática con celulasa proveniente del hongo *Penicillium funiculosum* para la determinación de la digestibilidad en forrajes, y comparar los valores de digestibilidad obtenidos mediante la técnica enzimática estandarizada con los valores de la prueba *in vitro* de Tilley y Terry (1963).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó gramíneas, leguminosas y pastos naturales provenientes de diferentes zonas del país, las cuales fueron colectados por personal de las estaciones experimentales del Centro de Investigación IVITA (Huancayo, Puno y Pucallpa). Los forrajes evaluados fueron:

- a) Gramíneas cultivadas: Dactilys (*Dactylis glomerata*), rye grass (*Lolium italiano* y *Lolium inglés*), braquiaria (*Brachiaria decumbens*), camerún (*Echinochloa polistachia*) y king grass (*Pennisetum purpureum* x *Pennisetum tipoides*).
- b) Leguminosas cultivadas: Alfalfa (*Medicago sativa*), trébol rojo (*Trifolium repens*), trébol blanco (*Trifolium perenne*), kudzu (*Pueraria phaseoloides*), centrocema (*Centrocema pubescens*) y calopo o rastrera (*Calopogonio mucunoides*).
- c) Pastos naturales: Ichu (*Stipa ichu*), festuca (*Festuca dolichophyllia*), mulembergia (*Mulembergia fastigiata*), toro urco (*Axonopus compressus* y *Paspalum conjugatum*).

Se usó la alfalfa y la paja de avena como controles. La cantidad de muestra que se recolectó fue aproximadamente de 500 g por cada forraje verde. Este material se secó en estufa a 60°C durante un mínimo de 24 horas y luego fue molido en un molino Willey Mill con criba de 1 mm. Las muestras se almacenaron en cajas de papel debidamente cubiertas a temperatura ambiental, y se volvieron a secar a 60 °C durante 24 horas an-

tes de los análisis. El análisis de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Se comparó el método enzimático con el método *in vitro* para determinar la digestibilidad en forrajes. Los reactivos utilizados para el método enzimático fueron la celulasa proveniente del hongo *Penicillium funiculosum* (EC 3.2.1.4) de Sigma Chemical Co., buffer acetato, ácido clorhídrico y pepsina. Para el método *in vitro* se utilizó licor ruminal proveniente de una alpaca macho de la variedad Huacaya, saliva artificial de Mc Dougall, ácido clorhídrico y pepsina.

Estandarización del método enzimático

Para establecer la concentración óptima enzima-sustrato que tuviera los resultados de digestibilidad enzimática (DE) más cercanos a los valores obtenidos con el método *in vitro*, se probó la técnica desarrollada por McQueen y Van Soest (1975), utilizándose la enzima *Penicillium funiculosum* que catalizó a los sustratos, representados por dos forrajes cuyas digestibilidades *in vitro* de la materia seca son conocidas: uno de alta (alfalfa) y otro de baja digestibilidad (paja) (Leyva, 2000). Simultáneamente se realizó el método *in vitro* de dos etapas de Tilley y Terry (1963) para correlacionar los resultados de ambas técnicas. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Se utilizó la técnica enzimática original; y luego, para establecer la actividad óptima enzima-sustrato, se modificó en forma proporcional las cantidades de forraje y de reactivos. Por otro lado, se probó 4 cantidades de enzima (100, 150, 200 y 281mg).

El porcentaje de digestibilidad de la materia seca (DMS), obtenida mediante el método enzimático, se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$DMS = \frac{\text{Muestra (g)} - \text{Residuo (g)}}{\text{Muestra (g)}} \times 100$$

Los resultados fueron evaluados mediante la prueba de “t” de student pareada; así como análisis de correlación y regresión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estandarización de la técnica enzimática

No se obtuvo los resultados esperados con la técnica original de Mc Queen y Van Soest (1975). Las cantidades originales indicadas por este método eran muy pequeñas y los tubos de fermentación, empleados en el Laboratorio, tenían una capacidad mayor que el volumen indicado, por lo que se producía la adherencia del residuo a las paredes del tubo al realizar las agitaciones, y al término de la prueba se obtenían valores alterados de digestibilidad (Cuadro 1). Por tal motivo, se intentó llevar el peso de la muestra hacia una cantidad operativa, guardándose las proporciones de peso y volumen. Los resultados de digestibilidad que se obtuvieron con el método corregido seguían siendo elevados en varias unidades porcentuales con respecto a los valores estándar, tanto para la alfalfa (+3%) como para la paja (+10%) (Cuadro 1). Aquí se tiene que tener en cuenta el origen de la especificidad de la enzima, ya que en el método original se trabajó con *Trichoderma viride*; mientras que en el modificado con *Penicillium funiculosum* y se sabe que existen diferencias entre la actividad hidrolítica de diferentes celulasas, aun cuando la enzima se encuentre en exceso.

La evaluación de los diferentes niveles de enzima mostró que la concentración óptima enzima-sustrato fue de 200 mg para 250 mg de sustrato (Cuadro 2), al obtenerse resultados más cercanos a los de la digestibilidad *in vitro* reportados por Leyva (2000).

Comparación entre los métodos de digestibilidad *in vitro* y enzimático

Mediante la prueba de “t” de student pareada se encontró que los resultados de

Cuadro 1. Estudio comparativo de la digestibilidad de forrajes entre el método original de (Mcqueen y Van Soest 1975) y otro adaptado a las condiciones peculiares del laboratorio de la FMV-UNMSM

	Método enzimático		Método <i>in vitro</i> ¹
	Original	Corregido ²	
Forraje (mg)	40	250	
Enzima (mg)	45	281.25	
Buffer (ml)	6.5	40.63	
HCl (ml)	1	6.25	
Pepsina (mg/ml Buffer)	70/1	437.50/6.25	
Digestibilidad (%)			
Alfalfa	92.35	72.18	68.84
Paja avena	71.24	55.52	45.29

¹ El método *in vitro* se realizó paralelamente al método enzimático

² Con el fin de llevar el peso de la muestra a 250 mg, se multiplicó el peso original por 6.25. De igual forma se multiplicó el peso de los demás valores.

digestibilidad obtenidos por los métodos enzimático e *in vitro* fueron estadísticamente diferentes ($p > 0.001$). Sin embargo, estos hallazgos podrían atribuirse, por un lado, a la riqueza del inóculo ruminal, donde actúan todo un conjunto de enzimas provenientes de los diferentes microorganismos (bacterias, protozoarios y hongos) que causan una mayor degradación de los forrajes, mientras que el método enzimático trabaja solo con celulasa proveniente de un hongo. Al respecto, Mc Queen y Van Soest (1975) afirman que la principal diferencia entre ambos métodos es la fermentación *in vitro*, la cual permite la adaptación de los microorganismos o la selección de las especies microbiales que elaborarían enzimas capaces de degradar ciertas asociaciones de los constituyentes de la pared celular. Por otro lado, el grado de ataque de la enzima también depende de la calidad del forraje, es decir, se obtiene diferentes resultados para un mismo forraje cuando se utiliza enzimas de diferente especificidad. Gabrielsen (1986) al comparar la actividad de diferentes celulasas comerciales indica que si se requiere de valores muy similares a los de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca

(DIVMS) se deberá trabajar con las soluciones enzimáticas más activas. Estudios realizados por diversos autores muestran que los valores de la digestibilidad enzimática de la materia seca de los forrajes son usualmente menores que los de la digestibilidad *in vivo* e *in vitro*, (Fahey, 1994; Guggolz *et al.*, 1971; Jones y Hayward, 1975; Burghrara y Sleper, 1986).

La comparación entre los resultados de digestibilidad obtenidos mediante el método enzimático y la digestibilidad *in vitro* se muestran en el Cuadro 3. La prueba de correlación demuestra que el grado de asociación entre los resultados de ambos métodos es alta (0.987). Similares coeficientes encontraron Burghrara *et al.* (1992), al comparar la DIVMS y otros procedimientos enzimáticos (correlaciones entre 0.57 y 0.95). Igualmente Narváez y Lascano (1989) encontraron una correlación de 0.94 para las gramíneas y 0.97 para las leguminosas.

El análisis de la regresión lineal de los datos produjo la siguiente ecuación:

$$\text{DIVMS} = 3.196 + \text{DE} (0.989)$$

Cuadro 2. Efecto de diferentes concentraciones de enzima celulasa del hongo *Penicillium funiculosum* sobre la digestibilidad de los forrajes estándar

Concentración de enzima (mg/40.63 ml buffer)	Digestibilidad (%)	
	Alfalfa	Paja de avena
281	72.18	55.52
200	69.27	52.25
150	65.82	48.29
100	64.08	38.68
Digestibilidad <i>in vitro</i> ¹	69.24	53.30

¹Valores reportados por Leyva (2000)

Cuadro 3. Comparación de los porcentajes de digestibilidad hallados en diversos forrajes mediante los métodos enzimático e *in vitro*

Forraje	Digestibilidad (%)	
	Celulasa ¹	<i>In vitro</i>
Gramíneas cultivadas		
Dactylis	74.34	75.91
Rye grass inglés	82.88	84.03
Rye grass italiano	81.61	83.25
Braquiaria	59.90	64.52
Camerún	50.32	49.56
King grass	45.29	51.17
Leguminosas cultivadas		
Alfalfa	74.95	80.83
Trébol rojo	83.97	85.02
Trébol blanco	89.39	92.90
Kudzu	56.18	58.81
Centrocema	53.80	57.41
Calopo	55.21	58.52
Pastos naturales		
Ichu	42.99	40.17
Festuca	41.49	48.71
Mulembergia	46.93	49.80
Toro urco ²	52.81	55.68
Toro urco ³	57.27	56.25
Promedio	61.73	64.27

¹ *Penicillium funiculosum*

² *Axonopus compressum*

³ *Paspalum conjugatum*

Los resultados obtenidos demuestran que es posible utilizar el método enzimático como análisis de rutina para hallar la digestibilidad de los forrajes; sean éstos, gramíneas, leguminosas o pastos naturales.

CONCLUSIONES

- El método de digestibilidad enzimática es un procedimiento simple de desarrollar y más rápido que el método *in vitro* para predecir la digestibilidad *in vivo* de la materia seca de los forrajes.
- Existe una alta correlación entre el método enzimático y el método *in vitro* por lo que se recomienda el uso del método enzimático como una alternativa en el laboratorio para la evaluación de la digestibilidad de los forrajes.

LITERATURA CITADA

1. **Bruni M. de los A.; P. Chilbroste. 2001.** Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 9: 43-51.
2. **Burghrara, S.S.; D.A. Sleper. 1986.** Digestion of several temperate forage species by a prepared cellulase solution. Agron. J. 78: 94-98.
3. **Burghrara, S.S.; D.A. Sleper; P.R. Beuselinck. 1992.** Comparison of cellulase solutions for use in digesting forage samples. Agron. J. 84: 631-636.
4. **Casler, M.D.; D.A. Sleper. 1991.** Smooth bromegrass digestibility tests: fungal cellulase vs. *in vitro* rumen fermentation. Crop Sci. 31: 1335-1338.
5. **Fahey G.C. 1994.** Forage quality evaluation and utilization. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Soc. of America, Wisconsin, USA. p 654-669.
6. **Gabrielsen, B.C. 1986.** Evaluation of marketed cellulases for activity and capacity to degrade forage. Agron. J. 78: 838-842.
7. **Guggolz, J.; R.M. Saunders; G.O. Kohler; T.J. Klopfenstein. 1971.** Enzymatic evaluation of processes for improving agricultural wastes for ruminant feeds. J. Anim. Sci. 33: 167-170.
8. **Jones, D.I.H.; M.V. Hayward. 1975.** The effect of pepsin pretreatment of herbage on the prediction of dry matter digestibility from solubility in fungal cellulase solutions. J. Sci. Food Agric. 26: 711-718.
9. **Leyva, L. 2000.** Prueba de digestibilidad *in vitro* con diferentes proporciones de saliva artificial y flora microbiana en alpacas. Tesis Bachillerato. Fac. Medicina Veterinaria, Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Lima. 33 p.
10. **Mc Queen, R.; P.J. Van Soest. 1975.** Fungal cellulase and hemicellulase prediction of forage digestibility. J. Dairy Sci. 58: 1482-1491.
11. **Narváez, N.; C. Lascano. 1989.** Digestibilidad *in vitro* de especies forrajeras tropicales. 1. Comparación de métodos de determinación. Pasturas Tropicales 11: 13-18.
12. **Ruiz, M.E.; A. Ruiz. 1990.** Nutrición de rumiantes: Guía metodológica de investigación. ALPA-RISPAL. San José, Costa Rica. p127-132.
13. **Tilley, J.M.A.; R.A. Terry. 1963.** A two stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. J. Br. Grassl. Soc. 18: 104-111.