

## MANUAL DE LABORATORIO DETERMINACIÓN DE LA TASA DE DIGESTIÓN EN FORRAJES

MC. Jorge L. Contreras Jácome<sup>1</sup>  
PhD. Francisco I. Juárez Lagunes<sup>1</sup>  
MC. Maribel Montero Lagunes<sup>2</sup>

### 1.- Introducción

Siempre que se discute el problema de analizar forrajes en el laboratorio, se debe determinar claramente para que se quieren obtener esos análisis. Cuando lo que se intenta es constatar la calidad de algún forraje disponible en gran cantidad, sobre todo si es muy común y ha sido analizado muchas veces con anterioridad, probablemente lo que más convenga sea realizar parte de un análisis químico proximal, como la proteína o la fibra, y cotejar los resultados con las tablas existentes de composición de alimentos. En las tablas (NRC, 1989 y NRC, 1996), se encuentran los valores del total de nutrimentos digestibles (TND), energía metabolizable (EM) y energía neta (EN). Con base en estos datos y al de proteína cruda, es posible realizar un balanceo para llenar ciertos requerimientos de los animales, de acuerdo a las normas de alimentación establecidas (Castellanos y col., 1990); sin embargo, el análisis químico proximal presenta muchas deficiencias para predecir o evaluar los alimentos destinados a los rumiantes, ya que algunos de sus componentes no representan fracciones químicas o nutritivas con un comportamiento definitivo en la fisiología digestiva de estos. Por ejemplo, la fibra cruda recupera únicamente una fracción del material fibroso de un forraje, parte de esta fracción escapa, siendo principalmente hemicelulosa, algo de celulosa y lignina. Estos compuestos quedan incluidos en el extracto libre de nitrógeno (ELN) y no únicamente los carbohidratos solubles (CHOS) que deberían representar esta fracción (Van Soest, 1967). Debido a estos problemas se han propuesto varios métodos alternativos para el análisis de forrajes para rumiantes, entre los cuales destacan los análisis de fracciones de fibra y de digestibilidad.

El estimador más comúnmente usado para evaluar el valor nutritivo de un forraje es su disponibilidad (**digestibilidad**), término utilizado para indicar lo que el animal en apariencia aprovecha. En varios países tropicales se ha medido la digestibilidad de los pastos; sin embargo, este valor cambia de acuerdo al medio ambiente y al manejo, por lo tanto, no se puede extrapolar a las condiciones del trópico mexicano (Montero y col., 1998); además, no hay información de digestibilidad de pastos tropicales de la zona Centro del Estado de Veracruz.

La digestibilidad de nutrimentos orgánicos puede ser determinada en el laboratorio por métodos biológicos donde los principales reactivos son enzimas adicionadas de manera directa o por microorganismos cultivados (líquido ruminal). La intención de este manual es la de describir un procedimiento en el que se usa líquido ruminal para la determinación de la digestibilidad de materia orgánica, y medición de su tasa de digestión.

---

<sup>1</sup> Universidad Veracruzana. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Veracruz. Posta Zootécnica "Torreón del Molino". Km. 14.5 Carretera Veracruz-Xalapa.

<sup>2</sup> INIFAP. CE. La Posta. Lab. de Nutrición animal. Km. 22.5 Carretera Veracruz-Córdoba.

## **2.- Digestibilidad *in vitro***

Los sistemas *in vitro* que usan líquido ruminal, son los más antiguos y aún los más comunes para medir la digestibilidad. Estos consisten en una fermentación del alimento durante 48 horas por los microorganismos ruminales. La cantidad de muestra (alimento) que desaparece se considera que ha sido "digerida". La cantidad de alimento digerida corregida por el contenido de cenizas es equivalente al TND, el cual es el punto de partida para estimar el valor energético de un alimento (Deinum y col., 1969).

Muchos procedimientos y modificaciones de procedimientos han sido propuestos; sin embargo, la mayoría de los que hoy están en uso son modificaciones del procedimiento de dos etapas de Tilley y Terry (1963) que está diseñado para obtener la digestibilidad verdadera por determinación de los constituyentes no digeridos de las paredes celulares.

Una excepción son los métodos basados en la producción de gas (Menke y col., 1979; Pell y Schofield, 1993) los cuales son útiles para tasas de digestión y evaluación de alimentos que son altos en sustancias solubles. Los métodos *in vitro* por ningún motivo son procedimientos fijos, el tratamiento metodológico y la secuencia son altamente dependientes del propósito de la determinación.

## **3.- Procedimiento *in vitro* usando líquido ruminal**

Hay muchas adaptaciones y modificaciones de los procedimientos ruminales *in vitro* al método de Tilley y Terry (1963); en el procedimiento descrito en este manual, se aplicaron las modificaciones de Van Soest, Wine y Moore (1966) con solución detergente neutro, las modificaciones de Goering y Van Soest (1970) al procedimiento de Tilley y Terry y las modificaciones de los sistemas de producción de gas (Pell y Schofield, 1993). Los dos sistemas de Van Soest usan diferentes métodos para la preparación del inóculo y de los amortiguadores, los cuales son más apropiados para estudios de tasa de digestión; sin embargo, cualquier método de preparación del inóculo o del amortiguador puede ser ajustado a cualquier sistema de tal forma que híbridos de este procedimiento básico son posibles.

#### 4.- Equipo de laboratorio

- a) Estufa bacteriológica ajustada a 39°C.
- b) Sistema y contenedor para suministro de CO<sub>2</sub>.
- c) Parrilla eléctrica con agitación.
- d) Bomba de vacío y sistema para filtración.
- e) Balanza analítica de precisión.
- f) Autoclave.
- g) Horno mufla con temperatura de hasta 550°C
- h) Estufa de aire forzado con niveles de 50 a 100°C (secado de muestras)
- i) Estufa para secado a 100°C
- j) Molino Thomas Wiley

#### 5.- Material de laboratorio

- a) Líquido ruminal de un bovino fistulado, alimentado con forraje de buena calidad
- b) Botellas de vidrio con capacidad de 120 ml, para uso de laboratorio
- c) Termo doméstico con capacidad de 1 l
- d) Gasa de uso clínico (50 x 10 cm)
- e) Fibra de vidrio (pelo de ángel)
- f) Jeringas desechables de 3, 5 y 50 ml
- g) Papel filtro de fibra de vidrio, laboratorios Gelman (tipo A/E 47 mm gelman laboratorio)
- h) Probetas de 100, 250 y 500 ml
- i) Pipeta semiautomática con perilla auxiliar (capacidad de 25 ml)
- j) Pinza selladora para tapón de hule y arillo de aluminio
- k) Charolas de aluminio de 60 ml de capacidad, tipo repostería
- l) Embudos para filtrar, de cristal y porcelana
- m) Desecador
- n) Espátulas
- o) Vasos de precipitado con capacidad de 200, 500, 2000 y 3000 ml
- p) Pinza de mango largo
- q) Guantes de uso industrial y de asbesto
- r) Tapones de hule para botellas de vidrio de 120 ml
- s) Arillos de aluminio para sellar las botellas de 120 ml
- t) Matraz de 750 y 1000 ml

## 6.- Reactivos y soluciones de laboratorio

### Medio de cultivo

Proporción para 50 muestras de 200 mg

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| a) Caseína                     | 2 g     |
| b) Agua destilada cbp          | 400 ml  |
| c) Solución de microminerales  | 100 µ l |
| d) Rezasurina                  | 1 ml    |
| e) Cysteína-HCL                | 500 mg  |
| f) Solución buffer             | 200 ml  |
| g) Solución de macro minerales | 200 ml  |
| h)CO <sub>2</sub>              |         |

### Preparación:

- Pesar y medir en la proporción indicada: el agua destilada, la caseína, la solución de microminerales, la solución buffer y la rezasurina ; depositándolos en un matraz Erlenmeyer y colocarlos en la parrilla con agitador en presencia de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar la ebullición.
- Enfriar esta solución a 39°C
- Pesar la cysteína correspondiente, disolverla en 30 ml de la solución premezclada y agregarla a la misma

\* El medio de cultivo se prepara al momento de hacer la digestión

### Solución amortiguadora (buffer)

Proporción para 5 l de solución

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| a) Agua destilada cbp    | 5.00 l   |
| b) Bicarbonato de amonio | 19.94 g  |
| c) Bicarbonato de sodio  | 174.51 g |

### Preparación:

- Medir el agua destilada correspondiente
- Agregar agitando, el bicarbonato de amonio y el bicarbonato de sodio en el orden presentado
- Guardar en refrigeración

### **Solución de macrominerales**

Proporción para 5 l

|                        |         |
|------------------------|---------|
| a) Agua destilada cbp  | 5.00 l  |
| b) Fosfato de sodio    | 28.49 g |
| c) Fosfato de potasio  | 30.99 g |
| d) Sulfato de magnesio | 2.92 g  |
| e) Cloruro de sodio    | 11.10 g |

#### **Preparación:**

- Medir el agua destilada correspondiente
- Agregar con agitación los reactivos correspondientes
- Guardar en refrigeración

### **Solución de microminerales**

Proporción para 100 ml

|                        |        |
|------------------------|--------|
| a) Agua destilada cbp  | 100 ml |
| b) Cloruro de calcio   | 13.2 g |
| c) Cloruro de magnesio | 10.0 g |
| d) Cloruro de cobalto  | 1.0 g  |
| e) Cloruro de hierro   | 8.0 g  |

#### **Preparación:**

- Disolver con agitación cada uno de los minerales, según el orden que presentan
- Guardar en refrigeración

### **7.- Preparación de la muestra por analizar**

Deshidratar el forraje en una estufa de aire forzado a 55°C por un tiempo no mayor de 36 h (un tiempo mayor sin ser necesario puede deprimir la digestibilidad). Una vez seca la muestra se procede a molerla en un molino tipo Wiley con malla de 1 mm. De no realizarse los análisis inmediatamente, mantener las muestras en lo frío, (sin congelar) pero protegidas de la humedad.

### **8.- Obtención del líquido ruminal**

El líquido ruminal deberá obtenerse al momento, de un bovino adulto con rumen fistulado, alimentado con heno de gramínea de buena calidad y concentrado comercial desde 15 días antes del inicio de la serie de colecciones del líquido (Castellanos y col., 1990).

Proporción para 50 muestras

- a) Líquido ruminal; 200 ml

Procedimiento de colecta del líquido ruminal

### **Trabajo de campo**

- a) Cuando la determinación se realiza temprano por la mañana no será necesario dietar a los animales, pero si se realiza más tarde, deberá evitarse el acceso de los animales al agua o alimento por tres horas antes del muestreo. Para obtener el líquido se quita la tapa de la cánula ruminal y preferentemente se deja reposar en una cubeta con agua tibia. Con la mano se retira toda la ingesta situada en la parte alta del interior del rumen. A continuación se introduce un vaso nalgene estéril de 250 ml al interior del rumen, se extrae el líquido ruminal de la parte media o baja del rumen y se deposita en el termo, el cual de preferencia debe quedar lleno para evitar espacios con aire (Castellanos y col., 1990). Finalmente se limpia el exterior de la cánula y nuevamente se coloca la tapa

### **Trabajo de laboratorio**

- a) En el embudo de porcelana, se colocan 4 capas de 25 cm de gasa y una más de fibra de vidrio (pelo de ángel), filtrar en un matraz con capacidad de 750 ml el líquido ruminal, procurando ser eficientes en el tiempo utilizado y en presencia de CO<sub>2</sub>, para afectar lo menos posible la microbiología del líquido colectado.
- b) Depositar en frascos de vidrio de 120 ml el líquido ruminal ya filtrado, esto en presencia de flujo de CO<sub>2</sub>, tapando y sellando los frascos en el menor tiempo posible.
- c) Mantener el líquido ruminal en la incubadora a 39°C mientras no se esté utilizando.

### **9.- Procedimiento de laboratorio**

- a) Pesar 200 mg de muestra y depositarla en un frasco de 120 ml (siempre por triplicado y perfectamente identificados)
- b) Adicionar 2 ml de agua destilada (previamente hervida y enfriada hasta 39°C) a los frascos con las muestras, procurando no agitar el contenido
- c) Agregar a los frascos con las muestras 14 ml del medio de cultivo, el cual debe estar a 39°C, dejando fluir en los mismos y durante 30 segundos suficiente CO<sub>2</sub>, tiempo en el cual los frascos deberán tener puestos sobre la manguera de fluido un tapón de hule que impida la entrada de O<sub>2</sub>
- d) Tapar y sellar los frascos con las muestras conforme e inmediatamente que se cumpla el punto c
- e) Adicionar a los frascos con las muestras 4 ml de líquido ruminal. Previamente del frasco con la muestra de forraje, se extraen 4 ml de gas CO<sub>2</sub> y se inyecta al frasco que contiene el líquido ruminal. A continuación tomar del mismo frasco y sin sacar la aguja 4 ml de inóculo para inyectarlo al frasco de la muestra (de preferencia utilizar agujas y jeringas desechables de uso clínico). No olvidar durante todo el proceso, un manejo cuidadoso y gentil para evitar en lo posible la adherencia de muestra a las

paredes del frasco, que por consecuencia quedaría lejos del contacto con el medio digestor.

- f) Colocar los frascos en la incubadora (previa constatación de la temperatura requerida 39°C para dar inicio al proceso de la digestión microbiana según el tiempo preestablecido (48h).
- g) Las charolitas de aluminio con los filtros se depositan en estufa a 100°C durante 24 horas después del cual pasan directamente al desecador, el cual en su interior previamente se depositó en una charolita aproximadamente 30 g de Pentóxido de fósforo. En el desecador permanecen las charolitas con los filtros durante un tiempo aproximado de 90 segundos, procediendo a continuación a efectuar el pesaje de la charola con el filtro.
- h) La detención de la digestión microbiana se logra retirando de la incubadora los frascos a las 48h, y agregando a cada uno 40 ml de la solución FDN
- i) Según la capacidad del autoclave, después de la aplicación de la solución FDN, se hierven a 105°C los frascos con las muestras por un tiempo efectivo de 60 minutos.
- j) A continuación se procede a efectuar el filtrado del contenido residual de las muestras de los frascos de vidrio utilizando las charolas y los filtros a peso constante.



## 10.- Análisis de micro-FDN

### Solución FDN

Proporción para 18 l

|   |          |
|---|----------|
| a) Etilendiaminotetraacetato de sodio. (EDTA) | 335.0 g  |
| b) Agua destilada                             | 18.0 l   |
| c) Borato de sodio                            | 122.6 g  |
| d) Sulfato lauryl sódico                      | 540.0 g  |
| e) Etilenglicol                               | 180.0 ml |
| f) Fosfato de sodio                           | 82.1 g   |

### Preparación:

- Pesar y disolver en 2 l de agua destilada el EDTA y el Borato de sodio
- Pesar y disolver en 1 l de agua destilada caliente (70°C) el fosfato de sodio
- Pesar y disolver en 3 litros de agua destilada el Sulfato lauryl sódico
- Incorporar las 3 premezclas en un depósito con capacidad para 18 litros
- Agregar 180 ml de etilenglicol a la premezcla
- Aforar con agua destilada hasta 18 l, agitando perfectamente

## 11.- Proceso de filtrado

- Colocar las botellas que contienen el residuo de la digestión en la parrilla eléctrica, por un tiempo aproximado de 3 minutos (sin llegar a la ebullición).
- En otra parrilla y en forma permanente durante todo el proceso de filtrado, se tendrá en ebullición constante agua destilada (para el enjuague de los frascos)
- Se adapta el papel filtro y el embudo al matraz Erlenmeyer, vaciando el contenido de la botella y accionando la bomba de vacío
- Se agregan 100 ml de agua destilada caliente a la botella que contenía el residuo, para enjuagar los restos de muestra, pasando por el filtro este contenido (se requiere de mucho cuidado para evitar derrames irrecuperables de residuo)
- Asperjar sobre el filtro con el residuo alcohol al 96 % (3ml aproximadamente) con la finalidad de extraer residuos de material soluble
- De la misma forma y cantidad se agrega acetona, procurando con esto una previa deshidratación de la muestra.
- El residuo ahora mantenido en el papel filtro se regresa con todo y filtro a la charola de aluminio y se deja en la estufa 100°C durante 48 h, después del cual se procede a pesar el residuo bajo el mismo procedimiento del punto g de la sección 9.
- Cálculos: Digestibilidad Verdadera =  $(1 - (R - F) / \text{peso de la muestra seca}) \times 100$

Donde: R = peso del residuo más charola con papel filtro  
F = peso de la charola con papel filtro



### 12.-Tasa de digestión.

Como ya mencionamos en un principio, el valor nutritivo de un forraje es dinámico y no es fácil de estimar. Sin embargo, para resolver ésta limitante, se está utilizando la técnica de digestibilidad *in vitro* no solo para medir el TND, sino también la tasa de digestión, la cual es un estimador dinámico de la digestión de los alimentos.

Para determinar la tasa de digestión se utilizan diferentes tiempos de digestión, de manera que se pueda monitorear el proceso de desaparición de la materia orgánica digestible. Los intervalos de muestreo que se recomiendan son a las 0, 1.5, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 36, 48, 72 y 96 h. La FDN es determinada en cada punto. Con estos puntos muestrales es posible aplicar la ecuación exponencial de Mertens y Loften (1980) que explica la tasa de digestión en porcentaje por hora del forraje en estudio.

*Cálculo de las tasas de digestión.*

$$Y = (a * (\text{Exp}(-b * (x - c))) + d)$$

En donde:

Y = La FDN residual al tiempo t, %

a = FDN digestible, %

b = Tasa de desaparición de la FDN, %/h

c = Tiempo de retraso, h

d = FDN indigestible, %

Las curvas son ajustadas utilizando el programa Table Curve (versión 4, Jandel Scientific, San Rafael, CA).

A continuación se muestran algunos ejemplos de la información que resulta de la aplicación de la ecuación exponencial utilizando el programa Table Curve.

### 13.- Tasa de digestión y potencial de producción de leche de cinco pastos tropicales.

En el cuadro1 se presentan los promedios de la tasa de digestión de los pastos en estudio, por especie. La media general es de 7.6% / h, con un rango de 7.3 a 7.9% /h. Esta información así como la de los análisis químicos complementarios se capturaron en el programa computacional del Sistema de Carbohidratos y Proteínas Neto de Cornell (CNCPS) (Sniffen y col., 1992; Fox y col., 1992; Russel y col., 1992).

Se hicieron pruebas de sensibilidad para observar el efecto sobre la producción de leche en función de la calidad del pasto; utilizando datos promedio de una vaca adulta cruzada de Holstein x Cebú, a mitad de la lactancia, con un peso promedio de 500 kg y produciendo 10 kg de leche por día. Se consideró al pasto como la única fuente de alimentación a un consumo de 12.7 kg de materia seca.

Los resultados de este estudio de sensibilidad se muestran en el cuadro 1. La energía y proteína metabolizable para lactancia fueron mayores en el pasto *Brachiaria brizantha* (Insurgente), (12.24 y 11.06 l/ día), seguidos por el *Andropogon gayanus* (Llanero) y el *Brachiaria decumbens* (Señal) y por último, los *Panicum maximum* (Tanzania y Privilegio). En cuanto a cantidad de nutrientes disponibles los *Panicum* sobresalen, pero la calidad de esos nutrientes es menor para soportar la lactancia, en comparación con las *Brachiaris*. Esto se debe al mayor contenido de FDN en los *Panicum*, lo cual diluye el valor energético de la dieta.

**Cuadro 1. Tasa de Digestión<sup>1</sup> y Potencial en producción<sup>2</sup> de leche por los pastos en estudio con vacas de doble propósito.**

| Pasto            | Tasa de Dig. %/h | EMI/kg              | PMI/kg              |
|------------------|------------------|---------------------|---------------------|
| Señal            | 7.5              | 11.49 <sup>ab</sup> | 10.32 <sup>ab</sup> |
| Privilegio       | 7.3              | 10.02 <sup>b</sup>  | 7.28 <sup>b</sup>   |
| Tanzania         | 7.9              | 10.70 <sup>ab</sup> | 8.50 <sup>ab</sup>  |
| Insurgente       | 7.4              | 12.24 <sup>a</sup>  | 11.06 <sup>a</sup>  |
| Llanero          | 7.7              | 11.81 <sup>ab</sup> | 10.98 <sup>ab</sup> |
| EEM <sup>2</sup> | 0.64             | 0.44                | 0.73                |

8 observaciones / tratamiento. Distinta literal en columna presenta diferencia estadística ( $P < 0.05$ )

<sup>1</sup> Tasa de Dig. %/h = Tasa de digestión %/h

<sup>2</sup> EMI/kg =Energía metabolizable para producción de leche; PMI/kg = Proteína Metabolizable para producción de leche.

<sup>4</sup> EEM = Error estándar de la media

En cuanto a la tasa de digestión clasificadas por edad al corte (cuadro 2), es importante señalar como las tasas de digestión de la FDN disminuye de 8.5 a 6.7 %/ h de los 21 a los 60 días de edad, lo cual influye dramáticamente en una caída de la disponibilidad de proteína para producción de leche obtenida; de 12.15 kg de leche al día a los 21 días de edad a 8.22 kg de leche a los 60 días.

**Cuadro 2. Tasa de digestión<sup>1</sup> y Potencial en producción de leche<sup>2</sup> por los pastos en estudio con vacas de doble propósito.**

| Edad/días        | Tasa Dig. %/h | EMI/kg              | PMI/kg             |
|------------------|---------------|---------------------|--------------------|
| 21               | 8.5           | 12.01 <sup>a</sup>  | 12.15 <sup>a</sup> |
| 28               | 7.7           | 10.99 <sup>ab</sup> | 9.27 <sup>b</sup>  |
| 35               | 7.3           | 10.27 <sup>b</sup>  | 8.87 <sup>b</sup>  |
| 60               | 6.7           | 10.27 <sup>b</sup>  | 8.22 <sup>c</sup>  |
| EEM <sup>4</sup> | 0.57          | 0.40                | 0.65               |

10 observaciones./ tratamiento. Distinta literal por columna presenta diferencia estadística ( $P < 0.05$ )

<sup>1</sup>Tasa de Dig. %/h = Tasa de Digestión %/h

<sup>2</sup> EMI/kg = Energía Metabolizable para producción de leche por kg; PMI/kg = Proteína Metabolizable para Producción de leche por kg

<sup>4</sup> EEM =Error estándar de la media

## 15.- Bibliografía

Castellanos, R. A., Llamas, L. G. y Shimada A. 1990. Manual de Técnicas de Investigación en Ruminología. México 1990. pp. 29-34

Deinum, B., and , Van Soest, P. J. 1969. Prediction of forage digestibility from some laboratory procedures. *Neth. J. Agric. Sci.* 17:119-127

Fox, D. G., Sniffen C. J., O'Connor J.D., Russell J. B. and Van Soest P. J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. III. Cattle requirements and diet adequacy. *J. Anim. Sci.* 70:3578-3596.

Goering, H. K., and Van Soest P. J. 1970. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications), *Agric. Handbook No. 379.* ARS-USDA. Washington, DC.

Menke, K. H., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritz D. and Schneider W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci. (Camb.)*. 93:217-222

Mertens, D. R., and Loften J. R. 1980. The effect of starch on forage fiber digestion Kinetics *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 63:1437 - 1446

Montero, L. M., Juárez, L. F., Contreras, J. J. 1998. Importancia de los Análisis de Digestibilidad en la Determinación del Valor Nutritivo de los Forrajes tropicales. Memoria Técnica, Día del Ganadero C. E. La Posta, "Paso del Toro"- INIFAP, pp. 21 - 29

NRC. National Research Council. 1989. Nutrient Requirements of Dairy Cattle (6th Ed.). National Academic Press, Washington, D.C.

NRC. National Research Council. 1996. Nutrient Requirements of Beef Cattle (7th Ed.). National Academy Press, Washington, DC.

Pell, A. N., and Schofield P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 76:1063-1073

Russell, J. B., O'Connor J. D., Fox D. G., Van Soest P. J. and Sniffen C. J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluation cattle diets. I. Ruminal fermentation. *J. Animal. Sci.* 70:3551-3561

Sniffen, C. J., O'Connor J. D., Van Soest P. J., Fox D. G. and Russell J. B. 1992. A net carbohydrate and protein availability (CNCPS). *J. Animal. Sci.* 70:3562-3577

Tilley, J. M. A., and Terry R. A. 1963. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassland Soc.* 18:104-111

Van Soest P. J. 1967. Development of a comprehensive system of feed analices and its application to forages. *J. Anim. Sci.* 26:119-128

Van Soest P. J. 1967. Development of a comprehensive system of feed analices and its application to forages. J. Anim. Sci. 26:119-128

Van Soest P. J., Wine, R. H. y Moore, L. A. 1966. Estimation of the true digestibility of forages by *in vitro* digestion of cell walls. Proc. 10 th Int. Grassland Congress. Helsingy. P 438-441