

Digestibilidad de la materia seca de forrajes tropicales usando el método de solubilidad en pepsina-celulasa*

MARTHA PEÑA**, OSVALDO PALADINES**

ABSTRACT

Six experiments were conducted in order to study the feasibility of predicting the dry matter digestibility of tropical forages from its solubility in a pepsine-fungal cellulase system. In vivo digestibility of dry mater at maintenance level of intake was predicted by pepsine-cellulase solubility with a standard error of $\pm 2.0\%$. Correlation was superior to 0.99. The comparison with in vitro digestibility showed equal precision for both methods.

Cellulase concentrations between 1 and 2% and sample size between 0.2 and 0.5 g did not affect the precision of the pepsine-cellulase method.

Introducción

EN muchos laboratorios la operación de la técnica de digestibilidad *in vitro* resulta difícil por la necesidad de tener animales fistulados para obtener el licor del rumen. El nuevo método de digestión por pepsina-celulasa (5, 6) reemplaza el licor del rumen por la enzima celulasa a la vez que mantiene la etapa de digestión proteica por pepsina. El laboratorio del CIAT ha empleado el método de digestibilidad *in vitro* (7) por varios años en forma satisfactoria, pero se creyó conveniente la sustitución por el método de celulasa. Adegbola y Paladines (1) encontraron, en un primer intento, buena correlación entre digestibilidad enzimática y digestibilidad *in vitro* de algunos forrajes tropicales. En este estudio se empleó una enzima de procedencia norteamericana (Worthington Biochemical Corporation), pero posteriormente Goto y Minson (3) sugirieron el empleo de la enzima japonesa Onozuka 55-P 1500 (que al ser más barata permite el empleo de mayores concentraciones

Donefer *et al.* (2) sugieron que la celulasa podría ser una alternativa en la determinación de la digestión de la materia seca estableciendo una buena relación entre digestibilidad *in vitro* y la solubilidad de los forrajes en solventes. Posteriormente, Jarrige *et al.* (4) encontraron muy buena correlación entre la digestibilidad *in*

vivo vs la digestión de la celulasa, y Jones y Hayward (5, 6) describieron una técnica de dos etapas en la cual 0,2 g de muestra fue incubada primero con pepsina ácida para remover el contenido celular y luego con una celulasa cruda producida de *Trichoderma viride*

Goto y Minson (3) emplearon el método de pepsina-celulasa para predecir la digestibilidad de la materia seca en forrajes tropicales, obteniendo correlaciones altamente significativas ($R = 0,937$) y una desviación estandar de la regresión de 2,7 unidades de digestibilidad.

En este trabajo se presentan los resultados de seis experimentos con el objeto de determinar: 1) la concentración adecuada de celulasa, 2) comparación de los métodos de digestibilidad *in vitro* y de solubilidad en pepsina-celulasa, 3) el tamaño de muestra más adecuado para un sistema rutinario de análisis.

Materiales y métodos

Forrajes

Las muestras de forrajes empleadas provenían de los trabajos de digestibilidad *in vivo* realizadas en el Programa de Ganado de Carne del CIAT. La digestibilidad fue determinada con ovinos machos 'africanos', ofreciendo el forraje a nivel aproximadamente de mantenimiento para evitar la selectividad en el material consumido en forma que la muestra que se someta a digestión en el laboratorio represente realmente lo que el

* Recibido para publicación el 25 de enero de 1979

** Asistente de investigación y jefe de la sección de utilización de pastos del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Apartado Aéreo 67-13. Cali, Colombia.

Cuadro 1.—Forrajes empleados en las pruebas de solubilidad en pepsina - celulasa y digestibilidad *in vitro*.

Descripción del forraje	Digestibilidad <i>in vivo</i> de la M. S. %	Experimento Nº
<i>Desmodium distortum</i> , planta	66,0	1 - 3
<i>Desmodium distortum</i> , hoja	75,0	4
<i>Stylosanthes guianensis</i> , maduro	51,4	2-4-5-6
<i>Desmodium distortum</i> , hoja + peciolo	71,2	5 - 6
<i>Desmodium distortum</i> , tallo	50,4	5 - 6
<i>Hyparrhenia rufa</i> , maduro, heno	30,0	2-4-5
<i>Digitaria decumbens</i> , heno	55,9	4-5-6
<i>Cynodon nlemfuensis</i> , var. robusta, maduro	41,3	4
<i>Cynodon nlemfuensis</i> , var. robusta, joven	56,2	4
<i>Cynodon nlemfuensis</i> , var. nlemfuensis joven	54,3	4
<i>Cynodon dactylon</i> , var. aridus, maduro	42,1	4
<i>Cynodon dactylon</i> , var. aridus, joven	57,1	4
<i>Digitaria transvala</i> , joven	56,2	4
Pradera nativa de los Llanos Orientales, heno	31,4	4-5-6

Cuadro 2.—Solubilidad en pepsina - celulasa de *Desmodium distortum* bajo cuatro concentraciones enzimáticas

Concentración	Solubilidad	Desviación estándar entre cuadruplicados
%	%	
1,5	51,8	1,28
2,0	52,0	1,47
2,5	52,0	1,51
3,0	49,9	2,81

Las diferencias entre concentraciones no son significativas ($P > 0,05$)

animal consumió. En el Cuadro 1 se describen los forrajes empleados anotándose los experimentos en los cuales fueron usados.

Todas las muestras fueron molidas en molino de laboratorio Wiley empleando criba de 1 mm. de diámetro.

Métodos de laboratorio

El método de solubilidad por pepsina-celulasa fue el mismo descrito por Jones y Hayward (6) con la modificación de la celulasa Onozuka 55 (P-1500) seguida por Goto y Minson (3). El método finalmente estandarizado en nuestro laboratorio es el siguiente: muestras de 0,2 g del forraje son incubadas en tubos plásticos de 50 ml de capacidad a 39°C por 48 horas con 20 ml de ácido clorhídrico 0,1 N que contiene pepsina (1:10 000) al 0,2%. Luego de 48 horas el sobrenadante se remueve con tubos filtrantes de absorción con ampollita de filtración de vidrio aglomerado. Se añaden luego 20 ml. de la solución de enzima al 1,5% y los tubos

Cuadro 3.—Solubilidad en pepsina-celulasa de dos forrajes tropicales bajo cuatro concentraciones enzimáticas

Especie	Concentración de celulasa				
	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	\bar{x}
<i>Stylosanthes guianensis</i>	43,9 ± 2,3 ^{a/}	45,0 ± 1,7	47,2 ± 2,0	44,0 ± 1,8	45,0 ^{b/}
<i>Hyparrhenia rufa</i>	22,6 ± 1,0	25,8 ± 0,7	23,4 ± 1,1	26,9 ± 0,9	24,7
Promedio	33,3	35,4	35,3	35,5	34,9

a/ Desviación estándar entre cuadruplicados dentro de los tratamientos.

b/ Las diferencias entre especies son significativas ($P < 0,01$) pero no son significativas las diferencias entre concentraciones ni la interacción especies X concentración ($P < 0,1$).

Cuadro 4.—Solubilidad en pepsina-celulasa de *Desmodium distortum* bajo cuatro concentraciones enzimáticas

Concentración	Solubilidad	Desviación estándar entre cuadruplicados
%	%	
1,0	50,5 a	1,62
1,5	55,5 b	0,85
2,0	52,2 a	3,07
2,5	55,2 b	0,72

Promedios con letras diferentes difieren significativamente al nivel de 1%

se incuban por 48 horas a 39°C, agitándose dos veces por día. El contenido del tubo es luego filtrado por succión en filtros de vidrio aglomerado, lavándose dos veces con agua fría, secándose a 105°C y pesándose. El residuo seco corresponde a la materia seca no digerida. Si se desea obtener la solubilidad de la materia orgánica se debe sustituir en la última filtrada los filtros de vidrio aglomerado por crisoles Gosh provistos de

lana de vidrio los cuales pueden ser calcinados en horno mufla a 500°C.

El método de digestibilidad *in vitro* es el mismo descrito por Tilley y Terry (9) y modificado por Moore y Dunham (7). En todos los experimentos se mantuvo constante el método de análisis, variando solamente la parte correspondiente al estudio

Experimento N° 1

Este experimento tuvo por objeto estudiar el efecto de 4 concentraciones de celulasa: 1,5, 2,0 2,5 y 3,0% sobre la solubilidad pepsina-celulasa en una muestra de *Desmodium distortum*. La prueba se hizo por tubos cuadruplicados

Experimento N° 2

Se probaron 4 concentraciones de enzima en dos muestras de forraje. Las concentraciones fueron 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0% de celulasa. Se emplearon cuatro tubos por tratamiento.

Experimento N° 3

En el mismo forraje del experimento N° 1 se probaron concentraciones de celulasa de 1,0, 1,5, 2,0 y 2,5%. Se usaron cuadruplicados

Cuadro 5.—Digestibilidad *in vivo* y solubilidad en pepsina - celulasa bajo dos concentraciones enzimáticas de once forrajes tropicales.

Especie	Digestibilidad <i>in vivo</i>		Solubilidad en pepsina - celulasa			
			Concentración 1.5%		Concentración 2.0%	
	%	D. E. a/	%	D. E. b/	%	D. E. b/
<i>D. decumbes</i> , heno maduro	55,9	2,0	42,1	2,2	45,0	1,5
<i>C. nlemfuensis</i> , var. robusta, maduro	41,3	1,7	41,0	1,7	40,0	1,0
<i>C. dactylon</i> , var. aridus, maduro	42,1	2,0	33,6	0,5	33,5	1,8
<i>C. nlemfuensis</i> , var. robusta, joven	56,2	0,9	48,9	0,4	55,7	1,2
<i>C. dactylon</i> , var. aridus, joven	57,1	2,1	55,6	0,1	54,5	0,4
<i>C. nlemfuensis</i> , var. nlemfuensis, joven	54,3	1,1	44,8	0,6	45,4	0,1
<i>D. distortum</i> , hoja	75,0		74,5	0,4	72,7	0,9
<i>Hyparrhenia rufa</i> , heno maduro	30,0	3,6	29,0	1,0	28,7	1,1
<i>S. guianensis</i> , maduro	51,4	2,7	50,7	2,3	51,7	0,1
<i>Digitaria transvala</i> , joven	56,2	2,4	45,2	3,1	44,3	2,9
Pradera nativa, heno	31,4	2,9	28,9	0,8	26,4	4,0
Promedio	50,1	13,0 ^{c/}	44,9	13,0 ^{c/}	45,3	13,4 ^{c/}

a/ D. E. = Desviación estándar entre animales (generalmente 4-6 animales)

b/ D. E. = Desviación estándar entre duplicados.

c/ Desviación estándar entre medias de especies.

Cuadro 6.—Relación entre digestibilidad *in vivo* y solubilidad en pepsina-celulasa de 11 forrajes tropicales, bajo dos concentraciones enzimáticas.

Concentración	Regresión			R ²
	Pendiente	Intercepta	S y. x	
1,5	0,920	8,74	1,5	0,995
2,0	0,909	8,90	1,8	0,991

Experimento Nº 4

Este experimento tuvo por objeto relacionar la solubilidad pepsina-celulasa con la digestibilidad *in vivo* de forrajes que incluyeron dos leguminosas y nueve gramíneas. Se probaron además concentraciones de celulasa de 1,5 y 2,0%, formando un factorial de 2 x 11, con tubos duplicados.

Experimento Nº 5

Este experimento comparó la precisión de los métodos de digestibilidad *in vitro* y solubilidad pepsina-celulasa para predecir la digestibilidad *in vivo* de seis forrajes tropicales (3 leguminosas y 3 gramíneas); cada tratamiento se repitió en cuatro tubos y a su vez el experimento se repitió cuatro veces en cuatro semanas consecutivas.

Experimento Nº 6

Este experimento tuvo por objeto determinar el efecto del peso de la muestra sobre la solubilidad y la interacción con la concentración de la celulasa. Se usaron cinco forrajes, tres tamaños de muestra: 0,20, 0,35 y 0,50 g y concentraciones de 1,5 y 2,0% de celulasa. Se emplearon tubos duplicados y el experimento se repitió tres veces en tres semanas consecutivas.

Resultados

Experimento Nº 1

El Cuadro 2 presenta los resultados obtenidos con cuatro concentraciones de celulasa sobre la solubilidad de *D. distortum*. Las desviaciones estándar entre tubos dentro de una misma concentración fueron bajas y no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

Experimento Nº 2

En el Cuadro 5 se presentan los promedios de solubilidad bajo dos concentraciones de enzima y la digestibilidad *in vivo* de los forrajes analizados, y el Cuadro 6 contiene el resumen de la regresión de digestibilidad *in vivo* en solubilidad pepsina-celulasa para las dos concentraciones. Las regresiones son altamente significativas ($P < 0,001$), y las correlaciones sobre 0,99 y las desviaciones de la regresión bajas. No hubo diferencias entre las pendientes para concentraciones de 1,5 y 2,0% de celulasa.

Experimento Nº 3

El Cuadro 3 presenta los promedios de solubilidad de una leguminosa y una gramínea con cuatro concentraciones de celulasa. Las diferencias entre especies fueron altamente significativas ($P < 0,001$), como era de esperarse, pero no hubo diferencias debido a la concentración de la celulasa ni fue significativa la interacción entre concentración y especie.

Experimento Nº 4

En este experimento se encontraron diferencias significativas ($P < 0,01$) entre concentraciones. La prueba de Dunçan indicó que la solubilidad obtenida con concentraciones de 1,5 y 2,5% fueron iguales y significativamente superiores a 1,0 y 2,0% (Cuadro 4).

Cuadro 7.—Relación entre digestibilidad *in vivo* de seis forrajes tropicales (3 gramíneas y 3 leguminosas) y dos métodos de predicción de la digestibilidad

Corrida	Solubilidad en pepsina-celulasa			Digestibilidad <i>in vitro</i>		
	Pendiente	D. E. de la pendiente	R ²	Pendiente	D. E. de la pendiente	R ²
1	0,923	0,093	0,95	0,971	0,114	0,95
2	0,868	0,087	0,95	1,133	0,134	0,94
3	0,874	0,087	0,97	1,079	0,130	0,91
4	0,869	0,086	0,97	0,984	0,115	0,97

Cuadro 8 —Precisión de dos métodos de laboratorio para predecir la digestibilidad *in vivo* de seis forrajes tropicales. Los valores corresponden a la regresión global de seis forrajes por cuatro corridas

Método	D. E. de la regresión	R ²
Solubilidad en pepsina - celulasa	3,42	0,96
Digestibilidad <i>in vitro</i>	4,02	0,95

Experimento N° 5

Los resultados de la regresión de digestibilidad *in vivo* en solubilidad en pepsina-celulasa y digestibilidad *in vitro* se presentan en el Cuadro 7. La prueba de homogeneidad de pendientes indicó que ellas son iguales dentro de cada método. La desviación estándar de la regresión para las cuatro corridas reunidas fue mayor en el método *in vitro* (Cuadro 8).

Experimento N° 6

El Cuadro 9 presenta los promedios de solubilidad de los cinco forrajes. No se encontraron diferencias significativas para peso de la muestra ni para concentraciones de celulasa.

Discusión

La serie de seis experimentos que se presentan en este trabajo se realizaron para determinar la factibilidad

Cuadro 9 —Solubilidad en pepsina - celulasa de cinco forrajes tropicales (3 leguminosas y 2 gramíneas) bajo dos concentraciones enzimáticas y tres tamaños de muestra ^{a/}

Tamaño de la muestra	Concentración de celulasa		
	1.5%	2.0%	\bar{X}
g	%		
0,20	49,4	47,9	48,7
0,35	45,8	49,3	47,6
0,50	47,4	48,5	48,0
\bar{X}	47,5	48,6	48,1

a/ No se encontraron diferencias significativas para los efectos de tamaño de la muestra ni concentración de la celulasa. Cada cifra representa el promedio de cinco especies, tres pruebas y duplicados en cada prueba

práctica de cambiar el método de estimación de la digestibilidad de los forrajes tropicales por incubación *in vitro* con licor del rumen, por considerarse que si se pudiera obviar el empleo de una animal donante del líquido ruminal, la práctica rutinaria en nuestro laboratorio de pastos sería más sencilla. Se estimó también que el empleo de una enzima, permitiría una mayor constancia en los resultados entre corridas por no depender de circunstancias diarias de alimentación del animal. Se creyó primero conveniente determinar cuál sería la concentración de celulasa más apropiada ya que Goto y Minson (3) han recomendado el empleo del 2% cuando se usa la enzima Onozuka. A esta concentración y con muestras de 0,5 g, se requiere 1,0 g de enzima por muestra, aproximadamente US\$ 0,20. En un laboratorio que analiza un número considerable de muestras, vale la pena disminuir el costo por este concepto.

En la mayoría de los casos se emplearon muestras por cuadruplicado para obtener una buena estimación de la precisión del método y usando la variación entre repeticiones como varianza del error, medir los efectos debidos a la concentración de celulasa. En los experimentos 1 y 3 se empleó la misma muestra de *D. distortum*

En el primero no hubo diferencia y las desviaciones estándar son bajas. En el experimento 3 la varianza fue mayor y las estimaciones de solubilidad menos precisas, encontrándose digestibilidades superiores a la digestibilidad *in vivo* del forraje. En el experimento 2 se probaron dos especies, una de gramíneas y otra de leguminosas para detectar posibles interacciones entre concentración y calidad del forraje, resultado negativa. Se decidió probar la precisión del método para predecir la digestibilidad de forrajes tropicales empleando concentraciones de 1,5 y 2,0% de celulasa en 9 muestras de gramíneas y 2 leguminosas de digestibilidad conocida al nivel de mantenimiento. No se encontraron diferencias para las dos concentraciones y es evidente que con las dos se puede predecir la digestibilidad con alta precisión (R² = 0,99) y un error inferior a 2,0%.

Goto y Minson (3) han recomendado el empleo de 0,5 g de muestra para análisis, sin embargo, Jones y Hayward (6) encontraron que con 0,2 g de muestra se obtenía alta precisión, tratándose de forrajes de clima templado. Adicionalmente, la cantidad de celulasa aumenta y proporcionalmente con el tamaño de la muestra.

Con 0,2 g de muestra y 1,5% de solución de celulasa se emplearía 0,3 g de celulasa por muestra en lugar del 1,0 g. En la comparación realizada entre tamaños de muestra de 0,20, 0,35 y 0,50 g no se encontraron diferencias significativas a concentraciones de celulasa de 1,5 y 2,0% lo cual indica que es factible emplear 0,2 g de muestra y la solución de celulasa al 1,5%.

Finalmente la comparación de los métodos de digestibilidad *in vitro* y de solubilidad en pepsina-celulasa no arrojó diferencias significativas entre métodos y aún cuando la precisión del método de pepsina-celulasa es numéricamente mejor que digestibilidad *in vitro*, no fue estadísticamente diferente

La conclusión de esta serie de experimentos es que se puede predecir adecuadamente la digestibilidad *in vivo* de los forrajes tropicales empleando el método de solubilidad en pepsina-celulasa, en muestras de 0,2 g y concentración de 1,5% en la solución de celulasa. El método descrito se aplica solamente cuando se emplea la celulasa indicada. Si se desea emplear otra fuente de celulasa es conveniente antes determinar la concentración más adecuada.

Resumen

Se realizaron seis experimentos para estudiar el método de solubilidad en pepsina-celulasa para predecir la digestibilidad *in vivo* al nivel de mantenimiento de forrajes tropicales y determinar la concentración adecuada de la celulasa y el tamaño máximo de muestra del forraje. Los resultados indicaron que se puede emplear concentraciones entre 1,0 y 2,0% de celulasa con igual precisión y que el tamaño de la muestra, entre 0,2 y 0,5 g, no afecta los resultados.

La digestibilidad *in vivo* de once muestras de forrajes tropicales y su solubilidad en pepsina-celulasa fueron correlacionadas a nivel superior al 0,99 con una desviación estándar de la regresión inferior al 2,0%. La comparación de este método con el método de digestibilidad *in vitro* indicó que se puede obtener igual precisión en las estimaciones con los dos métodos.

Agradecimiento

Los autores agradecen la colaboración del Dr. Juan Ospina de la Unidad de Biometría del CIAT en los análisis estadísticos.

Notas y Comentarios

Los reguladores de crecimiento bajo control

Uno de los trabajos presentados en Honolulu ante la reunión conjunta de la American Chemical Society y la Sociedad Química de Japón (abril de 1979) dio cuenta de trabajos para controlar los estímulos a plantas.

Desde el trigo hasta las piñas, el papel de los reguladores del crecimiento vegetal en la producción agrícola se está expandiendo. Tales compuestos son usados para promover un crecimiento, floración y producción de frutos lentos, para obtener un mayor volumen a final de cuentas. Sin embargo, los productos químicos producidos por técnicas sofisticadas se aplican a los cultivos, por lo general, mediante un método de aspersión que no ha cambiado en 20 años, afirmó G. G.

Allan, de la Universidad de Washington, ante la sección de polímeros de la reunión de químicos. Debido a que el momento y la dosis de los reguladores vegetales son a menudo cruciales para su efecto, Allan sostiene que las sustancias necesitan sistemas de aplicación de liberación controlada para alcanzar su potencial práctico pleno.

Literatura citada

1. ADEGBOLA, A y PALADINES, O Prediction of the digestibility of the dry matter of tropical forages from their solubility in fungal cellulase solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28: 775-785 1977.
2. DONEFER, E., CRAMPTON, E. W y LLOYD, I. E. The prediction of digestible energy intake potential (NVI) of forages using a simple *in vitro* technique. *Proceedings of the Xth International Grassland Congress, Helsinki, Finland 1963.* pp 442-445.
3. GOTO, I. y MINSON, D. J. Prediction of the dry matter digestibility of tropical grasses using a pepsin - cellulase assay. *Animal Feed Science and Technology* 2 (3): 247-253 1977.
4. JARRIGE, P., THIVAND, P. y DEMARQUILY, C. Development of a cellulolytic enzyme digestion for predicting the nutritive value of forages. *Proceedings XI International Grassland Congress Queensland, Australia 1970* p 762.
5. JONES, D. I. H. y HAYWARD, M. V. A cellulase digestion technique for predicting the dry matter digestibility of grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 24: 1419-1426 1973.
6. JONES, D. I. H. y HAYWARD, M. V. The effect of pepsin pre-treatment of herbage on the prediction of dry matter digestibility from solubility in fungal cellulase solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 26: 711-718 1975.
7. MOORE, J. y DUNHAM, D. G. Procedure for the two-stage *in vitro* organic matter digestion of forages (Revised), Department of Animal Science University of Florida, Gainesville, (Mimeographed) 1971.
8. MOORE, E. y MOOT, G. O. Structural inhibitors of quality in tropical grasses. *In* CSSA, Special Publication, Madison, Wisconsin. Crop Science Society of America. 1973 pp. 53-98.
9. TILLEY, J. M. A. y TERRY, R. A. A two-stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society* 18:104-111 1963.

El Dr Allan es un colaborador de Turrialba, en cuyas páginas aparecieron por primera vez algunas de sus investigaciones sobre el barrenador de los brotes de *Cedrella* (Cf Turrialba 20:478). Informó en Honolulu sobre el primer sistema para la liberación controlada de una sustancia estimuladora del crecimiento. El crecimiento del pino (*Pinus taeda*) y el abeto (*Pseudotsuga taxifolia*) fue incrementada en un período de ocho años por una auxina adherida a fragmentos de corteza del tronco. Los microorganismos descomponen lentamente la corteza, liberando el ingrediente activo. Originalmente, Allan no intentaba estimular el crecimiento vegetal, sino desarrollar un herbicida a largo plazo para usarse en los plantíos de coníferas en proyectos de reforestación. Sin embargo, en sus investigaciones Allan encontró que el herbicida a base de auxina no sólo prevenía el crecimiento de malezas, sino que estimulaba sustancialmente las ganancias en altura y diámetro de los árboles tanto en suelos ricos como en pobres.

En pruebas de campo, en cooperación con las autoridades del estado de Washington, los científicos han tratado ya medio millón de plántulas con una sola aplicación de auxina aprisionada. Calculan que el costo es de cinco centavos de dólar por árbol, y esperan que los expertos forestales encuentren que el tratamiento representa una inversión meritoria.