

REDUCCIÓN DEL TIEMPO DE DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* EN LA EVALUACIÓN DE FORRAJES¹

Reduction in *in vitro* digestibility time for forage evaluation

Rodolfo Saldaña P.² y Juan Carlos Dumont L.²

S U M M A R Y

The possibility of reducing the pepsine-incubating time in order to obtain the two-step *in vitro* digestibility in lucern plants was evaluated.

The incubation times were: 0, 4, 6, 24, and 48 hours, and temperatures: 40 and 50° C.

Regression analysis indicates that 4 hour incubation at 50 °C give the same result as 48 hours at 40° C. Dose of pepsine can be reduced from 900 to 540 units/tube.

It is possible then, to reduce the pepsine incubation time getting a better analysis capacity during the week, and less cost.

Key words: Digestibility, *in vitro*, pepsine, forage evaluation.

INTRODUCCIÓN

La evaluación de la calidad de los forrajes por métodos de laboratorio es de gran importancia para lograr eficiencia en producción animal. Dentro de los mejores métodos usados, se encuentra la digestibilidad de la materia seca (dms) determinada *in vitro*, según Tilley y Terry (1963) y Goering y Van Soest (1970), la cual permite predecir los valores *in vivo* con una mayor confiabilidad que los métodos químicos (Givens, Everington y Adamson, 1989; Mison y McLeod, 1972) ya que la correlación de éstos con la digestibilidad es afectada negativamente por la complejidad de las interacciones de la pared celular, la variabilidad entre cada tipo de plantas, su estado de madurez y los diversos estímulos ambientales (Hatfield, 1989; Jung, 1989). A pesar de las ventajas la dms determinada *in vitro* tiene algunos inconvenientes como la necesidad de animales fistulados para la obtención de licor ruminal, variabilidad del inóculo según la alimentación y prolongado tiempo que toma el análisis que consta de dos etapas.

- Primera etapa: 48 horas de incubación con líquido ruminal, 40 °C (Goering y Van Soest, 1970).

- Segunda etapa: 48 horas de incubación con pepsina en medio ácido, 40°C (Goering y Van Soest, 1970).

En la práctica el análisis demora entre 7 a 9 días, tiempo muy prolongado, especialmente, para muestras de origen comercial que requieren de una mayor rapidez. Se hace necesario entonces buscar una alternativa que logre agilizar este análisis.

En la literatura se encuentran antecedentes de que la etapa de incubación con pepsina por 48 horas, puede ser reducida a 24 horas, incluso a 16 horas (Larsen y Jones, 1973; Lorin y Harris, 1970; Van Soest y Robertson, 1985), pero no existe un estudio cinético que indique cuál es el tiempo mínimo que de resultados confiables, ni para qué muestras es aplicable.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la factibilidad de reducir el tiempo de análisis de la digestibilidad de la materia seca (dms) determinada *in vitro* manteniendo la etapa de incubación con líquido ruminal por 48 horas a 40 °C y modificando la etapa de incubación con pepsina por 48 horas a 40 °C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como muestra en estudio se utilizó una pradera de alfalfa con 18% de materia seca y 19,2% de proteína

¹Recepción de originales: 6 de enero de 1994.

²Centro Regional de Investigación Remehue (INIA), Casilla 24-0, Osorno, Chile.

cruda, la cual fue secada a 60 °C en una estufa de aire forzado por 48 horas y luego molida en un molino Willey Mill con tamiz de 1 mm.

La fuente de inóculo de líquido ruminal utilizado fue obtenido de una vaca fistulada, alimentada exclusivamente con heno.

El análisis de la dms determinada *in vitro* se realizó por la técnica de Goering y Van Soest, (1970) que se deriva de Tilley y Terry, (1963).

La pepsina usada fue de la marca Riedel-de Haën de 1.200 unidades/gramo, la cual fue disuelta en ácido clorhídrico 0,075 N (AOAC, 1975) para ser dispensada a los tubos.

Para optimizar la etapa de incubación con pepsina se modificaron los siguientes parámetros:

1. Temperatura de incubación.
2. Tiempo de incubación.
3. Cantidad de pepsina.

1. La determinación de temperatura óptima de la pepsina, se realizó incubando el forraje en un medio similar a la dms determinada *in vitro* pero sin líquido ruminal, durante 60 minutos. Los resultados se expresaron como porcentaje de material digerido.

2. El estudio cinético de la incubación con pepsina se realizó midiendo la dms determinada *in vitro*, para lo cual se mantuvo la etapa de incubación con líquido ruminal a 40 °C por 48 horas y se varió el tiempo de incubación con 720 unidades/tubo de pepsina a 1; 2; 4; 7,5; 24; y 48 horas a 40 °C y 50 °C. Se comparó los valores de la dms determinada *in vitro* a diferentes tiempos, cantidad de pepsina y temperatura, manteniendo la etapa de incubación con líquido ruminal por 48 horas a 40 °C y variando la etapa de incubación con pepsina de 0, 4, 6, 24 a 48 horas, con 360 y 900 unidades/tubo de pepsina a 40 °C y 50 °C. Los tubos que se mantuvieron en incubación por 48 horas con 360 unidades/tubo a 40 °C se consideraron como control.

3. La cantidad de pepsina óptima a utilizar se determinó midiendo la variación de la dms determinada *in vitro*, manteniendo la etapa de incubación con líquido ruminal 48 horas a 40 °C y variando las concentraciones de pepsina a 360, 540, 720, 900 unidades/tubo incubando por 4 horas y 50 °C. Se mantuvo como control la incubación con 360 unidades/tubo de pepsina a 40 °C por 48 horas.

El análisis de varianza se hizo con un nivel de significancia del 5%, tomando como control la dms determinada *in vitro* obtenida con incubación con pepsina de 360 unidades/tubo, 48 horas a 40 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las enzimas expresan su máxima capacidad de degradación en su temperatura óptima, característica que depende, entre otros factores, de su estructura, medio en que se encuentran y origen. En la etapa de incubación con pepsina de la digestibilidad de la materia seca (dms) determinada *in vitro* tradicionalmente los métodos usan una temperatura entre 39 y 40°C. Con el fin de verificar si ésta es la más adecuada, se determinó el efecto de la temperatura en la digestibilidad del forraje como se muestra en la Figura 1, la cual indica que 40 °C no es la mejor temperatura y que la óptima se encuentra a 51 °C, en donde su capacidad de degradación se duplica, siendo éste un factor importante para acelerar la velocidad de degradación de proteínas y reducir el tiempo de la etapa de incubación con pepsina.

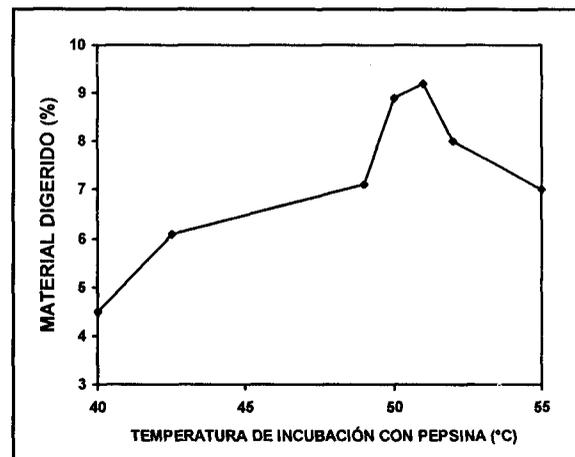


FIGURA 1. Efecto de la temperatura en la digestibilidad del forraje.

FIGURE 1. The effect of temperature on forage dry matter digestibility.

Para verificar la temperatura óptima de incubación con pepsina se midió la dms determinada *in vitro* manteniendo la etapa con líquido ruminal de 48 horas a 40 °C y comparando la etapa de incubación con pepsina a 40 y 50 °C en relación al tiempo de incubación, lo que se muestra en la Figura 2 al cual se le ajustó un modelo de dobles recíprocos (Lenhninger, 1972) transformado a la siguiente ecuación:

$$dms = \frac{dms \text{ máx} \times \text{horas}}{K + \text{horas}}$$

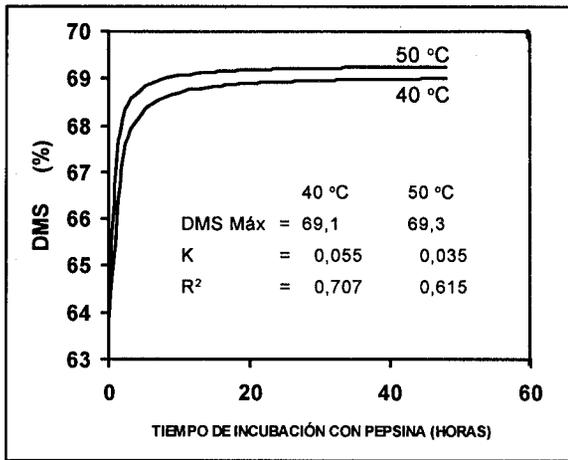


FIGURA 2. Efecto del tiempo y la temperatura de incubación sobre la digestibilidad de la materia seca del forraje.

FIGURE 2. The effect of time and temperature of incubation on forage dry matter digestibility.

dms = Digestibilidad de la materia seca determinada *in vitro*.

dms máx = Digestibilidad de la materia seca determinada *in vitro* máxima alcanzada según el modelo.

K = Constante.

Se puede apreciar que los valores de dms determinada *in vitro* a 50 °C se elevan más rápidamente que a 40 °C, confirmando que la temperatura es un parámetro que acelera la reacción de la enzima que se emplea en el presente estudio.

De los datos obtenidos de las regresiones se encuentra que entre 4 y 6 horas de incubación con pepsina se puede llegar al 99% de los valores máximos que alcanza la dms determinada *in vitro*, por lo tanto, las siguientes etapas se destinaron a comprobar si esos tiempos dan resultados comparables estadísticamente con las tradicionales 48 horas de incubación.

En el Cuadro 1, se muestran los valores de dms determinada *in vitro* obtenidos a diferentes tiempos de incubación con pepsina de 40 y 50 °C en donde se puede ver que existe una gran diferencia entre el tiempo 0 hora (sólo con incubación ruminal) y 48 horas lo que estaría justificando plenamente la etapa de incubación con pepsina de la dms. A partir de las 6 horas a 40 °C se obtuvieron resultados sin diferencias significativas con respecto a la incubación de 48 horas, condición que se toma como testigo de comparación. Aunque estos resultados a 40 °C parecen extremadamente buenos, se debe tener en cuenta que este experimento se realizó con un exceso de pepsina (900 unidades/tubo) de 150%

la cantidad normal, situación que sólo puede ser mantenida en ensayos experimentales y no como rutina. Finalmente a 50 °C, a partir de las 4 horas no hubo diferencias significativas con respecto a 48 horas, 40 °C, lo que significó un acortamiento considerable de la etapa de incubación con pepsina de la dms determinada *in vitro*.

En el Cuadro 2 y Figura 3, se muestran valores de dms determinada *in vitro* manteniendo la etapa de incubación ruminal por 48 horas a 40 °C y variando las cantidades de pepsina a 40 y 50 °C. La incubación con 360 unidades/tubo por 48 horas a 40 °C que es la tradicional fue usada como control. Los resultados indican que con un mínimo de 540 unidades/tubo a 4 horas 50 °C se obtuvieron resultados sin diferencias

CUADRO 1. Valores de DMS *in vitro* obtenidos a diferentes tiempos de incubación con pepsina a 40 °C y 50 °C

TABLE 1. *In vitro* dry matter values at different incubation time with pepsine at 40 °C and 50 °C

Tiempo de incubación (horas)	Cantidad de pepsina (U/tubo)	Valores de dms <i>in vitro</i>	
		40 °C (%)	50 °C (%)
0	-	63,3 ± 0,6	
4 ¹	900	66,2 ± 0,7	69,1 + 0,9*
6 ¹	900	69,4 ± 1,0*	70,5 + 1,0*
24 ²	360	68,6 ± 0,5*	
48 ²	360	69,2 ± 0,8 (c)	

¹Agitación manual cada hora.

²Agitación 3 veces al día.

(c) = control.

*Diferencias no significativas con respecto al control según prueba de Duncan (P > 0,05).

CUADRO 2. Valores de dms *in vitro* obtenidos con diferentes cantidades de pepsina a 40 °C y 50 °C

TABLE 2. *In vitro* dry matter values with different amount of pepsine at 40 °C and 50 °C

Cantidad de pepsina (U/tubo)	Valores de dms <i>in vitro</i>	
	48 horas a 40°C (%)	4 horas a 50°C (%)
360	68,2 ± 0,9 (c)	66,5 + 1,4
540		68,3 + 0,8*
720		68,5 + 1,1*
900		68,9 + 0,8*

(c) = control.

*Diferencias no significativas con respecto al control según prueba de Duncan (P > 0,05).

significativas con respecto al control. Este resultado es bastante importante porque indica que con cantidades de sólo 50% sobre lo normal de pepsina (y que puede ser mantenido como rutina, ya que no aumenta considerablemente los costos de análisis) se puede reducir el tiempo de incubación con pepsina de 48 horas a 4 horas.

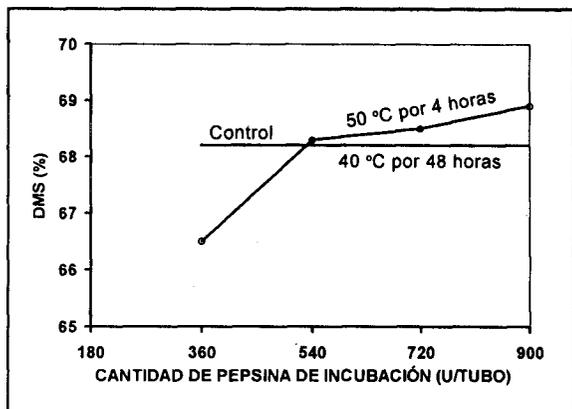


FIGURA 3. Efecto de la cantidad de pepsina sobre la digestibilidad de la materia seca del forraje.

FIGURE 3. The effect of amount of pepsine on forage dry matter digestibility.

CONCLUSIONES

- La temperatura de la segunda etapa de incubación con pepsina de 40 °C que es tradicional, no es la más adecuada para el tipo de enzima que se usa en nuestro laboratorio.

- La temperatura de la etapa de incubación con pepsina de 50 °C está muy cercana a la óptima (51 °C) que es la más adecuada, ya que su capacidad degradativa se encuentra aumentada con respecto a la temperatura tradicional de 40 °C.
- Es factible reducir el tiempo de análisis de la digestibilidad de la materia seca determinada *in vitro*, manteniendo la etapa de incubación ruminal de 40 °C por 48 horas y modificando la etapa de incubación con pepsina, de 48 horas a 40 °C (tradicional) por 4 horas a 50 °C, que en la práctica es un ahorro de dos días, permitiendo entregar un resultado en 4 ó 5 días.
- La cantidad óptima de pepsina para mantener los resultados de 4 horas, 50 °C es de 540 unidades/tubo lo que es un aumento de sólo un 50%, costo que puede ser mantenido en análisis de rutina.
- Aunque se utilizó una muestra que puede ser complicada para la etapa de incubación con pepsina (pradera de alfalfa con un alto porcentaje de proteínas), la aplicación de los resultados del presente trabajo a otros tipos de forraje necesita mayor investigación.

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la factibilidad de reducir el tiempo de la segunda etapa de incubación con pepsina en la determinación de la digestibilidad de la materia seca (dms) realizada *in vitro* para una pradera de alfalfa. La acción de la pepsina fue optimizada aumentando cantidad y temperatura de incubación. Se usaron 900 unidades/tubo de pepsina y tiempo de incubación de 0, 4, 6, 24 y 48 horas. A 40 °C (temperatura tradicional) y 50 °C (muy cercana al óptimo de la enzima), los resultados se ajustaron a un modelo de dobles recíprocos, que indicaron que con 4 horas de incubación a 50 °C, se logran resultados comparables con 48 horas de incubación a 40 °C. Se encontró que la cantidad de pepsina de

900 unidades/tubo se puede reducir hasta 540 unidades/tubo obteniéndose los mismos resultados. Finalmente, se concluye que es factible acortar el tiempo que toma el análisis de dms realizada *in vitro* manteniendo la etapa de incubación con líquido ruminal a 40 °C por 48 horas y reduciendo el tiempo de incubación con pepsina de 48 horas, a 4 horas y 50 °C para una muestra de pradera de alfalfa, lo que se traduce en un considerable ahorro de tiempo y una mayor capacidad de análisis durante una semana de trabajo.

Palabras claves: Digestibilidad *in vitro*, incubación con pepsina, evaluación de forrajes.

LITERATURA CITADA

- AOAC. 1975. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 134 p.
- GIVENS, D.I., EVERINGTON, J.M. and ADAMSON, A.H. 1989. The digestibility and metabolisable energy content of grass silage and their prediction from laboratory measurement. *Animal Feed Science and Technology*, 24: 27-43.
- GOERING, H.K. and VAN SOEST, P.J. 1970. Forage fiber analyses. Agriculture Handbook Nº 379, Agricultural Research Service. United States Department of agriculture.
- HATFIELD. 1989. Structural polisacarides in forages and their degradability. *Agronomy Journal*, 81: 39-46.
- JUNG, H.G. 1989. Forages lignins and their effects on fiber digestibility. *Agronomy Journal*, 81: 33-38.
- LARSEN, R.E. and JONES, G.M. 1973. A modified method for the *in vitro* determination of dry matter and organic matter digestibility. *Canadian Journal Animal Science*, 53: 251-256.
- LEHNINGER, A.L. 1972. Bioquímica. Quinta Reedición, Ediciones Omega S.A. Barcelona. 165 p.
- LORIN, R. and HARRIS, 1970. Nutrition research techniques for domestic and wild animals. An international record system and procedures for analysing samples. UTAH, vol. 1: 5053-5054.
- MISON, D.J. and Mc LEOD, M.N. 1972. The *in vitro* technique: its modification for estimating digestibility of large numbers of tropical pasture samples. Division of tropical pasteur technical, paper Nº 8.
- TILLEY, J.M.A. and Terry, R.A. 1963. A two-stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society* 18: 104.
- VAN SOEST, P.J. and ROBERTSON, J.B. 1985. Analysis of forages and fibrous foods. A laboratory manual for animal science. Ithaca, New York, USA. Cornell University. p. 165.